

Universidade do Minho
Escola de Engenharia

João André Gonçalves Oliveira

**Dispositivo *Point-of-Care Testing* para
análise dos Diabetes Mellitus e da
Função Renal em fluidos biológicos**



Universidade do Minho

Escola de Engenharia

João André Gonçalves Oliveira

**Dispositivo *Point-of-Care Testing* para
análise dos Diabetes Mellitus e da
Função Renal em fluidos biológicos**

Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica

Trabalho realizado sob a orientação da

Professora Doutora Graça Maria Henriques Minas
e da

Professora Doutora Margarida Correia-Neves

Outubro de 2012

Nome: João André Gonçalves Oliveira

Endereço eletrónico: a50116@alunos.uminho.pt

Telefone: 919223825

Número do Bilhete de Identidade: 13332930

Título da Tese: Dispositivo Point-of-Care Testing para análise dos Diabetes Mellitus e da Função Renal em fluidos biológicos

Orientadoras: Professora Doutora Graça Maria Henriques Minas e Professora Doutora Margarida Correia-Neves

Ano de conclusão: 2012

Designação do Mestrado: Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Universidade do Minho, ___ / ___ / _____

Assinatura: _____

Agradecimentos

Expresso o meu sincero agradecimento às professoras Graça Maria Henriques Minas e Margarida Correia-Neves por toda a orientação prestada ao longo desta dissertação, esclarecimento de dúvidas, leitura e correção do documento escrito.

Um agradecimento especial ao Dr. Carlos Capela e ao Dr. José Mariz por todo o apoio prestado e pelo esclarecimento de dúvidas relacionadas com a presente dissertação.

Aos técnicos das oficinas da Universidade do Minho, em especial ao Sr. Carlos Torres, um muito obrigado pela ajuda prestada com o material eletrónico.

A todos os meus amigos e colegas do laboratório, um muito obrigado pela vossa boa disposição, espírito de camaradagem e de ajuda ao longo destes meses de trabalho.

À minha namorada, Sara, um profundo obrigado por todo o carinho, apoio e ajuda disponibilizados ao longo destes meses.

Finalmente, aos meus pais, Anabela e João, e amigos, um sincero obrigado por todo o tempo, apoio e ajuda. O vosso contributo foi muito importante.

Obrigado a todos.

Resumo

Os Diabetes Mellitus podem definir-se como um distúrbio metabólico, resultante de uma deficiência na secreção de insulina por parte do pâncreas e/ou na ação da insulina no organismo, o que resulta em hiperglicemia com distúrbios no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas. É uma das doenças crônicas mais comuns e a sua prevalência global em 2008 foi estimada em 10%, para uma população de adultos com idade superior a 25 anos. A análise da Função Renal, associada aos Diabetes Mellitus é de elevada importância, uma vez que os diabetes constituem uma das principais causas da insuficiência renal.

Atualmente, o diagnóstico correto de mais de 50% das doenças é suportado por um grande número de análises laboratoriais. O desenvolvimento de biossensores e a miniaturização de analisadores clínicos de laboratório fez com que surgisse, recentemente, uma forma de análises laboratoriais descentralizada, designada por *Point-of-Care Testing*, que permite a realização das análises diretamente junto dos doentes.

Assim, como resultado deste trabalho de dissertação apresenta-se um dispositivo *Point-of-Care Testing* específico para o diagnóstico/monitorização dos Diabetes Mellitus e da Função Renal. É um dispositivo portátil, de pequenas dimensões (200 mm × 100 mm × 60 mm), com baixo custo de produção e fácil de operar. Em relação aos seus análogos comercialmente disponíveis, apresenta a grande vantagem e novidade de possuir um algoritmo interno de decisão capaz de informar o utilizador sobre o estágio da sua doença e de o guiar de forma autónoma num conjunto sequencial de análises, sem a necessidade de intervenção médica entre as diferentes análises.

O dispositivo implementado determina, através de técnicas óticas, a concentração de várias biomoléculas, selecionadas como críticas para a análise dos Diabetes Mellitus e da Função Renal, presentes em amostras de sangue ou de urina. O dispositivo utiliza como fonte de luz um sistema de LED's com comprimentos de onda específicos para as diferentes biomoléculas, como detetores fotodiodos para efetuar as medições óticas necessárias e um microcontrolador com um ecrã táctil que permite controlar todo o dispositivo a partir de uma interface intuitiva para o utilizador.

Abstract

Diabetes Mellitus is a metabolic disorder resulting from a defect in insulin secretion and/or insulin action, which results in a high serum glucose levels and disturbances of carbohydrate and lipid metabolism. It is one of the most common chronic diseases and its global prevalence in 2008 was estimated to be 10%, for a population of adults aged over 25 years. Intermittent Renal Function testing is very important, since the chronic kidney disease is strongly associated with Diabetes Mellitus.

A large number of laboratory analyses are currently required for a diagnosis in over 50% of all diseases. Due to the development of biosensors and lab-on-a-chips devices, there has been a recent trend towards a more decentralized diagnostic analysis, the so-called Point-of-Care Testing, which allows analyses directly at patients' beds.

Thus, as a result of this dissertation work, it is presented a specific Point-of-care Testing device for diagnosis/monitoring of Diabetes Mellitus and Renal Function. It is a portable device, with small dimensions (200 mm × 100 mm × 60 mm), low cost production and easy to operate. Compared to the similar Point-of-Care Testing devices commercially available, it has the great advantage and innovation of informing the patient of his disease stage and guide him to perform subsequent analyses, without medical intervention in-between the different analyses, due to a developed internal algorithm loaded into the device.

The implemented device determines, by means of optical techniques, the concentration of several biomolecules, selected as critical for the analysis of Diabetes Mellitus and Renal Function, in blood and urine samples. The device comprises a specific light source system, based in LED's, with specific wavelengths for the different biomolecules, it also comprises photodiodes to perform the optical measurements and a microcontroller with a touch screen, which allow controlling the entire device from an intuitive interface.

Índice

Agradecimentos	III
Resumo	V
Abstract	VII
Índice de figuras.....	XIII
Índice de tabelas	XVII
Nomenclatura	XIX
Capítulo 1 – Introdução	1
1.1. Enquadramento.....	1
1.2. Objetivos.....	4
1.3. Contributos deste projeto.....	4
1.3.1 Indicadores de realização.....	5
1.4. Organização da dissertação	6
Capítulo 2 – Sistemas de diagnóstico POCT	7
2.1 Métodos de análise utilizados atualmente nos POCT	7
2.1.1 Métodos POCT baseados em tiras quantitativas.....	7
2.1.2 Analisadores com cartucho descartável.....	8
2.1.3 Analisadores POCT bench-top	9
2.1.3.1 Analisadores por Espectrofotometria/ Reflectometria	9
2.1.3.2 Analisadores hematológicos multicanal	10
2.1.3.3 Dispositivos imunológicos multicanal.....	10
2.1.3.4 Analisadores dos gases sanguíneos (AGSs)	11
2.1.4 Analisadores de coagulação hemostaseológica	12
2.1.5 Medição contínua utilizando dispositivos POCT.....	13
2.1.6 Dispositivos POCT baseados em biologia molecular para a deteção de agentes infecciosos.....	14
2.2 Dispositivos POCT eletroquímicos e óticos	15
2.3 Sistemas óticos utilizados em dispositivos POCT	17
2.4 Dispositivos POCT comercialmente disponíveis com deteção ótica	18
2.4.1 Piccolo Xpress	19
2.4.2 Reflotron Plus	22
2.4.3 Triage MeterPro.....	23

2.5	Potenciais vantagens e desvantagens da utilização de dispositivos POCT	24
Capítulo 3 – Conceitos teóricos sobre as doenças analisadas e o método ótico utilizado		27
3.1	Diabetes Mellitus.....	27
3.2	Função Renal	28
3.3	Diagnóstico dos Diabetes Mellitus	29
3.4	Diagnóstico da Insuficiência Renal	36
3.5	Biomoléculas selecionadas para o diagnóstico dos DM e da Função Renal	39
3.6	Espectro eletromagnético e espectroscopia.....	40
Capítulo 4 – Seleção dos reagentes e validação dos protocolos		43
4.1	Seleção dos reagentes	43
4.2	Validação dos protocolos com o equipamento ótico existente no laboratório	45
4.2.1	Resultados obtidos.....	46
4.2.2	Discussão de resultados	53
Capítulo 5 – Projeto do dispositivo.....		57
5.1	Caraterização dos LED's e dos fotodíodos	57
5.2	Testes experimentais com os LED's e o fotodíodo	61
5.3	Algoritmo interno de decisão implementado	67
5.4	Funcionamento do dispositivo e eletrónica de controlo	70
5.5	<i>Design</i> do dispositivo.....	76
5.5.1	<i>Design</i> da caixa do dispositivo.....	76
5.5.2	<i>Design do disco de análise</i>	78
5.6	Microcontrolador	79
Capítulo 6 – Fabrico e testes do dispositivo final.....		83
6.1	Fabrico do dispositivo	83
6.1.1	Caixa do dispositivo	83
6.1.2	Disco de análise	85
6.2	Implementação da eletrónica necessária	86
6.2.1	Placa PCB com os LED's	86
6.2.2	Placa PCB com os fotodíodos	87
6.2.3	Placa de comando.....	87
6.3	Dispositivo final e suas especificações.....	88
6.4	Resultados experimentais utilizando o dispositivo fabricado.....	90
6.4.1	Resultados	92
6.4.2	Discussão de resultados	96

Capítulo 7 – Conclusão e perspectivas de trabalhos futuros	101
7.1 Conclusão.....	101
7.2 Perspetivas de trabalhos futuros.....	103
Bibliografia	105
Anexos	113
Anexo I – Protocolos dos reagentes selecionados.....	113
Anexo II – Reta calibração do ADC.....	131
Anexo III – Orçamento detalhado do dispositivo final.....	133
Anexo IV – Orçamento das diferentes análises	135

Índice de figuras

Figura 2.1 - (a) Glicosímetro de utilização caseira [8]; (b) i-STAT [9].	8
Figura 2.2 - (a) Piccolo [10]; (b) Triage MeterPro [11]; (c) Reflotron [12].	10
Figura 2.3 - PocH-100i [13].	10
Figura 2.4 - (a) Pathfast [14]; (b) Radiometer AQT90 [15].	11
Figura 2.5 - (a) Irma TRUpoint [16]; (b) OPTI CCA-TS [17]; (c) Cobas b 123 [18].	12
Figura 2.6 - (a) ROTEM [20]; (b) Sonoclot [21].	13
Figura 2.7 - Princípio da microanálise para medir os níveis de analitos no tecido subcutâneo (Adaptado de [1]).	14
Figura 2.8 - (a) Guardian RT [23]; (b) FreeStyle Navigator [24].	14
Figura 2.9 - GeneXpert [25].	15
Figura 2.10 - (a) Disco de reagentes [29]; (b) Conjunto de discos disponíveis para as diferentes análises [29].	22
Figura 2.11 - Reflotron Plus [30].	23
Figura 3.1 - Nefropatia diabética (Adaptado de [43]).	29
Figura 3.2 - Espectro eletromagnético (Adaptado de [71]).	40
Figura 3.3 - Absorção da luz numa cuvete associada à lei de Beer's (Adaptado de [72]).	42
Figura 3.4 - Escala da transmitância e escala logarítmica correspondente da absorvência (Adaptado de [75]).	42
Figura 4.1 - Visão geral do sistema ótico existente no laboratório.	45
Figura 4.2 - Componentes constituintes da montagem experimental.	46
Figura 4.3 - Espectros de absorvência obtidos para as diferentes concentrações de Glicose.	47
Figura 4.4 - Valores discretos de absorvência em função das diferentes concentrações de Glicose para o comprimento de onda de 501 nm.	47
Figura 4.5 - Espectros de absorvência obtidos para as diferentes concentrações de Albumina.	48
Figura 4.6 - Valores discretos de absorvência em função das diferentes concentrações de Albumina para o comprimento de onda de 622 nm.	48
Figura 4.7 - Espectros de absorvência obtidos para as diferentes concentrações de Beta-Hidroxibutirato.	49
Figura 4.8 - Valores discretos de absorvência em função das diferentes concentrações de Beta-Hidroxibutirato para o comprimento de onda de 501 nm.	49

Figura 4.9 - Espectros de absorvência obtidos para as diferentes concentrações de Potássio.	50
Figura 4.10 - Valores discretos de absorvência em função das diferentes concentrações de Potássio para o comprimento de onda de 501 nm.	50
Figura 4.11 - Espectros de absorvência obtidos para as diferentes concentrações de Creatinina no soro.	51
Figura 4.12 - Valores discretos de absorvência em função das diferentes concentrações de Creatinina no soro para o comprimento de onda de 501 nm.	51
Figura 4.13 - Espectros de absorvência obtidos para as diferentes concentrações de Creatinina na urina.	52
Figura 4.14 - Valores discretos de absorvência em função das diferentes concentrações de Creatinina na urina para o comprimento de onda de 501 nm (a seleção deste comprimento de onda como sendo o ideal, encontra-se explicada na secção seguinte).	52
Figura 5.1 - Valores da luminosidade relativa em função do comprimento de onda para o LED TLGTE1100B (T11).	58
Figura 5.2 - (a) Visão geral do sistema ótico existente no laboratório, com a fonte de luz do sistema substituída pelo LED a analisar; (b) Visão detalhada do LED à entrada do monocromador.	58
Figura 5.3 - Valores da luminosidade relativa em função do comprimento de onda para o LED HSMV-A100-T00J1.	60
Figura 5.4 - Montagem experimental.	62
Figura 5.5 - Valores discretos de tensão em função das diferentes concentrações de Glicose para o comprimento de onda de 501 nm.	62
Figura 5.6 - Valores discretos de tensão em função das diferentes concentrações de Beta-Hidroxibutirato para o comprimento de onda de 501 nm.	63
Figura 5.7 - Valores discretos de tensão em função das diferentes concentrações de Potássio para o comprimento de onda de 501 nm.	63
Figura 5.8 - Valores discretos de tensão em função das diferentes concentrações de Creatinina no soro para o comprimento de onda de 501 nm.	64
Figura 5.9 - Valores discretos de tensão em função das diferentes concentrações de Creatinina na urina para o comprimento de onda de 501 nm.	64
Figura 5.10 - Valores discretos de absorvência em função das diferentes concentrações de Albumina para o comprimento de onda de 622 nm.	65
Figura 5.11 - Algoritmo de decisão implementado no dispositivo.	69
Figura 5.12 - Diagrama de blocos da eletrónica a implementar no dispositivo.	72

Figura 5.13 - Representação esquemática do circuito de ligação de um LED.	74
Figura 5.14 - Diagrama de blocos do sistema de alimentação do dispositivo.....	75
Figura 5.15 - (a) Vista superior da caixa do dispositivo; (b) Vista lateral e traseira da caixa do dispositivo.....	77
Figura 5.16 - Suporte para o disco de análise.....	78
Figura 5.17 - Disco de análise.....	79
Figura 5.18 - Microcontrolador (STM32F103VET6).	80
Figura 5.19 - (a) Menu inicial; (b) Menu de inserção do número de identificação do paciente; (c) Menu de inserção do género e idade; (d) Menu com as diferentes análises disponíveis; (e) Menu com o botão de calibração; (f) Menu com algumas informações e o botão para se iniciar a análise; (g) Resultado da análise da Glicose.	81
Figura 6.1 - Caixa do dispositivo: (a) Visão do interior da caixa; (b) Visão do compartimento de análise com a tampa aberta; (c) Paredes traseira e lateral da caixa do dispositivo.	84
Figura 6.2 - Suporte para o disco de análise construído. Na imagem da esquerda observa-se os orifícios feitos numa das placas laterais e na imagem da direita a base do suporte onde encaixa o disco de análise.	85
Figura 6.3 - Disco de análise.....	85
Figura 6.4 - PCB com os LED's. Na imagem da esquerda observa-se o lado da placa que contém os componentes SMD e na imagem da direita, o outro lado da placa que contém as resistências e os conetores.....	86
Figura 6.5 - PCB com os fotodiodos. Na imagem da esquerda observa-se o lado da placa que contém os componentes SMD e na imagem da direita, o outro lado da placa que contém os conetores.	87
Figura 6.6 - PCB de comando. Na imagem da esquerda observa-se o lado da placa que contém os componentes SMD e na imagem da direita, o outro lado da placa que contém os restantes componentes.	88
Figura 6.7 - (a) Visão do compartimento de análise; (b) Visão do compartimento de análise e de comando.	89
Figura 6.8 - Valores discretos de absorvência em função das diferentes concentrações de Albumina, obtidos após a montagem do dispositivo final.....	91
Figura 6.9 - Valores de concentração obtida (C_o) em função dos valores de concentração esperada (C_e) para a Glicose	93
Figura 6.10 - Valores de concentração obtida (C_o) em função dos valores de concentração esperada (C_e) para a Creatinina na urina	93

Figura 6.11 - Valores de concentração obtida (C_o) em função dos valores de concentração esperada (C_e) para a Albumina	94
Figura 6.12 - Valores da razão Albumina/Creatinina obtida (R_o) em função dos valores da razão Albumina/Creatinina esperada (R_e).....	94
Figura 6.13 - Valores de concentração obtida (C_o) em função dos valores de concentração esperada (C_e) para a Beta-Hidroxibutirato	95
Figura 6.14 - Valores de concentração obtida (C_o) em função dos valores de concentração esperada (C_e) para o Potássio.....	95
Figura 6.15 - Valores da TFG obtida (TFG_o) em função dos valores da TFG esperada (TFG_e)	96

Índice de tabelas

Tabela 1.1 - Lista de parâmetros laboratoriais analisados com os sistemas <i>Point-of-Care Testing</i> [1].	3
Tabela 2.1 - Parâmetros avaliados com dispositivos POCT baseados em tiras quantitativas [1].	8
Tabela 2.2 - Analisadores <i>in vitro</i> dos gases existentes no sangue disponíveis no mercado [1].	11
Tabela 2.3 - Principais vantagens e desvantagens da utilização dos dispositivos POCT [34].	25
Tabela 3.1 - Resumo dos valores <i>threshold</i> do nível de glicose para os diferentes testes e respetivas indicações [46, 47, 48].	30
Tabela 3.2 - Valores limite das anormalidades na excreção de albumina na urina [48, 42, 50].	32
Tabela 3.3 - Algoritmo de decisão baseado no nível de corpos cetónicos existente no sangue de indivíduos diabéticos que utilizam bomba de insulina [55].	34
Tabela 3.4 - Algoritmo de decisão baseado no nível de corpos cetónicos existente no sangue de indivíduos adultos/crianças diabéticos tratados com insulina, exceto pacientes com bomba de insulina [55].	35
Tabela 3.5 - Estágios da doença renal crónica e respetivos valores da TFG [48, 61].	38
Tabela 3.6 - Resumo das biomoléculas que serão analisadas para efetuar o diagnóstico dos DM e da Função Renal.	39
Tabela 4.1 - Valores referidos nos protocolos e obtidos experimentalmente para os comprimentos de onda de deteção das diversas biomoléculas analisadas.	56
Tabela 5.1 - Limites máximo e mínimo dos valores de concentração, das diferentes biomoléculas, para os quais os reagentes selecionados mantêm a sua linearidade.	66
Tabela 5.2 - Valores <i>threshold</i> definidos para as diferentes situações que o dispositivo é capaz de informar ao utilizador	68
Tabela 5.3 - Informações sobre os quatro discos fabricados.	79
Tabela 6.1 - Valores máximos de concentração para as diferentes biomoléculas a partir dos quais é necessário diluir as amostras recolhidas.	92

Nomenclatura

Acrónimos

Acrónimo	Significado
ADC	Conversor Analógico-Digital
AGSs	Analisadores dos Gases Sanguíneos
CAD	Cetoacidose Diabética
CCD	<i>Charge-coupled Device</i>
CMOS	<i>Complementary metal-oxide-semiconductor</i>
DAC	Conversor Digital-Analógico
DEMUX	Demultiplexer
DM	Diabetes Mellitus
eTFG	Taxa de Filtração Glomerular estimada
GJA	Glicemia de Jejum Alterada
GPIO	<i>General Purpose Input/Output</i>
GPJ	Glicose Plasmática em Jejum
IFCC	Federação Internacional de Química Clínica e Medicina de Laboratório
iQC	<i>intelligent Quality Control</i>
LCD	Monitor de cristal líquido
LED	Díodo emissor de luz
LFA s	Testes de fluxo lateral
MDRD	<i>Modification of Diet in Renal Disease</i>
MRSA	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus Aureus</i>
MUX	Multiplexer
OSHA	<i>Occupational Safety and Health Administration</i>
PCB	Placa de Circuito Impresso
PDMS	Polidimetilsiloxano
PMMA	Polimetil-metacrilato
POCT	<i>Point-of-Care Testing</i>
RAC	Razão Albumina/Creatinina

SMD	Dispositivo de Montagem Superficial
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
TAOS	<i>Texas Advanced Optoelectronic Solutions</i>
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
TFT LCD	<i>Thin Film Transistor Liquid Crystal Display</i>
TGA	Tolerância à Glicose Alterada
TOTG	Teste Oral de Tolerância à Glicose
u. a.	Unidades de absorvência
USB	<i>Universal Serial Bus</i>

Variáveis

Variável	Significado	Unidades
A	Absorvência	u. a.
A_{amostra}	Absorvência da amostra analisada	u. a.
C	Concentração	mg/dL ou g/dL ou mM
C_{amostra}	Concentração da amostra analisada	mg/dL ou g/dL ou mM
C_{std}	Concentração do <i>standard</i> da biomolécula em análise	mg/dL ou g/dL ou mM
C_e	Concentração esperada	mg/dL ou g/dL ou mM
C_o	Concentração obtida	mg/dL ou g/dL ou mM
I	Corrente	A
I_o	Corrente incidente	A
I_t	Corrente transmitida	A
l	Comprimento do caminho ótico atravessado pela luz	cm
R	Resistência elétrica	Ω
R²	Coefficiente de determinação	—
Re	Razão esperada	mg/ g creatinina
Ro	Razão obtida	mg/ g creatinina
T	Transmitância	%

TFGe	TFG esperada	ml/min/1,73 m ²
TFGo	TFG obtida	ml/min/1,73 m ²
V	Tensão	V
V_{amostra}	Tensão lida pelo fotodíodo para a amostra	V
V_{reagente}	Tensão lida pelo fotodíodo para o reagente	V
V_{std}	Tensão lida pelo fotodíodo para o <i>standard</i>	V
ε	Absortividade molar	L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹
a e b	Constantes pré-definidas da equação da Albumina	—

Capítulo 1 – Introdução

Neste capítulo apresenta-se o enquadramento deste trabalho de dissertação, os seus principais objetivos e os seus contributos no apoio à área da saúde. No final do capítulo, são apresentados os resultados da atividade científica desenvolvida no âmbito deste projeto, bem como a organização do presente documento.

1.1. Enquadramento

O diagnóstico correto de mais de 50% das doenças existentes e a monitorização da administração de medicamentos são, atualmente, suportados por um grande número de análises laboratoriais. Sendo assim, a medicina de laboratório torna-se vital no apoio ao diagnóstico diferencial, à clínica geral e à prática local [1].

Um sistema acessível e competente de diagnóstico laboratorial é atualmente um facto e tem sido possível devido à centralização das análises em laboratórios construídos com esse propósito, ou devido às facilidades oferecidas pelos hospitais de grandes dimensões. Em contraste com essa centralização e devido ao desenvolvimento dos biossensores e à miniaturização dos analisadores clínicos de laboratório, tem havido uma tendência recente para o aparecimento de uma forma de análises laboratoriais mais descentralizada, designada por *Point-of-Care Testing* (POCT), que permite a realização das análises diretamente junto dos doentes, em salas de operação, em ambulatório e em locais de acidentes [1, 2].

POCT é definido pelo *College of American Pathologists* como correspondendo “a testes analíticos realizados fora de um laboratório central utilizando um dispositivo ou dispositivos que podem ser facilmente transportados para a proximidade do doente” [3]. Uma variedade de sinónimos pode ser utilizada para definir um dispositivo POCT, incluindo: testes de cabeceira, testes próximos do doente e testes de local alternativo. Agências regulamentares como o *Center for Medicare and Medicaid Services*, a *Joint Commission on the Accreditation of Healthcare Organizations* e o *College of American Pathologists* consideram que os dispositivos POCT encontram-se no âmbito laboratorial, apesar de os indivíduos que frequentemente utilizam este tipo de dispositivos serem pessoas externas ao laboratório [4].

Os dispositivos POCT são caracterizados principalmente pela miniaturização dos instrumentos utilizados, proximidade com o doente, possibilidade da realização de medições individuais quantitativas ou semiquantitativas, tempo de resposta curto, inexistência de pré-preparação da amostra, ausência da necessidade de transporte e armazenamento da amostra recolhida, utilização de reagentes pré-fabricados e redução do tempo necessário para a obtenção de resultados que permitem ação terapêutica. Todo o pessoal da enfermaria e do ambulatório deve ser capaz de utilizar estes dispositivos de análise, não sendo necessário qualquer conhecimento prévio sobre as técnicas de análise de amostras. É evidente que o uso de sistemas POCT permite reduzir o intervalo de tempo entre a recolha da amostra e a obtenção do resultado da análise. No entanto, este tipo de diagnóstico só é útil nos casos em que os resultados obtidos permitem tomar decisões terapêuticas imediatas. É ainda importante referir que a manutenção dos dispositivos POCT é vital para o controlo de qualidade das análises clínicas efetuadas e é exigida pela *Occupational Safety and Health Administration* (OSHA) [1, 2, 5].

Os sistemas de diagnóstico molecular POCT desenvolvidos atualmente destinam-se a diversas áreas, como por exemplo, testes genéticos, farmacogenómica e doenças infecciosas. A maioria dos clínicos de doenças infecciosas concorda que os sistemas POCT devem encontrar-se dentro das quatro seguintes categorias: (1) testes em que é necessário obter um resultado imediato devido ao doente se encontrar em risco de vida (e.g. meningite); (2) testes em que os resultados são necessários para se iniciar um tratamento (e.g. identificação de organismos e testes de resistência); (3) testes em que o resultado é necessário para se tomar uma decisão rápida sobre um organismo contaminante (e.g. bioterrorismo, *Mycobacterium tuberculosis*, vanco-mycin-resistant enterococci e methicillin-resistant *Staphylococcus Aureus* [MRSA]); (4) testes realizados em doentes que não apresentam melhorias devido ao tratamento que lhes foi administrado [4].

Um teste realizado com um dispositivo POCT é geralmente mais caro, numa unidade básica de custo, que o mesmo teste realizado num laboratório centralizado. Este conceito reflete o facto dos consumíveis utilizados nos dispositivos POCT serem tipicamente mais caros que os utilizados nos testes com equipamento de laboratório. O facto dos dispositivos POCT só permitirem realizar uma quantidade limitada de testes, faz com que não se consiga atingir a economia de escala proporcionada pelos testes automáticos de laboratório em larga escala.

Além disso, a adoção de novas tecnologias está inevitavelmente associada a elevados custos iniciais em *hardware* [6, 7].

Nos últimos anos, o mercado dos sistemas POCT apresentou um crescimento anual superior a 10%, verificando-se no entanto desde 2007 um ligeiro amortecimento desse crescimento. Contudo, a médio e a longo prazo é esperado um acentuado aumento deste mercado. Na tabela 1.1 apresentam-se alguns dos parâmetros laboratoriais que podem ser analisados com os dispositivos POCT [1].

Tabela 1.1 - Lista de parâmetros laboratoriais analisados com os sistemas *Point-of-Care Testing* [1].

Aplicação Clínica	Parâmetros
<i>Acid-base balance, blood gases</i>	<i>pH, pCO₂, pO₂</i>
<i>Electrolytes</i>	<i>Na⁺, K⁺, Cl⁻, Ca⁺⁺_{ionf}, Mg⁺⁺_{ion}</i>
<i>Metabolites</i>	<i>Cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerides, creatinine, urea, uric acid. Bilirubin, lactate, ammonia</i>
<i>Enzymes</i>	<i>Amylase, alkaline phosphatase, CK, AST, ALT, γ-GT</i>
<i>Coagulation</i>	<i>Activated clotting-time, activated partial thrombo-plastin time (aPTT), D-dimer, platelet function tests</i>
<i>Hematology</i>	<i>Hemoglobin, hematocrit, erythrocytes, leukocytes</i>
<i>Hemoglobin fractions</i>	<i>CO-Oximetry</i>
<i>Cardiac markers</i>	<i>TnT, Tnl, myoglobin, CK-MB, BNP/NT-pro-BNP</i>
<i>Diabetes Mellitus</i>	<i>Glucose, HbA_{1c}, microalbumin, minimal invasive continuous glucose monitoring</i>
<i>Acute-phase proteins</i>	<i>CRP</i>
<i>Allergy in-vitro diagnostics</i>	<i>Allergy specific IgE</i>
<i>Rheumatology</i>	<i>Antibodies against mutated citrullinated vimentin (anti-MCV)</i>
<i>Therapeutic drug monitoring, drugs-of-abuse screening</i>	<i>Therapeutic drugs, alcohol, amphetamines, barbiturates, benzodiazepines, cannabinoids, cocaine, methadone</i>
<i>Infectious agents</i>	<i>HIV, infectious mononucleosis, Chlamydia trachomatis, Trichomonas vaginalis, Steptococcus A and B</i>
<i>Fertility</i>	<i>hCG, LH and FSH, sperm count</i>
<i>Urine diagnostics</i>	<i>Urine strips (pH, protein, glucose, ketones, bilirubin, urobilinogen, nitrite, leukocytes, erythrocytes), microalbumin</i>
<i>Stool diagnostics</i>	<i>Blood</i>

1.2. Objetivos

Esta dissertação tem como principal objetivo o planeamento e construção de um protótipo comercial de um dispositivo POCT destinado à monitorização dos Diabetes Mellitus (DM) e da Função Renal, através de técnicas de espectrofotometria. Este trabalho de mestrado encontra-se inserido no projeto “MyHEALTH”, correspondendo a uma parte do módulo “MyLab” desse projeto. Pretende-se que o dispositivo implementado seja capaz de determinar a concentração de vários parâmetros bioquímicos em fluidos biológicos (urina e sangue), e que, ao mesmo tempo, seja portátil, leve, simples de operar, que tenha um tempo de resposta curto e que em comparação com os dispositivos óticos análogos comercialmente disponíveis, tenha um custo de produção bastante inferior. Outro objetivo consiste na criação e implementação, no dispositivo, de um algoritmo interno capaz de guiar de forma autónoma o utilizador do sistema, na realização de um conjunto de análises que permitem um diagnóstico fiável e preciso dos DM e da Função Renal.

1.3. Contributos deste projeto

Os recentes avanços nos campos médico, biomédico, da engenharia, da informática e das telecomunicações propiciam uma oportunidade única para a criação de uma plataforma de registo médico eletrónico integrado, que seja não só capaz de armazenar e transmitir dados diversos (como por exemplo resultados laboratoriais, sinais fisiológicos e imagens), mas fazê-lo de uma forma compreensível e útil para os clínicos. Quando se considera a atual tendência de enfatizar os cuidados de saúde prestados em ambientes extra-hospitalares, uma monitorização mais precisa dos sinais clínicos nestes contextos assume ainda maior importância porque permitirá: (1) um melhor acompanhamento dos doentes (em particular dos que são afetados por doenças crónicas) reduzindo as complicações, (2) melhorar a qualidade de vida desses indivíduos e (3) reduzir os custos para o sistema de saúde.

Sendo assim, procedeu-se à elaboração de um dispositivo POCT portátil, ideal para ser utilizado em ambiente extra-hospitalar, capaz de guiar de forma autónoma o seu utilizador na realização de um conjunto de análises que permitem um diagnóstico fiável e preciso dos DM e da Função Renal. Dependendo do valor obtido para uma dada análise, o dispositivo tem a

capacidade de informar o utilizador de uma das seguintes situações: (1) o valor obtido encontra-se dentro da gama de valores normais existentes para essa análise; (2) o valor obtido encontra-se fora da gama de valores normais existentes e o utilizador deve realizar a análise seguinte e (3) o valor obtido encontra-se muito acima da gama de valores normais e o utilizador deve ir ao médico com a maior urgência possível. Tal capacidade permite então fazer um diagnóstico dos DM e da Função Renal, através de um conjunto de análises sequenciais e interligadas entre si, sem a necessidade de intervenção médica entre as diferentes análises. Esta característica constitui uma das grandes vantagens e novidades deste dispositivo em relação aos seus análogos comercialmente disponíveis, uma vez que permite uma grande economia de tempo e recursos, visto não ser necessário consultar o médico entre cada análise. Outra característica do dispositivo é o facto de ser específico para o diagnóstico dos DM e da Função Renal, pois as análises que com ele se podem realizar, assim como a ordem em que estas se realizam, foram pré-definidas durante a criação do algoritmo de decisão do dispositivo, para permitir um diagnóstico fiável e preciso de forma prática e intuitiva.

Para a realização das diferentes análises, o dispositivo utiliza discos de análise descartáveis, equivalentes a cuvetes, que contêm os reagentes necessários para a realização das respetivas análises a que se destinam.

1.3.1 Indicadores de realização

No âmbito desta dissertação foi aprovado um artigo em conferência, com apresentação em *poster*:

J. A. Oliveira, José Mariz, Carlos Capela, M. Correia-Neves, G. Minas, “Point-of-Care Testing device for Diabetes Mellitus and Renal Function analysis of biological fluids”, published in Proceedings of Eurosensors 2012, Krakow, September 9-12, 2012

Foram ainda proferidas duas comunicações orais:

Seminário “Apresentação dos trabalhos de dissertação do grupo de Micro/Nanotecnologias” – Centro Algoritmi, Universidade do Minho, Campus de Azurém, 18 de Abril de 2012.

João Oliveira, Margarida Correia-Neves, G. Minas, “Lab-on-a-chip for Diabetes Mellitus and Renal Function analysis in biological fluids” Poster session in 4^o Workshop on Biomedical Engineering, Faculty of Sciences of the University of Lisbon, 21 April 2012.

1.4. Organização da dissertação

O presente documento encontra-se dividido em sete capítulos. No primeiro, apresenta-se a noção, motivação e objetivos deste projeto assim como os seus contributos para o mundo das tecnologias na área da saúde. O segundo capítulo contém uma revisão dos principais dispositivos POCT existentes atualmente no mercado, as técnicas por eles utilizadas e as potenciais vantagens e desvantagens da utilização deste tipo de dispositivos. Neste capítulo apresenta-se ainda a diferença existente entre os dispositivos POCT eletroquímicos e óticos, mostrando-se as principais vantagens e desvantagens de cada um. No terceiro capítulo é feita uma breve descrição dos Diabetes Mellitus e da Função Renal, sendo ainda apresentados os principais métodos utilizados para o seu diagnóstico. Para além disso são apresentados alguns conceitos teóricos sobre o método ótico implementado no dispositivo. O capítulo quatro descreve a seleção dos reagentes a utilizar e a validação dos protocolos desses reagentes através de testes experimentais realizados com um espectrofotómetro, sendo apresentados os resultados obtidos com esses testes e a respetiva discussão dos mesmos. A definição dos diversos componentes a utilizar no dispositivo, o seu *design*, os resultados obtidos com os testes desses componentes e a discussão desses resultados são apresentados no capítulo cinco. O sexto capítulo dedica-se ao fabrico do dispositivo com base nas características definidas no capítulo cinco e aos testes finais realizados com o mesmo. Por fim, no capítulo sete são apresentadas as principais conclusões do trabalho realizado, bem como as perspetivas de trabalho futuro.

Capítulo 2 – Sistemas de diagnóstico POCT

Neste capítulo é apresentada uma revisão dos diversos sistemas de diagnóstico POCT existentes atualmente no mercado, assim como as diferentes técnicas de detecção por eles utilizadas. É ainda descrita a diferença existente entre os dispositivos POCT eletroquímicos e óticos, mostrando-se as principais vantagens e desvantagens de cada um. No final do capítulo, abordam-se as potenciais vantagens e desvantagens da utilização deste tipo de dispositivos.

2.1 Métodos de análise utilizados atualmente nos POCT

Os dispositivos POCT disponíveis no mercado podem dividir-se em vários grupos, dependendo do seu uso prático e dos seguintes atributos: características do sensor, complexidade, modo de medição, princípio de detecção subjacente e/ou matriz de amostras [1]. Os métodos de detecção incorporados nestes dispositivos são essencialmente baseados na detecção eletroquímica ou ótica.

2.1.1 Métodos POCT baseados em tiras quantitativas

Os dispositivos POCT baseados em tiras quantitativas discriminam os resultados dentro de certas gamas e são na sua maioria do tipo *strip-based*. A avaliação é frequentemente realizada por visualização simples ou por detecção ótica utilizando um dispositivo de leitura simples. As reações vão desde as que utilizam indicadores químicos até reações imunológicas. As tiras são constituídas por uma matriz porosa que contém uma mistura de reagentes secos com um elemento transportador. A amostra (e.g. urina ou sangue) é depositada sobre a tira e inicia-se a reação. Como exemplo de aplicações deste tipo de sistemas POCT existem os testes de gravidez urinários, testes de urina com vareta, triagem de microalbumina e a detecção de agentes infecciosos, todos listados na tabela 2.1 [1].

Tabela 2.1 - Parâmetros avaliados com dispositivos POCT baseados em tiras quantitativas [1].

Aplicação do dispositivo POCT	Parâmetro	Amostra
Testes de gravidez	<i>Human Chorionic Gonadotropin (hCG)</i>	Urina, Soro
Teste de urina com vareta	<i>Ascorbic acid, glucose, bilirubin, ketone, specific gravity, blood, pH, protein, urobilinogen, leukocytes, microalbumin, anti-VC, nitrite</i>	Urina
Triagem de microalbumina	<i>Albumin</i>	Urina
Deteção de agentes infecciosos	<i>Group A Streptococcus, respiratory syncytial virus (RSV), influenza A + B, HIV, Chlamydia trachomatis antigen, Helicobacter pylori-specific IgG-antibody, MRSA</i>	Swab, Soro

2.1.2 Analisadores com cartucho descartável

Os analisadores com cartucho descartável são a forma mais simples de dispositivos POCT quantitativos. A maior parte da análise é feita nas respectivas tiras de teste, sendo o leitor apenas utilizado para ler o resultado da reação ocorrida. É ainda importante referir que as tiras de teste são descartáveis (de uso único). Como exemplo deste tipo de dispositivos encontram-se os glicosímetros de utilização caseira (Figura 2.1 (a)), as estações POCT dos hospitais e o i-STAT System da Abbott (Abbott Park, IL, EUA), um dispositivo POCT multiparâmetro de uso unitário (Figura 2.1 (b)) [1].

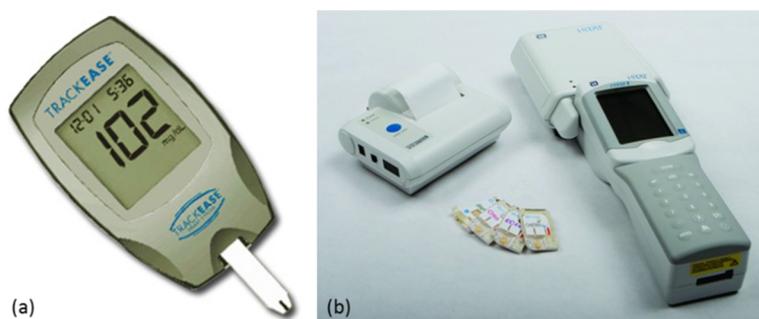


Figura 2.1 - (a) Glicosímetro de utilização caseira [8]; (b) i-STAT [9].

A análise da quantidade de açúcar presente no sangue é historicamente e financeiramente a técnica POCT mais utilizada. Tal facto é válido para os cuidados hospitalares e ambulatoriais e para os testes realizados em casa pelos pacientes. Embora geralmente seja utilizado sangue capilar ou venoso, os resultados podem ser apresentados como sendo o nível de glicose no sangue ou o nível de glicose no plasma, dependendo da calibração feita pelo fabricante do dispositivo utilizado. Para diminuir o risco de confusão entre o nível de glicose no sangue ou no plasma, a Federação Internacional de Química Clínica e Medicina de Laboratório (IFCC) sugeriu em 2005 que os valores de glicose devem ser sempre apresentados como níveis de glicose no plasma, independentemente do tipo da amostra e do método de medição [1].

2.1.3 Analisadores POCT bench-top

Os dispositivos POCT *bench-top* são geralmente mais complexos que os equipamentos de uso único descritos anteriormente, uma vez que pretendem, a uma escala mais reduzida, realizar muitas das análises que são realizadas nos equipamentos dos laboratórios de análises clínicas. Exemplos destes analisadores, assim como os princípios de análise que utilizam são descritos a seguir [1].

2.1.3.1 Analisadores por Espectrofotometria/ Reflectometria

Os analisadores que utilizam espectrofotometria ou reflectometria são dispositivos geralmente utilizados para a determinação de parâmetros de química clínica. Como exemplo deste tipo de dispositivos temos o Piccolo Xpress da Abaxis (Union City, CA, EUA) (Figura 2.2 (a)), o Triage MeterPro da Alere Health (EUA) (Figura 2.2 (b)) e o Reflotron da Roche Diagnostics (Mannheim, Alemanha) (Figura 2.2 (c)) [1].



Figura 2.2 - (a) Piccolo [10]; **(b)** Triage MeterPro [11]; **(c)** Reflotron [12].

2.1.3.2 Analisadores hematológicos multicanal

Os analisadores hematológicos multicanal são dispositivos que utilizam técnicas convencionais, neste caso contagem de partículas hematológicas, adaptadas às necessidades dos dispositivos POCT. Um exemplo é o Poch-100i da Sysmex (Kobe, Japão) (Figura 2.3) [1].

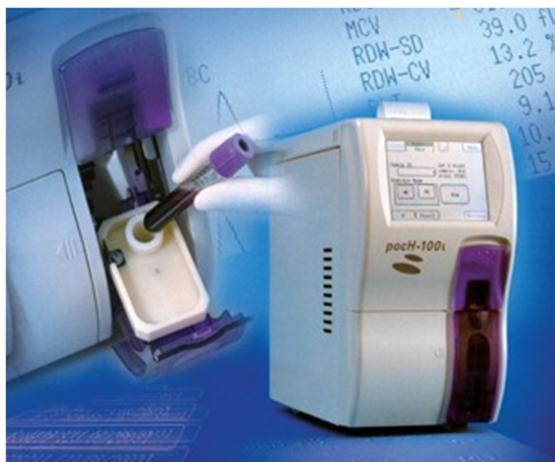


Figura 2.3 - Poch-100i [13].

2.1.3.3 Dispositivos imunológicos multicanal

Os dispositivos imunológicos multicanal utilizam metodologias de imunoensaio baseadas em anticorpos. Como exemplo temos, o Pathfast da Mitsubishi Chemical (Tokyo, Japão) (Figura 2.4 (a)) e o Radiometer AQT90 da Radiometer Medical ApS (Dinamarca) (Figura 2.4 (b)) [1].

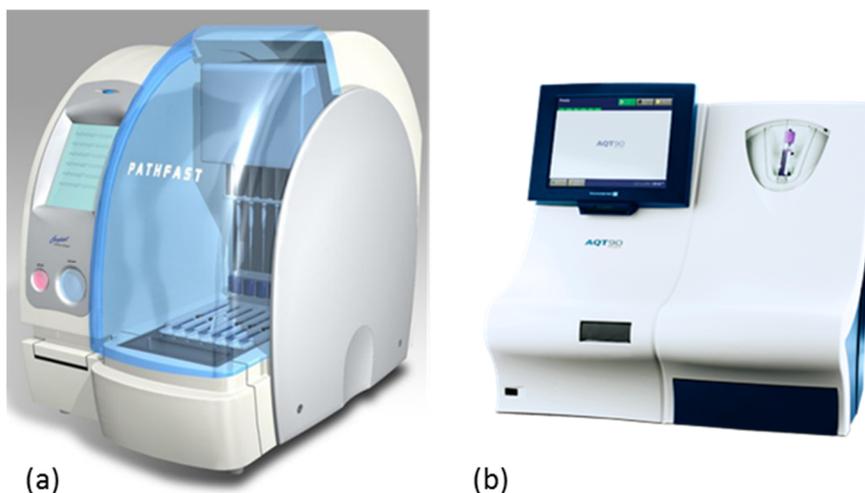


Figura 2.4 - (a) Pathfast [14]; (b) Radiometer AQT90 [15].

2.1.3.4 Analisadores dos gases sanguíneos (AGSs)

Os analisadores de gases sanguíneos (AGSs) utilizam sensores de gasometria potenciométricos, amperométricos ou óticos para medir o pH, pO_2 e pCO_2 . Estes dispositivos podem ainda conter elétrodos sensíveis a iões, permitindo assim a monitorização de eletrólitos. Na tabela 2.2 é possível observar alguns exemplos de dispositivos deste tipo [1].

Tabela 2.2 - Analisadores *in vitro* dos gases existentes no sangue disponíveis no mercado [1].

Fornecedor	Dispositivos POCT
Instrumentation Laboratory (IL)	IEM Premier 3500 & 4000
ITC Medical	Irma TRUpoint (Figura 2.5 (a))
Nova Biomedical	Stat Profile pHox/pHOx Plus/pHOx Plus L; Nova CRT; Stat Profile Critical Care Xpress
OPTI Medical Systems	AVOXimeter 4000; OPTI CCA-TS (Figura 2.5 (b)); OPTI R
Radiometer	ABL5; ABL800 FLEX; ABL800 BASIC; ABL90
Roche Diagnostics	Cobas b 123 (Figura 2.5 (c)); Cobas b 221
Siemens Medical Solutions Diagnostics	Rapidlab 248/348, 800, 1200; Rapidpoint 400/405



Figura 2.5 - (a) Irma TRUpoint [16]; **(b)** OPTI CCA-TS [17]; **(c)** Cobas b 123 [18].

2.1.4 Analisadores de coagulação hemostaseological

Os analisadores de coagulação hemostaseological são dispositivos POCT que apresentam um elevado grau de complexidade, o que leva a que somente pessoas qualificadas devam operá-los (médicos ou técnicos de laboratório treinados) [1]. Como exemplos desses dispositivos encontra-se o ROTEM da TEM International (Munich, Alemanha) (Figura 2.6 (a)) e o Sonoclot da Sienco Inc (Arvada, CO, EUA) (Figura 2.6 (b)) [1, 19]. A utilização destes dispositivos POCT permite superar várias das limitações existentes nos testes de coagulação comuns. O sangue passa a ser analisado junto à cama do doente, não sendo necessário transportá-lo até ao laboratório central, o que permite obter tempos de resposta bastante mais rápidos. O estado de coagulação é avaliado no sangue total, permitindo um sistema de coagulação *in vivo* no qual as interações entre as plaquetas e os glóbulos vermelhos fornecem informações importantes para a avaliação da função plaquetária. Além disso, a formação do coágulo pode ser observada visualmente em tempo real e a análise de coagulação feita à temperatura do corpo humano [19].



Figura 2.6 - (a) ROTEM [20]; (b) Sonoclot [21].

É possível ainda analisar a função plaquetária utilizando dispositivos que se designam por pseudo-POCT [1]. Nestes dispositivos, essa análise é feita avaliando a duração de uma hemorragia ou através de agregometria ótica. Alguns exemplos são o PFA 100 da Siemens Healthcare Diagnostics (Eschborn, Alemanha) e o VerifyNow da Accumetrics (San Diego, CA, EUA) [1].

2.1.5 Medição contínua utilizando dispositivos POCT

O exemplo mais comum de medição contínua utilizando dispositivos POCT é a monitorização contínua da glicose [22]. Este tipo de análises e de sistemas já se encontra disponível comercialmente, permitindo substituir os elétrodos utilizados por via intravenosa (método invasivo) por um cateter de microanálise colocado no tecido subcutâneo (método minimamente invasivo) (Figura 2.7). Os métodos existentes não invasivos, como por exemplo as técnicas óticas ou de *microporation* de medição transcutânea direta de parâmetros metabólicos, têm menos probabilidade de prevalecer. Tal dificuldade deve-se principalmente ao facto de certas características da pele humana, tais como a espessura, pigmentação e pilosidade e de determinados fenómenos fisiológicos (e.g. humidade e teor de sal), poderem apresentar uma ampla gama de valores e afetarem a medição efetuada de forma aleatória [1].

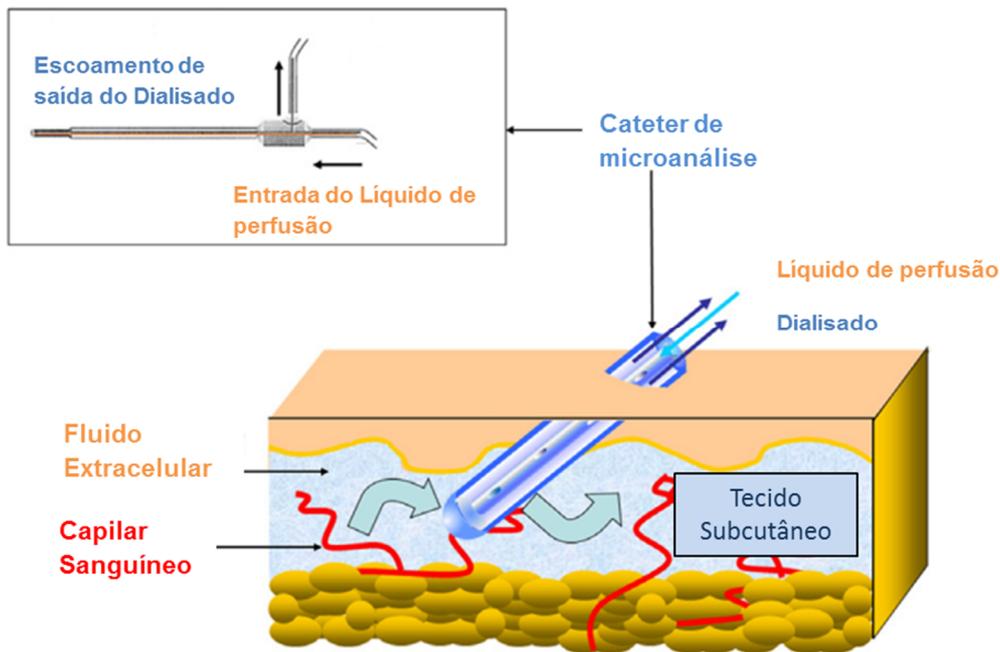


Figura 2.7 - Princípio da microanálise para medir os níveis de analitos no tecido subcutâneo (Adaptado de [1]).

Alguns exemplos de dispositivos POCT atualmente disponíveis para a monitorização contínua dos níveis de glicose são o Guardian RT da Medtronic (Minneapolis, MN, EUA) (Figura 2.8 (a)), o Glucoday da A. Menarini (Florence, Itália), o Abbott FreeStyle Navigator (Figura 2.8 (b)) e o Glucowatch da Cygnus Inc (Petosket, MI, EUA) [1].

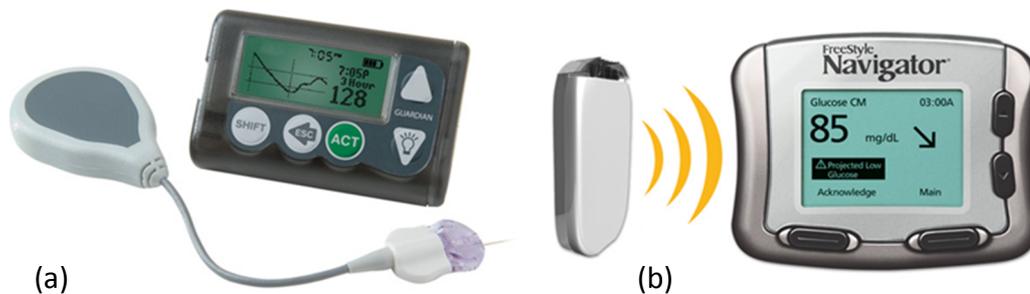


Figura 2.8 - (a) Guardian RT [23]; (b) FreeStyle Navigator [24].

2.1.6 Dispositivos POCT baseados em biologia molecular para a detecção de agentes infecciosos

No mercado existem diversos testes qualitativos baseados em tiras para a detecção de agentes infecciosos. O princípio básico na maioria destes sistemas é a imunocromatografia de um antigene microbiano específico (ou mais raramente, anticorpo) na amostra do paciente (urina ou

sangue total). Existem ainda algumas tentativas de utilizar métodos de biologia molecular (principalmente a reação em cadeia da polimerase (qRT)-PCR) em dispositivos POCT, no entanto como estes métodos são tecnicamente exigentes, com a etapa de extração do DNA/RNA, os dispositivos existentes não apresentam um desempenho ideal. Devido à complexidade dos procedimentos dos testes e à interpretação desafiante dos resultados, é mais provável que os dispositivos para análise dos ácidos nucleicos se encontrem, no futuro, apenas em laboratórios centrais. Um exemplo de um dispositivo deste tipo comercialmente disponível é o sistema GeneXpert da Cepheid (Sunnyvale, CA, EUA) (Figura 2.9) [1].



Figura 2.9 - GeneXpert [25].

2.2 Dispositivos POCT eletroquímicos e óticos

Uma vez que se pretende implementar um dispositivo POCT baseado em técnicas de detecção ótica e de forma a justificar tal escolha, é importante evidenciar quais as principais diferenças existentes entre os dispositivos POCT eletroquímicos e óticos disponíveis atualmente no mercado. Sendo assim, nesta secção são apresentadas as principais vantagens e desvantagens de cada um desses tipos de dispositivos POCT.

Os testes de fluxo lateral (LFAs) e os sensores eletroquímicos dominam o mercado dos sistemas de diagnóstico POCT. Os LFAs de imunocromatografia, normalmente designados por “*dipstick tests*”, dependem do fluxo capilar e da leitura visual quantitativa. Os LFAs encontram-se comercialmente disponíveis para uma determinada variedade de testes diagnósticos (teste de

gravidez, marcadores cardíacos, doenças infecciosas, etc.). O sucesso destes dispositivos deve-se ao seu baixo custo de fabrico, robustez e facilidade de manuseamento. No entanto, apresentam uma sensibilidade relativamente baixa quando comparados com os ensaios imunológicos dos laboratórios convencionais. Os LFAs são ideais para aplicações onde a quantidade de analito existente é relativamente elevada, onde não é necessário uma preparação complexa da amostra e quando um simples diagnóstico de sim/não é suficiente. Contudo, em muitos casos são necessários ensaios mais sofisticados que exigem protocolos multipasso e manuseamento de fluidos complexos [26].

Os testes eletroquímicos têm apresentado um elevado sucesso nas análises quantitativas de certos analitos de pequenas dimensões, análises a determinadas biomoléculas presentes no sangue e análises à urina. Convencionalmente os medidores do nível de glicose no sangue baseiam-se em métodos de deteção eletroquímica, como é o caso do dispositivo i-STAT, utilizado nas unidades de cuidados intensivos dos hospitais, que é capaz de efetuar rapidamente a análise de 25 parâmetros diferentes no sangue. No entanto, as técnicas eletroquímicas são fortemente influenciadas por variações de temperatura do eléctrodo, fatores químicos como o pH e concentrações iónicas, acumulação de subprodutos das reações redox perto dos eléctrodos e pelas condições da superfície do eléctrodo (fator que pode condicionar o prazo de validade e exigir condições de armazenamento mais rigorosas para os dispositivos POCT descartáveis) [26].

Por outro lado, a deteção ótica apresenta a vantagem de poder ter um custo por teste inferior à deteção eletroquímica, pois ao contrário dos eléctrodos esta não necessita de ser integrada em dispositivos descartáveis. Além disso, a deteção ótica é mais fácil de produzir sob a forma de matriz, utilizando *charge-coupled device* (CCD) comercial ou tecnologia *complementary metal-oxide-semiconductor* (CMOS), permitindo assim realizar centenas ou milhares de reações em simultâneo, pois cada *pixel* da matriz corresponde a um local diferente de deteção. Além disso, a multiplexagem a esta escala é difícil de conseguir quando se está a trabalhar com eléctrodos [26].

Enquanto a deteção ótica é bastante simples em ambiente laboratorial, onde microscópios, lasers, espectrofotómetros, lentes e filtros podem ser dispostos e alinhados de forma precisa, estes sistemas são difíceis de miniaturizar de forma a obter um dispositivo portátil, robusto e com baixo custo de fabrico. No entanto, devido à rápida redução do custo dos componentes ótico-eletrónicos como os CCDs e os fotodíodos, bem como as recentes inovações

na integração de micro fluidos e materiais à nano escala, a detecção ótica está a tornar-se cada vez mais propícia para ser aplicada em dispositivos POCT [26].

2.3 Sistemas óticos utilizados em dispositivos POCT

Os métodos de detecção ótica convencionais, ou seja, a absorvência, fluorescência, quimioluminescência, interferometria e *surface plasmon resonance* (SPR) são, atualmente, utilizados em dispositivos POCT. Diversos sistemas óticos integrados estão a ser explorados, nos quais guias de ondas, filtros e até elementos ótico-eletrónicos têm sido utilizados de forma a aumentar a sensibilidade e a manter o baixo custo. Além disso, diversos grupos de investigação têm incorporado ótica de baixo custo, díodos emissores de luz (LED's), câmaras CCD e fotodíodos CMOS, tudo em conjunto com os vários componentes integrados de eletrónica num chip, de forma a criar plataformas portáteis de diagnóstico [26].

A detecção por absorvência Ultravioleta/Visível é o método de detecção mais utilizado em sistemas de diagnóstico laboratorial à escala macro. Na maioria dos casos, é suficiente para o diagnóstico alterações na absorvência ou na cor da amostra, por isso a instrumentação necessária para as medições de absorvência tende a ser bastante simples e económica quando comparada com os restantes métodos óticos, sendo por isso esta técnica a mais facilmente implementável à escala micro. A maior limitação da medição da absorvência em dispositivos de dimensões micrométricas é o facto da redução do volume da amostra levar a uma diminuição do comprimento do caminho ótico através da amostra, diminuindo a sensibilidade do dispositivo e afetando a medição de um valor de absorvência de confiança [26, 27]. Uma explicação mais detalhada deste método encontra-se na secção 3.6.

A fluorescência é um método ótico bastante utilizado em dispositivos POCT, devido à sua elevada seletividade e sensibilidade. Embora se encontre disponível uma vasta variedade de fontes de excitação, a fluorescência induzida por laser é mais facilmente adaptada às dimensões desses dispositivos. A coerência e a baixa divergência do feixe do laser facilitam a sua focagem para uma pequena região de detecção, permitindo assim obter uma irradiação muito elevada que resulta num dos limites de detecção mais baixos de qualquer sistema de detecção. Como alternativa de menor custo, podem utilizar-se LED's para a excitação no processo de

fluorescência [26, 27]. No entanto, devido à elevada divergência do feixe emitido e ao espectro de emissão relativamente amplo, a utilização de LED's torna necessário a implementação de filtros e gera frequentemente elevados níveis de ruído de fundo [26].

A quimioluminescência tem mostrado ser um método de detecção ótica atrativo em situações em que a luz é gerada a partir de uma reação química. É uma técnica com elevada sensibilidade, limites de detecção baixos e não necessita da utilização de instrumentação de excitação, o que elimina praticamente o ruído de fundo. Estas vantagens tornam a quimioluminescência num método de detecção adequado para sistemas de diagnóstico à escala micro. No entanto, como o reagente de quimioluminescência tem de ser misturado com os analitos separados antes da sua detecção, é necessário um *layout* bastante mais complexo [27].

A interferometria em relação aos outros métodos apresentados possui a vantagem de ser menos sensível a variações de temperatura. No entanto, a instrumentação necessária é um pouco mais complexa que a utilizada na detecção por absorvência, fluorescência e quimioluminescência [26].

O SPR é uma técnica bem estabelecida e com uma sensibilidade excelente. No entanto, a instrumentação necessária é bastante complexa e a camada de metal (normalmente ouro) que é necessário depositar no dispositivo descartável tem um custo elevado. Além disso, a técnica apresenta uma elevada dependência da temperatura. Recentemente, os esforços concentram-se na redução do tamanho e da complexidade dos sensores SPR, para que estes possam ser integrados em sistemas de diagnóstico à escala micro [26].

2.4 Dispositivos POCT comercialmente disponíveis com detecção ótica

Dos dispositivos POCT comercialmente disponíveis que utilizam métodos óticos como técnica de detecção, selecionaram-se para uma descrição mais pormenorizada os três dispositivos que apresentam as características mais idênticas às pretendidas para o dispositivo POCT a implementar: o Piccolo Xpress, o Reflotron Plus e o Triage MeterPro.

2.4.1 Piccolo Xpress

O Piccolo *Point-of-Care Chemistry Analyzer* é um instrumento portátil e leve que permite analisar amostras de sangue, soro ou plasma utilizando discos de uso único que contêm os reagentes necessários para as análises pretendidas. Juntamente com todo o processo automático e com o tratamento interno de dados, o Piccolo incorpora um processo único designado por *intelligent Quality Control* (iQC). Transparente para o operador, o iQC verifica durante cada análise o estado do analisador, dos discos e da amostra de forma a averiguar o correto funcionamento de toda a eletrônica e o desempenho das reações químicas. Automaticamente o iQC suspende uma reação química ou todas as reações do painel caso seja detetado um desempenho atípico do aparelho, alertando imediatamente o operador dos respetivos problemas. A partir do autoteste realizado quando se inicia a gravação ou a impressão dos resultados obtidos, são realizadas uma série de verificações que permitem garantir a precisão e confiança dos resultados finais [28].

No Piccolo é introduzido um pequeno volume da amostra do paciente diretamente no disco de reagentes e de uso único, sendo posteriormente a preparação da amostra feita de forma automática. Todas as reações (determinação da concentração de analito presente na amostra e testes de controlo de qualidade do equipamento) ocorrem dentro de pequenas cuvetes que se encontram na periferia do disco. Em contraste com a maioria dos fotômetros de laboratório, que utilizam apenas um comprimento de onda para efetuar uma determinada medição, o Piccolo gera poderosos *flashes* com todo o espectro da luz branca e para cada reação efetua medições da absorção em múltiplos comprimentos de onda, desde o ultravioleta ao infravermelho próximo. De forma a garantir a precisão dos resultados, o iQC verifica a composição e a distribuição de todas as substâncias participantes nas reações químicas, valida o desempenho do gerador de luz e dos componentes de deteção e verifica se a conversão para digital dos valores de absorção lidos foi realizada de forma correta. Esses valores digitais são posteriormente utilizados para o cálculo das concentrações das diferentes substâncias presentes na amostra analisada [28].

As calibrações do equipamento que normalmente são demoradas e propícias a erros não são necessárias quando se utiliza o Piccolo, nem existe a possibilidade de se utilizarem reagentes fora do prazo. O código de barras existente na face superior de cada disco contém informação sobre o tipo de painel de teste, a data de validade e os fatores de calibração dos

reagentes. Quando se inicia o funcionamento do equipamento, o iQC verifica a integridade da informação contida no código de barras através de um ciclo de verificação redundante. Em seguida, confirma a data de validade do disco utilizando o seu relógio interno. A informação sobre a calibração é transferida para a memória do analisador, sendo posteriormente utilizada para o cálculo dos resultados [28].

A medição e o movimento dos fluidos (amostra, diluente e amostra diluída) são controlados em todas as fases da análise pelo motor do analisador e pelas características do desenho do disco. Em vários ciclos rigorosamente cronometrados, o disco é girado alternadamente de forma a criar uma força centrífuga e a permitir a formação de uma ação capilar. Estas forças sincronizam o movimento dos fluidos dentro e fora das câmaras, canais e cuvetes contidas no disco, conforme for necessário para que as reações ocorram na altura correta [28].

O iQC é responsável por monitorizar todas as reações que ocorrem, verificando se estas são lineares, se as absorvências medidas se encontram dentro dos limites definidos e se o substrato foi completamente utilizado. Nas reações *endpoint*, o analisador verifica se todas as medições se encontram dentro da gama dinâmica do fotómetro e se a reação ocorreu completamente [28].

Quanto ao sistema ótico, ele é constituído por uma lâmpada estroboscópica de arco xenon que gera um feixe incidente, um conjunto de divisores de feixe, um conjunto de filtros que permitem definir os comprimentos de onda utilizados e fotodetectores que convertem a intensidade da luz lida num dado comprimento de onda em corrente elétrica. A corrente é encaminhada para um ou dois multiplexes, que selecionam os sinais de interesse e os enviam para amplificadores de ganho variável. O sinal amplificado passa posteriormente por um conversor analógico-digital e a intensidade da luz lida é convertida num número digital a ser utilizado nos cálculos. O brilho da lâmpada modifica muito gradualmente com o tempo e uso (apresentando uma intensidade de 50% depois de um mínimo de 40 milhões de flashes ou 20 anos de uso normal). Estas alterações são normais e esperadas, e normalmente afetam todos os comprimentos de onda de uma forma mais ou menos igual. No entanto, de modo a manter uma sensibilidade máxima, o analisador ajusta-se a estas mudanças. No início de cada execução o iQC efetua de forma automática um ajuste do ganho dos amplificadores de ganho variável e

verifica se o ruído associado à intensidade da luz em qualquer comprimento de onda se encontra dentro dos limites aceitáveis [28].

O ruído de fundo encontra-se sempre presente em todos os sistemas. No início de cada análise o iQC mede a quantidade de ruído de fundo registado pelo fotómetro para cada comprimento de onda. Valores de ruído de fundo maiores que o esperado para diferentes comprimentos de onda, indicam normalmente problemas associados com a eletrónica do analisador ou fugas de luz no fotómetro provenientes de outras fontes de luz que não o caminho de luz primário. Estes problemas provocam diminuição da exatidão e precisão das leituras efetuadas, especialmente para valores de absorvência elevados. Quando o nível de ruído de fundo ultrapassa os limites, o iQC aborta o ensaio e mostra ao utilizador uma mensagem de erro [28].

O disco de reagentes do Piccolo (Figura 2.10 (a)) é constituído por componentes integrados com as funções óticas, eletrónicas e mecânicas do analisador e participa em todas as fases da análise da amostra. O código de barras existente na face superior do disco contém o código de identificação do disco, o número de lote, a data de validade e os dados para a calibração do equipamento. A transferência correta desses dados para o *software* do analisador é posteriormente verificada pelo iQC [28].

Com o Piccolo Xpress e devido à diversa variedade de discos existentes (Figura 2.10 (b)), é possível obter os resultados clínicos para as seguintes funções críticas: fígado, intestino, glândulas paratiroides, rins, pâncreas, medula óssea, metabólica, respiratória, icterícia, cardiovascular, hepática, vesícula, diabética e muito mais. Os resultados das análises possíveis de realizar com um determinado disco são obtidos em aproximadamente 12 minutos [29].



(a)



(b)

Figura 2.10 - (a) Disco de reagentes [29]; **(b)** Conjunto de discos disponíveis para as diferentes análises [29].

2.4.2 Reflotron Plus

O Reflotron Plus (Figura 2.11) é um dispositivo de diagnóstico *in vitro* que permite realizar a análise quantitativa de 17 parâmetros de química clínica a partir de um pequeno volume de amostra de sangue total, soro ou plasma. Trabalha com base no princípio da fotometria de refletância (baseada na alteração de cor das tiras de teste) e assegura resultados rápidos e fiáveis, apresentando ainda um fácil manuseamento. O Reflotron Plus permite obter resultados comparáveis aos alcançados através dos métodos laboratoriais *standard*, em 2 ou 3 minutos por parâmetro. Desta forma, o resultado está disponível ainda na presença do paciente, podendo a decisão terapêutica ser tomada sem qualquer demora. Através dos 17 parâmetros disponíveis, com os testes Reflotron estão cobertas as indicações mais importantes e frequentes dos cuidados de saúde primários, tais como os diabetes, dislipidemias, doenças renais, enfarte miocárdio, anemia, doenças hepáticas, pancreatite, gota e doenças ósseas [30].

Os testes Reflotron são constituídos por tiras reativas, concebidas para a determinação quantitativa de 17 parâmetros de química clínica, utilizando material de amostra não diluído. A incorporação de um sistema de separação do plasma torna possível a utilização de sangue total capilar ou venoso, assim como soro e plasma. Na parte traseira de cada tira de teste existe uma banda magnética que contém todos os dados referentes ao teste e às especificações do lote, para que não seja necessário haver qualquer calibração por parte do utilizador [30].

Os resultados obtidos para os diferentes parâmetros analisados são apresentados de forma clara num monitor de cristal líquido (LCD), podendo ser impressos através da impressora

integrada. Os dados dos pacientes podem ser, ainda, armazenados de forma rápida e eficiente, pois o Reflotron Plus possui a capacidade de armazenar 60 resultados com informação adicional. Devido à sua interface de dados, pode estabelecer-se uma ligação a um computador externo, o que permite um posterior processamento dos dados dos doentes, assim como a troca de dados [30].

O Reflotron Plus está concebido para ser fácil de manusear e necessitar de pouca manutenção, não havendo necessidade de preparar os reagentes e/ou calibrar o sistema. Devido às suas pequenas dimensões (aproximadamente 300 x 350 x 210 mm), ele ocupa muito pouco espaço [30].



Figura 2.11 - Reflotron Plus [30].

2.4.3 Triage MeterPro

O Triage MeterPro (Figura 2.2 (b)) é um dispositivo portátil que permite a determinação de diversos marcadores cardíacos, renais e toxicológicos num laboratório ou próximo do doente. Encontram-se disponíveis 20 imunoensaios que permitem obter resultados entre 15 e 20 minutos, utilizando sangue total, plasma ou urina [31]. O método ótico utilizado é a fluorescência, sendo utilizado um laser como fonte de luz e um fotodíodo de silício como detetor. A luz proveniente do laser atinge a tira de teste já com a amostra que foi inserida no dispositivo, provocando a fluorescência do corante existente na tira. Dependendo da quantidade de energia libertada no processo de fluorescência é feita a determinação quantitativa do parâmetro em análise [32].

Os resultados obtidos para as diferentes análises são mostrados e impressos sobre a forma de números fáceis de interpretar, sendo destacados os valores que se encontram fora do

normal. Os resultados qualitativos são apresentados sobre a forma de positivo ou negativo, de forma a eliminar a necessidade de interpretação de linhas. É um dispositivo leve (0,7 Kg) e de pequenas dimensões (225 × 190 × 70 mm), o que o torna fácil de manusear [32].

2.5 Potenciais vantagens e desvantagens da utilização de dispositivos POCT

A determinação das vantagens e desvantagens da utilização dos dispositivos POCT não constitui um processo simples, pois encontra-se envolvida uma grande quantidade de fatores tais como o custo, controlo de qualidade, limitações do pessoal, questões regulamentares, entre outros. Apesar desse problema, numerosos estudos têm analisado e produzido resultados que sugerem uma série de vantagens e desvantagem para a utilização desses dispositivos. A redução do tempo de resposta é claramente observada, encontrando-se tal vantagem devidamente documentada [33]. Outra vantagem, consequente da anterior, consiste no aumento da tomada de decisões médicas *in-loco*, uma vez que a análise pode ser realizada diretamente junto do doente. Uma desvantagem observada com a utilização dos dispositivos POCT fora do ambiente laboratorial/clínico consiste no facto dos testes serem geralmente efetuados por indivíduos, externos ao laboratório, que não possuem o tipo de treino necessário para assegurar o controlo de qualidade apropriado, resolver os problemas ocorridos com o analisador e documentar os resultados de forma correta [34].

Dependendo do formato do dispositivo de análise e das despesas associadas a cada teste, pode existir uma diminuição significativa nos gastos associados ao uso de dispositivos POCT. Outra vantagem é a possibilidade da realização de análises em tempo real, sem necessidade de esperar minutos ou horas pelos resultados dos testes. A amostra recolhida não necessita de ser transportada nem armazenada, o que permite reduzir os erros pré-analíticos e contribuir para a garantia de qualidade. Note-se que este tipo de erros é normalmente consequência da deterioração da amostra de sangue devido do longo tempo que esta permanece dentro do tubo de recolha. A maioria dos clínicos está ciente da existência de erros pré-analíticos na forma de hipoglicemia artefactual em amostras de sangue que não foram processadas em tempo útil [34]. Outra vantagem médica da utilização dos dispositivos POCT é a diminuição da perda sanguínea iatrogénica (perda de sangue devido a erro médico), levando

assim à conservação do sangue. A questão da conservação do sangue não é trivial, pois a transfusão contínua de sangue devido a doença constitui um grande problema clínico. Vários investigadores acreditam que a conservação sanguínea nos cuidados intensivos é especialmente importante, uma vez que os doentes que se encontram nessa unidade necessitam frequentemente de múltiplas transfusões de sangue. O uso de analisadores microquímicos para limitar a perda de sangue, acoplados a outras estratégias de conservação sanguínea tais como a eritropoietina e algoritmos de transfusão, podem ajudar a limitar a necessidade de transfusões sanguíneas em indivíduos doentes [34].

A tabela 2.3 apresenta um resumo das principais vantagens e desvantagens da utilização dos dispositivos POCT, de forma a facilitar uma rápida observação.

Tabela 2.3 - Principais vantagens e desvantagens da utilização dos dispositivos POCT [34].

Vantagens	Desvantagens
Diminuição do tempo de resposta terapêutico	Duplicação dos instrumentos e métodos
Disponibilidade rápida de informação	Questões de controlo de qualidade e de proficiência dos testes
Aumento da tomada de decisão clínica	Testes não autorizados
Aumento da monitorização dos doentes em tempo real	Performance analítica pobre
Diminuição dos erros pré-analíticos	Problemas de treino e de competência
Redução dos custos com o doente por episódio	Falta de documentação adequada
Diminuição da perda de sangue iatrogénica	Erros na manipulação das amostras
Diminuição dos exames de sangue redundantes	Menu de testes limitado
Conveniência para os clínicos	Diminuição da entrada de resultados na ficha do doente
Melhoria da interface clínico-doente	Erros pós-analíticos (e.g. erro na transcrição dos dados ou falha de comunicação)
Instrumentação personalizada	Necessidade de licença (s) separada (s)
Conveniente quando um laboratório é inacessível	Falha no cumprimento dos regulamentos
Atratividade para os doentes	Aumento dos custos
Integração com algoritmos de decisão	

Capítulo 3 – Conceitos teóricos sobre as doenças analisadas e o método ótico utilizado

Neste capítulo é feita uma breve descrição sobre as duas doenças a analisar (DM e Função Renal) e são apresentados os principais métodos utilizados para o seu diagnóstico. No final do capítulo, descrevem-se alguns conceitos teóricos sobre o espectro eletromagnético, a espectroscopia e a absorvência, de forma a fornecer as noções necessárias sobre o método ótico utilizado pelo dispositivo a implementar.

3.1 Diabetes Mellitus

Os Diabetes Mellitus podem definir-se como um distúrbio metabólico, resultante de uma deficiência na secreção de insulina por parte do pâncreas e/ou na ação da insulina no organismo, o que resulta em hiperglicemia com distúrbios no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas. É uma das doenças crônicas mais comuns e segundo a Organização Mundial de Saúde, a sua prevalência global em 2008 foi estimada em 10%, para uma população de adultos com idade superior a 25 anos [35]. Nas últimas décadas tem-se verificado um aumento drástico da incidência dos DM, predominantemente devido à mudança do estilo de vida, aumento da prevalência da obesidade e envelhecimento da população [36].

Clinicamente, os DM podem ser classificados como diabetes do tipo 1 e do tipo 2. Mais de 80% dos casos de diabetes são DM do tipo 2 que afetam tipicamente indivíduos idosos, com sobrepeso ou sedentários e aqueles que têm uma fisiopatologia complexa, envolvendo resistência à ação da insulina no organismo ou secreção inadequada de insulina por parte do pâncreas [37]. É importante referir, que recentemente têm-se verificado um crescente aumento da prevalência dos diabetes tipo 2 na população jovem, principalmente devido ao aumento da obesidade infantil. Tal facto tem atraído cada vez mais a atenção dos especialistas, uma vez que é fortemente responsável pelo aumento da prevalência dos DM [38]. Os DM do tipo 1 são caracterizados pela destruição autoimune das células- β secretoras de insulina, localizadas nos ilhéus de Langerhans, e pela tendência para cetoacidose mesmo em estado basal,

compreendendo 5% a 10% de todos os diabetes. Com muito menor frequência, outras causas específicas podem levar, também, ao aparecimento de diabetes [37].

Quando não tratados adequadamente, os DM levam ao desenvolvimento de outras complicações crônicas, que se dividem em dois grupos: (1) complicações microvasculares específicas dos diabetes como a retinopatia, nefropatia e neuropatia; (2) complicações macrovasculares que incluem o infarto do miocárdio, complicações cerebrovasculares, hipertensão e doença vascular periférica [36, 39].

O facto dos diabetes tipo 2 terem-se tornado rapidamente um problema de saúde global fez com que surgisse uma necessidade urgente de prevenir a progressão da doença e das suas complicações [40]. Embora ainda não haja uma cura definitiva para os diabetes, existem vários tratamentos disponíveis que, quando seguidos de forma regular, permitem controlar a doença.

3.2 Função Renal

O estudo da Função Renal, em nefropatia, permite obter um conjunto de informações sobre o funcionamento e o estado fisiológico dos rins. A função primária dos rins é a manutenção dos fluidos corporais e da composição eletrolítica corporal. O fluxo renal sanguíneo é elevado, cerca de 1,2 L/min, que corresponde a 22-25% do débito cardíaco. Este fluxo é responsável pela produção de cerca de 180 L/dia de filtrado glomerular, sendo a maioria desse volume reabsorvido através dos túbulos. Os processos de filtração glomerular, reabsorção tubular e secreção tubular definem a composição final e o volume de urina excretada, garantindo a manutenção do volume dos fluidos corporais e da quantidade de eletrólitos existentes. Outra função desempenhada pelos rins é a excreção através da urina de produtos residuais do metabolismo, como o caso da ureia, creatinina, bilirrubina e ácido úrico e de drogas solúveis em água. Além disso, os rins são ainda responsáveis por manter o equilíbrio ácido-base do organismo, através da excreção urinária dos iões H^+ e HCO_3^- [41].

A análise da Função Renal, associada aos DM apresenta uma elevada importância, uma vez que os diabetes são a principal causa da insuficiência renal, sendo a nefropatia diabética considerada uma doença renal crónica. Após muitos anos de diabetes o sistema delicado de filtração existente nos rins começa a ficar destruído, perdendo-se, numa fase inicial, as proteínas

maiores do sangue, como a albumina, através da urina (Figura 3.1). Sendo tal facto mais provável de acontecer se a quantidade de açúcar existente no sangue for mal controlada [40]. Sendo assim, a análise da quantidade da albumina presente na urina, torna-se um bom marcador precoce da insuficiência renal, exigindo para tal, um método de deteção sensível [42].

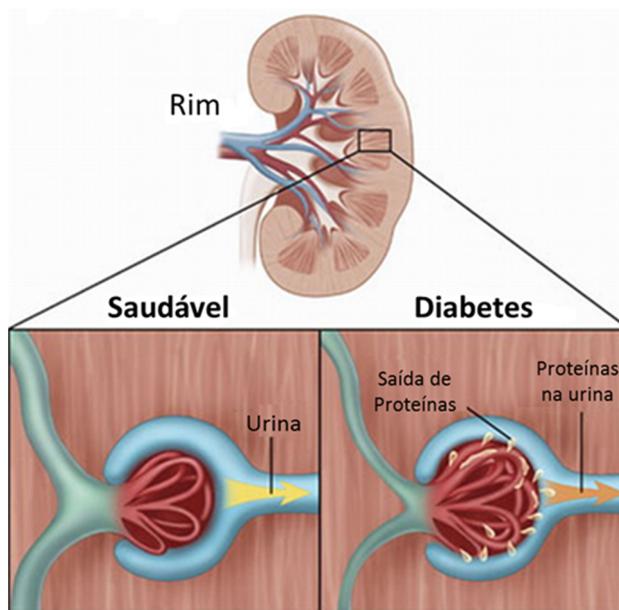


Figura 3.1 - Nefropatia diabética (Adaptado de [43]).

Seguidamente serão apresentados os principais métodos utilizados para o estudo dos DM e da Função Renal.

3.3 Diagnóstico dos Diabetes Mellitus

Durante décadas, o diagnóstico dos diabetes baseou-se no critério da medição do nível de glicose plasmática, ou seja, a glicose plasmática em jejum (GPJ) ou o valor medido ao fim de 2 horas no teste de tolerância a 75 g ingeridas por via oral. Em 1997, o primeiro *Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus* reviu o critério de diagnóstico, utilizando a associação observada entre os níveis da GPJ e a presença de retinopatia como fator chave para identificar o *threshold* ideal para o nível de glicose [44]. Essa revisão permitiu assim obter um novo valor limite de 126 mg/dL para o exame da GPJ e confirmar o valor limite de 200 mg/dL existente para o teste oral de tolerância à glicose (TOTG). Ainda durante o mesmo ano e em 2003, *The Expert Committee on the Diagnosis and*

Capítulo 3

Classification of Diabetes Mellitus reconheceu a existência de um grupo intermédio de indivíduos, onde os níveis de glicose não satisfazem os critérios para diabetes, mas são mais elevados que os níveis considerados normais [45]. Essas pessoas foram definidas como tendo glicemia de jejum alterada (GJA) (níveis da GPJ entre 100 mg/dL e 125 mg/dL) ou tolerância à glicose alterada (TGA) (níveis de glicose no TOTG entre 140 mg/dL e 199 mg/dL). Indivíduos com GJA e/ou TGA têm sido referidos como tendo pré-diabetes, indicando um risco relativamente elevado para um desenvolvimento futuro de diabetes. Geralmente a GJA e a TGA estão associadas à obesidade (especialmente obesidade abdominal ou visceral), dislipidemia com elevados níveis de triglicérides e/ou baixos níveis de colesterol HDL e hipertensão [46].

Atualmente, os critérios estabelecidos para o diagnóstico de diabetes (GPJ e TOTG) continuam válidos. No entanto, pacientes com hiperglicemia grave, como aqueles que apresentam graves sintomas clássicos de hiperglicemia ou crises de hiperglicemia podem ser diagnosticados de forma contínua através de um exame casual do nível de glicose plasmática [46]. Na tabela 3.1 é possível observar os diferentes valores de *threshold* e as respectivas indicações existentes para os testes acima referidos.

Tabela 3.1 - Resumo dos valores *threshold* do nível de glicose para os diferentes testes e respectivas indicações [46, 47, 48].

Teste	Nível de Glicose	Indicação
Glicose plasmática em jejum (GPJ)	De 70 a 99 mg/dL (3,9 a 5,5 mmol/L)	Nível de glicose em jejum normal
	De 100 a 125 mg/dL (5,6 a 6,9 mmol/L)	Nível de glicose alterado (Pré-Diabetes)
	≥ 126 mg/dL (7.0 mmol/L)	Diabetes
Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)	< 140 mg/dL (7,8 mmol/L)	Nível de tolerância à glicose normal
	De 140 a 199 mg/dL (7,8 a 11,0 mmol/L)	Nível de tolerância à glicose alterado (Pré-Diabetes)
	≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/l)	Diabetes
Glicose plasmática casual	≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/l)	Diabetes

Uma das principais complicações provocadas pelos DM é o aparecimento de pequenas, mas anormais, quantidades de albumina na urina (≥ 30 mg/24h ou $\geq 20\mu\text{g}/\text{min}$), designada por microalbuminúria e que traduz um dos primeiros sinais de insuficiência renal. Indivíduos que apresentam estes níveis de albumina na urina são referidos como portadores de nefropatia incipiente. Sem intervenções específicas, aproximadamente 80% dos pacientes com diabetes do tipo 1 que exibem indícios de microalbuminúria apresentam um aumento na excreção de albumina urinária a uma taxa de aproximadamente 10-20% por ano. Tal aumento é responsável pela evolução dos doentes para um estado de nefropatia evidente ou albuminúria clínica, num período de 10 a 15 anos [42].

As diferentes técnicas de deteção da quantidade de albumina presente na urina, bem como a sua reprodutibilidade influenciam a sua quantificação. A determinação clássica é efetuada utilizando colheitas de urina de 24 horas mas a existência de múltiplos fatores de erro, dos quais o mais frequente é a incompleta coleção de urina, levou à procura de alternativas mais fidedignas [49]. Sendo assim, mais recentemente, passou a utilizar-se amostras pontuais de urina para determinar a razão Albumina/Creatinina (RAC), definindo-se que a microalbuminúria está presente quando o valor de RAC da amostra de urina se encontra entre 30-299 mg albumina/g creatinina urinária. Se o valor de RAC for superior a 300 mg albumina/g creatinina urinária significa que o paciente possui doença renal crónica [42, 49]. Este novo sistema de análise tem sido equiparado à taxa de excreção de albumina determinada a partir de uma amostra de urina de 24 horas, sendo mais fácil de realizar e apresentando uma menor quantidade de erros associados [49]. Outra técnica existente, mas não tão frequentemente utilizada, é a *timed collection*, na qual é determinada a quantidade de albumina existente por minuto através de uma amostra de urina recolhida durante algumas horas (e.g. amostra de 12 horas diurnas) [42].

Na tabela 3.2 é possível observar um resumo dos valores *threshold* dos diferentes estágios da presença de albumina na urina, para os três métodos de triagem referidos anteriormente.

Tabela 3.2 - Valores limite das anormalidades na excreção de albumina na urina [48, 42, 50].

Categoria	Amostra pontual de urina (mg/ g creatinina)	Amostra de urina de 24 horas (mg/24 h)	Timed collection (µg/min)
Normal	<30	<30	<20
Microalbuminúria	30-299	30-299	20-199
Albuminúria clínica	≥300	≥300	≥200

Em pacientes com diabetes tipo 1 ou tipo 2, a presença de albumina na urina, além de ser uma das primeiras manifestações de nefropatia, constitui um marcador do grande aumento da morbidez e mortalidade cardiovascular. Assim, a existência de microalbuminúria é uma indicação para a triagem de uma doença cardiovascular e para uma intervenção agressiva de forma a reduzir todos os fatores de risco cardiovascular (e.g. redução do colesterol LDL, terapia anti-hipertensiva, parar de fumar, início da prática de exercício, etc.) [42].

Um outro marcador que, em conjunto com a microalbuminúria, permite avaliar o estado de evolução dos DM, é a concentração de creatinina existente na urina, uma vez que os seus níveis refletem o estado da função renal e muscular. A creatinina é produzida naturalmente pelo organismo e filtrada pelos rins a partir da corrente sanguínea em quantidades relativamente constantes todos os dias [51, 52]. Sendo assim, a existência de falha renal leva a que os valores de creatinina urinária, numa amostra pontual de urina, se encontrem fora dos seguintes intervalos considerados normais: 40-300 mg/dL nos homens e 37-250 mg/dL nas mulheres [53]. É importante referir que a monitorização da creatinina urinária é um método eficiente na determinação do estágio inicial da doença renal crónica [54]. A monitorização da concentração de creatinina urinária e da presença de microalbuminúria permite então avaliar o estado de evolução dos Diabetes Mellitus.

Tal como referido anteriormente, os DM são uma doença crónica que se encontra associada a diversas complicações. Complicações metabólicas agudas, como a cetoacidose, podem ser diferenciadas de complicações crónicas promovidas pelo fraco controlo diabético e pela elevada incidência de episódios hiperglicémicos. Um défice absoluto ou relativo de insulina pode resultar em cetose que na ausência de tratamento pode evoluir para uma cetoacidose, condição patológica grave e por vezes fatal [55].

A Cetoacidose Diabética (CAD) ocorre predominantemente em indivíduos com diabetes tipo 1, mas também pode ocorrer em indivíduos com diabetes tipo 2, sob determinadas circunstâncias. A falta de insulina faz com que o organismo não consiga utilizar a glicose como fonte de energia. Como resposta, o organismo inicia o metabolismo de proteínas e de lípidos para obter energia, formando-se como resultado os corpos cetônicos, que são ácidos fracos. Quando a formação dos corpos cetônicos é intensa, o sangue tende a ficar mais ácido do que o normal, dando origem a uma cetoacidose diabética. Nos adultos, a grande maioria dos doentes tratados por cetoacidose são aqueles nos quais os diabetes já foram diagnosticados. Apenas 10% dos doentes com cetoacidose correspondem a casos que levaram ao diagnóstico dos diabetes. Já em crianças isso não acontece, uma vez que a cetoacidose corresponde ao motivo mais frequente para a detecção da existência de diabetes [55].

Os dois corpos cetônicos mais produzidos pelo organismo são o ácido acetoacético e o ácido β -hidroxibutirato, sendo este último utilizado como fonte de energia quando há ausência de insulina no organismo. Sendo assim, a monitorização do β -hidroxibutirato pode ser utilizada para o diagnóstico da cetoacidose diabética. Não é possível interpretar a quantidade de corpos cetônicos existentes no sangue, sem compará-la com os níveis de glicose e os resultados obtidos para a quantidade de corpos cetônicos e de glicose, existentes no sangue ao longo do tempo. A interpretação do contexto clínico também é essencial, particularmente em crianças (e.g. jejum prolongado, a existência de uma doença concomitante) [55].

Por consenso, uma quantidade de corpos cetônicos presentes no sangue superior a 0,5 mmol/L é considerada anormal. Este valor constitui um valor de *threshold* no que diz respeito ao risco de descompensação. Conseqüentemente, indivíduos hiperglicêmicos tratados com insulina (quantidade de glicose presente no sangue > 250 mg/dL) e cuja quantidade de corpos cetônicos detetada é superior a 0,5 mmol/L, necessitam de um aumento da monitorização com repetição das medições efetuadas, ou mesmo de terapia avançada [55].

Nas populações de risco específico para cetoacidose diabética, este *threshold* pode ter um valor inferior. Portanto, indivíduos tratados com insulina podem beneficiar do início da intervenção para um nível sanguíneo de corpos cetônicos superior a 0,3 mmol/L, em particular, se este valor corresponder a uma determinação pós-prandial. Nas mulheres grávidas, os níveis de corpos cetônicos são interpretados dependendo do estágio da gravidez. Contudo, são necessários estudos específicos para definir as condutas padronizadas para a intervenção. Caso

Capítulo 3

o nível de corpos cetônicos medido se encontre entre 0,5 mmol/L e 3,0 mmol/L, são administradas medidas corretivas baseadas em injeções subcutâneas de insulina de ação rápida ou de um análogo da mesma, de acordo com os protocolos estabelecidos e com a iniciação de monitorização, efetuada hora a hora até à resolução do episódio. No entanto, em certos contextos clínicos pode justificar-se monitorização hospitalar, principalmente se a causa da descompensação persistir ou se esta não puder ser clarificada imediatamente (Tabelas 3.3 e 3.4) [55].

Para um nível de corpos cetônicos no sangue superior a 3,0 mmol/L, mesmo se a hiperglicemia for moderada, a cetoacidose é confirmada e deve ser iniciada uma gestão de emergência apropriada. Um episódio de cetose só é considerado resolvido quando o nível de corpos cetônicos existente no sangue voltar a ser inferior ao valor de *threshold* para intervenção, ou seja, um nível de corpos cetônicos inferior a 0,5 mmol/L ou inferior a 0,3 mmol/L para indivíduos diabéticos que utilizem bomba de insulina [55].

Tabela 3.3 - Algoritmo de decisão baseado no nível de corpos cetônicos existente no sangue de indivíduos diabéticos que utilizam bomba de insulina [55].

Glicose no sangue	Corpos cetônicos no sangue	Recomendação
>250 mg/dL	>0,3 mmol/L e <0,5 mmol/L	Verificação do equipamento utilizado para efetuar a análise; Repetição da medição dos níveis de glicose e corpos cetônicos existentes no sangue 1 hora depois a se necessário a cada hora.
>250 mg/dL	>0,5 mmol/L e <3,0 mmol/L	Intervenção terapêutica corretiva.
>250 mg/dL	>3,0 mmol/L	Emergência médica.

Tabela 3.4 - Algoritmo de decisão baseado no nível de corpos cetônicos existente no sangue de indivíduos adultos/crianças diabéticos tratados com insulina, exceto pacientes com bomba de insulina [55].

Glicose no sangue	Corpos cetônicos no sangue	Recomendação
>250 mg/dL	>0,5 mmol/L e <3,0 mmol/L	Intervenção terapêutica corretiva; Repetição da medição dos níveis de glicose e corpos cetônicos existentes no sangue 1 hora depois e se necessário a cada hora.
>250 mg/dL	> 3,0 mmol/L	Emergência médica.

Geralmente os doentes hospitalizados com cetoacidose diabética aguda apresentam níveis de potássio no sangue normais ou ligeiramente elevados (hipercaliemia), devendo-se estes últimos à saída do potássio do interior das células para o meio extracelular devido à saída da água do interior das células por hiperglicemia ou devido à acidose metabólica. Por outro lado, a utilização de insulina como terapia de correção para um episódio de acidose provoca a entrada de potássio para o espaço intracelular, verificando-se uma rápida diminuição do nível de potássio sanguíneo e uma forte tendência para a ocorrência de um episódio de hipocaliemia [56, 57].

A gama normal de valores para a concentração do potássio sanguíneo é de 3,5 a 5,0 mmol/L (3,5 a 5,0 mEq/L) [56, 58]. Sendo considerada a existência de hipocaliemia para valores de concentração de potássio no sangue inferiores a 3,5 mmol/L e de hipercaliemia para valores superiores a 5,0 mmol/L [57].

De forma a evitar situações de hipocaliemia em pacientes com cetoacidose diabética, a reposição de potássio no organismo deve ser iniciada após os níveis séricos de potássio serem inferiores a 5,5 mmol/L (5,5 mEq/L) e a administração de insulina deve ser adiada até a concentração de potássio ser restabelecida para um valor superior a 3,3 mmol/L (3,3 mEq/L) [57].

Doentes com DM de longa data podem também desenvolver acidose tubular renal tipo IV, o que pode dar origem a problemas de hipercaliemia, pois verifica-se a acumulação de ácido no corpo devido à incapacidade dos rins em acidificar a urina de forma apropriada [56].

3.4 Diagnóstico da Insuficiência Renal

Em termos de progressão da doença, a insuficiência renal pode ser classificada em insuficiência renal aguda ou insuficiência renal crônica. A insuficiência renal aguda é definida pela perda rápida da função renal, anteriormente normal, num período de horas até semanas, sendo que na maioria dos casos, os danos provocados são reversíveis quando resolvidas as causas subjacentes. Das muitas causas possíveis, a diminuição da perfusão renal e a presença de agentes nefrotóxicos são as mais comuns. O principal marcador utilizado para avaliar a insuficiência renal aguda é a taxa de filtração glomerular estimada (eTFG), uma vez que a presença desta doença é responsável por uma queda transitória e assintomática da TFG [59, 60]. Em contraste, a insuficiência renal crônica é definida pela diminuição lenta e progressiva da função renal, num período de meses ou anos, sendo na maioria dos casos os danos causados irreversíveis [60]. Os dois principais marcadores utilizados para avaliar a insuficiência renal crônica são a quantidade de albumina existente na urina e a taxa de filtração glomerular estimada (eTFG) [61, 62].

Tal como referido e explicado na secção 3.3, existem diferentes técnicas para a determinação da quantidade de albumina existente na urina, sendo o cálculo da RAC a mais fidedigna e utilizada atualmente.

A taxa de filtração glomerular (TFG) pode ser estimada a partir da depuração de creatinina ou através da estimativa da depuração de creatinina, baseada nos níveis da creatinina sérica. No entanto, a medição da depuração de creatinina com marcadores exógenos é complexa, dispendiosa e difícil de realizar na prática clínica de rotina [61]. Além disso, estudos científicos têm revelado um erro de medição de 5% a 20% [63, 64, 65], sendo essa variação mais acentuada para valores mais elevados da TFG [63].

Como alternativa ao método anteriormente descrito foram desenvolvidas uma série de expressões para estimar o valor da TFG. Essas equações incluem, para além da creatinina sérica, diversas variáveis como a idade, sexo, raça e volume corporal [61, 62], o que obvia os erros associados à utilização de apenas o valor de creatinina sérica para estimar a TFG. É importante referir que os níveis de creatinina sérica são fortemente dependentes de uma série de fatores como a idade, sexo, raça, massa muscular, dieta alimentar e o uso de determinados medicamentos [66]. Após alguma pesquisa sobre as diferentes expressões existentes, optou-se

por escolher a expressão *Modification of Diet in Renal Disease* (MDRD) devido a esta ter sido extensivamente estudada e amplamente aplicada [62, 63, 67, 68].

O estudo da equação MDRD foi desenvolvido em 1999 recorrendo a dados de 1628 indivíduos com doença renal crónica. A equação estima a taxa de filtração glomerular ajustada à área da superfície do corpo e é representada pela equação 3.1 [62].

$$TFG = 186 \times (S_{cr})^{-1,154} \times (idade)^{-0,203} \times multiplicador \quad (3.1)$$

Onde a concentração da creatinina sérica (S_{cr}) é expressa em mg/dL, a *idade* em anos e o *multiplicador* pode tomar o valor de 0,742 caso o doente seja uma mulher de raça não negra, 1,212 caso o doente seja um indivíduo de raça negra ou 1,0 para os restantes indivíduos. Em 2005 a equação foi reescrita, de forma a poderem-se utilizar testes de creatinina sérica padronizados que produzem valores com um erro 5% mais baixo [61]. A nova equação obtida foi a seguinte:

$$TFG = 175 \times (S_{cr})^{-1,154} \times (idade)^{-0,203} \times multiplicador \quad (3.2)$$

Onde a concentração da creatinina sérica (S_{cr}) é expressa em mg/dL, a *idade* em anos e o *multiplicador* pode tomar o valor de 0,742 caso o doente seja uma mulher de raça não negra, 1,212 caso o doente seja um indivíduo de raça negra ou 1,0 para os restantes indivíduos. O valor obtido para a taxa de filtração glomerular é expresso em ml/min/1,73 m² [61].

A expressão MDRD foi aplicada a um elevado número de populações, incluindo negros, brancos e asiáticos com doença renal não diabética, indivíduos com diabetes e doença renal, indivíduos com diabetes e sem doença renal, destinatários a transplante renal e potenciais dadores de rins. A sua aplicação apresentou resultados razoavelmente precisos em doentes não hospitalizados com conhecimento de possuírem doença renal crónica. No entanto, a expressão MDRD foi relatada em alguns estudos como tendo menor precisão em populações sem doença renal crónica, tais como doentes jovens com diabetes tipo 1 e sem presença de microalbuminúria [61].

Os valores normais da taxa de filtração glomerular, relacionados com a idade, sexo e dimensão corporal são aproximadamente 130 ml/min/1,73 m² nos homens jovens e 120 ml/min/1,73 m² nas mulheres jovens, verificando-se a partir dos 40 anos de idade um decaimento progressivo da TFG com o aumento da idade. A redução da TFG, para um valor

Capítulo 3

inferior a 60 ml/min/1,73 m², é definida como um indicador precoce da presença de doença renal crónica. A gravidade da doença renal crónica pode ser caracterizada através dos seis estágios apresentados na tabela 3.5 [61].

Tabela 3.5 - Estágios da doença renal crónica e respetivos valores da TFG [48, 61].

Estágio da doença renal crónica	Descrição	Valor da taxa de filtração glomerular ml/min/1,73 m²
0	Funcionamento normal do rim (Ausência de microalbuminúria)	>90
1	Dano renal e TFG normal ou aumentada	>90
2	Dano renal e TFG ligeiramente diminuída	60-89
3	TFG com diminuição moderada	30-59
4	TFG com diminuição severa	15-29
5	Falha renal	<15

A creatinina é produzida naturalmente pelo organismo e filtrada pelos rins a partir da corrente sanguínea em quantidades relativamente constantes diariamente [51]. Sendo assim, a existência de falha renal leva a que haja um aumento dos níveis de creatinina existentes no sangue, sendo a sua concentração considerada anormal para valores acima de 1,2 mg/dL em mulheres e 1,4 mg/dL nos homens [54]. É importante referir que a definição destes valores *threshold* é também influenciada pela idade do doente. O facto de só se verificar um aumento dos níveis de creatinina sérica quando ocorre dano nos nefrónios (estrutura microscópica dos rins capaz de eliminar os resíduos resultantes do metabolismo sanguíneo) faz com que este marcador por si só não seja adequado para a deteção da doença renal crónica no seu estágio inicial [54].

Na prática clínica, existem dois níveis de decisão significativa: (1) concentrações de creatinina sérica superiores aos valores acima referidos que indicam a necessidade da realização de um enquadramento clínico do estado do doente, de modo a saber se as alterações são agudas ou crónicas, e a necessidade da realização de outros exames complementares; (2) concentrações de creatinina sérica superiores a 6,0 mg/dL são quase invariavelmente associadas a insuficiência renal grave. É ainda importante referir que mais relevante que o valor

absoluto determinado é o aumento da concentração de creatinina observado em relação ao basal do indivíduo [52, 69].

3.5 Biomoléculas selecionadas para o diagnóstico dos DM e da Função Renal

Depois de recolhida a informação sobre os DM e a Função Renal e sobre quais os principais métodos utilizados para o seu diagnóstico, procedeu-se à planificação do algoritmo de decisão a implementar no dispositivo (algoritmo esse, apresentado e explicado posteriormente na secção 5.3). A construção desse algoritmo contou com o auxílio de dois médicos (Dr. Carlos Capela e Dr. José Mariz), responsáveis por fornecer as informações necessárias sobre quais as biomoléculas que devem ser analisadas pelo dispositivo e qual a ordem em que estas devem ser analisadas, de forma a garantir um diagnóstico fiável e preciso dos DM e da Função Renal. Na tabela 3.6 é apresentado um resumo das biomoléculas, já mencionadas anteriormente neste capítulo, que serão analisadas pelo dispositivo.

Tabela 3.6 - Resumo das biomoléculas que serão analisadas para efetuar o diagnóstico dos DM e da Função Renal.

Biomolécula	Local	Doença
Glicose	Soro	Diabetes Mellitus
Creatinina	Urina	
Albumina	Urina	
Beta-Hidroxiacetato	Soro	
Potássio	Soro	
Creatinina	Soro	Função Renal

3.6 Espectro eletromagnético e espectroscopia

A radiação eletromagnética é uma forma de energia que pode ser descrita por uma onda caracterizada através de um comprimento de onda, uma frequência, uma velocidade e uma amplitude. Em contraste com as ondas sonoras, a radiação eletromagnética não necessita de um meio de suporte para se propagar, conseguindo deslocar-se com facilidade através do vazio. Esta forma de energia pode ser medida através do seu espectro eletromagnético que cobre uma enorme gama de energias e os respetivos comprimentos de onda. Normalmente, a radiação eletromagnética é classificada, conforme o seu comprimento de onda, em Raios Gama, Raios-X, Ultravioleta, Visível, Infravermelho, Micro-ondas e ondas Radio (RF), tal como se pode observar na figura 3.2 [70].

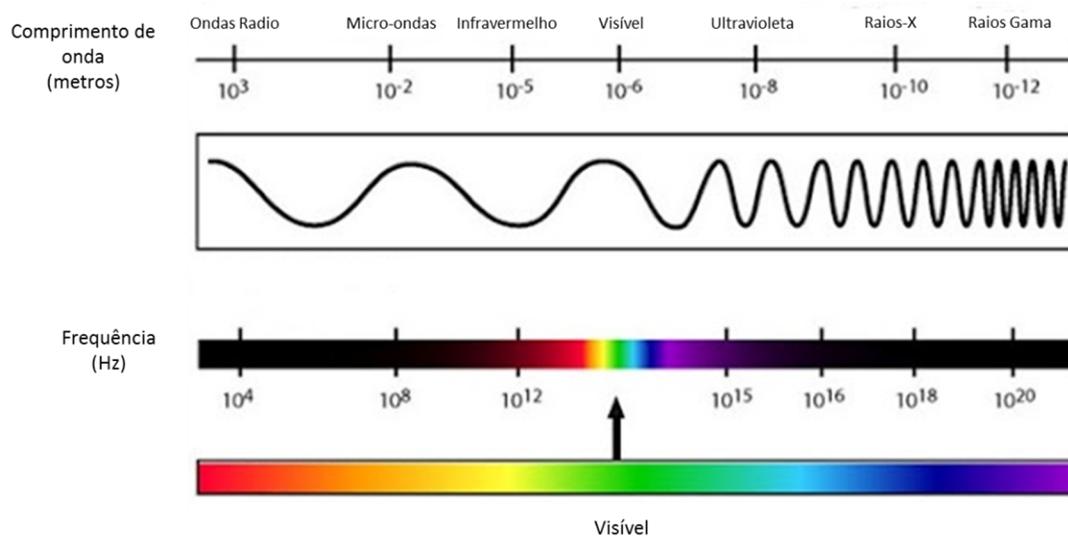


Figura 3.2 - Espectro eletromagnético (Adaptado de [71]).

As medições baseadas na luz e noutras formas de radiação eletromagnética são extremamente utilizadas em análises químicas, sendo o estudo da interação entre a radiação eletromagnética e a matéria designado por espectroscopia. Os diversos métodos utilizados na espectroscopia analítica são baseados na medição da quantidade de radiação produzida ou absorvida pelas espécies moleculares que estão a ser estudadas. Esses métodos podem ser classificados de acordo com a região do espectro eletromagnético envolvida no processo de medição [70].

A detecção da absorvência na região Ultravioleta/Visível é o método de espectroscopia mais utilizado em biologia, engenharia, química analítica, entre outros [70]. Nesta técnica é efetuada a medição da quantidade de luz absorvida pela solução em função do comprimento de onda, utilizando um espectrofotómetro. O espectro resultante revela picos de absorção que podem fornecer informação quantitativa e qualitativa da solução analisada [26].

Em espectroscopia, a lei da absorção também conhecida como lei de Beer-Lambert ou apenas lei de Beer's é definida como uma relação empírica entre a quantidade de luz absorvida e a quantidade de moléculas existentes na amostra que é atravessada pelo feixe de luz. Esta lei mostra que a absorvência (A) é proporcional à concentração (C) das moléculas existentes na amostra que absorvem a luz num dado comprimento de onda, de acordo com a equação 3.3 [72, 73].

$$A = \epsilon l C \quad (3.3)$$

Onde A corresponde à absorvência, ϵ à absorvidade molar ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$), l ao comprimento do caminho ótico atravessado pela luz (cm) e C à concentração do meio absorvente (mol/L). A absorvidade molar é uma propriedade intrínseca das espécies químicas, que apresenta um valor muito elevado para compostos com elevada absorção ($\epsilon > 10.000$) e muito pequeno quando a absorção é fraca ($\epsilon = 10-100$) [72].

Para entender de forma correta a relação entre a quantidade de luz absorvida e a concentração da amostra é importante conhecer o conceito de transmitância. A transmitância (T) é definida como a razão entre a quantidade de luz que atravessa a amostra (luz transmitida) e a quantidade de luz que inicialmente incidiu sobre a amostra (luz incidente). O seu valor pode ser obtido através da equação 3.4 [73, 74].

$$T(\%) = \frac{I_t}{I_0} \times 100 \quad (3.4)$$

Onde I_0 e I_t correspondem às intensidades de luz incidente e transmitida, respetivamente (Figura 3.3). A absorvência (A) encontra-se relacionada com a transmitância (T) de uma forma logarítmica (Equação 3.5) [72].

$$A = -\log_{10} T = \log_{10} \frac{I_0}{I_t} \quad (3.5)$$

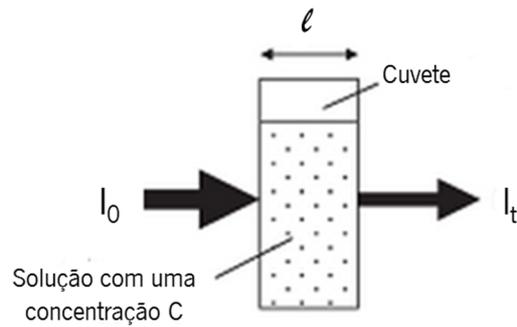


Figura 3.3 - Absorção da luz numa cuvette associada à lei de Beer's (Adaptado de [72]).

Na figura 3.4 observa-se a escala linear da transmitância e a escala logarítmica correspondente da absorvência. Note-se que quando a absorvência de uma solução aumenta, a sua transmitância diminui.

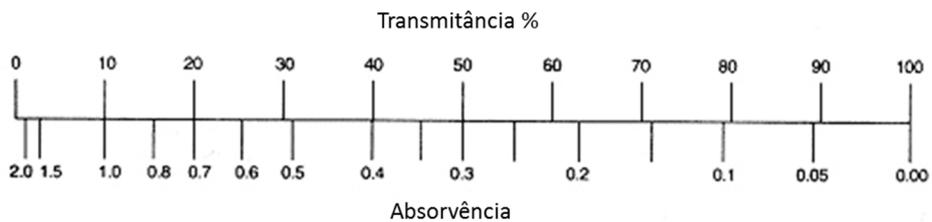


Figura 3.4 - Escala da transmitância e escala logarítmica correspondente da absorvência (Adaptado de [75]).

Capítulo 4 – Seleção dos reagentes e validação dos protocolos

Neste capítulo são apresentados os principais requisitos utilizados na seleção dos reagentes necessários para a determinação quantitativa das diferentes biomoléculas a analisar, os resultados obtidos com os testes desses reagentes, utilizando um sistema ótico equivalente a um espectrofotómetro comercial, e a respetiva discussão desses resultados para posterior planeamento e fabrico do dispositivo POCT.

4.1 Seleção dos reagentes

Depois de definidas as biomoléculas a analisar (tabela 3.6), procedeu-se à seleção dos reagentes necessários para efetuar a sua determinação quantitativa. A seleção dos reagentes mais apropriados para a determinação das biomoléculas envolveu uma série de requisitos: (1) a gama de valores a determinar para cada biomolécula e o local onde esta se encontra (sangue ou urina), pois pretende-se que a determinação quantitativa de cada biomolécula seja feita da forma mais direta possível e sem haver necessidade de diluir a amostra recolhida; (2) o comprimento de onda de deteção de cada biomolécula, uma vez que é fundamental que este se encontre na gama visível do espectro eletromagnético, para permitir que toda a eletrónica envolvida seja bastante mais simples de implementar e ao mesmo tempo mais económica; (3) o tempo que a reação demora a ocorrer, pois pretende-se que este seja o menor possível, de forma a permitir um sistema de análises bastante rápido. Para além dos requisitos acima referidos foram selecionados reagentes com reações *endpoint* e preferencialmente lineares, uma vez que se pretende que a determinação quantitativa da biomolécula presente na amostra seja feita através de um método de comparação com uma concentração conhecida dessa biomolécula (método esse explicado posteriormente na secção 5.4). Uma reação *endpoint* é um tipo de reação que apresenta um ponto de conclusão caracterizado pela ocorrência de uma alteração física da solução, como por exemplo a alteração da cor da mesma [76].

Para o caso da Glicose, Beta-Hidroxibutirato e Potássio foram encontrados, comercialmente disponíveis, reagentes que satisfazem todos os requisitos acima referidos. No

caso da Albumina, de forma a selecionar um reagente adequado para os valores normais da sua concentração presente na urina, não se encontrou comercialmente disponível, um reagente que apresentasse uma reação linear. Sendo assim, teve-se o cuidado de selecionar um reagente que apresentasse um comportamento constante e representável através de uma função, de forma a esta poder ser introduzida no dispositivo para posterior utilização nos cálculos da concentração de biomolécula presente na amostra analisada. Para o caso da Creatinina é necessário efetuar a sua medição no soro e na urina e os valores de concentração esperados são bastante diferentes nos dois locais (tal como referido no capítulo 3). Deste modo, foram selecionados dois reagentes com sensibilidades diferentes, de modo a que a determinação quantitativa da Creatinina em ambos os casos seja feita com a maior sensibilidade possível e sem a necessidade de várias diluições da amostra recolhida. Os dois reagentes selecionados satisfazem todos os requisitos referidos.

No Anexo I encontram-se os diversos protocolos dos reagentes utilizados. Para a realização dos testes óticos apresentados na secção 4.2 e posteriormente com os componentes a incorporar no dispositivo final, utilizou-se o procedimento em cuvette descrito no protocolo de cada reagente. A utilização deste procedimento é adequado, pois no primeiro caso o equipamento utiliza as mesmas cuvetes que os espectrofotómetros comercialmente disponíveis e no segundo caso (dispositivo POCT a implementar) cada compartimento do disco de análise produzido apresenta dimensões semelhantes às cuvetes utilizadas nos espectrofotómetros. Os volumes de reagente e de amostra utilizados em cada análise deste procedimento são diferentes para cada biomolécula e encontram-se indicados nos respetivos protocolos dos reagentes. Durante a realização dos diversos testes experimentais foram respeitados esses volumes indicados.

Antes da realização dos testes procedeu-se à preparação dos reagentes (quando necessário e indicado), seguindo as instruções contidas nos seus protocolos. Prepararam-se, ainda, amostras com diferentes valores de concentração, efetuando-se as diluições necessárias a partir do *standard* (solução com uma concentração conhecida dessa biomolécula) fornecido com cada reagente. No caso do reagente utilizado para a determinação quantitativa da Creatinina na urina foi utilizado como *standard* o nível 2 do Lyphochek Quantitative Urine Control da BIORAD (Anexo I.VII), em vez do *standard* fornecido com o reagente, de forma a obter-se amostras com valores de concentração semelhantes aos da Creatinina na urina.

4.2 Validação dos protocolos com o equipamento ótico existente no laboratório

Realizou-se uma série de testes experimentais com os diferentes reagentes selecionados utilizando o sistema ótico existente no laboratório (Figura 4.1). Esse sistema ótico é constituído por uma fonte de luz (modelo: 66881 da Thermo Oriel), um monocromador (Cornerstone 1/8 m da Newport), um picoamperímetro (modelo: 487 da Keithley), uma fibra ótica (modelo: 77563 da Newport), uma montagem experimental e um sistema de aquisição de dados (software CEC Testpoint). Por sua vez, a parte da montagem experimental (Figura 4.2) inclui a ponta da fibra ótica que transporta o feixe de luz proveniente do monocromador, o fotodíodo (S1336-5BQ da Hamamatsu) e o suporte onde é colocada a cuvete com a amostra que se pretende analisar. Este sistema quando corretamente montado e alinhado é equivalente aos espectrofotómetros disponíveis comercialmente.

A realização dos testes experimentais com esse sistema ótico teve como objetivo determinar para cada um dos reagentes selecionados qual o melhor comprimento de onda a ser utilizado na determinação da concentração de cada biomolécula. Sendo assim, utilizaram-se diferentes concentrações de cada biomolécula, de forma a obter-se os espectros de absorvência para cada uma dessas concentrações ao longo dos diversos comprimentos de onda dentro da gama visível do espectro eletromagnético (380 nm a 750 nm, tal como referido em [77]). Através da análise dos valores de absorvência obtidos é possível identificar o comprimento de onda para o qual se verifica a existência de maior sensibilidade de deteção, ou seja, o comprimento de onda onde existe uma maior diferença entre os valores de absorvência lidos para as diferentes concentrações da biomolécula.

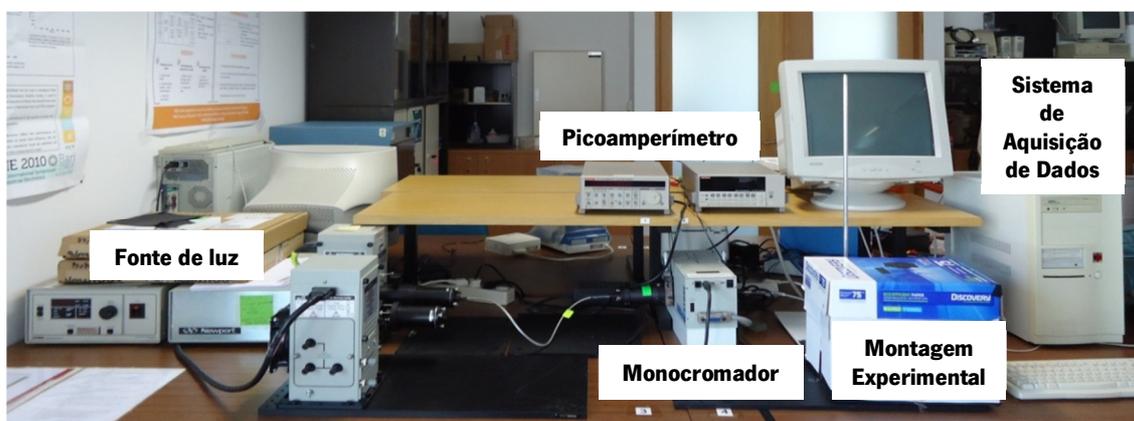


Figura 4.1 - Visão geral do sistema ótico existente no laboratório.

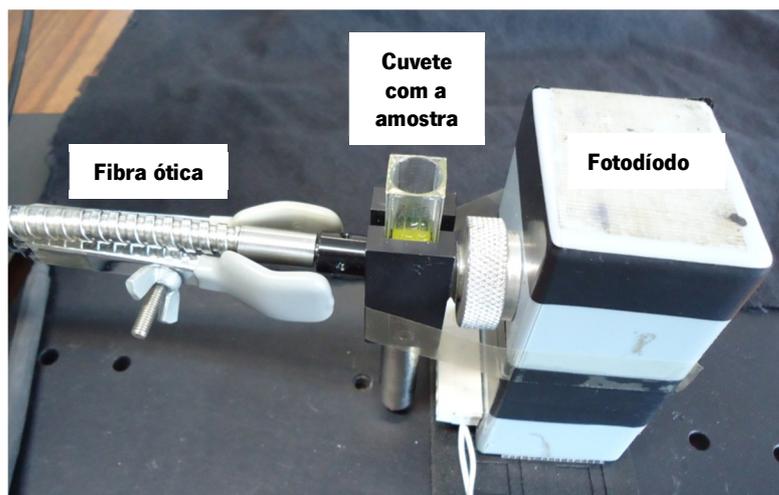


Figura 4.2 - Componentes constituintes da montagem experimental.

4.2.1 Resultados obtidos

Seguidamente apresentam-se os resultados obtidos de absorção ótica, para as seis biomoléculas a analisar (ver tabela 3.6), com o sistema ótico descrito anteriormente. Na secção seguinte far-se-á uma discussão desses resultados. Na realização de todos os testes experimentais foi tido em conta a gama de concentrações normal e anormal para cada biomolécula. Cada concentração diferente foi testada cinco vezes, sendo, nos resultados, apresentada uma média desses cinco testes. Os resultados encontram-se organizados por biomolécula e na seguinte ordem: Glicose, Albumina, Beta-Hidroxi-butirato, Potássio, Creatinina no soro e Creatinina na urina, sendo apresentados dois gráficos para cada uma delas. O primeiro gráfico apresenta os espectros de absorvência obtidos para as diferentes concentrações de amostra utilizada, ao longo da gama visível do espectro eletromagnético e o segundo gráfico apresenta os valores discretos de absorvência obtidos para as diferentes concentrações no comprimento de onda de deteção selecionado após a análise do primeiro gráfico. Este segundo gráfico corresponde à curva de calibração do método.

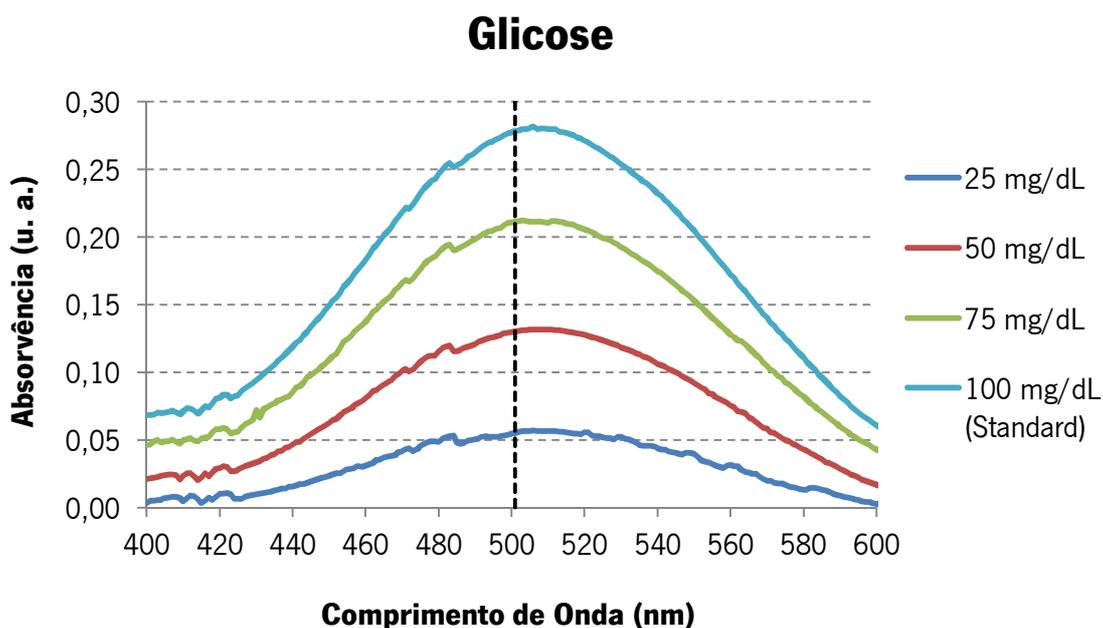


Figura 4.3 - Espectros de absorvência obtidos para as diferentes concentrações de Glicose.

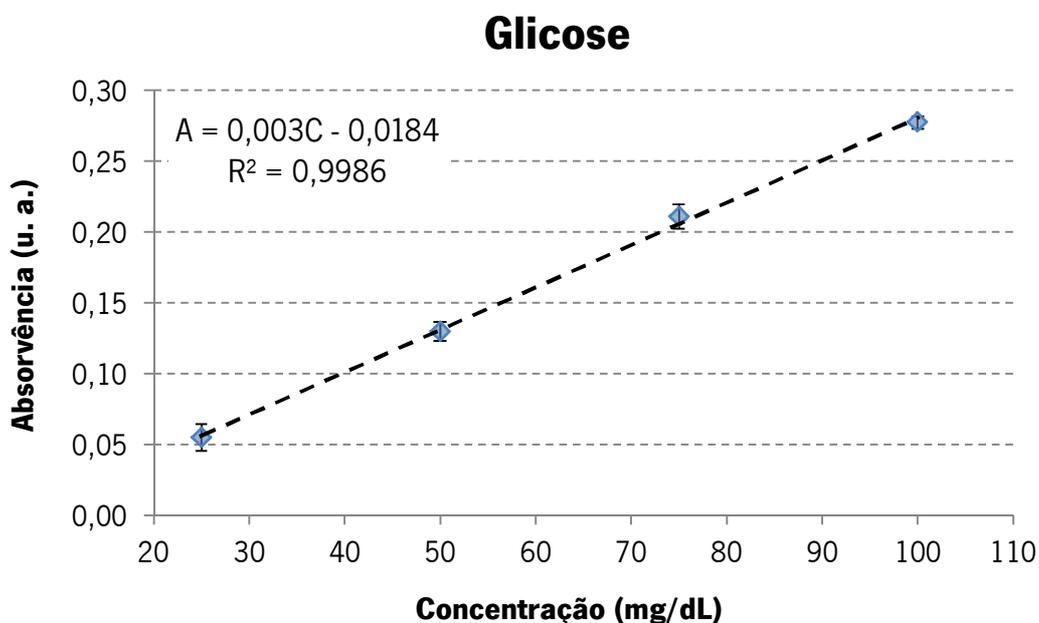


Figura 4.4 - Valores discretos de absorvência em função das diferentes concentrações de Glicose para o comprimento de onda de 501 nm.

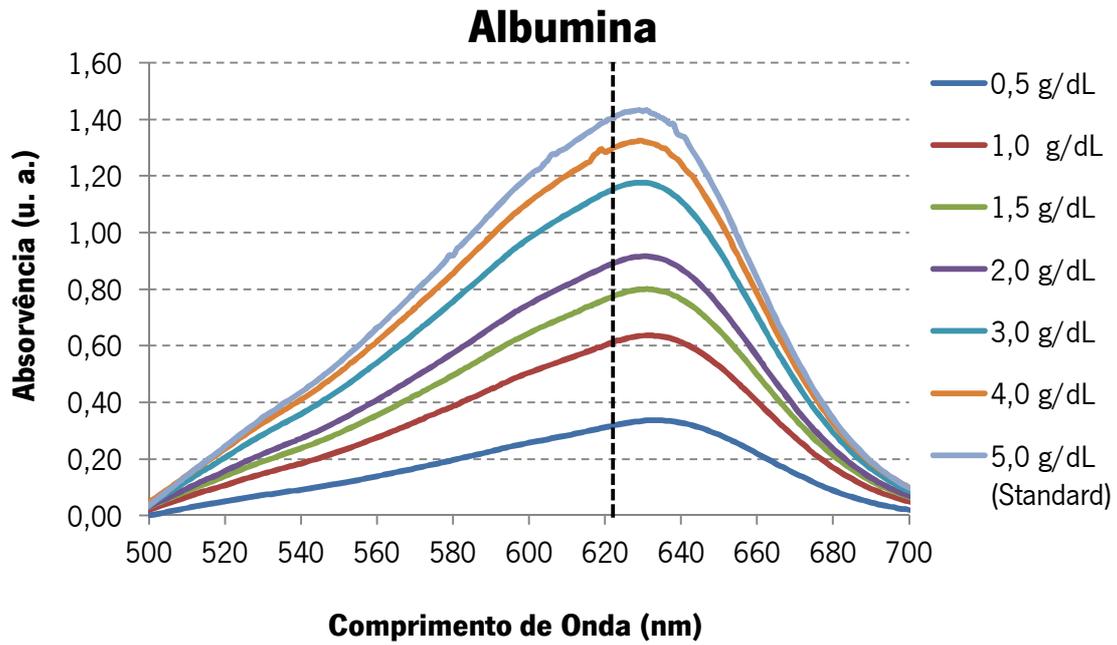


Figura 4.5 - Espectros de absorvência obtidos para as diferentes concentrações de Albumina.

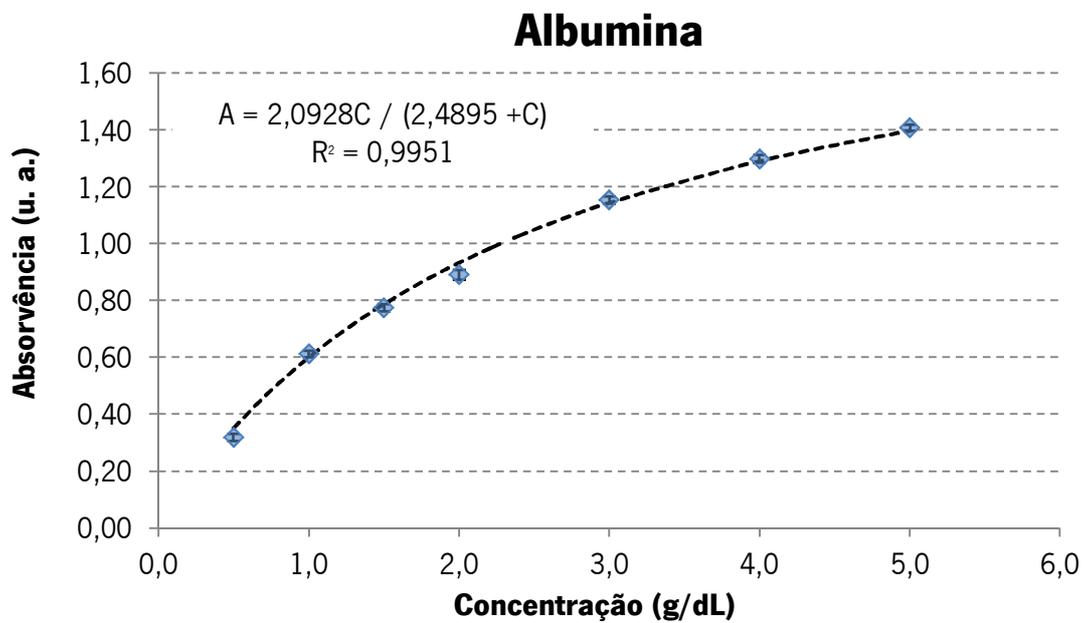


Figura 4.6 - Valores discretos de absorvência em função das diferentes concentrações de Albumina para o comprimento de onda de 622 nm.

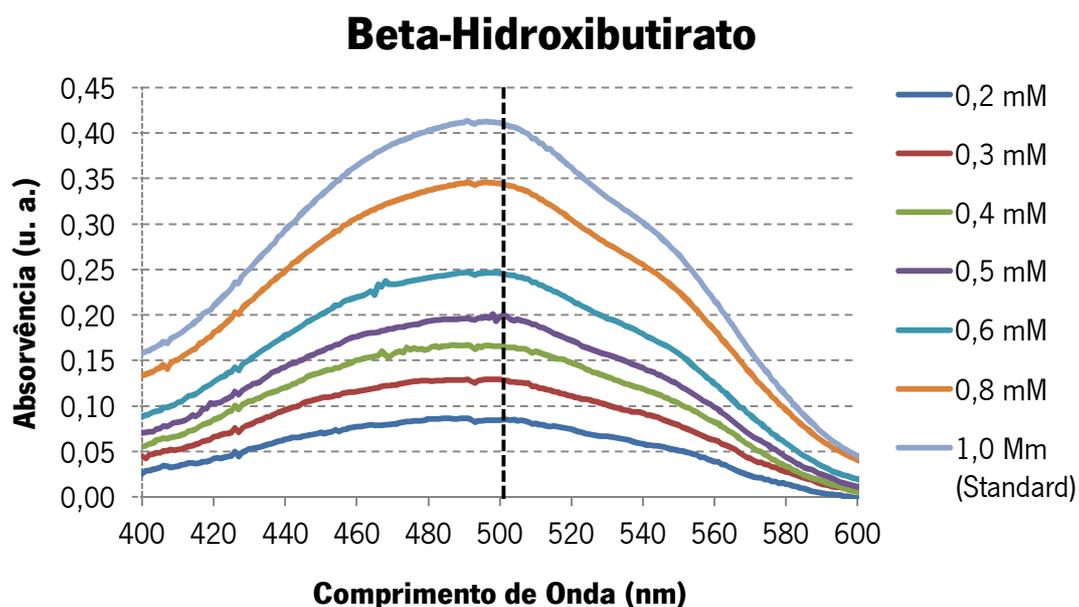


Figura 4.7 - Espectros de absorvência obtidos para as diferentes concentrações de Beta-Hidroxibutirato.

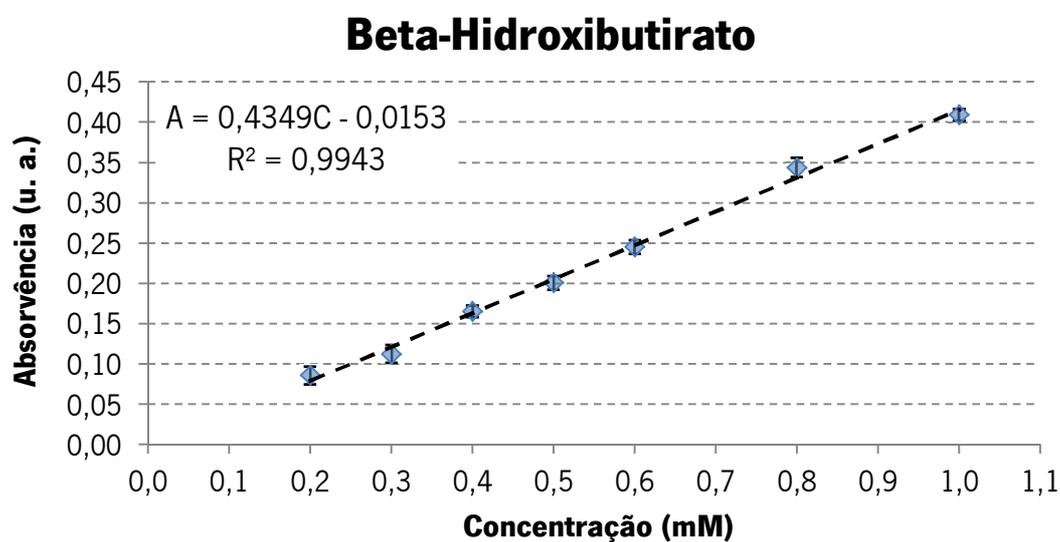


Figura 4.8 - Valores discretos de absorvência em função das diferentes concentrações de Beta-Hidroxibutirato para o comprimento de onda de 501 nm.

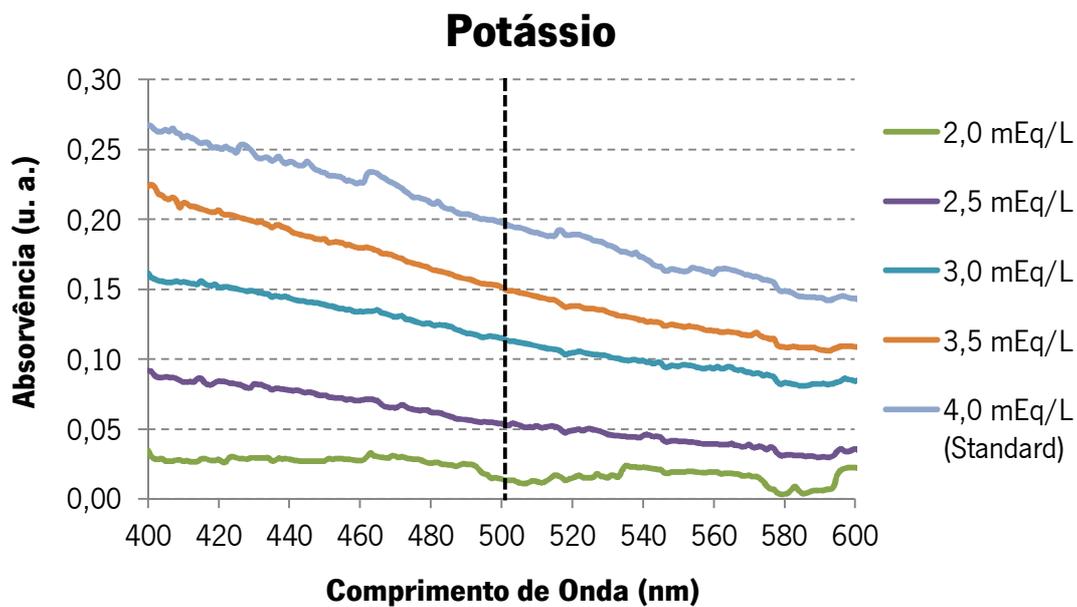


Figura 4.9 - Espectros de absorvência obtidos para as diferentes concentrações de Potássio.

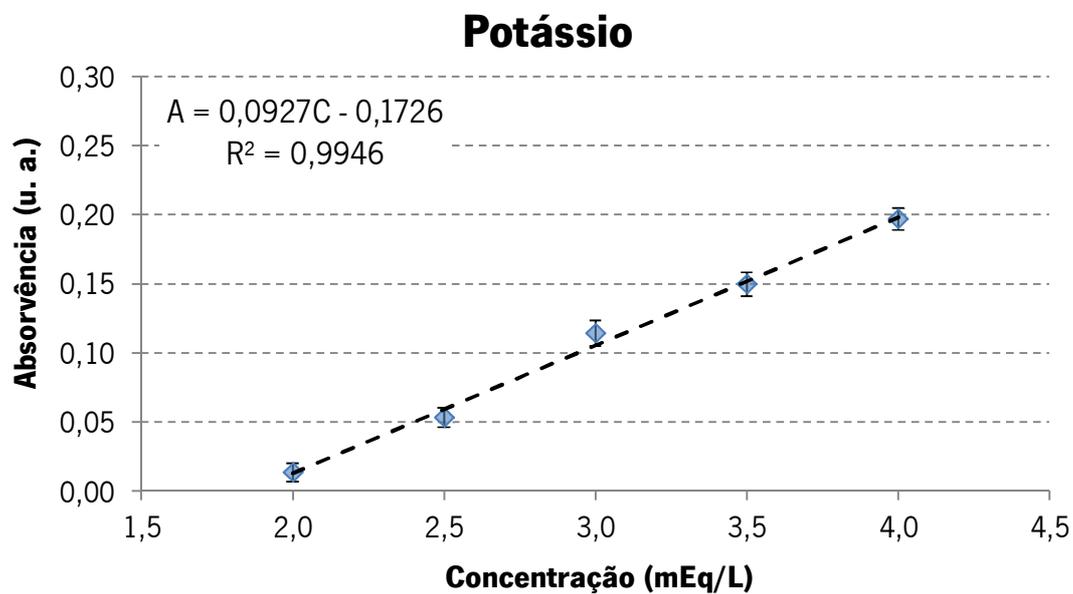


Figura 4.10 - Valores discretos de absorvência em função das diferentes concentrações de Potássio para o comprimento de onda de 501 nm.

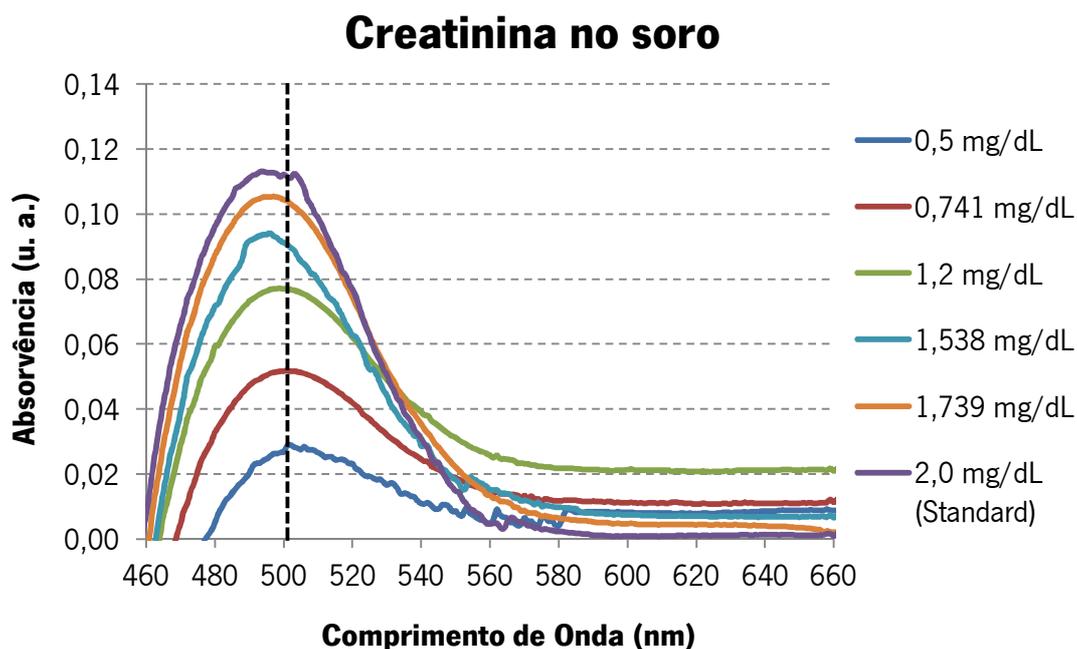


Figura 4.11 - Espectros de absorvência obtidos para as diferentes concentrações de Creatinina no soro.

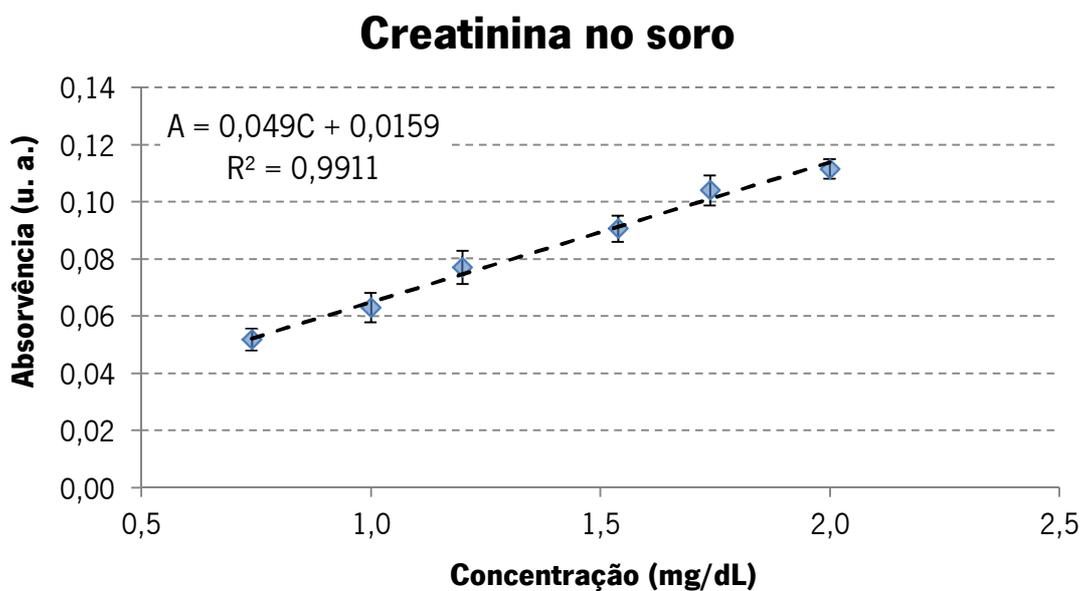


Figura 4.12 - Valores discretos de absorvência em função das diferentes concentrações de Creatinina no soro para o comprimento de onda de 501 nm.

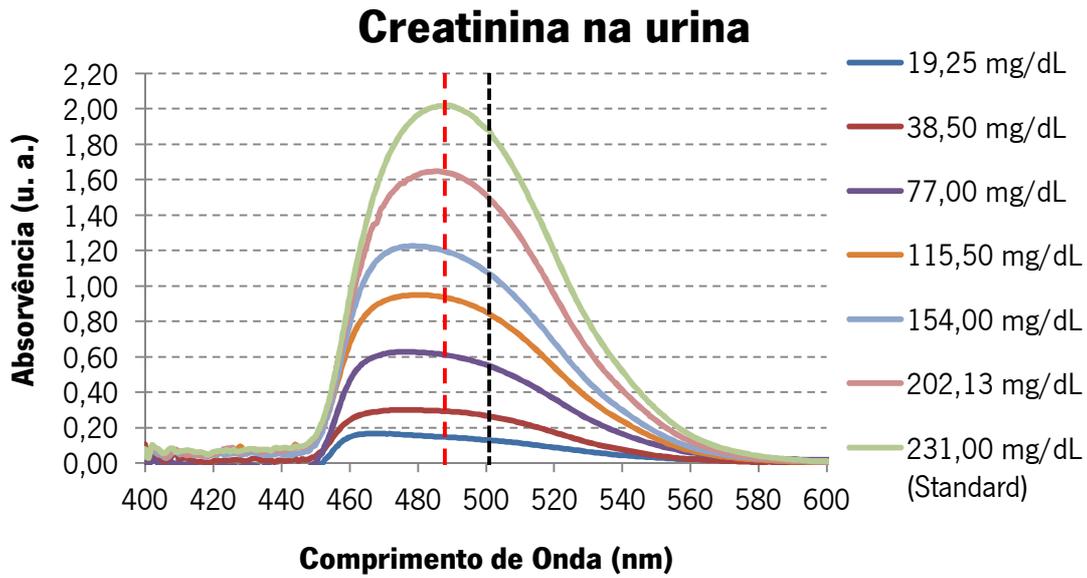


Figura 4.13 - Espectros de absorvência obtidos para as diferentes concentrações de Creatinina na urina.

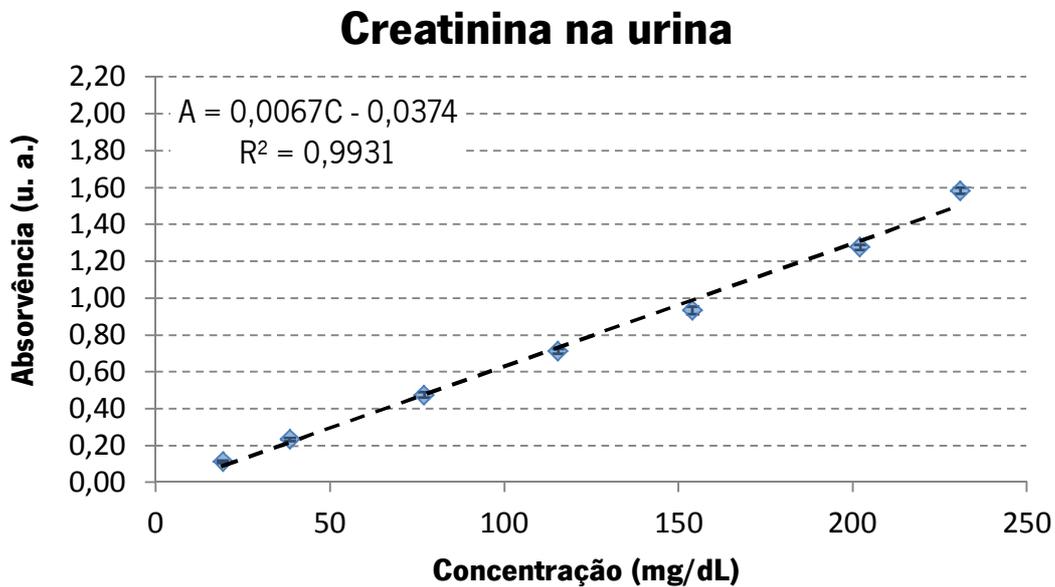


Figura 4.14 - Valores discretos de absorvência em função das diferentes concentrações de Creatinina na urina para o comprimento de onda de 501 nm (a seleção deste comprimento de onda como sendo o ideal, encontra-se explicada na secção seguinte).

4.2.2 Discussão de resultados

As curvas apresentadas nos gráficos das figuras 4.3, 4.5, 4.7, 4.11 e 4.13, correspondentes à análise da Glicose, Albumina, Beta-Hidroxi-butarato, Creatinina no soro e Creatinina na urina, respetivamente, estão de acordo com as curvas características de uma reação colorimétrica, ou seja, apresentam um pico a um determinado comprimento de onda para o qual a reação do reagente com a amostra exibe uma maior absorvência [78]. No caso da figura 4.9, correspondente à análise do Potássio, o gráfico obtido é diferente dos referidos anteriormente, pois para este reagente não se verifica a ocorrência de uma reação colorimétrica mas apenas a formação de turbulência na solução. Essa turbulência varia conforme a concentração de biomolécula existente na amostra, ou seja, quanto maior for a concentração de Potássio presente na amostra, maior é a turbulência formada e maior é o valor de absorvência. Sendo assim, as curvas obtidas não apresentam um pico para o comprimento de onda de deteção, sendo aproximadamente paralelas entre si e apresentando diferentes valores de absorvência para diferentes valores de concentração de Potássio presente em solução.

Analisando as curvas obtidas para as diferentes concentrações de Glicose, Beta-Hidroxi-butarato e Creatinina no soro conclui-se que o melhor comprimento de onda para a deteção das diferentes concentrações destas biomoléculas encontra-se na zona dos 500 nm. No caso do Potássio, devido ao facto das curvas obtidas não apresentarem um pico, uma vez que a reação não é colorimétrica, para além de se analisar a zona onde se verifica um maior afastamento entre as curvas obtidas (zona de maior sensibilidade de deteção) teve-se também em consideração quer o comprimento de onda de deteção indicado no protocolo fornecido com o reagente, quer os picos de emissão dos LED's disponíveis comercialmente. Sendo assim, escolheu-se os 501 nm como o comprimento de onda a ser utilizado na deteção das quatro biomoléculas referidas.

De forma a confirmar se o pico de emissão a 501 nm (pico do LED que se pretende utilizar e cujas especificações serão apresentadas posteriormente no capítulo 5) é adequado para ser utilizado no dispositivo final, procedeu-se ao estudo da linearidade dos reagentes escolhidos para essas biomoléculas e para esse comprimento de onda. Para esse estudo seleccionou-se os valores de absorvência a 501 nm para as diferentes concentrações de cada uma das cinco biomoléculas. Esses valores foram obtidos a partir dos dados contidos nas curvas dos gráficos apresentados nas figuras 4.3, 4.7, 4.9 e 4.11. Através da análise das curvas de

linearidade obtidas (Figuras 4.4, 4.8, 4.10 e 4.12) pode concluir-se que esse comprimento de onda é adequado para a determinação quantitativa das diferentes concentrações de biomolécula presente numa dada amostra, uma vez que os coeficientes de determinação (R^2) são todos superiores a 0,99. Sendo assim, os reagentes selecionados apresentam uma boa linearidade nesse comprimento de onda.

Analisando as curvas obtidas para as diferentes concentrações de Creatinina na urina, observa-se que o comprimento de onda para a máxima absorvência encontra-se entre os 480 e 490 nm (linha vermelha a tracejado no gráfico da figura 4.13). Em virtude da não existência de LED's comercialmente disponíveis para essa gama e devido à largura do pico de deteção obtido (cerca de 50 nm), escolheu-se o comprimento de onda de 501 nm como comprimento de onda de deteção. Esta seleção deveu-se principalmente ao facto de este valor corresponder ao pico de emissão dos LED's comercialmente disponíveis, mais próximo da gama pretendida e também pelo facto de ele já ser utilizado para a análise das quatro biomoléculas referidas anteriormente, o que pode simplificar o projeto do dispositivo final. Sendo assim, de forma a verificar se este comprimento de onda pode ser utilizado no processo de deteção, procedeu-se ao estudo da linearidade do reagente a 501 nm. O método utilizado neste estudo foi o mesmo que foi utilizado para as biomoléculas anteriores, sendo neste caso, os valores de absorvência para as diferentes concentrações de Creatinina na urina selecionados a partir dos dados contidos nas curvas do gráfico apresentado na figura 4.13. Analisando a curva de linearidade obtida (Figura 4.14) pode concluir-se que o comprimento de onda de 501 nm pode ser utilizado na determinação quantitativa da Creatinina presente na urina e que o reagente apresenta uma boa linearidade nesse comprimento de onda, pois o valor obtido para o coeficiente de determinação (R^2) é superior a 0,99.

No caso da Albumina, analisando as curvas obtidas para as suas diferentes concentrações, observa-se que o comprimento de onda para o qual se obtém o valor máximo de absorvência encontra-se na zona dos 620 nm. Sendo assim, selecionou-se os valores de absorvência obtidos a 622 nm para as diferentes concentrações de amostra utilizadas, de forma a estudar-se o comportamento do reagente nesse comprimento de onda. A escolha do comprimento de onda de 622 nm realizou-se, também, tendo em consideração a existência de um LED comercialmente disponível cujo pico de emissão se encontra a 622 nm (as especificações deste LED são também apresentadas no capítulo 5). Neste caso, ao contrário das

biomoléculas anteriores não se procedeu ao estudo da linearidade do reagente no comprimento de onda de deteção selecionado, mas sim ao estudo do comportamento do reagente nesse comprimento de onda, pois, tal como referido anteriormente, o reagente escolhido para a determinação quantitativa da Albumina presente na urina não apresenta um comportamento linear. Analisando a curva obtida para o comportamento do reagente a 622 nm (Figura 4.6), observa-se que o reagente apresenta um comportamento que é representado através de uma função racional exposta na figura. Esta função racional foi obtida a partir da adaptação da equação descrita no respetivo protocolo (Anexo I.III) aos valores de absorvência obtidos nos testes experimentais realizados. Além disso, pode concluir-se que o comprimento de onda de 622 nm é adequado para a determinação das diferentes concentrações de Albumina presentes na amostra, pois o valor do coeficiente de determinação (R^2) é superior a 0,99.

Os resultados obtidos permitem concluir que, para as seis biomoléculas, os comprimentos de onda obtidos experimentalmente como sendo os adequados para a determinação quantitativa das biomoléculas, estão de acordo com os comprimentos de onda referidos nos respetivos protocolos (Anexo I). Esta informação encontra-se sumariada na tabela 4.1. Para a Glicose, Albumina, Beta-hidroxiacetato e Potássio observa-se que os comprimentos de onda obtidos são praticamente iguais aos fornecidos nos respetivos protocolos. No caso da Creatinina no soro, embora o comprimento de onda obtido seja ligeiramente diferente do fornecido no protocolo, este encontra-se dentro da gama de comprimentos de onda indicada. Por fim, para a Creatinina na urina obteve-se uma maior diferença entre o comprimento de onda obtido e o fornecido no protocolo devido ao facto de ter sido utilizado outro *standard* que não o fornecido pelo reagente, pelos motivos descritos na secção 4.1.

Tabela 4.1 - Valores referidos nos protocolos e obtidos experimentalmente para os comprimentos de onda de detecção das diversas biomoléculas analisadas.

Biomolécula	Comprimento de onda de detecção (nm)	
	Referido no protocolo	Obtido experimentalmente
Glicose	500 (460-560)	501
Albumina	620	622
Beta-Hidroxibutirato	505	501
Potássio	500	501
Creatinina no soro	490 (490-510)	501
Creatinina na urina	520	501

Analisando as curvas de calibração obtidas, verifica-se que estas estão de acordo com os resultados esperados e descritos nos respetivos protocolos (Anexo I). O comportamento linear e os valores de R^2 obtidos para os reagentes da Glicose, Beta-Hidroxibutirato, Potássio, Creatinina no soro e Creatinina na urina permitem concluir que as escolhas dos comprimentos de onda de detecção são adequadas e que o método pode ser utilizado para o projeto do dispositivo. No caso da Albumina esta conclusão é de igual modo válida, uma vez que obteve-se um comportamento semelhante a uma função racional, tal como referido no protocolo, e um valor de R^2 bastante próximo do apresentado no respetivo protocolo (Anexo I.III).

Capítulo 5 – Projeto do dispositivo

Neste capítulo é exibida toda a planificação do dispositivo POCT implementado, sendo apresentadas e explicadas as principais características que levaram à seleção dos diversos componentes utilizados, os testes realizados com esses componentes, a metodologia implementada para realizar uma análise e o algoritmo de decisão implementado no dispositivo.

5.1 Caracterização dos LED's e dos fotodíodos

O projeto do dispositivo envolveu a seleção das fontes de iluminação mais adequadas para a análise de cada biomolécula e que simultaneamente cumprissem os requisitos necessários aos objetivos do dispositivo. Com os testes experimentais apresentados no capítulo 4 obtiveram-se os comprimentos de onda mais adequados à análise das seis biomoléculas: 501 nm e 622 nm. Selecionaram-se assim, dois LED's que produzissem uma eficiência máxima nesses comprimentos de onda. O LED cujo pico de emissão é a 501 nm é um dispositivo de montagem superficial (SMD), do fabricante Toshiba e tem a seguinte referência: TLGTE1100B (T11). As diversas características necessárias para a utilização deste LED, tais como a tensão/corrente de alimentação, comprimento de onda do pico de emissão, intensidade luminosa, dimensões do LED e ângulo de visão, são fornecidas pelo seu *datasheet* [79]. O valor do comprimento de onda do pico de emissão do LED foi confirmado experimentalmente, através da análise do espectro de emissão de luz do LED (Figura 5.1) na gama dos 400 a 600 nm. Esse espectro foi adquirido utilizando o sistema ótico existente no laboratório, descrito na secção 4.2, substituindo a fonte de luz do sistema pelo LED a analisar (Figura 5.2).

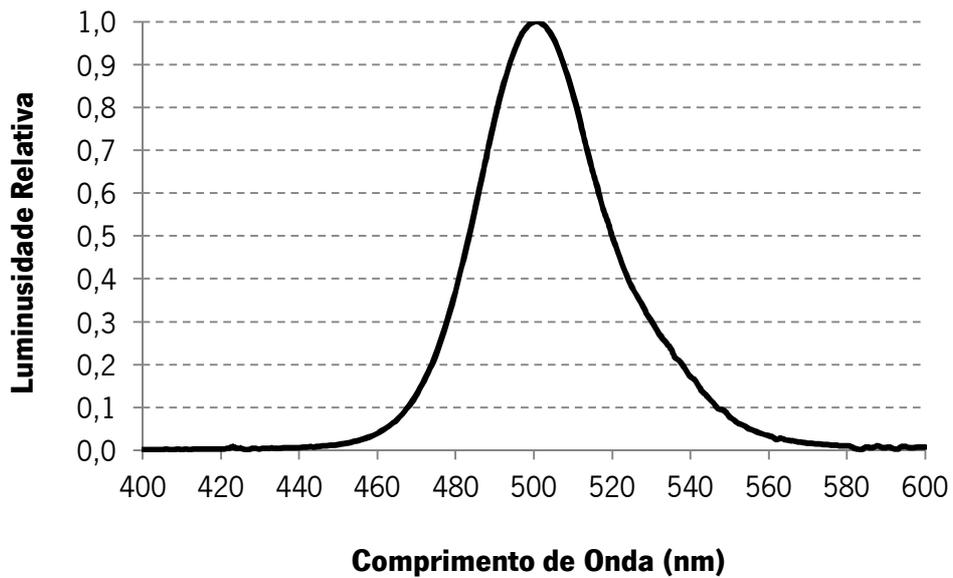


Figura 5.1 - Valores da luminosidade relativa em função do comprimento de onda para o LED TLGTE1100B (T11).

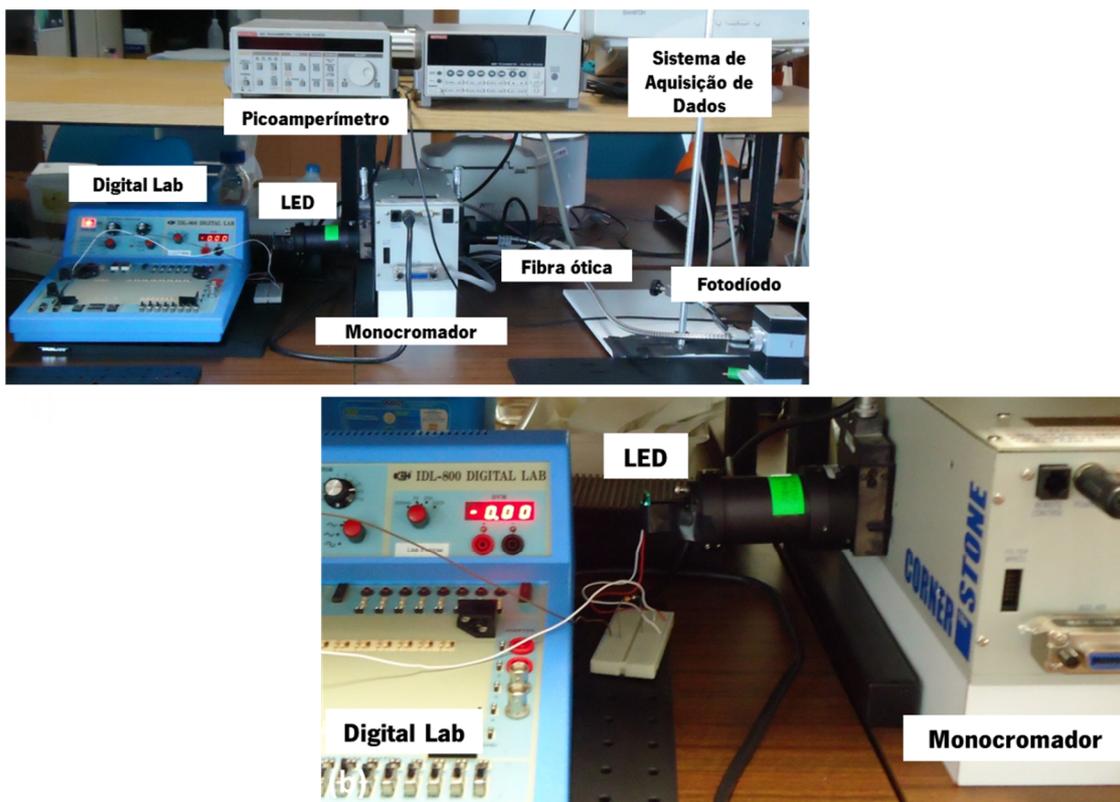


Figura 5.2 - (a) Visão geral do sistema óptico existente no laboratório, com a fonte de luz do sistema substituída pelo LED a analisar; (b) Visão detalhada do LED à entrada do monocromador.

Analisando os valores da luminosidade relativa apresentados no gráfico da Figura 5.1, conclui-se que o pico de emissão do LED encontra-se nos 501 nm e que a sua largura espectral é de 36 nm. A largura espectral, em termos de variação de comprimento de onda, corresponde ao intervalo de pontos em que o valor de corrente obtido desce até metade do seu valor máximo [80]. A realização desta análise teve como objetivo confirmar se o valor do comprimento de onda do pico de emissão do LED é o mesmo que o indicado no seu *datasheet*, uma vez que esse valor constituiu um dos fatores fundamentais para a seleção do LED a utilizar. Comparando o espectro de emissão obtido com a informação contida no *datasheet*, observa-se que o comprimento de onda do pico de emissão obtido (501 nm) é bastante próximo do indicado (496 nm). Quanto ao valor obtido para a largura espectral (36 nm), este também se encontra próximo do valor indicado no *datasheet* (30 nm). Estas ligeiras diferenças devem-se ao facto de ser utilizado outro equipamento diferente do que foi utilizado para a obtenção das curvas apresentadas no *datasheet*, e no qual a sua calibração relativamente aos comprimentos de onda de referência pode encontrar-se ligeiramente desviada. Contudo, isto não afetará nem põe em causa o projeto do dispositivo, uma vez que os valores são bastante próximos e encontram-se dentro da tolerância do equipamento ($< 0.5\%$).

O LED com o pico de emissão a 622 nm é um LED do tipo SMD, do fabricante Avago Technologies e tem a seguinte referência: HSMV-A100-T00J1. As características necessárias para a utilização deste LED, referidas anteriormente, são também fornecidas pelo seu *datasheet* [81]. Tal como para o LED anterior, o valor de 622 nm foi obtido através da análise do espectro de emissão de luz do LED (Figura 5.3) na gama dos 500 a 700 nm. Esse espectro de emissão foi obtido pelo mesmo método utilizado para o LED anterior.

Analisando os valores da luminosidade relativa apresentados no gráfico da figura 5.3, conclui-se que o pico de emissão do LED encontra-se nos 622 nm e que a sua largura espectral é de 23 nm. A realização desta análise teve como objetivo confirmar se o valor do comprimento de onda do pico de emissão do LED é o mesmo que o indicado no *datasheet*, pois tal como no caso anterior, o conhecimento exato deste valor é fundamental para o desenvolvimento do projeto. Comparando o espectro de emissão obtido com a informação contida no *datasheet* observa-se que o valor do comprimento de onda de emissão obtido (622 nm) é praticamente o mesmo que o indicado (623 nm). Não é possível fazer uma comparação do valor obtido para a largura espectral, uma vez que o valor teórico não é fornecido pelo *datasheet* do LED.

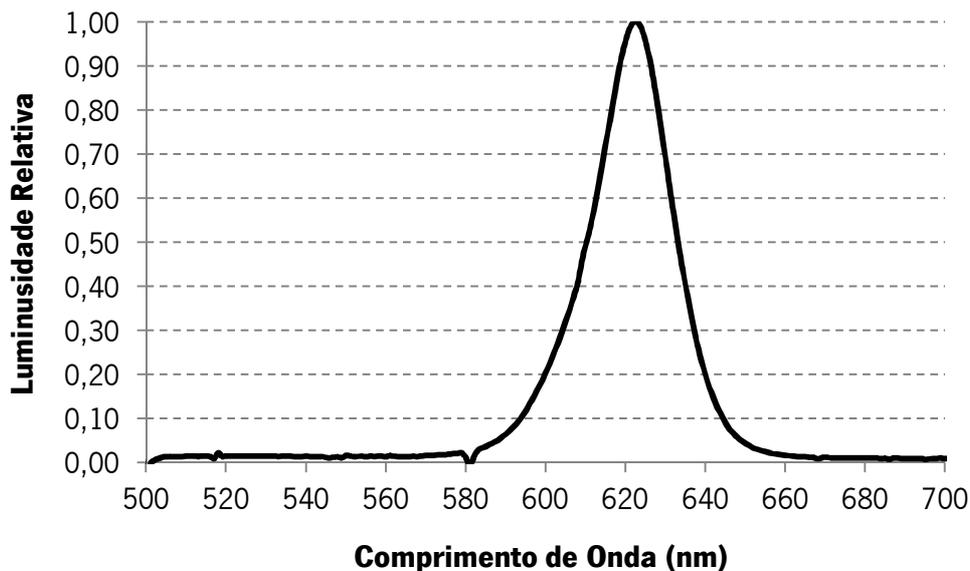


Figura 5.3 - Valores da luminosidade relativa em função do comprimento de onda para o LED HSMV-A100-T00J1.

De forma a efetuar a leitura da intensidade de luz que atravessa a amostra em análise selecionou-se um fotodíodo com os requisitos necessários para ser utilizado no dispositivo a implementar. O fotodíodo selecionado é um sensor ótico luz-tensão, que combina um fotodíodo e um amplificador de transimpedância num único circuito integrado. É um SMD da Texas Advanced Optoelectronic Solutions (TAOS), com a referência: TSL250RD. A escolha deste fotodíodo foi feita tendo em consideração uma série de características necessárias para a implementação do dispositivo final. Uma das características mais importantes que foi considerada foi a resposta espectral do fotodíodo entre os 400 e 700 nm, zona onde se encontram os comprimentos de onda a analisar, que como se pode observar pela informação contida no seu *datasheet* [82] é aproximadamente linear e superior a 0,5 nessa zona. Outro aspeto importante é o facto de a saída ser em tensão, o que faz com que não seja necessário implementar a conversão de corrente para tensão. Sendo assim, a saída em tensão é diretamente proporcional à intensidade de luz que incide no fotodíodo e pode ser lida diretamente através de um microcontrolador. Outras características consideradas foram as dimensões, tensão de alimentação, limites da tensão de saída e a área ativa do fotodíodo, todas indicadas no seu *datasheet*.

5.2 Testes experimentais com os LED's e o fotodíodo

Antes do fabrico do dispositivo foi necessário validar a utilização dos LED's e fotodíodo selecionados na determinação quantitativa das seis biomoléculas a analisar, verificando-se se os resultados obtidos com eles estão de acordo com os obtidos anteriormente e apresentados na secção 4.2. Sendo assim, realizou-se uma série de testes para as seis biomoléculas utilizando o fotodíodo e os LED's descritos na secção anterior. A realização destes testes teve ainda como objetivo verificar se a linearidade dos reagentes se mantinha e se o fotodíodo escolhido tem resolução suficiente para conseguir distinguir as diferentes concentrações de biomolécula a determinar. Com a realização destes testes pretendeu-se ainda determinar quais os limites máximo e mínimo dos valores de concentração para os quais os diferentes reagentes selecionados mantinham a sua linearidade. Cada concentração diferente foi testada cinco vezes, sendo, nos resultados, apresentada uma média desses cinco testes e os respetivos desvios padrão obtidos.

Para a realização dos testes efetuou-se uma montagem experimental composta pelo LED, fotodíodo, resistência e pelo suporte onde se coloca a cuvette com a amostra a analisar (Figura 5.4), procedendo-se ao correto alinhamento do fotodíodo com o LED e com o suporte antes de se efetuar as medições. A utilização da resistência em série com o LED é fundamental para controlar a corrente e a tensão de alimentação do LED, garantindo assim, que este não se danifica. O valor da resistência a utilizar para os dois LED's (501 nm e 622 nm) foi determinado com base nas informações sobre a corrente e tensão admissíveis para a sua alimentação, contidas nos respetivos *datasheet's*. Além disso, considerou-se o facto da intensidade luminosa dos LED's não saturar o fotodíodo, ou seja, garantiu-se que quando se efetua a medição ótica do reagente de cada biomolécula, correspondente ao maior valor de tensão obtido no fotodíodo, este encontra-se abaixo do valor de saturação do mesmo. Sendo assim, o valor obtido para a resistência a utilizar para ambos os LED's foi de 33 Ω .

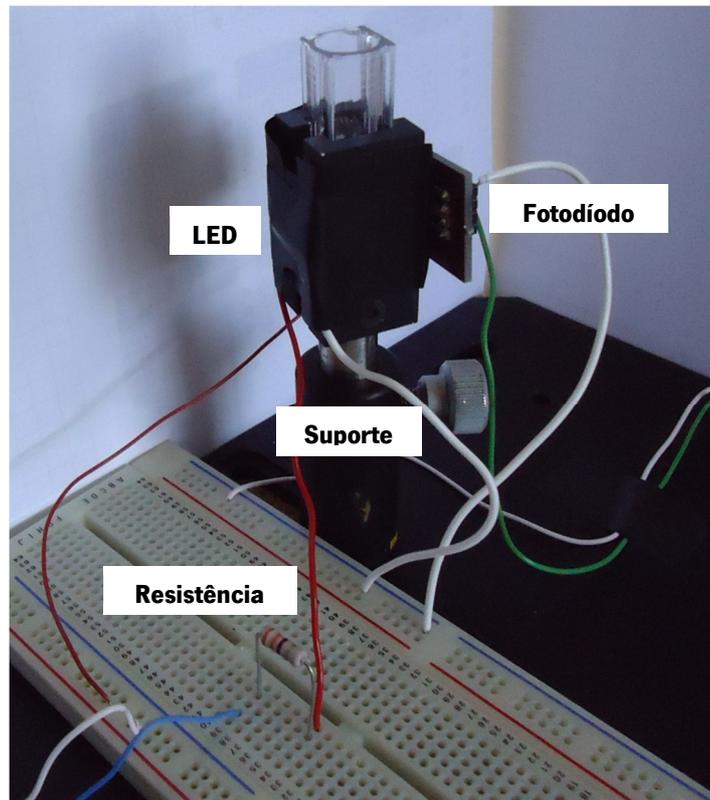


Figura 5.4 - Montagem experimental.

Seguidamente apresentadam-se os resultados obtidos para a Glicose (Figura 5.5), Beta-Hidroxibutirato (Figura 5.6), Potássio (Figura 5.7), Creatinina no soro (Figura 5.8) e Creatinina na urina (Figura 5.9), cujas análises foram realizadas utilizando o LED de 501 nm.

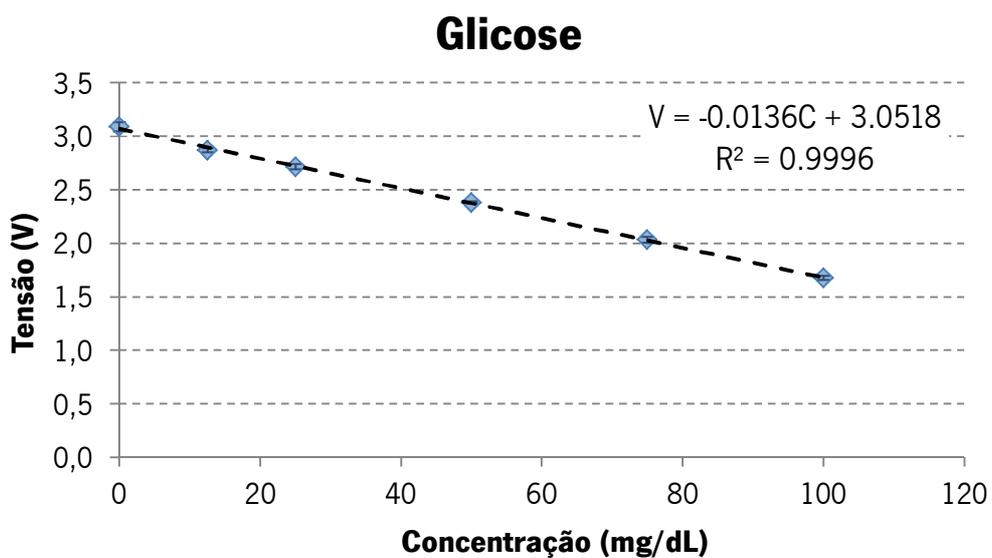


Figura 5.5 - Valores discretos de tensão em função das diferentes concentrações de Glicose para o comprimento de onda de 501 nm.

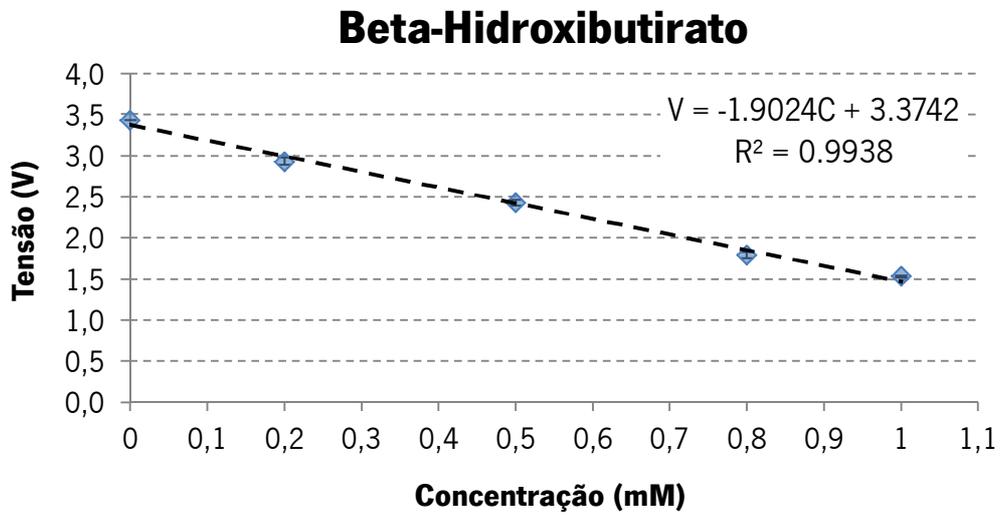


Figura 5.6 - Valores discretos de tensão em função das diferentes concentrações de Beta-Hidroxibutirato para o comprimento de onda de 501 nm.

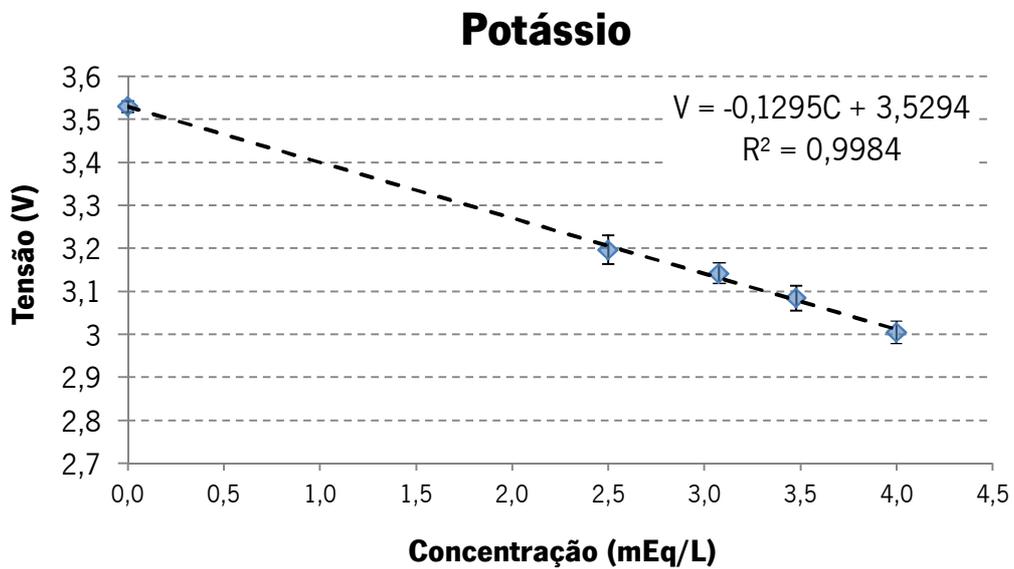


Figura 5.7 - Valores discretos de tensão em função das diferentes concentrações de Potássio para o comprimento de onda de 501 nm.

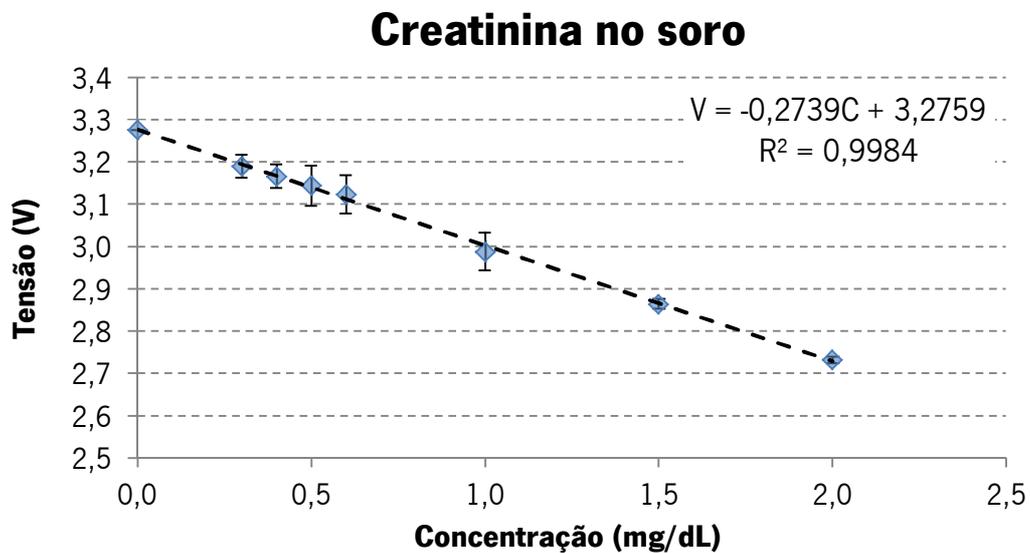


Figura 5.8 - Valores discretos de tensão em função das diferentes concentrações de Creatinina no soro para o comprimento de onda de 501 nm.

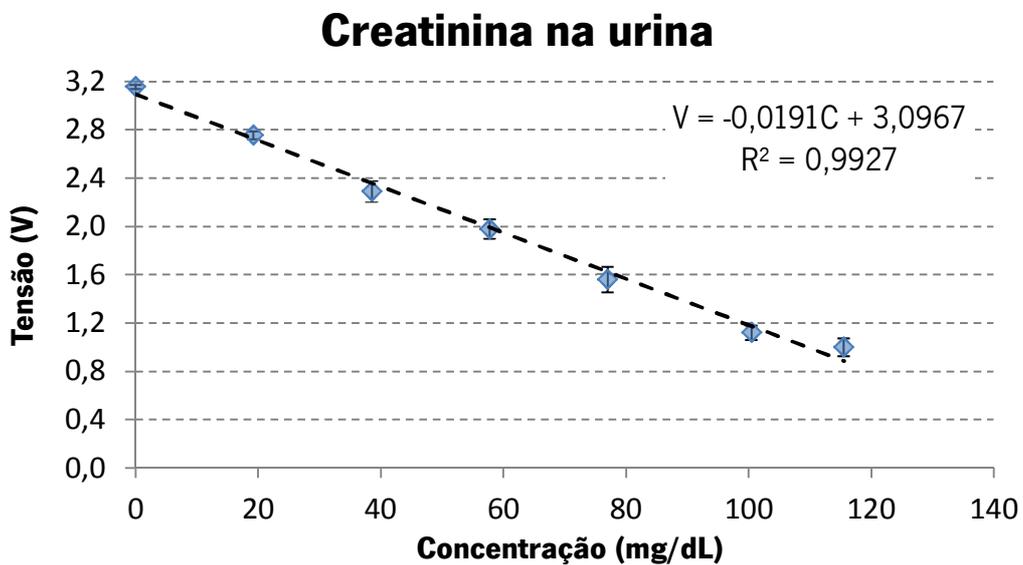


Figura 5.9 - Valores discretos de tensão em função das diferentes concentrações de Creatinina na urina para o comprimento de onda de 501 nm

Na figura 5.10 são apresentados os resultados obtidos para os testes realizados com a Albumina, utilizando o LED de 622 nm.

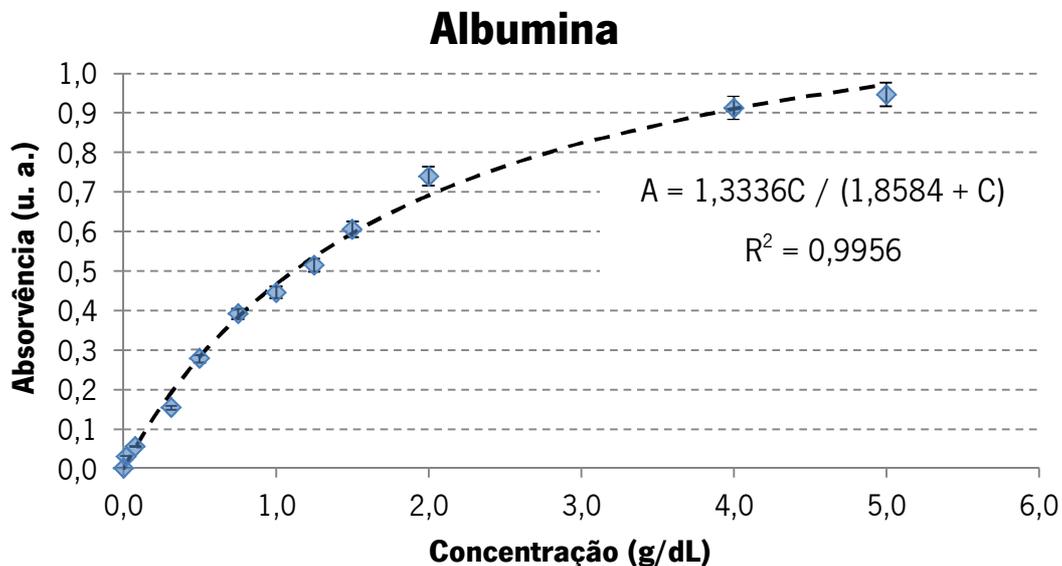


Figura 5.10 - Valores discretos de absorvência em função das diferentes concentrações de Albumina para o comprimento de onda de 622 nm

Analisando os resultados obtidos para as diferentes biomoléculas (Figuras 5.5 - 5.10), observa-se que o fotodiodo mostrou ter resolução suficiente para distinguir as diferentes concentrações utilizadas. Pode ainda observar-se que no caso da Glicose, Beta-Hidroxi-butirato, Potássio, Creatinina no soro e Creatinina na urina a linearidade dos reagentes se manteve, quando comparada com os resultados apresentados no capítulo 4, uma vez que o valor obtido para o R^2 em todas as biomoléculas é superior a 0,99. No caso da Albumina os valores apresentados são de absorvência em função das diferentes concentrações de amostra utilizadas e não de tensão. A necessidade do cálculo da absorvência, que teve em conta os valores de tensão lidos pelos fotodiodos (explicado posteriormente na secção 5.4) deve-se ao facto do comportamento do reagente ser definido através de uma função racional, representada pela equação 5.1. Sendo assim, o valor de absorvência é então depois utilizado para a determinação do valor da concentração de biomolécula presente na amostra analisada.

$$A = aC / (b + C) \quad (5.1)$$

A corresponde ao valor de absorvência lido, C à concentração da amostra analisada e a e b são constantes pré-definidas. Os valores obtidos para a e b foram respetivamente 1,3336 e 1,8584, tal como se pode observar na equação presente na figura 5.10. É importante referir que

a determinação destas duas constantes fez-se a partir do conjunto de valores de absorvência medidos para as diferentes concentrações de Albumina utilizadas e tendo por base a equação da função racional que descreve o comportamento do reagente, apresentada no respetivo protocolo que se encontra no Anexo I.III.

Antes de determinar os limites máximo e mínimo dos valores de concentração para os quais os reagentes selecionados mantêm a sua linearidade, consultou-se os protocolos dos diferentes reagentes de forma a ter conhecimento sobre os valores limites aconselhados pelos fabricantes. Seguidamente procedeu-se à preparação de amostras das diferentes biomoléculas, com valores de concentração situados em torno dos limites mínimos indicados, nos respetivos protocolos. Quanto aos limites máximos apenas conseguiu-se atingir o valor indicado nos protocolos com o *standard* de Albumina, uma vez que para as restantes biomoléculas os valores de concentração máxima disponíveis encontram-se abaixo dos limites indicados nos respetivos protocolos. Sendo assim, e devido ao facto de se ter verificado que os limites mínimos, determinados experimentalmente, para as diferentes biomoléculas encontram-se muito próximos dos indicados nos protocolos, considerou-se como limites máximos os valores indicados pelos fabricantes dos reagentes selecionados nos respetivos protocolos. Na tabela 5.1 observa-se um resumo dos valores limites máximo e mínimo definidos para as diferentes biomoléculas analisadas.

Tabela 5.1 - Limites máximo e mínimo dos valores de concentração, das diferentes biomoléculas, para os quais os reagentes selecionados mantêm a sua linearidade.

Biomolécula	Limite mínimo	Limite máximo
Glicose	25 mg/dL	500 mg/dL
Creatinina na urina	5,0 mg/dL	300 mg/dL
Albumina	0,01 g/dL	5,0 g/dL
Beta-Hidroxibutirato	0,05 mM	4,5 mM
Potássio	2,5 mEq/L	7,0 mEq/L
Creatinina no soro	0,3 mg/dL	15 mg/dL

5.3 Algoritmo interno de decisão implementado

De forma a cumprir o objetivo proposto de construir um dispositivo POCT capaz de guiar de forma autónoma o seu utilizador na realização de um conjunto de análises que permitem um diagnóstico fiável e preciso dos DM e da Função Renal, procedeu-se ao desenvolvimento de um algoritmo de decisão a implementar no dispositivo. Tal como anteriormente referido na secção 4.1, a planificação deste algoritmo foi feita com o auxílio de dois médicos responsáveis por fornecer as informações sobre quais as biomoléculas que devem ser analisadas no estudo da DM e da Função Renal, qual a ordem em que estas devem ser analisadas e quais os valores *threshold* a utilizar. Com base nessa informação obteve-se o algoritmo apresentado na figura 5.11. O algoritmo é constituído por quatro conjuntos de análises, dos quais os três primeiros se destinam à avaliação dos DM e o último à avaliação da Função Renal.

O primeiro conjunto de análises é constituído pela análise da Glicose em jejum presente no soro sanguíneo, uma vez que, tal como referido na secção 3.3, este é um dos principais indicadores da presença de DM. Sendo assim, se o valor obtido for normal, significa que os DM encontram-se controlados e que a análise pode terminar, por outro lado se este for anormal/elevado o dispositivo informará o utilizador que deve passar para o conjunto de análises seguintes. O dispositivo informa ainda o utilizador que caso o valor da concentração de Glicose obtido seja muito elevado, ele deve consultar o médico e caso o valor obtido seja extremamente elevado, o utilizador encontra-se perante uma situação de urgência médica (na tabela 5.2 é apresentado um resumo desses valores *threshold* utilizados). O segundo conjunto de análises é constituído pela análise da Creatinina na urina e da Razão Albumina/Creatinina na urina, sendo em ambos os casos a análise feita com amostras pontuais de urina. As duas análises são realizadas em simultâneo e caso o valor de concentração obtido para ambas seja normal, a análise termina e o dispositivo informa o utilizador que os DM não estão controlados e que deve consultar o médico, pois a concentração de Glicose obtida na análise anterior encontrava-se elevada. Caso uma das análises dê um valor anormal/elevado o dispositivo notifica o utilizador que deve realizar o próximo conjunto de análises. O terceiro conjunto de análises, correspondente à análise da cetoacidose diabética, já explicada na secção 3.3, é constituído pela análise da Beta-Hidroxiacetato e do Potássio, ambos no soro sanguíneo. Tal como no caso anterior, as análises são feitas em simultâneo e caso uma delas dê um valor anormal/elevado o dispositivo informa o utilizador que se encontra perante uma situação de Urgência médica.

Capítulo 5

O quarto conjunto de análises que corresponde à avaliação da Função Renal é constituído pela análise da TFG a partir do valor de Creatinina sérica e utilizando a equação MDRD apresentada na secção 3.4. Caso o valor obtido para a TFG seja anormal/baixo o dispositivo informa o utilizador que a Função Renal não se encontra controlada e que este deve consultar o médico, e caso esse valor seja demasiado baixo, o dispositivo informa o utilizador que este se encontra perante uma situação de urgência médica.

Na tabela 5.2 apresenta-se um resumo dos valores *threshold* definidos para as diferentes situações referidas nesta secção. O dispositivo a implementar informará ao utilizador, não só as análises a realizar, mas também estes valores. Eles foram definidos com base nas informações apresentadas nas secções 3.3 e 3.4, com a ajuda dos dois médicos que contribuíram para a construção do algoritmo de decisão e com base na sensibilidade dos diferentes reagentes.

Este algoritmo de decisão foi implementado no microcontrolador, que será descrito posteriormente neste capítulo, e utilizado para controlar o dispositivo.

Tabela 5.2 - Valores *threshold* definidos para as diferentes situações que o dispositivo é capaz de informar ao utilizador

Análise	Situação			
	Normal	Avançar	Observação médica	Urgência médica
Valores				
Glicose	<126 mg/dL	≥126 mg/dL	≥200 mg/dL	≥500 mg/dL
Creatinina	Homem <300 mg/dL	≥300 mg/dL	—	—
	Mulher <250 mg/dL	≥250 mg/dL	—	—
Razão Albumina/Creatinina	<50 mg/g creatinina	≥50 mg/g creatinina	—	—
Beta-Hidroxibutirato	<0,5 mM	—	—	≥0,5 mM
Potássio	<5,5 mEq/L	—	—	≥5,5 mEq/L
TFG	>90 ml/min/1,73 m ²	—	<90 ml/min/1,73 m ²	<15 ml/min/1,73 m ²

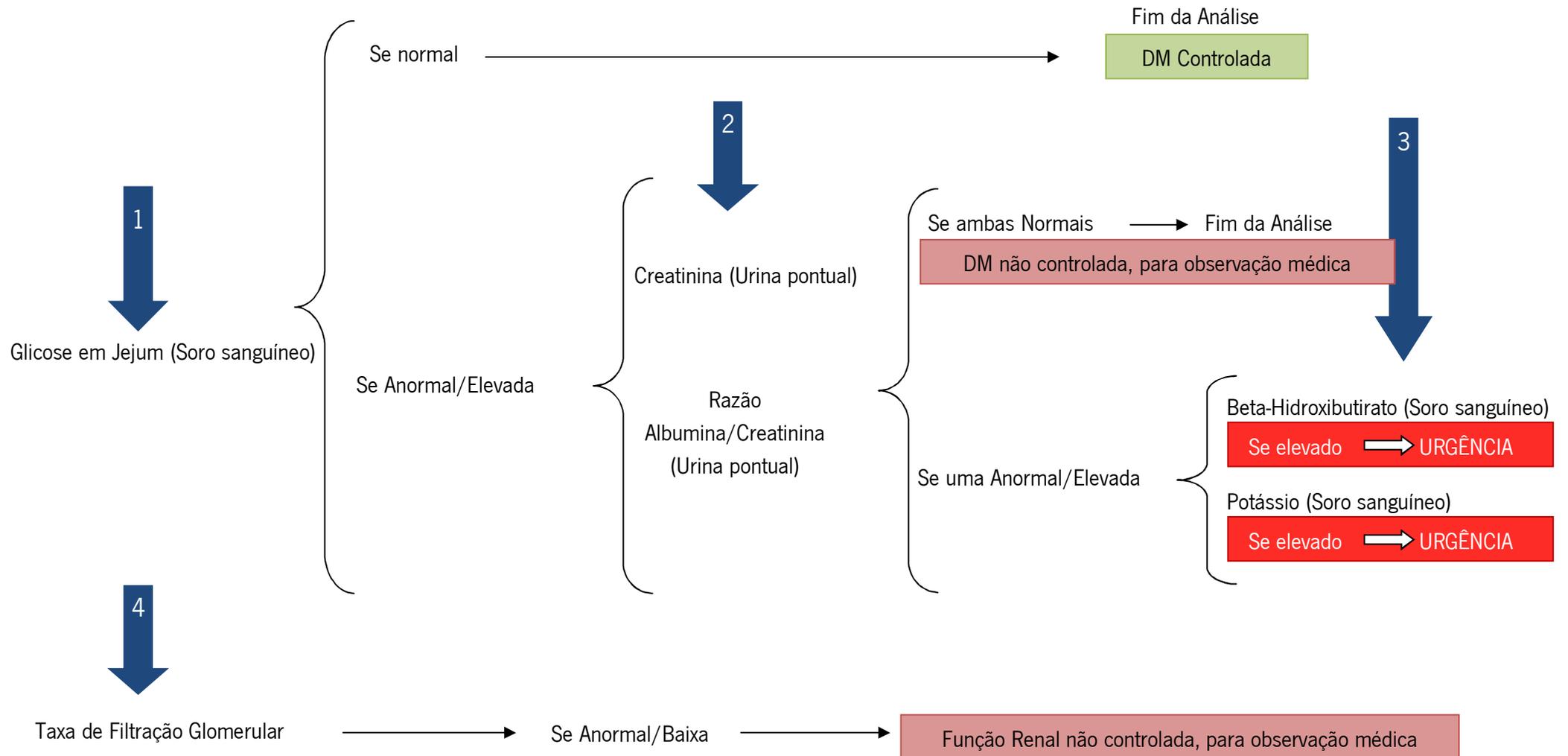


Figura 5.11 - Algoritmo de decisão implementado no dispositivo.

5.4 Funcionamento do dispositivo e eletrónica de controlo

Depois de efetuados os testes descritos na secção 5.2 e tendo em conta o algoritmo de decisão definido na secção anterior, procedeu-se ao projeto da eletrónica necessária, selecionando-se os componentes necessários, para além dos LED's e fotodíodos, e definindo-se o esquema a implementar para efetuar a determinação quantitativa da biomolécula em análise.

A determinação quantitativa da concentração de Glicose, Beta-Hidroxibutirato, Potássio, Creatinina no soro e Creatinina na urina existente numa dada amostra é efetuada através de três medições óticas: (1) medição ótica do reagente utilizado, que constitui a linha de base; (2) medição ótica da mistura do reagente com a amostra que se pretende analisar e (3) medição ótica da mistura do reagente com uma solução de concentração conhecida dessa biomolécula (*standard*). Depois de obtidos estes três valores de tensão, medidos pelos fotodíodos, e sabendo que a tensão do reagente ($V_{reagente}$) corresponde a uma concentração de zero (mg/dL, g/dL ou mM) e que a tensão do *standard* (V_{std}) corresponde a uma concentração conhecida (C_{std}), pode obter-se o valor da concentração da amostra em análise a partir da equação 5.2, onde $C_{amostra}$ corresponde à concentração da amostra que se está a analisar e $V_{amostra}$ corresponde à tensão lida para essa mesma amostra.

$$C_{amostra} = \frac{V_{amostra} - V_{reagente}}{\frac{V_{std} - V_{reagente}}{C_{std}}} \quad (5.2)$$

Sendo assim, em cada análise realizada, o cálculo da concentração é sempre efetuado a partir dos três valores de tensão lidos no momento da análise e do valor da concentração do *standard* utilizado, não sendo necessária a incorporação de uma fórmula previamente calculada no microcontrolador, responsável pela execução dos cálculos. Tal particularidade permite minimizar a ocorrência de erros associados a variações da intensidade luminosa dos LED's devido ao seu desgaste com a utilização e com variações de temperatura [83]. Além disso, permite ainda minimizar erros associados a variações ao longo do tempo na sensibilidade de deteção do fotodíodo. Características estas extremamente importantes num dispositivo POCT.

Para a Albumina, como o reagente não é linear, o processo de determinação é ligeiramente diferente do acabado de descrever. São de igual modo efetuadas as três medições óticas atrás referidas, que correspondem a três valores de tensão dos três fotodíodos, no

entanto, o cálculo da concentração da amostra em análise ($C_{amostra}$) é feito através de um rearranjo da equação 5.1 definida na secção 5.2 que origina a equação 5.3.

$$C_{amostra} = \frac{A_{amostra} \times b}{a - A_{amostra}} \quad (5.3)$$

Onde, $A_{amostra}$ corresponde ao valor de absorvência lido no momento da análise e a e b correspondem a duas constantes previamente determinadas. O valor de $A_{amostra}$ é determinado a partir da substituição do I_0 e do I_t da equação 3.5 definida na secção 3.6 pelo $V_{reagente}$ e $V_{amostra}$ respetivamente (equação 5.4). Essa substituição é possível de realizar, uma vez que a corrente (I) e a tensão (V) são diretamente proporcionais, tal como se pode observar a partir da lei de Ohm representada na equação 5.5, onde R corresponde à resistência elétrica.

$$A_{amostra} = \log_{10} \frac{V_{reagente}}{V_{amostra}} \quad (5.4)$$

$$V = R \times I \quad (5.5)$$

Neste caso, ao contrário do que acontece para as biomoléculas anteriormente referidas, os valores de a e b da equação 5.3 já se encontram previamente incorporados no microcontrolador do dispositivo. A determinação prévia destas duas constantes realizou-se no próprio dispositivo, ficando assim garantidas as mesmas condições em todas as análises a efetuar. Para esta determinação utilizou-se uma gama de valores de concentração obtidos a partir de várias diluições feitas com o *standard* fornecido no kit do reagente. Determinou-se ainda, previamente, o valor de absorvência lido para o *standard*, com o objetivo de, quando se utilizar o dispositivo para efetuar uma análise, comparar-se o valor de absorvência obtido para o *standard* nessa análise, com o valor guardado no dispositivo, verificando-se assim se o dispositivo ainda se encontra calibrado e se a equação nele inserida pode ser utilizada. Caso o valor de absorvência obtido para o *standard* numa dada análise varie em mais de 1% do previamente guardado no dispositivo, o utilizador terá de repetir novamente a análise e caso se verifique que o erro se repete de forma sistemática será necessário voltar a calibrar o dispositivo para determinar novamente os valores das constantes a e b da equação 5.3. Esta calibração terá de ser efetuada por um técnico especializado no desenvolvimento do dispositivo.

Para efetuar as seis análises necessárias (Glicose, Beta-Hidroxiacetato, Potássio, Creatinina no soro, Creatinina na urina e Albumina) são utilizados os dois LED's e o fotodiodo selecionados anteriormente. O sistema será composto por nove LED's (seis de 501 nm e três de

622 nm) e nove fotodíodos, o que se traduz em três conjuntos de três, cujo planeamento da eletrónica adicional encontra-se representada no diagrama de blocos da figura 5.12 para dois desses conjuntos.

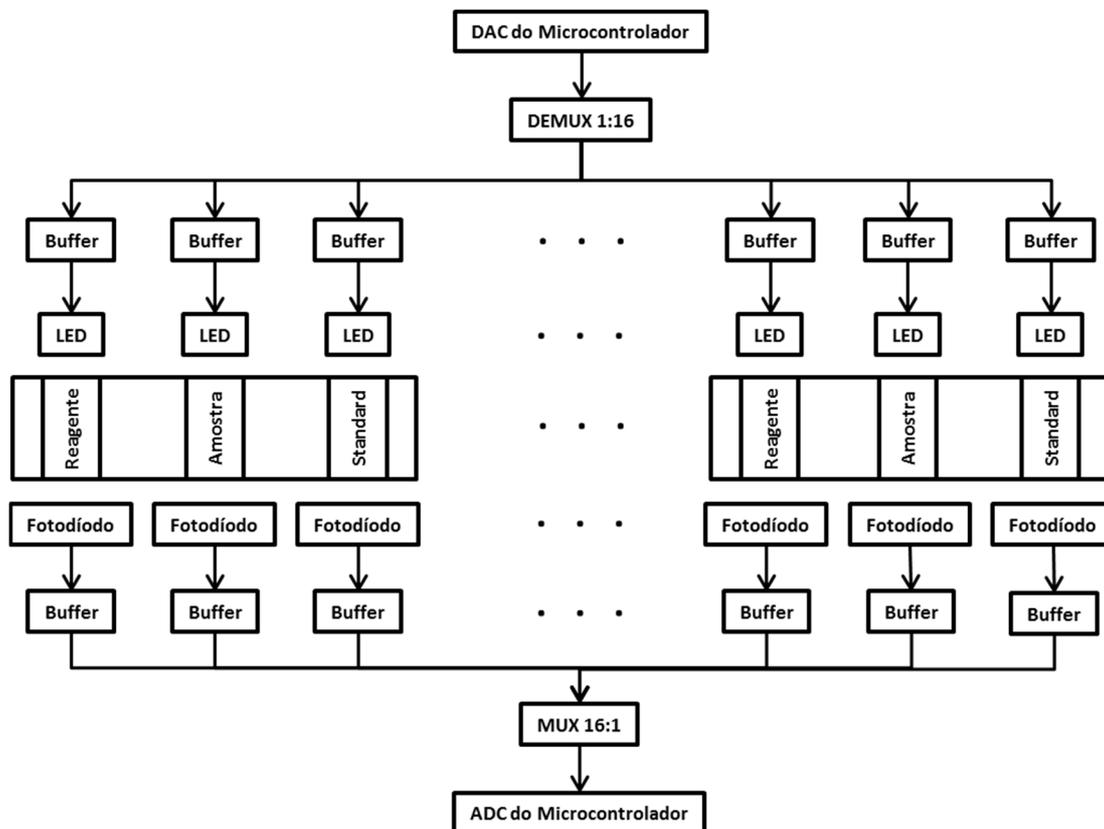


Figura 5.12 - Diagrama de blocos da eletrónica a implementar no dispositivo.

Antes da realização de uma dada análise, o dispositivo necessita de ser calibrado de forma a garantir-se que a intensidade luminosa emitida pelos três LED's utilizados nessa análise é aproximadamente a mesma. Tal característica é fundamental para garantir o correto funcionamento do dispositivo, uma vez que se a intensidade luminosa dos três LED's não for a mesma isso afeta as medições óticas realizadas e conseqüentemente o valor de concentração calculado. A calibração do dispositivo é feita através da colocação do disco de análise (descrito posteriormente na secção 5.5.2) já com o reagente a utilizar nessa análise colocado nos três compartimentos. Este disco de análise será o utilizado posteriormente na análise da biomolécula. O primeiro LED do conjunto é alimentado com uma tensão previamente guardada no dispositivo e o valor de tensão adquirido pelo fotodíodo correspondente é guardado. De seguida, o segundo LED é alimentado com a mesma tensão do primeiro e o valor de tensão lido pelo fotodíodo é adquirido. É feita uma comparação entre o valor de tensão adquirido pelo

segundo fotodíodo e o valor de tensão adquirido pelo primeiro fotodíodo que se encontra guardado e caso estes sejam diferentes, o dispositivo vai modificando o valor da tensão de alimentação do segundo LED até que a tensão adquirida pelo segundo fotodíodo seja aproximadamente igual à que foi lida pelo primeiro fotodíodo. Quando isso se verifica, significa que a intensidade luminosa dos dois LED's é aproximadamente a mesma. Estes passos são de seguida repetidos para o terceiro LED do conjunto, de forma a garantir que a intensidade luminosa dos três LED é aproximadamente a mesma. Os valores de tensão de alimentação dos três LED's, determinados durante este processo de calibração, são depois guardados na memória do microcontrolador para serem utilizados posteriormente durante a análise, na alimentação dos respetivos LED's.

A alimentação dos LED's é efetuada e controlada através do conversor digital-analógico (DAC) do microcontrolador. O número limitado de pinos do microcontrolador que permitem aceder ao DAC obriga a que seja necessário utilizar desmultiplexagem para conseguir alimentar os nove LED's. A desmultiplexagem é a técnica através da qual um sinal (um canal único) é encaminhado para vários canais diferentes de forma alternada, através de uma seleção prévia do canal de destino [84]. Sendo assim, foi utilizado um demultiplexer 1:16 (bloco designado por DEMUX 1:16 na figura 5.12), obtido a partir de um multiplexer/demultiplexer 16:1/1:16 da Analog Devices, de tecnologia CMOS com a referência: ADG706. Selecionou-se este multiplexer/demultiplexer por permitir uma alimentação simples de 5 V, apresentar um baixo consumo de potência, possuir tempos de comutação bastante baixos (na gama das dezenas de ns) e por permitir uma gama de valores dos sinais analógicos de entrada e de saída (0V a 5V) adequada aos valores de tensão utilizados para alimentação dos LED's. As informações sobre as características referidas podem ser consultadas no seu *Datasheet* [85]. O bloco designado por LED da figura 5.12 é constituído por uma resistência e por um LED, ligados em série (Figura 5.13). A necessidade da utilização da resistência e o seu valor foram previamente descritos na secção 5.2. Note-se que no dispositivo final, os LED's e fotodíodos utilizados foram exatamente os utilizados durante os testes descritos nessa secção.

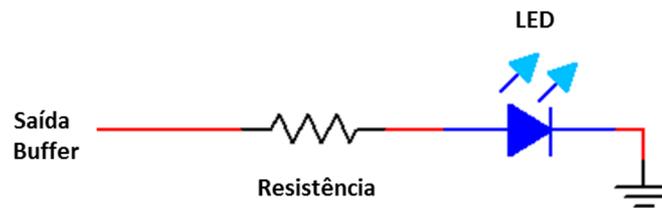


Figura 5.13 - Representação esquemática do circuito de ligação de um LED.

Durante a realização dos testes descritos na secção 5.2, efetuou-se uma montagem experimental constituída por três suportes de cuvette, iguais ao da figura 5.4, e respetiva eletrónica necessária, de forma a realizar as três medições óticas necessárias na determinação quantitativa da concentração das biomoléculas a analisar. A implementação desta montagem teve como principal objetivo analisar o funcionamento do multiplexer e do demultiplexer a colocar no dispositivo. Através dessa análise concluiu-se ser necessário colocar um seguidor de tensão (*buffer*) entre o demultiplexer e a resistência do LED de forma a adaptar as impedâncias entre estes componentes. Verificou-se ainda que era necessário colocar outro *buffer* entre o fotodiodo e o multiplexer pelo mesmo motivo. Para a implementação dos *buffers* utilizou-se um Amplificador Operacional da Analog Devices em tecnologia CMOS, o AD8694. Este circuito integrado possui quatro amplificadores operacionais e foi escolhido por permitir uma alimentação simples de 5 V e por aceitar uma gama de tensões de entrada (0 V a 5,3 V) adequada aos valores de tensão utilizados.

Os valores de tensão lidos pelos fotodiodos são adquiridos pelo conversor analógico-digital (ADC) do microcontrolador, que posteriormente efetua o cálculo da concentração de biomolécula existente na amostra. Tal como no caso do DAC, devido ao limitado número de pinos do microcontrolador que permitem aceder ao ADC é também aqui necessário utilizar um multiplexer, o ADG706, (bloco designado por MUX 16:1 na figura 5.12), de modo a conseguir-se adquirir os valores de tensão lidos pelos nove fotodiodos. Grande parte dos 21 pinos de acesso ao ADC é utilizada para a comunicação com outros periféricos.

De forma a cumprir o objetivo de construir um dispositivo portátil, procedeu-se à elaboração de um sistema de alimentação do dispositivo com base numa bateria. O diagrama de blocos do sistema de alimentação implementado encontra-se na figura 5.14. A bateria utilizada foi uma bateria recarregável de 8,3V. É importante referir que numa primeira fase utilizou-se

pilhas recarregáveis para alimentar o dispositivo, no entanto verificou-se, a partir de uma série de testes realizados, que as pilhas não conseguiam alimentar o microcontrolador durante um tempo de funcionamento desejável. Sendo assim, foi necessário procurar uma bateria com maior energia para permitir obter um maior tempo de funcionamento do dispositivo, antes de ser necessário proceder ao carregamento da mesma. Apesar da bateria selecionada permitir um maior tempo de funcionamento do dispositivo (20 min), este ainda se encontra longe do desejável. A potência consumida pelo dispositivo é 400 mW, sendo este valor calculado a partir do valor de corrente obtido após o regulador de tensão de 5V.

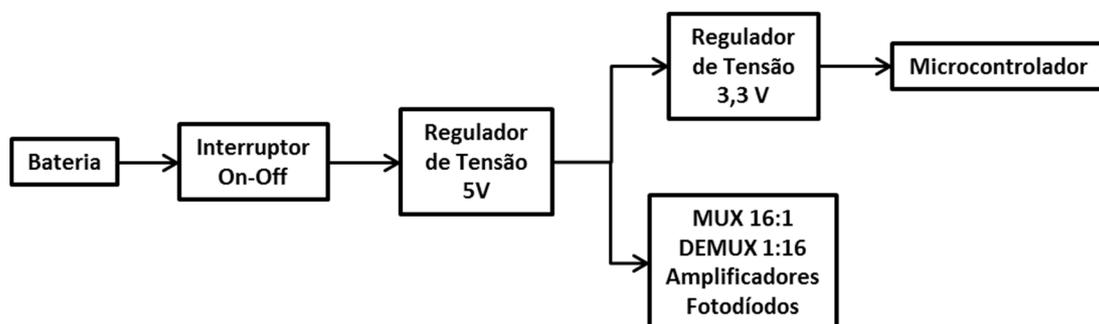


Figura 5.14 - Diagrama de blocos do sistema de alimentação do dispositivo

O facto da alimentação do MUX 16:1, do DEMUX 1:16, dos amplificadores e dos fotodíodos ser 5V, tal como referido anteriormente, levou à necessidade de um regulador de tensão de 5V de forma a converter a tensão da bateria utilizada numa tensão fixa de 5V, garantindo-se assim o correto funcionamento dos componentes. O regulador de tensão de 5V utilizado é o L7805CV da STMicroelectronics, podendo as suas características e esquema de montagem serem consultados no seu *datasheet* [86].

A alimentação do microcontrolador, descrito posteriormente neste capítulo, é de 3,3 V. Sendo assim, utilizou-se um regulador de tensão de 3,3 V de forma a fixar a tensão de saída do regulador de tensão de 5V nos 3,3 V. O regulador de 3,3 V utilizado é o UA78M33C da Texas Instruments, podendo as suas características e esquema de montagem serem consultados no seu *datasheet* [87]. A alimentação do microcontrolador pode também ser feita por Universal Serial Bus (USB), ligando por exemplo o dispositivo a um computador, no entanto essa opção torna o dispositivo não tão portátil.

5.5 *Design do dispositivo*

O modelo tridimensional dos diversos componentes do dispositivo (caixa do dispositivo e disco de análise) foi realizado recorrendo-se às potencialidades do *software* de desenho AutoCAD 2012. As cores dos diversos componentes apresentados nas figuras 5.15 – 5.17 são meramente representativas e têm como objetivo permitir uma melhor visualização e identificação dos diferentes componentes.

5.5.1 *Design da caixa do dispositivo*

A caixa do dispositivo é constituída por dois compartimentos, o compartimento de comando e o compartimento de análise. No compartimento de comando, encontra-se o microcontrolador, responsável pelo controlo de todo o dispositivo, a bateria e alguma eletrónica necessária. No compartimento de análise, encontram-se os LEDs, os fotodíodos e o suporte para colocar o disco de análise. O utilizador tem acesso ao compartimento de análise através de uma tampa facilmente removível, de modo a conseguir colocar de forma prática os discos para efetuar as diversas análises. Por outro lado, o compartimento de comando encontra-se fechado e só será essencial aceder-lhe quando for necessário proceder ao carregamento/substituição da bateria de alimentação. O compartimento de análise, depois de corretamente fechada a tampa encontra-se completamente isolado da luz externa, garantindo-se que não existem interferências da luz ambiente durante a realização das medições óticas. Considerando as dimensões de todos os componentes a colocar no dispositivo e que este deve apresentar as menores dimensões possíveis, para cumprir os objetivos anteriormente referidos, decidiu-se que as suas dimensões finais seriam as seguintes: comprimento 200 mm; largura 100 mm e altura 60 mm.

Na figura 5.15 observam-se dois planos diferentes da caixa do dispositivo com alguns dos componentes aos quais é necessário ter acesso. Em (a) é apresentada a parte superior da caixa, onde é possível observar o local onde ficará o LCD do microcontrolador (a azul escuro) e o interior do compartimento de análise já com um disco de análise (representado a azul claro) colocado no suporte. Em (b) são apresentadas a parte lateral e traseira da caixa do dispositivo onde é possível observar as duas portas USB e a porta RS-232 que permitem comunicar com o microcontrolador, assim como a ranhura destinada à inserção do cartão de memória e a tampa responsável por isolar o compartimento de análise.

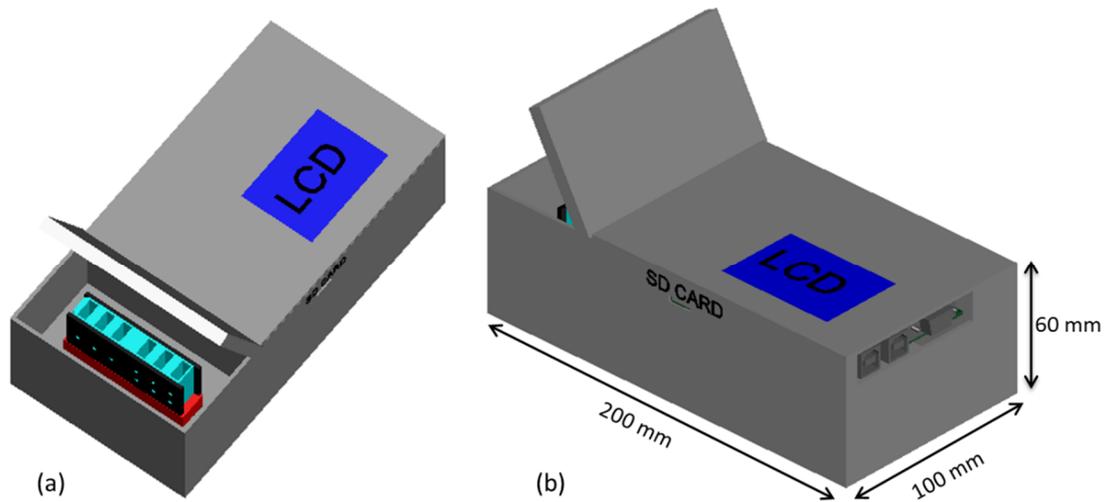


Figura 5.15 - (a) Vista superior da caixa do dispositivo; **(b)** Vista lateral e traseira da caixa do dispositivo.

O suporte para o disco de análise é constituído por dois elementos importantes, a base e as placas laterais. Na figura 5.16 apresentam-se dois planos diferentes do suporte construído, onde se observa com detalhe os elementos que o compõem. Quanto à base, representada a vermelho, foi construída tendo em consideração o formato do disco de análise, com o objetivo de este encaixar de forma correta e precisa, não se deslocando durante a realização das diferentes análises. Cada uma das placas laterais, a preto na figura 5.16, possui nove orifícios (com 2 mm de diâmetro cada um) correspondentes aos locais onde serão colocados os LED's e os fotodíodos. Estes orifícios permitem que a luz emitida pelos LED's alcance a solução existente num dado compartimento do disco de análise, sem haver muita dispersão do feixe emitido. Além disso, permitem ainda que o resultado dessa interação seja depois captado pelo fotodíodo correspondente. As dimensões finais destas duas placas (comprimento: 68 mm e largura: 36 mm) foram determinadas de acordo com as dimensões do disco de análise e de forma a garantir a sua fácil colocação e remoção do suporte.

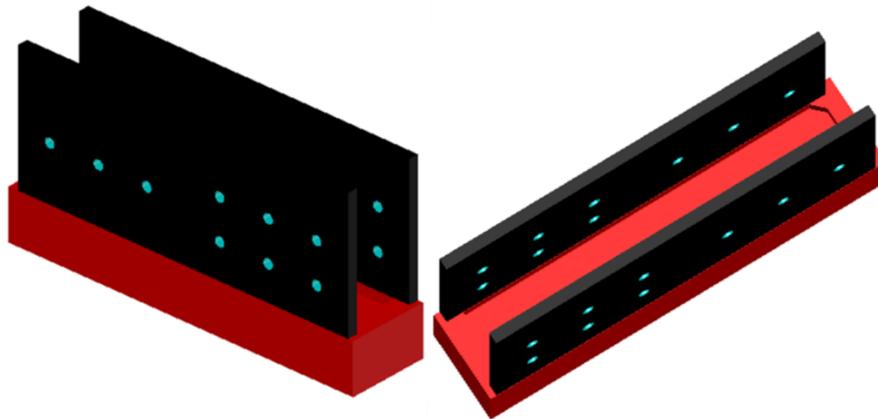


Figura 5.16 - Suporte para o disco de análise.

5.5.2 *Design do disco de análise*

O desenho do disco de análise foi feito tendo em consideração uma série de características: (1) o número de análises que é necessário efetuar em cada um dos passos do algoritmo de decisão apresentado na secção 5.3; (2) os volumes de reagente e de amostra que são necessários colocar em cada um dos compartimentos do disco de análise; (3) o método utilizado para a determinação quantitativa da concentração de biomolécula existente na amostra, descrito na secção 5.4, (4) o caminho ótico necessário para efetuar as medições de forma correta e precisa (1 cm, tal como referido em [88]) e (5) a posição em que o disco ótico é colocado no suporte. Deste modo, o disco de análise apresenta as seguintes dimensões: comprimento 66 mm, largura 12 mm e altura 28 mm (Figura 5.17). Por sua vez, cada um dos compartimentos do respetivo disco ficou com as seguintes dimensões: comprimento 5 mm, largura 10 mm e altura 26 mm.

O disco de análise é então constituído por 6 compartimentos, tal como se pode observar na figura 5.17, de forma a permitir efetuar a análise de duas biomoléculas em simultâneo, uma vez que tal como explicado na secção 5.4 são necessários três compartimentos para efetuar cada análise de uma biomolécula. Além disso, de modo a garantir que o utilizador coloca sempre o disco de análise na sua posição correta no dispositivo, ficando os reagentes alinhados com os respetivos LED's definidos, uma das suas paredes laterais possui uma saliência, tal como se pode observar na figura 5.17.

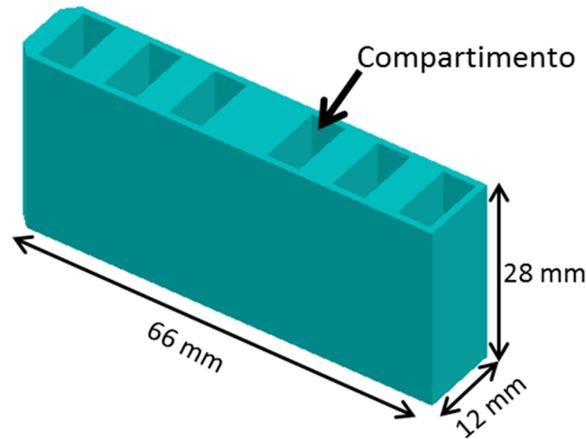


Figura 5.17 - Disco de análise

De forma a ser possível realizar todas as análises apresentadas no algoritmo de decisão, descrito na secção 5.3, produziram-se quatro discos de análise. Depois de obtidos esses discos colocou-se neles os diversos reagentes necessários para a análise das diferentes biomoléculas. É ainda importante referir que os discos produzidos são descartáveis, não devendo estes ser reutilizados depois de realizada a análise. As informações sobre esses discos podem ser consultadas em maior detalhe na tabela 5.3.

Tabela 5.3 - Informações sobre os quatro discos fabricados.

Nome do Disco	1ª Biomolécula	2ª Biomolécula
Glucose	Glicose (Soro)	—
Creatinine & Albumin/Creatinine Ratio	Creatinina (Urina)	Albumina (Urina)
Diabetic Ketoacidosis (DKA)	Beta-Hidroxibutirato (Soro)	Potássio (Soro)
Glomerular Filtration Rate (GFR)	Creatinina (Soro)	—

5.6 Microcontrolador

O microcontrolador utilizado é o STM32F103VET6 (Figura 5.18), que contém um processador ARM Cortex-M3, três ADC's de 12 bits, com 21 canais de acesso no total e dois DAC's também de 12 bits, com dois canais de acesso. A *board* onde o microcontrolador se encontra soldado contém duas portas USB, uma porta RS-232, um *slot* para cartões de memória

micro SD, um botão RESET e um conjunto de portas programáveis de entrada e saída de dados, designadas por *General Purpose Input/Output* (GPIO), que permitem a comunicação entre os diversos periféricos e o microcontrolador. É importante referir que o botão RESET, anteriormente referido, permite reiniciar o programa do microcontrolador caso aconteça alguma anormalidade durante o seu funcionamento. Além desses componentes, tem ainda um ecrã táctil *Thin film transistor liquid crystal display* (TFT LCD).



Figura 5.18 - Microcontrolador (STM32F103VET6).

O microcontrolador foi programado de forma a criar-se uma interface agradável e intuitiva para o utilizador, que lhe permita seleccionar de forma rápida e simples as diferentes análises que pretende efetuar. Sendo assim, foram utilizadas as diversas potencialidades do seu ecrã táctil para mostrar: os vários menus necessários para a recolha dos dados do utilizador; a apresentação das análises possíveis de realizar; a apresentação dos resultados obtidos com essas análises e a apresentação das informações associadas a esses resultados. Os diversos menus e mensagens apresentados pelo dispositivo encontram-se em inglês, de forma a tornar a interface desenvolvida universal. Foi utilizada a linguagem de programação C para programar o microcontrolador. Na figura 5.19 observa-se em (a) o menu inicial, apresentado quando o utilizador liga o dispositivo, em (b) o menu que permite a introdução do número de identificação do utilizador, em (c) o menu onde o utilizador insere a sua idade e o seu género, em (d) o menu com as diversas análises disponíveis, em (e) o menu com o botão que permite efetuar a calibração do dispositivo antes de realizar a análise, em (f) o menu com algumas informações e

o botão para iniciar a análise pretendida e em (g) o resultado obtido numa análise à concentração de glicose existente no sangue.

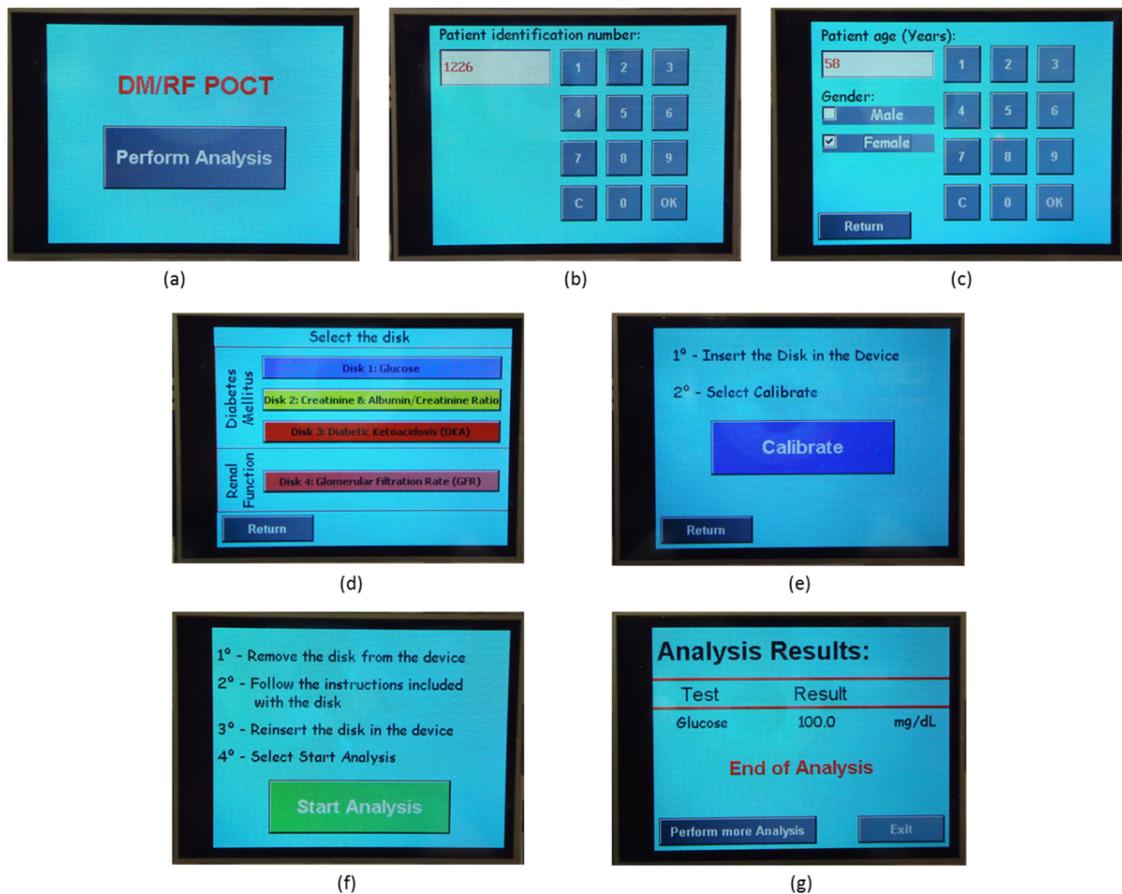


Figura 5.19 - (a) Menu inicial; **(b)** Menu de inserção do número de identificação do paciente; **(c)** Menu de inserção do género e idade; **(d)** Menu com as diferentes análises disponíveis; **(e)** Menu com o botão de calibração; **(f)** Menu com algumas informações e o botão para se iniciar a análise; **(g)** Resultado da análise da Glicose.

Os comandos necessários para o controlo de toda a eletrónica existente no dispositivo foram também programados no microcontrolador, utilizando-se as portas GPIO para estabelecer a comunicação entre o microcontrolador e os diversos componentes. Além das funções descritas anteriormente, foi implementado o algoritmo de decisão apresentado na secção 5.3, de forma a cumprir-se o objetivo de obter-se um dispositivo autónomo que informe o utilizador sobre quais as análises que deve efetuar e que forneça também alguns avisos.

Foi necessário determinar a reta de calibração do ADC do microcontrolador, para a partir do valor lido pelo ADC obter-se o valor de tensão real existente à entrada do mesmo. A curva de calibração obtida encontra-se no Anexo II. É importante referir que a gama de valores de tensão admitida pelo microcontrolador à entrada do ADC, de forma a evitar que este se danifique é de 0V a 3,6V.

Capítulo 6 – Fabrico e testes do dispositivo final

Neste capítulo são apresentados os diversos detalhes sobre o fabrico do dispositivo final, as suas especificações, os resultados obtidos com os testes experimentais realizados no próprio dispositivo e a discussão dos respetivos resultados obtidos.

6.1 Fabrico do dispositivo

Seguidamente serão apresentados os diversos detalhes sobre o fabrico da caixa e do disco de análise do dispositivo.

6.1.1 Caixa do dispositivo

A caixa do dispositivo foi construída tendo em consideração o *design* e as especificações apresentadas na secção 5.5.1. Construiu-se uma caixa com os dois compartimentos descritos nessa secção e com as respetivas tampas para os fechar (Figura 6.1 (a) e (b)). A matéria-prima utilizada para o fabrico da caixa do dispositivo foi o acrílico, procedendo-se no final da sua construção à pintura do acrílico de negro, garantindo-se que não existe passagem de luz ambiente para o interior da caixa, uma vez que essa passagem de luz interfere nas medições óticas realizadas, tal como referido na secção 5.5.1. O interior da caixa do dispositivo, as respetivas tampas e o suporte para o disco de análise possuem também uma coloração negra para evitar reflexões de luz que possam interferir com as medições óticas realizadas.

A tampa do compartimento de análise foi construída de forma a conferir a este um total isolamento da luz ambiente e a possuir um sistema que a permita remover e colocar facilmente. Na tampa do compartimento de comando foi necessário fazer uma abertura com as dimensões do LCD (largura: 43 mm e comprimento: 60 mm) do microcontrolador, para que o utilizador consiga ter acesso ao mesmo. Para além disso, fez-se ainda um orifício que permite o fácil acesso ao botão RESET do microcontrolador (Figura 6.1 (b)). Nas paredes traseira e lateral da caixa do dispositivo foi necessário fazer duas aberturas para permitir o acesso às portas USB e RS-232 e ao local de inserção dos cartões de memória do microcontrolador (Figura 6.1 (c)). Na parede interna da caixa que separa os dois compartimentos foi também necessário colocar uma

abertura de forma a passar os fios responsáveis pela comunicação entre a eletrónica existente no compartimento de análise e o microcontrolador que se encontra no compartimento de comando.

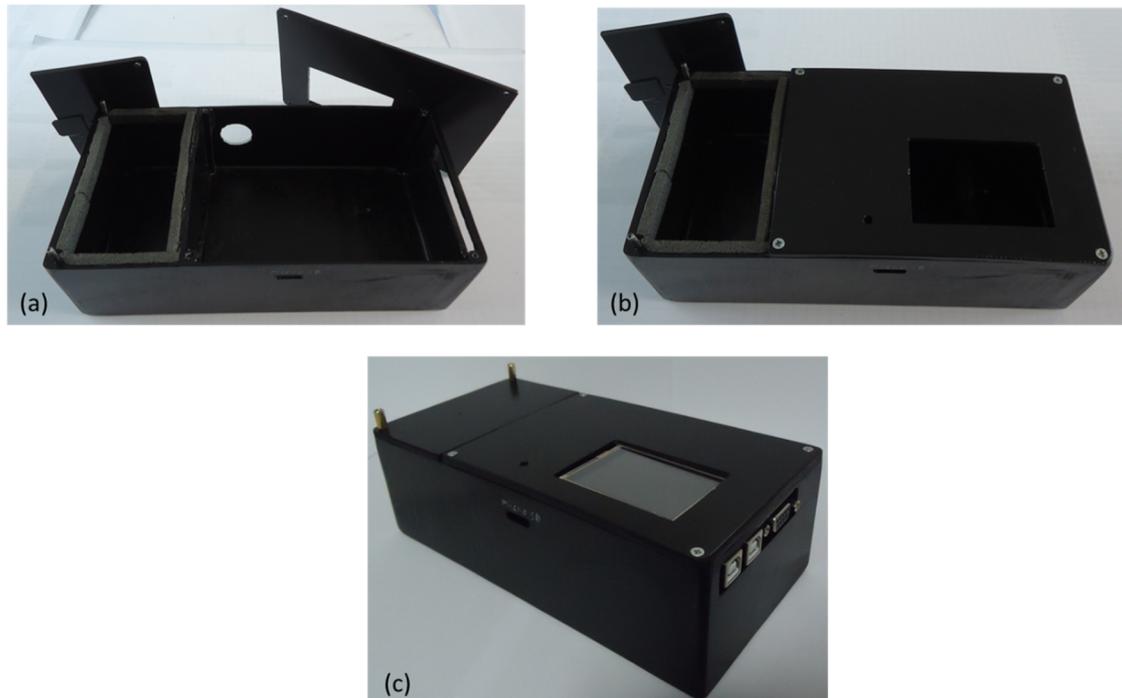


Figura 6.1 - Caixa do dispositivo: **(a)** Visão do interior da caixa; **(b)** Visão do compartimento de análise com a tampa aberta; **(c)** Paredes traseira e lateral da caixa do dispositivo.

O suporte para o disco de análise, apresentado na figura 6.2, foi construído tendo em consideração as especificações apresentadas na secção 5.5.1, sendo os orifícios das duas placas laterais, orifícios para a passagem da luz emitida pelos LED's, feitos com elevada precisão, numa máquina CNC, e o mais alinhados possível. Além destes orifícios, foi ainda necessário fazer mais dois orifícios de maior dimensão (assinalados a vermelho na figura 6.2), em cada uma das placas, de forma a conseguir-se acoplar a eletrónica necessária às mesmas.

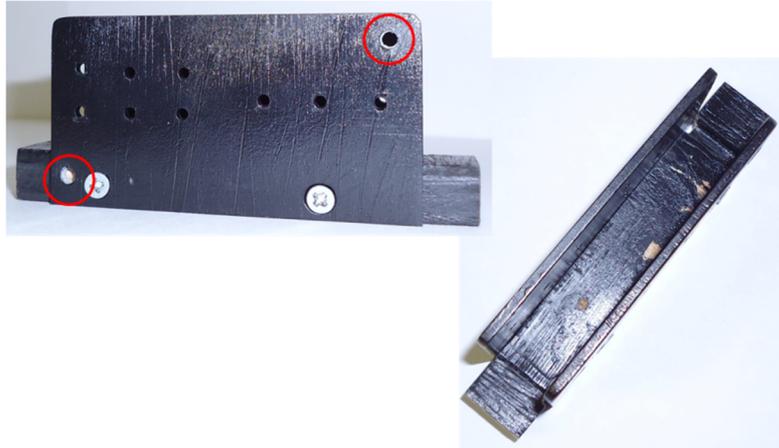


Figura 6.2 - Suporte para o disco de análise construído. Na imagem da esquerda observa-se os orifícios feitos numa das placas laterais e na imagem da direita a base do suporte onde encaixa o disco de análise.

6.1.2 Disco de análise

O disco de análise (Figura 6.3) foi construído respeitando as especificações referidas na secção 5.5.2. A matéria-prima utilizada para o fabrico do disco de análise foi o PDMS (Polidimetilsiloxano), uma vez que é um material transparente e que permite obter paredes perfeitamente lisas na secção de análise, o que é fundamental para que não haja dispersão do feixe de luz emitido pelos LED's.

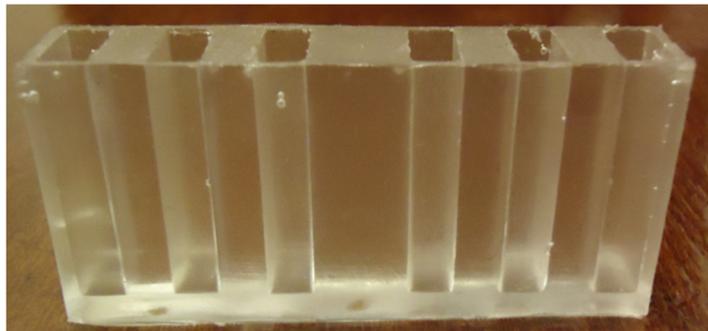


Figura 6.3 - Disco de análise.

De forma a obter um disco de análise com melhores características, seria necessário recorrer a outros processos de fabrico mais precisos, como é o caso das técnicas de injeção de moldes. No entanto, estas técnicas envolvem custos elevados, o que as torna viáveis apenas no caso de produção em massa. Relativamente à matéria-prima, pode utilizar-se o mesmo material (PDMS) ou o PMMA (Polimetil-metacrilato), uma vez que este último apresenta as mesmas

características do PDMS. O PDMS constituiu um bom material para o fabrico de protótipos, no entanto, para a produção em larga escala é economicamente mais viável utilizar o PMMA.

6.2 Implementação da eletrónica necessária

Os componentes eletrónicos, a maior parte em SMD devido às suas pequenas dimensões, foram montados em placas de circuito impresso (PCB). Os principais conceitos a reter sobre a construção de placas PCB encontram-se explicados em [89]. Utilizou-se o *software* Eagle [90] para efetuar o desenho das placas de PCB, sendo estas depois fabricadas nas oficinas do Departamento de Eletrónica Industrial da Universidade do Minho. Os componentes eletrónicos (LED'S, resistências, amplificadores, fotodíodos, MUX 16:1, DEMUX 1:16, reguladores e condensadores) colocados nas três placas PCB produzidas encontram-se descritos no capítulo 5.

6.2.1 Placa PCB com os LED's

A placa PCB com os LED's incorpora não só os nove LED's como também o circuito de alimentação de cada um dos LED's. Para além dessa eletrónica, foi ainda necessário colocar alguns conetores, para a alimentação dos amplificadores e dos LED's. Na figura 6.4 observa-se o PCB fabricado.

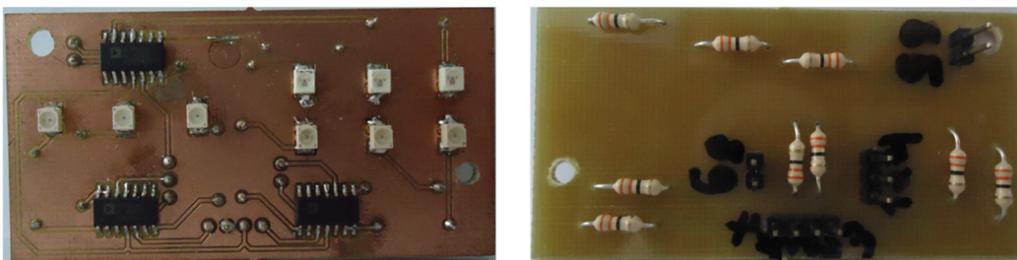


Figura 6.4 - PCB com os LED's. Na imagem da esquerda observa-se o lado da placa que contém os componentes SMD e na imagem da direita, o outro lado da placa que contém as resistências e os conetores.

A disposição dos LED's na placa foi determinada tendo em consideração a largura e a localização de cada um dos compartimentos existentes no disco de análise, de forma a garantir que o feixe de luz imitado pelos LED's atravessasse o interior de cada um desses compartimentos. As dimensões do PCB foram definidas a partir das dimensões das placas laterais do suporte para o disco de análise, obtendo-se as seguintes dimensões: largura 35 mm e comprimento

68 mm. Foi necessário fazer dois orifícios no PCB de forma a conseguir fixá-lo à placa lateral do suporte para o disco de análise.

6.2.2 Placa PCB com os fotodíodos

A placa PCB com os fotodíodos e respetiva eletrónica necessária permite a leitura dos valores de tensão adquiridos pelos nove fotodíodos utilizados. Para além dessa eletrónica, foi ainda necessário colocar alguns conetores, para alimentar os amplificadores e ter acesso aos pinos de saída dos fotodíodos. Na figura 6.5 observa-se o PCB fabricado.

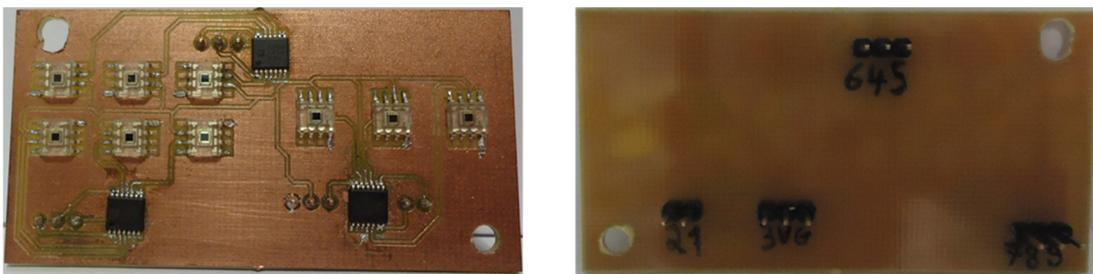


Figura 6.5 - PCB com os fotodíodos. Na imagem da esquerda observa-se o lado da placa que contém os componentes SMD e na imagem da direita, o outro lado da placa que contém os conetores.

A disposição dos fotodíodos na placa foi efetuada de forma a estes ficarem o mais alinhado possível com os LED's da placa descrita anteriormente, garantindo-se assim que o feixe de luz emitido pelos LED's, depois de atravessar a solução contida nos compartimentos do disco de análise, atinge com exatidão a zona ativa dos fotodíodos correspondentes. As dimensões do PCB são as mesmas que a do PCB descrito na secção 6.2.1. Foi necessário fazer dois orifícios no PCB para o fixar à outra placa lateral do suporte para o disco de análise.

6.2.3 Placa de comando

Devido às reduzidas dimensões das duas placas PCB anteriormente descritas, impostas pelo *layout* do dispositivo, foi necessário fabricar uma terceira placa PCB, designada por placa de comando. Nesta placa colocou-se o DEMUX 1:16, o MUX 16:1 e os conetores necessários para se estabelecerem as ligações com o microcontrolador, tal como representado no esquema da figura 5.12 da secção 5.4. Para além disso, implementou-se ainda o sistema de alimentação da figura 5.14 da mesma secção. As dimensões deste PCB (comprimento: 80 mm e

largura: 65 mm) foram determinadas tendo em conta as dimensões do compartimento de comando da caixa do dispositivo, onde ele será colocado. Foi necessário fazer três orifícios na placa, para a fixar à base da caixa e assim evitar que esta se danifique com a utilização do dispositivo. Na figura 6.6 observa-se o PCB fabricado.

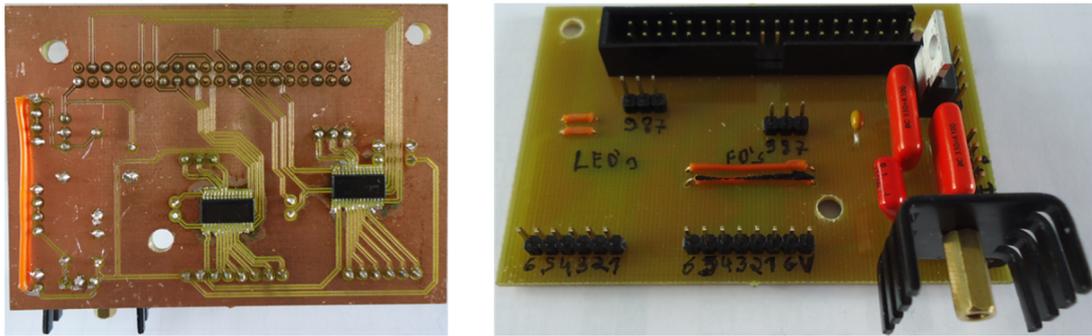


Figura 6.6 - PCB de comando. Na imagem da esquerda observa-se o lado da placa que contém os componentes SMD e na imagem da direita, o outro lado da placa que contém os restantes componentes.

6.3 Dispositivo final e suas especificações

Depois de construídos todos os componentes que compõem o dispositivo, procedeu-se à montagem do mesmo. Na figura 6.7 (a) observa-se o compartimento de análise com o suporte para o disco de análise, o respetivo disco de análise e as placas PCB dos LED's e fotodiodos. Na figura 6.7 (b) observa-se o interior do compartimento de comando, com o microcontrolador, a placa de comando, o interruptor e a bateria de alimentação.



Figura 6.7 - (a) Visão do compartimento de análise; **(b)** Visão do compartimento de análise e de comando.

Especificações do dispositivo final

Seguidamente faz-se uma breve descrição das especificações conseguidas com o dispositivo fabricado. Note-se que elas foram sendo estudadas ao longo de todo o projeto, de forma a obter-se um dispositivo final que cumprisse os objetivos inicialmente propostos.

- Determinação quantitativa de diversas biomoléculas através de um método ótico (absorvência);
- Análise rápida: realiza cada teste em aproximadamente 12 minutos (aproximadamente 2 minutos para efetuar a calibração e 10 minutos para efetuar a análise);
- Fácil de operar, apresentando uma interface intuitiva para o utilizador;

- Permite guardar os resultados da análise num cartão de memória;
- Permite efetuar análises ao sangue (soro) e à urina;
- Quatro discos de análise descartáveis que permitem um diagnóstico correto e fidedigno da DM e Função Renal;
 - Disco 1 – Glucose;
 - Disco 2 - Creatinine & Albumin/Creatinine Ratio;
 - Disco 3 - Diabetic Ketoacidosis (DKA);
 - Disco 4 - Glomerular Filtration Rate (GFR);
- Dimensões reduzidas (comprimento: 200 mm, largura: 100 mm e altura: 60 mm);
- Leve (700 g);
- Portátil;
- Construção económica (\cong 272€, o orçamento detalhado é apresentado no Anexo III);
- Custo por análise relativamente baixo, no Anexo IV são apresentados os diversos custos de cada uma das diferentes análises;

6.4 Resultados experimentais utilizando o dispositivo fabricado

Depois de montado o dispositivo final e antes da realização dos testes experimentais com o mesmo, foi necessário definir certas condições fundamentais para o correto funcionamento do dispositivo. É importante referir que essas condições apenas podem ser obtidas com a caixa completamente montada e fechada.

Em primeiro lugar, definiu-se para os seis reagentes utilizados a tensão de alimentação do primeiro LED, que corresponde ao reagente, de cada conjunto de três LED's, de forma a que a tensão lida pelo fotodiodo nessa cuvete não ultrapasse os 3 V. Tal característica é fundamental, pois caso o valor de tensão lido pelo fotodiodo para a cuvete que contém apenas reagente ultrapasse o valor máximo da tensão de saída do fotodiodo (3,45 V), a saída do fotodiodo satura nos 3,45 V e introduz erros nas medições óticas realizadas. Além disso é importante que esse valor se encontre no máximo admissível, de forma a obter-se a maior gama de valores de tensão possível para determinar as diferentes concentrações de biomolécula, pois

tal como se pode observar nos resultados apresentados na secção 5.2, quanto maior o valor da concentração da amostra, menor é o valor de tensão lido pelo fotodiodo. Esta restrição permite ainda garantir que o valor lido pelo ADC do microcontrolador é inferior ao máximo admitido por este (3,6 V), evitando assim que haja a possibilidade de ele se danificar.

Seguidamente, procedeu-se à determinação das variáveis a e b da equação 5.3 presente na secção 5.4, de forma a ser possível, posteriormente, determinar a concentração de Albumina existente nas diferentes amostras utilizadas, através do método descrito nessa secção. Na equação da figura 6.8 observam-se os valores obtidos para a e b : 1,7006 e 4,529 respetivamente.

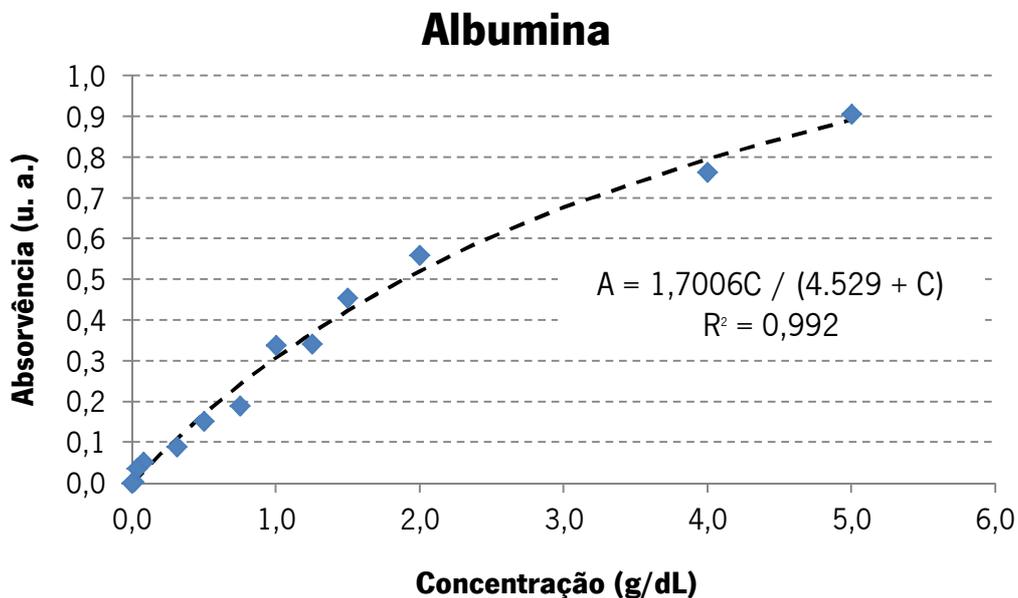


Figura 6.8 - Valores discretos de absorvência em função das diferentes concentrações de Albumina, obtidos após a montagem do dispositivo final.

Por fim, devido ao facto do valor de concentração de algumas das biomoléculas, para o qual a tensão lida no fotodiodo é próxima de 0 V ser inferior ao limite máximo admitido pelo reagente (Tabela 5.1 presente na secção 5.2), foi necessário definir para essas biomoléculas qual o valor de concentração a partir do qual é necessário proceder à diluição da amostra recolhida. Verificou-se ainda que para valores muito próximos de zero, o erro de leitura do fotodiodo era bastante elevado. Sendo assim, definiu-se para as seis biomoléculas um valor de concentração máximo que obedece com uma certa margem de segurança às condições referidas e que garante o correto funcionamento do dispositivo (Tabela 6.1). Estes valores serão fornecidos com o dispositivo.

Tabela 6.1 - Valores máximos de concentração para as diferentes biomoléculas a partir dos quais é necessário diluir as amostras recolhidas.

Biomoléculas	Valor máximo
Glicose	180 mg/dL
Creatinina na urina	120 mg/dL
Albumina	5,0 g/dL
Beta-Hidroxibutirato	1,5 mM
Potássio	7,0 mEq/L
Creatinina no soro	10 mg/dL

Depois de corretamente configurado o dispositivo, realizou-se uma série de testes experimentais com o objetivo de verificar se todos os seus componentes se encontravam corretamente fabricados e montados e se o dispositivo conseguia efetuar de forma correta e precisa a determinação quantitativa das diferentes biomoléculas a analisar. De forma a verificar o correto funcionamento do sistema de isolamento do dispositivo, esses testes foram realizados em condições de luminosidade diferentes. Para a realização destes testes foram utilizadas diferentes concentrações de cada biomolécula que pode ser analisada pelo dispositivo, de forma a testar todas as análises possíveis de realizar. Cada concentração diferente foi testada cinco vezes, sendo, nos resultados, apresentada uma média desses cinco testes e os respectivos desvios padrão obtidos (não se realizaram mais testes devido ao elevado custo dos reagentes).

6.4.1 Resultados

Os resultados obtidos com estes testes são apresentados de seguida. Estes encontram-se organizados por disco de análise e na seguinte ordem:

- Disco 1 – Glicose;
- Disco 2 – Creatinina na urina, Albumina e Razão Albumina/Creatinina;
- Disco 3 – Beta-Hidroxibutirato e Potássio;
- Disco 4 – TFG (Creatinina no soro).

Nos gráficos são apresentados os valores das concentrações obtidas pelo dispositivo após a realização da análise e os valores das concentrações esperadas que correspondem ao valor de concentração teórico da amostra utilizada.

- **Disco 1 - Glicose**

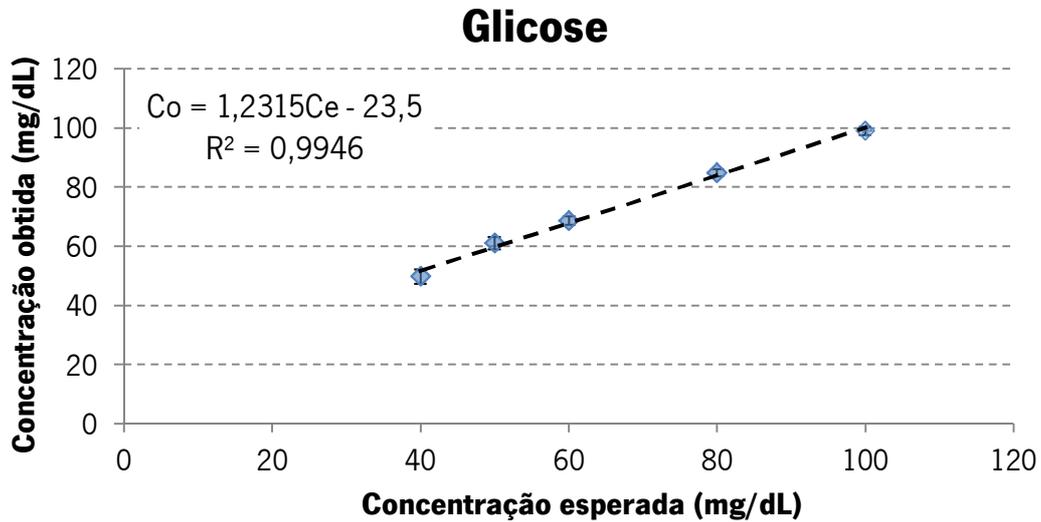


Figura 6.9 - Valores de concentração obtida (Co) em função dos valores de concentração esperada (Ce) para a Glicose

- **Disco 2 - Creatinina na urina, Albumina e Razão Albumina/Creatinina**

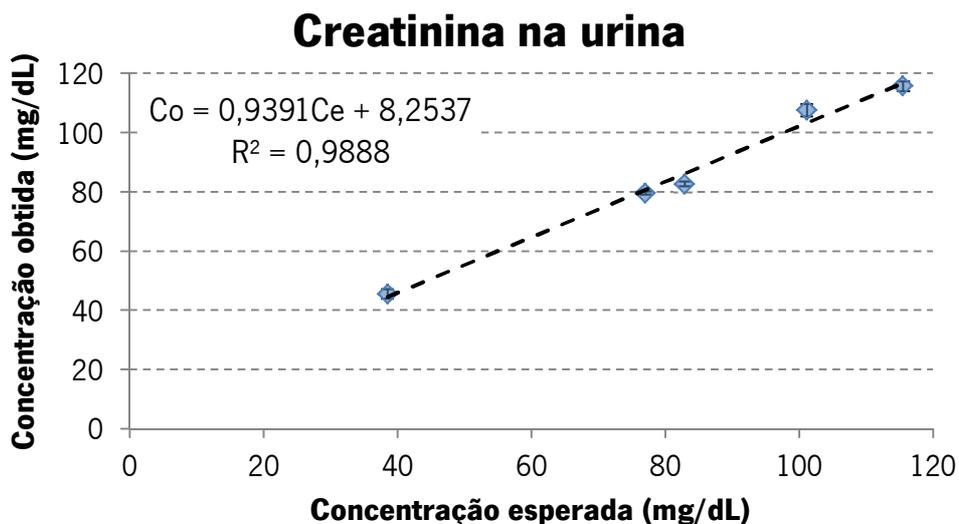


Figura 6.10 - Valores de concentração obtida (Co) em função dos valores de concentração esperada (Ce) para a Creatinina na urina

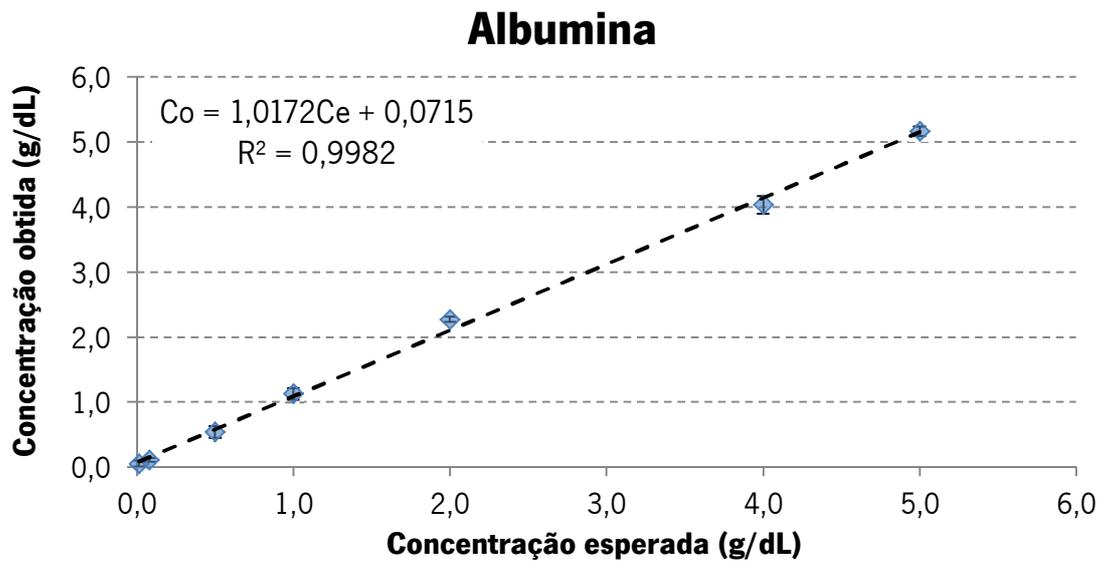


Figura 6.11 - Valores de concentração obtida (C_o) em função dos valores de concentração esperada (C_e) para a Albumina

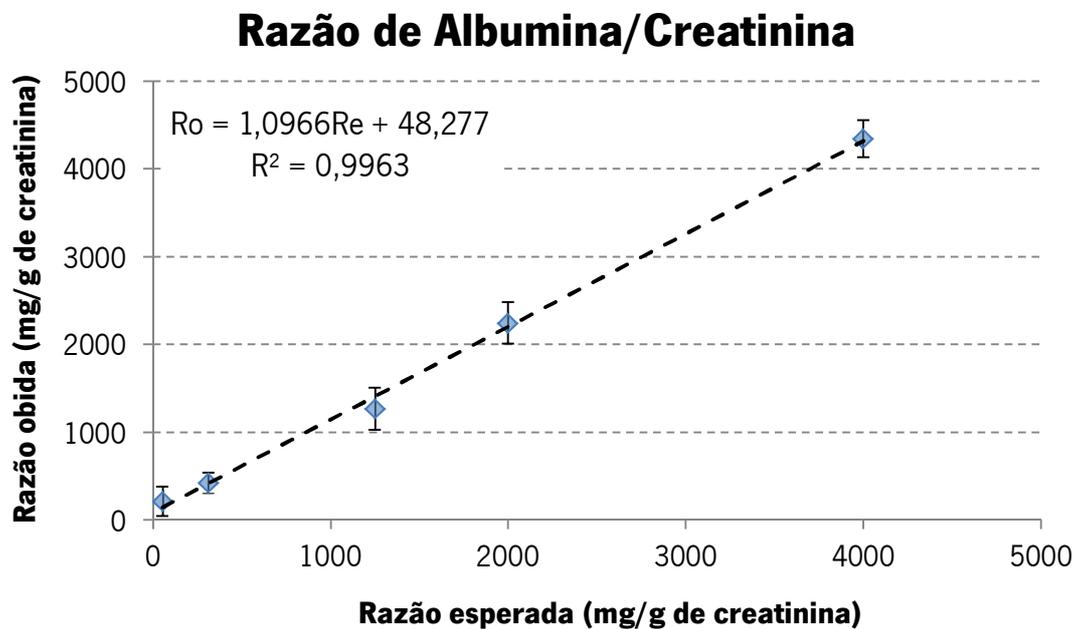


Figura 6.12 - Valores da razão Albumina/Creatinina obtida (R_o) em função dos valores da razão Albumina/Creatinina esperada (R_e)

• Disco 3 - Beta-Hidroxi-butirato e Potássio

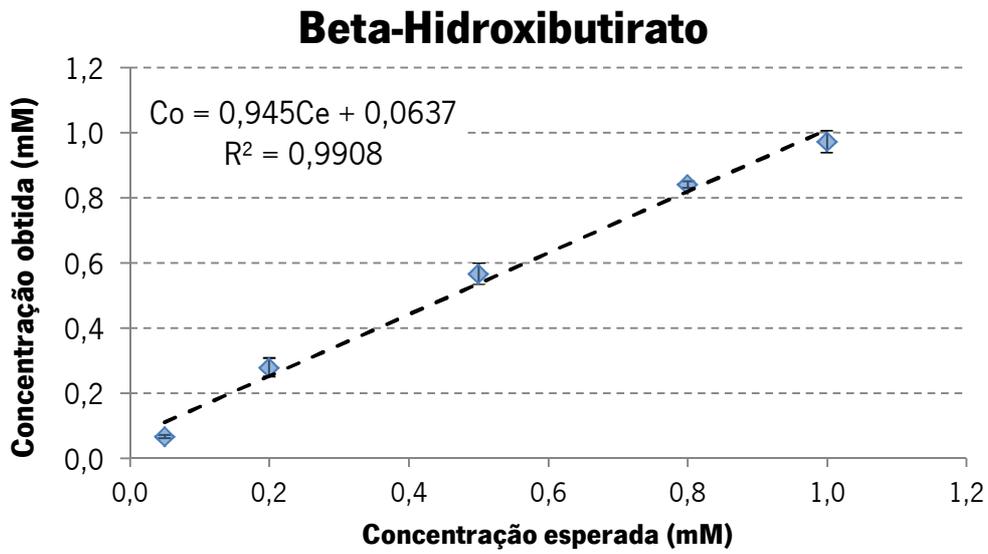


Figura 6.13 - Valores de concentração obtida (C_o) em função dos valores de concentração esperada (C_e) para a Beta-Hidroxi-butirato

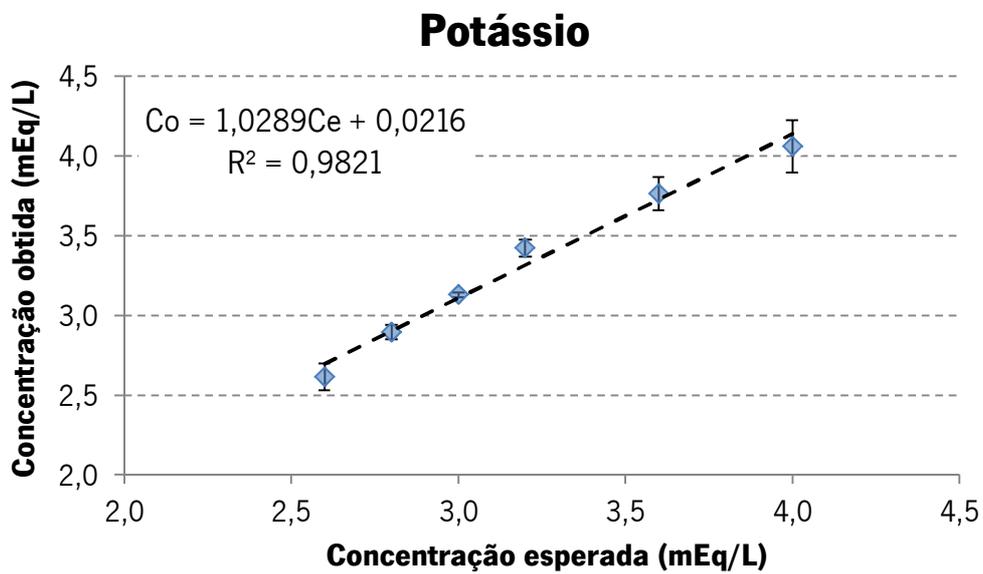


Figura 6.14 - Valores de concentração obtida (C_o) em função dos valores de concentração esperada (C_e) para o Potássio

• Disco 4 - TFG

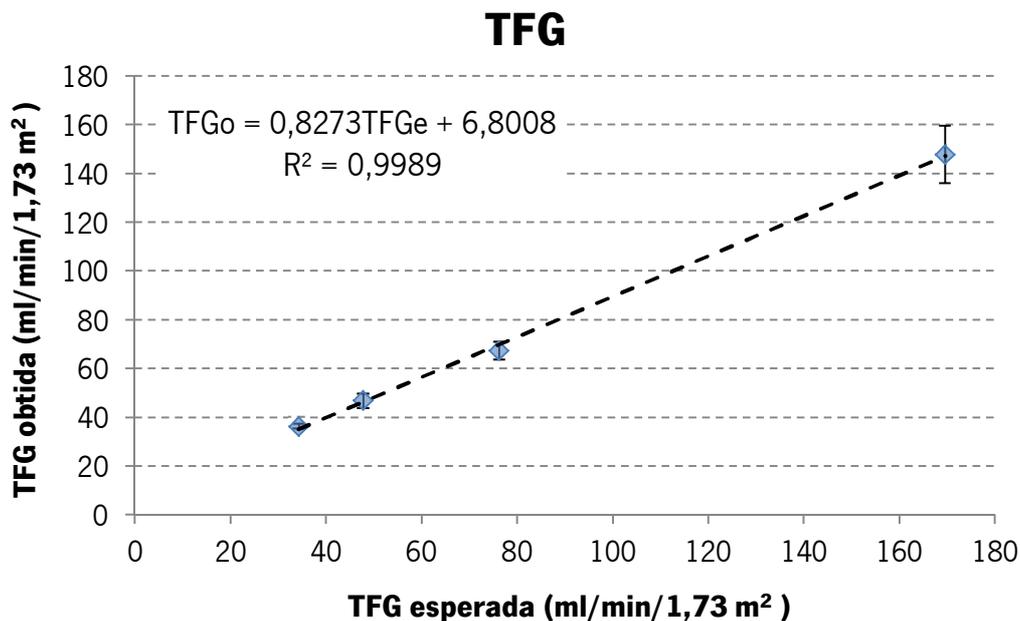


Figura 6.15 - Valores da TFG obtida (*TFGo*) em função dos valores da TFG esperada (*TFGe*)

6.4.2 Discussão de resultados

Analisando os resultados obtidos com os testes experimentais da Glicose (Figura 6.9), Beta-Hidroxibutirato (Figura 6.13) e TFG (Figura 6.15) que utilizam os mesmos LED's e fotodiodos no processo de análise, observa-se que os valores obtidos para o R^2 estão muito próximos de 1 e superiores a 0,99. Tal facto, significa que o erro obtido na determinação quantitativa destas biomoléculas é bastante baixo, o que permite que o dispositivo possa ser utilizado para a determinação da TFG, da concentração de Glicose e Beta-Hidroxibutirato existente no sangue de uma forma fidedigna e com uma precisão aceitável.

A pequena taxa de erro presente nos três casos, deve-se a erros existentes durante o processo de diluição dos respetivos *standards*, utilizados para a obtenção das diferentes concentrações analisadas. Um exemplo disso é o facto de no caso da Glicose, verificar-se que para uma concentração de 100 mg/dL (correspondente à concentração do *standard* e em que não é necessário diluição), a taxa de erro obtida é bastante inferior à obtida para as outras concentrações, nas quais foram realizadas diluições. Observa-se ainda que à medida que a concentração aumenta o erro obtido diminui, o que vem confirmar a proveniência do erro no processo de diluição, e o que é favorável, uma vez que a concentração normal de Glicose

existente no sangue encontra-se perto das 100 mg/dL. Além disso, no caso da Beta-Hidroxi-butirato também se verifica que para uma concentração de 1 mM (correspondente à concentração do *standard* e em que não é necessário diluição) a taxa de erro obtida é, mais uma vez, inferior à obtida para as outras concentrações, em que foram realizadas diluições.

Para a realização dos testes experimentais da TFG utilizou-se diferentes valores de concentração de Creatinina no soro, obtidos a partir da diluição do *standard* de Creatinina fornecido com o reagente. Através dos diversos testes realizados a esta biomolécula, verificou-se que o reagente utilizado para a determinação quantitativa de Creatinina no soro é muito sensível a pequenas variações de concentração da biomolécula existente na amostra analisada, por isso, pequenos erros existentes durante o processo de diluição do *standard* afetam bastante os resultados obtidos. O cálculo da TFG foi efetuado pelo dispositivo, o qual já contém inserida a equação 3.2 presente na secção 3.4, sendo fornecidas ao dispositivo, aquando da seleção desta análise, pelo utilizador as informações necessárias para completar a equação (doente do sexo masculino, de raça não negra e com 60 anos de idade). É importante referir que foram sempre utilizadas estas informações para os diversos testes realizados, com o objetivo de se manterem sempre as mesmas condições de análise. Nos resultados obtidos observa-se ainda que para uma TFG de aproximadamente 170 ml/min/1,73 m², o desvio padrão é mais elevado. Isto deve-se ao facto desse valor da TFG ter sido calculado a partir de uma concentração baixa (0,5 mg/dL) de Creatinina no soro. Sendo assim, devido à elevada sensibilidade do reagente, os pequenos erros obtidos durante o processo de preparação das amostras dessa concentração (que são mais elevados para menores concentrações), vão provocar uma maior variação no valor da TFG obtido.

No caso da Creatinina na urina (Figura 6.10), que utiliza os mesmos LED's e fotodíodos das três análises anteriormente referidas, observa-se que apesar de o valor obtido para o R² ser ligeiramente inferior (0,9888) aos obtidos para as biomoléculas referidas anteriormente, o dispositivo pode ser utilizado para determinar a concentração de Creatinina existente na urina com uma precisão aceitável. A taxa de erro presente deve-se a erros existentes durante o processo de diluição do controlo de urina, já referido na secção 4.1, para a obtenção das diferentes concentrações de biomolécula analisadas. Mais ainda, devido ao facto do valor da concentração do controlo de urina indicado no seu folheto informativo (Anexo I.VII) ser apenas um valor médio (231 mg/dL), podendo o valor real dessa concentração encontrar-se dentro da

seguinte gama de valores (185 mg/dL – 277 mg/dL). A existência dessa gama de valores faz com que o valor de concentração assumido para o *standard* possa não ser o seu valor real e consequentemente sejam obtidos erros durante a determinação quantitativa da concentração de Creatinina existente nas amostras analisadas. Contudo, estes valores de erro obtidos não são significativos para o diagnóstico. À semelhança do que se verifica para o caso da Glicose, para valores mais elevados da concentração de Creatinina também se observa uma diminuição do erro obtido, o que é favorável, pois a concentração normal de Creatinina na urina encontra-se próxima das 300 mg/dL.

Analisando os resultados obtidos com os testes da Albumina (Figura 6.11), que utiliza o segundo conjunto de LED's e fotodíodos, observa-se que o valor obtido para o R^2 encontra-se muito próximo de 1 e superior a 0,99. No entanto, verifica-se que o dispositivo para concentrações de Albumina inferiores a 0,5 g/dL apresenta uma taxa de erro mais elevada. Esse aumento da taxa de erro, deve-se mais uma vez a erros existentes durante o processo de diluição do *standard* para obter as pequenas concentrações de biomolécula utilizadas, uma vez que foi necessário realizar um grande número de diluições consecutivas a partir do *standard* (5 g/dL) para obter esses pequenos valores de concentração. Outro fator que pode ser responsável pelo aumento da taxa de erro é o facto de se utilizar uma equação previamente inserida no dispositivo. A utilização dessa equação é sempre responsável pela introdução de pequenos erros, principalmente para valores de absorvência mais baixos, onde pequenas variações no valor de absorvência lido dão origem à modificação do valor de concentração calculado. O erro introduzido pela equação é provocado pelo facto de quando o dispositivo procede à verificação do valor lido para a absorvência do *standard*, admite um erro nesse valor de 0% até 1%, tal como referido na secção 5.4.

Analisando os resultados obtidos para a razão Albumina/Creatinina (Figura 6.12), observa-se que o valor obtido para o R^2 encontra-se próximo de 1, embora para valores mais baixos da razão Albumina/Creatinina o dispositivo apresente uma taxa de erro ligeiramente mais elevada. Tal facto deve-se à dificuldade do dispositivo na determinação das baixas concentrações de Albumina presente na urina, tal como anteriormente referido. Analisando os resultados obtidos neste caso para o desvio padrão observa-se que estes encontram-se ligeiramente mais elevados que os obtidos para as outras análises. Tal situação deve-se ao facto do cálculo da razão Albumina/Creatinina ser influenciado simultaneamente pelas taxas de erro obtidas na

determinação das concentrações de Creatinina e de Albumina presentes na urina pois, os resultados apresentados correspondem a baixas concentrações de Albumina presentes na urina (concentrações para as quais o dispositivo apresenta uma maior taxa de erro na sua determinação). Com base nestes resultados, conclui-se que o dispositivo pode ser utilizado na determinação da razão Albumina/Creatinina com alguma precisão, embora para valores mais baixos (menos que 100 mg/g de creatinina) se verifique uma taxa de erro ligeiramente mais elevada (cerca de 20%).

Por fim, analisando os resultados obtidos com os testes experimentais do Potássio (Figura 6.14), que utiliza o terceiro conjunto de LED's e fotodíodos, observa-se que apesar do valor obtido para o R^2 ser ligeiramente inferior (0,9821) aos obtidos anteriormente, pode afirmar-se que o dispositivo pode ser utilizado para determinar a concentração de Potássio existente no sangue com alguma precisão. Além disso, verifica-se ainda que os desvios padrões obtidos para algumas concentrações encontram-se ligeiramente mais elevados, o que também ajuda a explicar a maior taxa de erro obtida. A taxa de erro presente, deve-se a erros existentes na diluição do *standard*, tal como para os casos anteriores.

Com base nos resultados obtidos para a Glicose, Creatinina na urina, Beta-Hidroxibutirato e TFG observa-se que o primeiro conjunto de LED's e fotodíodos, utilizado para realizar as análises destas biomoléculas, encontra-se corretamente montado e alinhado. Com base nos resultados obtidos para a Albumina, observa-se que o segundo conjunto de LED's e fotodíodos também se encontra corretamente montado e alinhado. Por outro lado, as maiores taxas de erro observadas nos resultados obtidos com os testes do Potássio podem indicar, para além dos problemas nas diluições, que os LED's e respetivos fotodíodos do terceiro conjunto não se encontram tão corretamente alinhados como os dos outros dois conjuntos.

Os resultados obtidos permitem ainda concluir que as três placas PCB encontram-se bem construídas, uma vez que o dispositivo funcionou corretamente durante a realização das diferentes análises. Além disso, pode concluir-se que o sistema de isolamento do compartimento de análise é eficaz, uma vez que este foi sujeito a variações exteriores de luminosidade e não se verificou a existência dessas interferências durante a realização das medições óticas no dispositivo.

Capítulo 7 – Conclusão e perspectivas de trabalhos futuros

Este capítulo apresenta as principais conclusões desta dissertação assim como os potenciais trabalhos futuros que poderão ser desenvolvidos.

7.1 Conclusão

Os DM são uma das doenças crônicas mais comuns em todo o mundo, verificando-se nas últimas décadas um aumento drástico da sua incidência, predominantemente devido à mudança do estilo de vida, aumento da prevalência da obesidade e envelhecimento da população. Quando não tratados adequadamente, os DM levam ao desenvolvimento de outras complicações crônicas. A análise da Função Renal, associada aos DM apresenta uma elevada importância, uma vez que os diabetes constituem uma das principais causas da insuficiência renal. Com base nessas informações e em conjunto com os médicos Dr. Carlos Capela e Dr. José Mariz chegou-se à conclusão que seria muito interessante e vantajoso para a comunidade médica desenvolver um dispositivo POCT específico para o diagnóstico/monitorização dos DM e da Função Renal.

Atualmente existe uma vasta gama de dispositivos POCT disponíveis comercialmente que utilizam diferentes técnicas e métodos de análise e que permitem realizar um grande conjunto de análises clínicas. Sendo assim, e depois de estudadas as principais vantagens e desvantagens dos dispositivos POCT existentes, eletroquímicos e óticos, conclui-se que era preferível desenvolver um dispositivo que utilizasse técnicas óticas, uma vez que estas permitem obter uma maior sensibilidade de detecção, um custo por teste inferior e são menos influenciadas por fatores externos como a temperatura, humidade e variações de pH.

O dispositivo POCT projetado e fabricado baseia-se no método de detecção por absorvência e contém um algoritmo interno de decisão capaz de informar o doente do estágio da sua doença e de guiá-lo através de um conjunto sequencial de análises, sem haver a necessidade de intervenção médica entre cada análise.

Foram realizados inicialmente testes experimentais, utilizando um sistema ótico existente no laboratório, e que tiveram como objetivo a prova do conceito, a validação da informação contida nos protocolos dos diferentes reagentes selecionados, a confirmação da linearidade dos mesmos reagentes e a obtenção da menor quantidade de amostra que pode ser analisada. Estas características são fundamentais para o projeto do dispositivo e para o seu correto funcionamento. Com a realização destes testes, conclui-se que é possível utilizar os reagentes selecionados para a determinação quantitativa das biomoléculas a analisar.

Depois de definidas as condições necessárias para a determinação quantitativa das biomoléculas a analisar, procedeu-se à planificação e seleção de toda a eletrónica a utilizar. O segundo conjunto de testes experimentais realizados teve como objetivo verificar se os componentes eletrónicos selecionados eram adequados para a determinação quantitativa das biomoléculas e se a linearidade dos reagentes se mantinha ao utilizar esses componentes. Com a realização destes testes, conclui-se que os LED's, o fotodíodos e a restante eletrónica adicional são apropriados para serem utilizados no dispositivo final, uma vez que a linearidade dos reagentes se manteve e a determinação das diferentes concentrações de biomolécula utilizadas foi feita de forma precisa.

Posteriormente à realização dos testes com a respetiva eletrónica a colocar no dispositivo, procedeu-se ao *design* do dispositivo e construção do mesmo, de forma a cumprir os objetivos inicialmente propostos: sistema de reduzidas dimensões, baixo custo de produção, leve, portátil e fácil de operar. Nesta fase, procedeu-se ainda à programação do dispositivo de forma a implementar nele o algoritmo interno de decisão desenvolvido. Os resultados obtidos com os testes experimentais no dispositivo final, terceiro conjunto de testes, permitiram concluir que o dispositivo POCT fabricado efetua a determinação quantitativa dessas biomoléculas definidas como críticas para a obtenção de um diagnóstico fiável dos DM e da Função Renal.

Relativamente às principais dificuldades e limitações sentidas ao longo da realização desta dissertação, estas encontram-se relacionadas com o tempo de espera de algum material e com o elevado custo de certos reagentes necessários para a realização dos testes experimentais. Outras dificuldades estão relacionadas com o correto funcionamento dos PCB's fabricados devido a fenómenos de oxidação e corrosão dos mesmos. Para além disso, verificou-se que este tipo de placas é bastante afetado por fenómenos de eletricidade estática, o que condiciona o seu

correto funcionamento. Estas dificuldades podem ser eliminadas através do fabrico de PCB's com melhores características de isolamento.

As características do dispositivo permitem que este possa ser utilizado em instituições de saúde, em instituições de solidariedade social, como o caso dos lares de 3ª idade e em países em desenvolvimento. A utilização do dispositivo POCT implementado permite uma grande economia de tempo e de recursos, uma vez que não é necessário a intervenção médica entre cada análise, mas sim apenas no fim de realizado o conjunto de análises indicado pelo dispositivo.

7.2 Perspetivas de trabalhos futuros

Como perspetivas de trabalhos num futuro próximo, realça-se a melhoria dos PCB's utilizados neste primeiro protótipo do dispositivo, de forma a eliminar por completo interferências que possam existir. Mais ainda, será necessária a realização de testes clínicos numa população mais representativa, composta por uma amostra de cerca de 200 indivíduos com DM em vários graus e indivíduos saudáveis, de forma a validar-se o correto funcionamento do dispositivo em ambiente clínico. Pretende-se ainda, que as amostras recolhidas dessa população selecionada sejam analisadas em simultâneo por um laboratório de análises clínicas, de forma a ser possível confirmar a veracidade dos resultados obtidos com o dispositivo construído.

A adição de uma placa *wireless* ao dispositivo, de forma a permitir enviar os resultados das análises efetuadas diretamente para a base de dados da instituição responsável pelo dispositivo, também constitui um dos trabalhos futuros a desenvolver.

Outra perspetiva de trabalho futuro recai na alteração do disco de análise fabricado, de forma a incorporar um sistema que permita a separação do sangue em soro e componentes celulares. Tal característica permitirá eliminar a necessidade da utilização de outros equipamentos necessários para a separação do sangue, como por exemplo uma centrífuga. Além disso, pretende-se que este novo disco contenha um sistema capaz de definir o volume adequado de amostra necessário para cada uma das reações, permitindo assim que o utilizador insira apenas um determinado volume de sangue no dispositivo, em vez de estar a medir o volume de amostra (soro) necessário para cada reação.

Numa perspetiva mais alargada, a criação de novos discos de análise, que permitam fazer o diagnóstico de outras doenças que possam estar relacionadas com os DM e com a Função Renal, uma vez que caso essas análises utilizem os mesmos LED's, basta apenas alterar o *software* do dispositivo, de forma a este aceitar os novos discos de análise criados. Ou seja, realizar mais análises diferentes não significa a necessidade de construir um novo dispositivo.

Bibliografia

- [1] P. B. Lippa, C. Muller, A. Schlichtiger e H. Schlebusch, "Point-of-care testing (POCT): Current techniques and future perspectives," *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 30, n.º 6, pp. 887-898, 2011.
- [2] G. J. Fermann e J. Suyama, "POINT OF CARE TESTING IN THE EMERGENCY DEPARTMENT," *The Journal of Emergency Medicine*, vol. 22, n.º 4, pp. 393-404, 2002.
- [3] College of American Pathologists, "Point-of-care testing, section 30," College of American Pathologists, Northfield, IL, 2001.
- [4] C. A. Holland e F. L. Kiechle, "Point-of-care molecular diagnostic systems — past, present and future," *Current Opinion in Microbiology*, vol. 8, pp. 504-509, 2005.
- [5] O. Adeogun, A. Tiwari e J. R. Alcock, "Informatics-based product-service systems for point-of-care devices," *CIRP Journal of Manufacturing Science and Technology*, vol. 3, pp. 107-115, 2010.
- [6] E. Lee-Lewandrowski e K. Lewandrowski, "Perspectives on Cost and Outcomes for Point-of-Care Testing," *Clinics in Laboratory Medicine*, vol. 29, n.º 3, pp. 479-489, Setembro 2009.
- [7] C. Willmott e J. E. Arrowsmith, "Point-of-care testing," *Surgery*, vol. 28, n.º 4, pp. 159-160, 2010.
- [8] "A importância do medidor de glicemia no consultório odontológico," [Online]. Available: <http://sorridentsfranchising.wordpress.com/2010/02/11/a-importancia-do-medidor-de-glicemia-no-consultorio-odontologico/>. [Acedido em 22 Maio 2012].
- [9] "Cardinal Health," [Online]. Available: <http://www.cardinal.com/us/en/distributedproducts/ASP/6F16-10.asp?cat=laboratory>. [Acedido em 22 Maio 2012].
- [10] "ABAXIS - PICCOLO XPRESS," [Online]. Available: <http://www.sire-web.com/shop/product.php?productid=120&cat=59&page=1>. [Acedido em 22 Maio 2012].
- [11] "Alere Health- Products," [Online]. Available: <http://www.alerehealth.nl/products/4ka.html>. [Acedido em 22 Maio 2012].
- [12] "Reflotron," [Online]. Available: <http://www.agiannidis-medizintechnik.com/hardware/reflotron.htm>. [Acedido em 22 Maio 2012].

Bibliografia

- [13] "Sysmex pocH-100i™," [Online]. Available: <http://www.labwrench.com/?equipment.view/equipmentNo/10828/Sysmex/pocH-100i-trade/>. [Acedido em 22 Maio 2012].
- [14] "Velez Lab," [Online]. Available: http://www.velezlab.com.co/catalog_detail.php?pro=107&cte=94&lang=en. [Acedido em 23 Maio 2012].
- [15] "Radiometer," [Online]. Available: <http://www.radiometer.com/en/products/immunoassay/aqt90-flex-analyzer>. [Acedido em 23 Maio 2012].
- [16] "ITC - IRMA TruPoint," [Online]. Available: http://zoll.com.au/products/itc_trupoint/. [Acedido em 23 Maio 2012].
- [17] "OPTI Medical Systems," [Online]. Available: http://www.optimedical.com/products/opti/opti_cca_touch_over.htm. [Acedido em 23 Maio 2012].
- [18] "Blood Gas Testing," [Online]. Available: http://www.rochecanada.com/portal/ca/blood_gas_testing. [Acedido em 23 Maio 2012].
- [19] M. T. Ganter e C. K. Hofer, "Coagulation Monitoring: Current Techniques and Clinical Use of Viscoelastic Point-of-Care Coagulation Devices," *Anesthesia & Analgesia*, vol. 106, n.º 5, pp. 1366-1375, Maio 2008.
- [20] "ROTEM® delta," [Online]. Available: http://www.rotem.de/site/index.php?option=com_content&view=article&id=7&Itemid=18&lang=en. [Acedido em 23 Maio 2012].
- [21] "Sienco," [Online]. Available: <http://www.sienco.com/main.html>. [Acedido em 23 Maio 2012].
- [22] A. M. Corstjens, J. J. Ligtenberg, I. C. van der Horst, R. Spanjersberg, J. S. Lind, J. E. Tulleken, J. H. Meertens e J. G. Zijlstra, "Accuracy and feasibility of point-of-care and continuous blood glucose analysis in critically ill ICU patients," *Critical Care*, vol. 10, n.º R135, pp. 1-7, 2006.
- [23] "Guardian® REAL-Time System," [Online]. Available: http://medgadget.com/2006/07/guardian_realti.html. [Acedido em 23 Maio 2012].
- [24] "diaTribe," [Online]. Available: <http://www.diatribes.us/issues/9/new-now-next.php>. [Acedido em 23 Maio 2012].
- [25] "Cepheid | GeneXpert," [Online]. Available: <http://www.cepheid.com/product->

- catalog/systems/genexpert-iv/. [Acedido em 23 Maio 2012].
- [26] F. B. Myers e L. P. Lee, "Innovations in optical microfluidic technologies for point-of-care diagnostics," *The Royal Society of Chemistry*, vol. 8, pp. 2015-2031, 2008.
- [27] B. Kuswandi, Nuriman, J. Huskens e W. Verboom, "Optical sensing systems for microfluidic devices: A review," *Analytica Chimica Acta*, vol. 601, pp. 141-155, Setembro 2007.
- [28] Abaxis, "Intelligent Quality Control (iQC) on the Piccolo Point-of-Care Chemistry Analyzer".
- [29] "Piccolo Xpress," [Online]. Available: <http://www.piccoloxpress.com/medical-diagnostics/piccolo-xpress>. [Acedido em 25 Maio 2012].
- [30] Roche Portugal, "Reflotron Plus - Roche Portugal," [Online]. Available: <http://www.roche.pt/portugal/index.cfm/produtos/equipamentos-de-diagnostico/products/near-patient-testing/reflotron-plus/>. [Acedido em 28 Maio 2012].
- [31] Alere, "Alere Triage® MeterPro," [Online]. Available: <http://www.alere.com/us/en/product-details/triage-meterpro.html>. [Acedido em 28 Maio 2012].
- [32] Alere, "Triage MeterPro User Manual," 2012. [Online]. Available: https://sdmctrlprod.biosite.com/MC/main/mastercontrol/vault/view_doc.cfm?ls_id=3EF04F1C073D10439F. [Acedido em 28 Maio 2012].
- [33] M. Salem, B. Chemow e R. Burke, "Bedside diagnostic testing: its accuracy, rapidity, and utility in blood conservation," *JAMA*, vol. 266, pp. 382-389, 1991.
- [34] G. J. Kost, S. S. Ehrmeyer, B. Chernow, J. W. Winkelman, G. P. Zaloga, R. P. Dellinger e T. Shirey, "The Laboratory-Clinical Interface: Point-of-Care Testing," *CHEST*, vol. 115, n.º 4, pp. 1140-1154, Abril 1999.
- [35] World Health Organization, "Global status report on noncommunicable diseases 2010," WHO, Geneva, 2010.
- [36] I. Heydari, V. Radi, S. Razmjou e A. Amiri, "Chronic complications of diabetes mellitus in newly diagnosed patients," *International Journal of Diabetes Mellitus*, vol. 2, p. 61-63, 2010.
- [37] I. Ahmed e B. Goldstein, "Diabetes mellitus," *Clinics in Dermatology*, n.º 24, p. 237-246, 2006.
- [38] E. T. Rhodes, L. A. Prosser, T. J. Hoerger, T. Lieu, D. S. Ludwig e L. M. Laffel, "Estimated morbidity and mortality in adolescents and young adults diagnosed with Type 2

- diabetes mellitus," *Diabetic Medicine*, vol. 29, n.º 4, pp. 453-463, 2012.
- [39] A. J. Krentz, G. Clough e C. D. Byrne, "Interactions between microvascular and macrovascular disease in diabetes: pathophysiology and therapeutic implications," *Diabetes, Obesity and Metabolism*, n.º 9, p. 781–791, 2007.
- [40] M. G. B. K, B. Nayal, S. D. O, S. Shivashanker, R. Maradi e D. R. N, "MICROALBUMIURIA AND SERUM CREATININE LEVELS IN DIABETIC AND NON-DIABETIC SUBJECTS," *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, vol. 8, n.º 1, pp. 93-95, 2011.
- [41] R. Mouton e K. Holder, "Laboratory tests of renal function," *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, vol. 7, n.º 7, pp. 240-243, 2006.
- [42] American Diabetes Association, "Nephropathy in Diabetes," *Diabetes Care*, vol. 27, pp. 79-83, Janeiro 2004.
- [43] "La Starting Grant del CER dà il via alla ricerca indipendente sul diabete," 4 Agosto 2012. [Online]. Available: <http://www.liquidarea.com/2009/09/la-starting-grant-del-cer-da-il-via-alla-ricerca-indipendente-sul-diabete>.
- [44] The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, "Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus," *Diabetes Care*, n.º 20, p. 1183–1197, 1997.
- [45] The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, "Follow-up Report on the Diagnosis of Diabetes Mellitus," *Diabetes Care*, n.º 26, p. 3160–3167, 2003.
- [46] A. D. ASSOCIATION, "Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus," *Diabetes Care*, vol. 34, pp. 62-69, 2011.
- [47] 23 Março 2012. [Online]. Available: <http://labtestsonline.org/understanding/analytes/glucose/tab/test#>. [Acedido em 8 Maio 2012].
- [48] American Diabetes Association, "Standards of Medical Care in Diabetes," *Diabetes Care*, vol. 32, n.º 1, pp. 13-61, 2009.
- [49] J. d. A. B. Cotter, *Relações da hipertensão arterial com a taxa de excreção de albumina numa consulta hospitalar de hipertensão arterial e risco cardiovascular*, 2008.
- [50] National Heart Lung and Blood Institute, "The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure," p. 37, 2004.

- [51] U. Lad, S. Khokhar e G. M. Kale, "Electrochemical Creatinine Biosensors," *Analytical Chemistry*, vol. 80, n.º 21, pp. 7910-7917, Novembro 2008.
- [52] C. D. Rasmussen, J. E. T. Andersen e B. Zachau-Christiansen, "Improved Performance of the Potentiometric Biosensor for the Determination of Creatinine," *Analytical Letters*, vol. 40, n.º 1, pp. 39-52, Fevereiro 2007.
- [53] Laboratory Redwood Toxicology. [Online]. Available: <http://www.redwoodtoxicology.com/>. [Acedido em 10 Maio 2012].
- [54] J. E. R. Junior, "A Doença Renal Crônica: Do Diagnóstico ao Tratamento," *Prática Hospitalar*, n.º 52, pp. 183-187, Julho-Agosto 2007.
- [55] B. Guerci, N. Tubiana-Rufi, B. Bauduceau, R. Bresson, A. Cuperlier, C. Delcroix, D. Durain, C. Fermon, J. Le Floch, C. Le Devehat, V. Melki, L. Monnier, H. Mosnier-Pudar, P. Taboulet e H. Hanaire-Broutin, "Advantages to using capillary blood B-hydroxybutyrate determination for the detection and treatment of diabetic ketosis," *Diabetes Metab*, vol. 31, pp. 401-406, 2005.
- [56] J. Hughes e J. A. Jefferson, *Clinical Chemistry Made Easy*, Churchill Livingstone, 2008.
- [57] American Diabetes Association, "Hyperglycemic Crises in Patients With Diabetes Mellitus," *Clinical Diabetes*, vol. 19, n.º 2, pp. 82-90, 2001.
- [58] A. Kratz, M. Ferraro, P. M. Sluss e K. B. Lewandrowski, "Laboratory Reference Values," *The New England Journal of Medicine*, vol. 351, n.º 15, pp. 1548-1564, Outubro 2004.
- [59] W. V. Biesen, R. Vanholder e N. Lameire, "Defining Acute Renal Failure: RIFLE and Beyond," *Clin J Am Soc Nephrol*, vol. 1, pp. 1314-1319, 2006.
- [60] J. G. Abuelo, *Renal Failure: Diagnosis and Treatment*, Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995, pp. 3-5.
- [61] L. A. Stevens, J. Coresh, T. Greene e A. S. Levey, "Assessing Kidney Function - Measured and Estimated Glomerular Filtration Rate," *The New England Journal of Medicine*, vol. 354, n.º 23, pp. 2473-2483, Junho 2006.
- [62] A. S. Levey, J. P. Bosch, J. B. Lewis, T. Greene, N. Rogers e D. Roth, "A More Accurate Method To Estimate Glomerular Filtration Rate from Serum Creatinine: A New Prediction Equation," *Annals of Internal Medicine*, vol. 130, n.º 6, pp. 461-470, Março 1999.
- [63] A. S. Levey, T. Greene, M. D. Schluchter, P. A. Cleary, P. E. Teschan, R. A. Lorenz, M. E. Molitch, W. E. Mitch, C. Siebert e P. M. Hall, "Glomerular Filtration Rate Measurements in Clinical Trials," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 4, n.º 5, pp. 1159-1171, 1993.

- [64] J. Coresh, R. D. Toto, K. A. Kirk, P. K. Whelton, S. Massry, C. Jones, L. Agodoa e F. V. Lente, "Creatinine Clearance as a Measure of GFR in Screenees for the African-American Study of Kidney Disease and Hypertension Pilot Study," *American Journal of Kidney Diseases*, vol. 32, n.º 1, pp. 32-42, Julho 1998.
- [65] F. Gaspari, N. Perico, M. Matalone, O. Signorini, N. Azzollini, M. Mister e G. Remuzzi, "Precision of Plasma Clearance of Iohexol for Estimation of GFR in Patients with Renal Disease," *Journal of the American Society of Nephrology*, pp. 310-313, 1988.
- [66] F. Ceriotti, J. C. Boyd, G. Klein, J. Henny, J. Queraltó, V. Kairisto e M. Panteghini, "Reference Intervals for Serum Creatinine Concentrations: Assessment of Available Data for Global Application," *General Clinical Chemistry*, vol. 54, n.º 3, pp. 559-566, 2008.
- [67] N. Fontseré, I. Salinas, J. Bonal, B. Bayés, J. Riba, F. Torres, J. Rios, A. Sanmartí e R. Romero, "Are prediction equations for glomerular filtration rate useful for the long-term monitoring of type 2 diabetic patients?," *Nephrol Dial Transplant*, vol. 21, pp. 2152-2158, Maio 2006.
- [68] A. D. Rule, T. S. Larson, E. J. Bergstralh, J. M. Slezak, S. J. Jacobsen e F. G. Cosio, "Using Serum Creatinine To Estimate Glomerular Filtration Rate: Accuracy in Good Health and in Chronic Kidney Disease," *Annals of Internal Medicine*, vol. 141, n.º 12, pp. 929-938, Novembro 2004.
- [69] M. B. Madaras e R. P. Buck, "Miniaturized Biosensors Employing Electropolymerized Permselective Films and Their Use for Creatinine Assays in Human Serum," *Analytical Chemistry*, vol. 68, n.º 21, pp. 3832-3839, Novembro 1996.
- [70] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler e S. R. Crouch, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 8ª ed., Canada: Brooks/Cole - Thomson Learning, 2004, pp. 710-739.
- [71] "Magnetismo," [Online]. Available: <http://magnetiismo.blogspot.pt/2012/04/espectro-eletromagnetico.html>. [Acedido em 25 Julho 2012].
- [72] C. Zhang, *Fundamentals of Environmental Sampling and Analysis*, United States of America: Wiley, 2007, p. 204.
- [73] C. E. Housecroft e E. C. Constable, *Chemistry: An Introduction to Organic, Inorganic, and Physical Chemistry*, 3ª ed., Prentice Hall, 2005, p. 348.
- [74] J. C. Kotz, P. M. Treichel e G. C. Weaver, *Chemistry and Chemical Reactivity*, 7ª ed., vol. 2, Canada: Thomson Brooks/Cole, 2006, pp. 189-192.
- [75] "Chem," [Online]. Available: <http://www.chemhacker.com/2011/06/transmissometry-extended/>. [Acedido em 26 Julho 2012].

- [76] D. C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis*, 7ª ed., New York: W. H. Freeman and Company, 2007, pp. 133-136.
- [77] C. Starr, C. A. Evers e L. Starr, *Biology: Concepts and Applications*, 8ª ed., Brooks/Cole, Cengage Learning, 2011, p. 94.
- [78] D. J. Holme e H. Peck, *Analytical Biochemistry*, 3ª ed., Singapore: Prentice Hall, 1988.
- [79] Toshiba, *TLBE1100B(T11), TLGTE1100B(T11), TLEGE1100B(T11)*, Datasheet, 2006.
- [80] “Fontes Ópticas - Tipos e principais características -,” [Online]. Available: <http://radio.lx.it.pt/STG/STG0405acetatos10.pdf>. [Acedido em 03 Setembro 2012].
- [81] Avago Technologies, *HSMx-A10x-xxxxx PLCC-2 Surface Mount LED Indicator*, Datasheet, 2010.
- [82] Texas Advanced Optoelectronic Solutions Inc, *TSL250RD, TSL251RD, TSL260RD, TSL261RD Light-to-Voltage Optical Sensors*, Datasheet, 2007.
- [83] ETAP, *Dossier LED, Iluminação com uma nova fonte de luz*, 2ª ed., 2011.
- [84] D. De, *Basic Electronics*, Dorling Kindersley, 2010, p. 557.
- [85] Analog Devices, *CMOS, +1.8 V to +5.5 V/ 2.5 V, 2.5 Low-Voltage, 8-/16-Channel Multiplexers*, Datasheet, 2002.
- [86] STMicroelectronics, *Positive voltage regulators L7800 series*, Datasheet, 2006.
- [87] Texas Instruments, *POSITIVE-VOLTAGE REGULATORS uA78M00 SERIES*, Datasheet, 2010.
- [88] H.-G. Eisenwiener e M. Keller, “Absorbance Measurement in Cuvettes Lying Longitudinalto the Light Beam,” *Clinical Chemistry*, vol. 25, n.º 1, pp. 117-121, 1979.
- [89] K. Mitzner, *Complete PCB design using OrCad capture and layout*, 1ª ed., Newnes, 2007, pp. 1-14.
- [90] CadSoft, “CadSoft - Home of CadSoft EAGLE PCB Design Software- Best PCB Design Software,” [Online]. Available: <http://www.cadsoftusa.com/>. [Acedido em 7 Agosto 2012].

Anexos

Anexo I – Protocolos dos reagentes selecionados

Os protocolos dos reagentes selecionados são apresentados na seguinte ordem:

Anexo I.I – Protocolo do reagente da Glicose.

Anexo I.II – Protocolo do reagente da Creatinina na urina.

Anexo I.III – Protocolo do reagente da Albumina.

Anexo I.IV – Protocolo do reagente da Beta-Hidroxibutirato.

Anexo I.V – Protocolo do reagente do Potássio.

Anexo I.VI – Protocolo do reagente da Creatinina no soro.

Anexo I.VII – Folheto informativo do Lyphochek Quantitative Urine Control.

Anexo I.I – Protocolo do reagente da Glicose.



BIOLABO REAGENTS
www.biolabo.fr

MANUFACTURER:
BIOLABO SA,
02160, Maizy, France

GLUCOSE GOD-PAP

Reagent for quantitative determination of glucose
in human plasma, serum, cerebrospinal fluid (CSF) or urines

REF 80009	R1	1 x 500 mL	R2	1 x 7.5 mL	R3	1 x 5 mL
REF 87109	R1	6 x 250 mL	R2	6 x 3.75 mL	R3	1 x 5 mL
REF 16GL8	R1	6 x 1000 mL	R2	6 x 15 mL	R3	2 x 5 mL

TECHNICAL SUPPORT AND ORDERS

Tel : (33) 03 23 25 15 50

Fax : (33) 03 23 256 256



IVD IN VITRO DIAGNOSTIC USE

CLINICAL SIGNIFICANCE (1) (6)

The glucose level in blood is maintained within a fairly narrow range under diverse conditions (feeding, fasting, or severe exercise) by regulatory hormones such as insulin, glucagon, or epinephrin. Measurement of glucose is one of the most frequently performed procedures in clinical chemistry laboratories in conjunction with other tolerance testing (Glucose tolerance test, Glucose 2h post-prandial...).

The most frequently encountered disorder of carbohydrate metabolism in blood is hyperglycemia due to diabetes mellitus.

Hyperglycemia higher than 300 mg/dL (16.5 mmol/L) may induce keto-acidosis and hyperosmolar coma.

In prolonged hypoglycemia, lower than 30 mg/dL (1.7 mmol/L), severe irreversible encephalic damage may occurs.

PRINCIPLE (4) (5)

Trinder Method. Glucose is oxidised by GOD to gluconic acid and hydrogen peroxide which in conjunction with POD, reacts with chloro-4-phenol and PAP to form a red quinoneimine. The absorbance of the coloured complexe, proportional to the concentration of glucose in the specimen is measured at 500 nm.

REAGENTS COMPOSITION

Vial R1 ENZYMES-BUFFER

Phosphate Buffer	150	mmol/L
Glucose oxidase (GOD)	≥ 20 000	UI/L
Peroxidase (POD)	≥ 1000	UI/L
4-Amino-antipyrine (PAP)	0.8	mmol/L

Vial R2 CHROMOGEN

Chloro-4-phenol	2	mmol/L
-----------------	---	--------

Vial R3 STANDARD

Glucose 100 mg/dL (5.55 mmol/L)

SAFETY CAUTIONS

BIOLABO reagents are designated for professional, in vitro diagnostic use.

- ∞ Verify the integrity of the contents before use
- ∞ Use adequate protections (overall, gloves, glasses).
- ∞ Do not pipette by mouth.
- ∞ In case of contact with skin or eyes, thoroughly wash affected areas with plenty of water and seek medical advice.
- ∞ Material Safety Data Sheet is available upon request.
- ∞ Waste disposal : Respect legislation in force in the country.

All specimens should be handled as potentially infectious, in accordance with good laboratory practices using appropriate precautions. Respect legislation in force in the country.

Version AT 80009 28 08 2008

REAGENTS PREPARATION

Vial R1 and R2 : If appropriate, use a non-sharp instrument to remove aluminium cap.

Using a volumetric flask, measure the volume of demineralised water stated on the label of the vial R1(Enzymes-Buffer).

Transfer the contents of vial R1 into the flask and mix gently until complete dissolution (approximately 2 minutes). Then, add the contents of vial R2 and mix gently. Store away from light in a plastic bottle free from contamination

STABILITY AND STORAGE

Store at 2-8°C, away from light.

- ∞ Standard (vial R3) : transfer requested quantity, well recap the vial and store at 2-8°C.
- ∞ Reagent R1 (unopened) and reagents R2 and R3 are stable until expiry date stated on the label of the kit when stored and used as described.
- ∞ Once reconstituted, working reagent is stable for at least 2 years when free from contamination.
- ∞ Discard reagent if cloudy or if reagent blank at 500 nm is > 0.400.
- ∞ Don't use working reagent after expiry date stated on the label of the kit.

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING (2)

Serum or plasma :

Separate promptly from cells to prevent glycolysis. If fluoride is used as a preservative, a decrease of 9 mg/dL (0.5 mmol/L) is seen within the first 2 hours, then concentration stabilises.

Glucose is stable in serum or heparinised plasma :

- ∞ for 8 h at 25°C
- ∞ for 72 h at 2-8°C

Glucose is stable in plasma (Sodium fluoride or iodoacetate) :

- ∞ for 24 h at room temperature.

CSF :

Process immediately to avoid falsely low results. Store at -20°C.

Urines :

Collect in dark bottle and store at 2-8°C. Preserve 24 h urines with 5 mL glacial acetic acid or 5 g sodium benzoate or sodium fluoride.

INTERFERENCES (3)

Ascorbic acid : No interference up to 10 mg/dL.

Total bilirubin : Negative interference above 20 mg/dL.

Direct bilirubin : No interference.

Hemolysis : No interference.

Lipemia : Positive interference above 626 mg/dL of triglycerides.

For a more comprehensive review of factors affecting this assay refer to the publication of Young D.S.

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Basic medical analysis laboratory equipment.
2. Normal and pathological control sera.

Anexo I.II – Protocolo do reagente da Creatinina na urina.



CREATININE		
OSR6178	4 x 51 mL	R1
	4 x 51 mL	R2
OSR6678*	4 x 150 mL	R1
	4 x 150 mL	R2

Intended Use

System reagent for the quantitative determination of Creatinine in human serum and urine on Beckman Coulter AU analyzers.

*Creatinine reagent OSR6678 for use on the AU2700/5400 system only.

Summary

Measurements of creatinine are used in the diagnosis and treatment of renal disease. Serum creatinine measurements prove useful in evaluation of kidney glomerular function and in monitoring renal dialysis. However, the serum level is not sensitive to early renal damage and responds more slowly than blood urea nitrogen (BUN) to hemodialysis during treatment of renal failure. Both serum creatinine and BUN are used to differentiate prerenal and postrenal (obstructive) azotemia. An increase in serum BUN without concomitant increase of serum creatinine is key to identifying prerenal azotemia. With postrenal azotemia, both serum BUN and creatinine rise, but the rise is disproportionately greater for BUN.¹ Serum creatinine varies with the subject's age, body weight, and sex. It is sometimes low in subjects with relatively small muscle mass, cachectic patients, amputees, and in older persons. A serum creatinine level that would usually be considered normal does not rule out the presence of impaired renal function.

Methodology

This Creatinine procedure is a kinetic modification of the Jaffe procedure,² in which creatinine reacts with picric acid at alkaline pH to form a yellow-orange complex. However, this reaction is not completely specific for creatinine since other reducing substances such as glucose, pyruvate, ascorbic acid, and acetoacetates will react with picrate to form a similar color.³ Fabiny and Ertingshausen⁴ found that alkaline creatinine picrate reaches maximum color development at a different rate than pseudo-creatinine material. Cook⁵ utilized different reaction rates of alkaline picrate positive substances to obtain greater specificity with the Jaffe reaction.

The rate of change in absorbance at 520/800nm is proportional to the creatinine concentration in the sample.

Creatinine + Alkaline Picrate → Yellow-Orange Complex

System Information

For AU400/400⁷/480, AU600/640/640⁷/680 and AU2700/5400 Beckman Coulter Analyzers.

Reagents

Final concentration of reactive ingredients:

Sodium hydroxide	120 mmol/L
Picric acid	2.9 mmol/L

Also contains preservatives

Precautions

- For *in vitro* diagnostic use. Do not ingest.
- R1 is corrosive and causes burns. **Do not** pipette by mouth. Avoid contact with eyes, skin or clothing. In case of contact, immediately rinse affected area with plenty of water for 15 minutes. Obtain medical attention immediately for eye contact or ingestion. **Do not** induce vomiting.
- R2 is **POISON**. **Do not** pipette by mouth. In case of external contact, immediately flush affected area with plenty of water for 15 minutes. Obtain medical attention immediately for eye contact or ingestion.
- R2 contains picric acid. Dry picric acid explodes when rapidly heated or subjected to percussion. Dilute any spills with water and wipe up immediately.

Preparation of Reagents

For OSR6178, the Creatinine reagent is ready for use. No preparation is required. For OSR6678, insert the pipe supplied into the 180 mL reagent vial before use on the analyzer. Care must be taken when handling the pipe to avoid contamination. The pipe is for single use only.

Storage and Stability

- The unopened reagents are stable until the expiration date printed on the label when stored at 2 – 8°C.
- Opened reagents are stable for 7 days when stored in the refrigerated compartment of the analyzer.
- R1 is light sensitive. Store in the dark before placing on the instrument.

Indications of Deterioration

Visible signs of microbial growth, turbidity, precipitate, or any change in color in the Creatinine reagent may indicate degradation and warrant discontinuance of use.

Specimen Collection and Preparation

Serum or heparinized samples free from hemolysis are the recommended specimens and should be separated from the red cells as soon as possible. Urine specimens should be collected into a clean, leakproof container. If urine must be collected with a preservative for other analytes, 6N HCL or Boric acid can be used.⁶

Sample Storage and Stability

Serum Creatinine is stable for 7 days at 2 – 8°C and indefinitely when frozen (≤ -20°C).⁸ Creatinine in urine is stable for 2 days at room temperature (20 – 25°C) and for 6 days at 4 – 8°C.⁷

Creatinine

Interfering Substances

Results of studies⁹ show that the following substances interfere with this creatinine procedure.

The criteria for no significant interference is recovery within 10% of the initial value.

Bilirubin:	No significant interference up to 20 mg/dL Bilirubin
Hemolysis:	No significant interference up to 500 mg/dL Hemolysate
Lipemia:	No significant interference up to 700 mg/dL Intralipid*
Protein:	Interference less than 20% between 3 and 12g/dL Protein

*Intralipid, manufactured by KabiVitrium Inc., is a 20% IV fat emulsion used to emulate extremely turbid samples.

The information presented is based on results from Beckman Coulter studies and is current at the date of publication. Beckman Coulter Inc. makes no representation about the completeness or accuracy of results generated by future studies. For further information on interfering substances, refer to Young¹⁰ for a compilation of reported interference with this test.

Procedure

A complete list of test parameters and operational procedure can be found in the User's Guide appropriate to the analyzer.

Materials Provided

Creatinine Reagent
Pipe (one per each 180 mL vial)

Materials Required But Not Provided

Chemistry Calibrator (Cat # DR0070)
Urine Creatinine Calibrator (Cat # DR0091)

Stability of Final Reaction Mixture

The Beckman Coulter AU analyzer automatically computes every determination at the same time interval.

Calibration

The frequency of calibration is daily. Calibration of this creatinine procedure for serum determinations is accomplished by use of the Chemistry Calibrator (Cat # DR0070), which is traceable to an isotope dilution mass spectrometry (IDMS) reference method using the National Institutes of Standards and Technology (NIST) Standard Reference Material 967. For the calibration of urine specimens, Urine Creatinine Calibrator (Cat # DR0091) should be used.

Recalibration of this test is required when any of these conditions exist:

1. A reagent lot number has changed or there is an observed shift in control values.
2. A fresh bottle of reagent is used for testing.
3. Major preventative maintenance was performed on the analyzer or critical part was replaced.

Quality Control

During operation of the Beckman Coulter AU analyzer at least two levels of an appropriate quality control material should be tested a minimum of once a day. In addition, controls should be performed after calibration, with each new lot of reagent, and after specific maintenance or troubleshooting steps described in the appropriate User's Guide. Quality control testing should be performed in accordance with regulatory requirements and each laboratory's standard procedure. Appropriate qualified urine controls should be established and utilized during urine analysis.

Results

Automatically printed out for each sample in mg/dL at 37°C.

Dynamic Range

The Creatinine procedure is linear from 0.2 to 25.0 mg/dL for serum determinations and 1 - 300 mg/dL for urine determinations. Samples exceeding the upper limit of linearity should be diluted and repeated. The sample may be diluted, repeated and multiplied by the dilution factor automatically by utilizing the AUTO REPEAT RUN.

Expected Values

	Serum ¹¹	Urine ¹
Male	0.7 - 1.3 mg/dL	14 - 26 mg/kg/24 hours
Female	0.6 - 1.2 mg/dL	11 - 20 mg/kg/24 hours
Beckman Coulter Reference Range ¹³	0.6 - 1.3 mg/dL	

Expected values may vary with age, sex, diet and geographical location. Each laboratory should determine its own expected values as dictated by good laboratory practice.

Specific Performance Characteristics

The following data was obtained using the Creatinine Reagent on Beckman Coulter AU analyzers according to established procedures. Results obtained in individual laboratories may differ.

Precision¹⁴

Estimates of precision, based on CLSI recommendations,¹² are consistent with typical performance. The within run precision for serum samples is less than 3% CV and total precision is less than 6% CV. Assays of control sera were carried out and the data reduced following CLSI guidelines above.

Serum

N = 100	Within run		Total	
	Mean, mg/dL	SD	CV%	SD
1.00	0.01	1.0	0.01	1.0
5.60	0.05	0.8	0.09	1.5

Creatinine

Urine

N = 100	Within run		Total	
	Mean, mg/dL	SD	CV%	CV%
96.5	0.60	0.6	1.00	1.0
195.9	1.10	0.5	2.50	1.3

Method Comparison¹⁴

Serum

Patient samples were used to compare this Creatinine Reagent. The table below demonstrates representative performance on the AU analyzers.

Y Method	AU640
X Method	AU600
Slope	1.029
Intercept	-0.01
Correlation Coeff. (r)	0.9996
No. of Samples (n)	175
Range (mg/dL)	0.2-16.0

Urine

Patient samples were used to compare this Creatinine Reagent. The table below demonstrates representative performance on the AU analyzers.

Y Method	AU640/640 ^o
X Method	AU600
Slope	1.000
Intercept	0.9
Correlation Coeff. (r)	0.9998
No. of Samples (n)	176
Range (mg/dL)	11-281

Sensitivity

Typical change in absorbance for 1 mg/dL of Creatinine is 12.5 mAbsorbance.

References

1. Tietz, N.W.(ed), Textbook of Clinical Chemistry, W.B. Saunders, 1986.
2. Jaffe, M.Z. Physiol Chem, 10: 391,1886.
3. Soldin, S.J. et al., Clin Biochem, 11: 82, 1987.
4. Fabiny, D.I. and Ertingshausen, G., Clin Chem, 17: 696, 1971.
5. Cook, J.G.H., Clin Chem Acta, 32: 485, 1971.
6. CLSI/NCCLS. Urinalysis and Collection, Transportation, and Preservation of Urine Specimens; Approved Guideline. CLSI/NCCLS Document GP16-A2, 2nd ed. Pennsylvania.
7. Ehret W, Heil W, Schmitt Y, Topfer G, Wisser H, Zawta B, et al. Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations and stability of blood, plasma and serum samples. WHO/DIL/LAB/99.1 Rev.2:22pp.
8. Tietz, N.W., Fundamentals of Clinical Chemistry, 3rd Edition W.B Saunders, 1987.
9. CLSI/NCCLS, Interference Testing in Clinical Chemistry EP7-A, 2002.
10. Young, D.S., Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests, 5th Edition, AACC Press, 2000.
11. Burtis, C.A. and Ashwood, E.R., eds., Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2nd Edition, AACC Press, 1990.
12. CLSI/NCCLS Evaluation Protocol, EP5-A, 1999.
13. Beckman Coulter Inc. data on samples collected from 200 blood donors in North Texas.
14. Data is on file for specific AU analyzers.

Manufactured by: Beckman Coulter, Inc., 250 S. Kraemer Blvd. Brea, CA 92821, USA



Anexo I.III – Protocolo do reagente da Albumina.

Quantichrom™ BCG Albumin Assay Kit (DIAG-250) Quantitative Colorimetric Albumin Determination at 620nm

DESCRIPTION

Albumin is the most abundant plasma protein in human. It accounts for about 60% of the total serum protein. Albumin plays important physiological roles, including maintenance of colloid osmotic pressure, binding of key substances such as long-chain fatty acids, bile acids, bilirubin, haematin, calcium and magnesium. It has anti-oxidant and anticoagulant effects, and also acts as a carrier for nutritional factors and drugs, as an effective plasma pH buffer. Serum albumin is a reliable prognostic indicator for morbidity and mortality, liver disease, nephritic syndrome, malnutrition and protein-losing enteropathies. High levels are associated with dehydration.

Simple, direct and automation-ready procedures for measuring albumin concentration in biological samples are becoming popular in Research and Drug Discovery. BioAssay Systems' BCG albumin assay kit is designed to measure albumin directly in biological samples without any pretreatment. The improved method utilizes bromocresol green that forms a colored complex specifically with albumin. The intensity of the color, measured at 620nm, is directly proportional to the albumin concentration in the sample. The optimized formulation substantially reduces interference by substances in the raw samples.

KEY FEATURES

Sensitive and accurate. Use as little as 5 µL samples. Detection range 0.1 g/dL (15µM) to 5 g/dL (750µM) albumin in 96-well plate assay.

Simple and high-throughput. The procedure involves addition of a single working reagent and incubation for 5 min. Can be readily automated as a high-throughput assay in 96-well plates for thousands of samples per day.

Improved reagent stability and versatility. The optimized formulation has greatly enhanced reagent and signal stability. Cuvet or 96-well plate assay.

No interference in biological samples. No pretreatments are needed. Assays can be directly performed on raw biological samples i.e., in the presence of lipid and protein.

APPLICATIONS:

Direct assays: albumin in serum, plasma, urine, biological preparations.
Drug discovery/Pharmacology: effects of drugs on albumin metabolism.

KIT CONTENTS (250 tests in 96-well plates)

Reagent: 50 mL Albumin Standard: 1 mL 5 g/dL BSA

Storage conditions. Store Reagent in the provided amber bottle and standard at 4°C and -20°C, respectively. Shelf life: 12 months.

Precautions: reagents are for research use only. Normal precautions for laboratory reagents should be exercised while using the reagents. Please refer to Material Safety Data Sheet for detailed information.

PROCEDURES

Reagent Preparation:

Important: bring reagent to room temperature and shake before use.

Procedure using 96-well plate:

1. Dilute standards in distilled water as follows. Dilute serum and plasma samples 2 fold. Transfer 5 µL diluted standards and diluted samples to wells of a clear bottom plate. Store diluted standards at -20°C for future use.

No	STD + H ₂ O	Vol (µL)	BSA (g/dL)
1	100µL + 0µL	100	5.0
2	80µL + 20µL	100	4.0
3	60µL + 40µL	100	3.0
4	40µL + 60µL	100	2.0
5	30µL + 70µL	100	1.5
6	20µL + 80µL	100	1.0
7	10µL + 90µL	100	0.5
8	0µL + 100µL	100	0

2. Add 200 µL working reagent and tap lightly to mix. Avoid bubble.

3. Incubate 5 min at room temperature and read optical density at 570-670nm (peak absorbance at 620nm). Signal is stable for > 60min.

Procedure using cuvette:

1. Transfer 20 µL Blank, Standards and samples to appropriately labeled tubes. Add 1000 µL working reagent and tap lightly to mix. Incubate 5 min at room temperature.

2. Transfer to cuvet and read optical density at 620nm.

Important: if sample OD is higher than the OD for standard, dilute samples with distilled water and repeat the assay.

CALCULATION

Subtract blank OD (water, #8) from the standard OD values and plot the OD against standard concentrations. Use the standard curve to determine the sample albumin concentration, or fit the standard curve using the equation $y = a \cdot x / (b+x)$. The albumin concentration of Sample is calculated as

$$= \frac{\Delta OD_{\text{SAMPLE}} \times b}{a - \Delta OD_{\text{SAMPLE}}} \times n \quad (\text{mg/dL})$$

$\Delta OD_{\text{SAMPLE}} = (OD_{\text{SAMPLE}} - OD_{\text{BLANK}})$. n is the dilution factor.

Conversions: 0.1 g/dL albumin equals 15 µM, 0.1% or 1000 ppm.

MATERIALS REQUIRED, BUT NOT PROVIDED

Pipeting devices and accessories (e.g. 5 µL).

Procedure using 96-well plate:

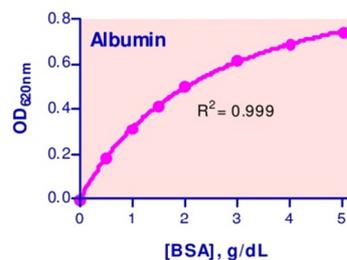
Clear bottom 96-well plates (e.g. Corning Costar) and plate reader.

Procedure using cuvette:

Spectrophotometer and cuvetts for measuring OD at 620nm.

EXAMPLES:

Albumin was assayed in duplicate using the 96-well assay protocol. The albumin content (g/dL) was 4.8 ± 0.0 and 5.4 ± 0.0 in human serum and plasma, 2.2 ± 0.0 and 2.8 ± 0.2 in rat serum and plasma, 3.2 ± 0.2 in goat serum and 2.0 ± 0.0 in fetal bovine serum, respectively. Albumin in a fresh healthy human urine sample was below the detection limit (0.01 g/dL).



Calibration curve in 96-well plate
 $y = 1.125 \cdot x / (2.535 + x)$

LITERATURE

- Nicholson, JP, Wolmarans, MR and Park, GR (2000). The role of albumin in critical illness. Br. J. Anaesthesia 85(4): 599-610.
- Goldwasser, P and Feldman, J (1997). Association of serum albumin and mortality risk. J. Clin. Epidemiol 50: 693-703.
- Kamphuis, JS, Salden, HJM and Zuiderhoudt, FMJ (2001). Albumine-analyse in plasma: vergelijking tussen de bromocresol-groen, bromocresolpurper en een immunoassay bij volwassen patiënten met en zonder hemodialyse. Ned Tijdschr Klin Chem 26: 9-12.

Anexo I.IV – Protocolo do reagente da Beta-Hidroxibutirato.



β-Hydroxybutyrate Reagent Set

Intended Use

For the quantitative determination of β-hydroxybutyrate in serum or plasma. For *in vitro* diagnostic use only.

Summary and Explanation of Test

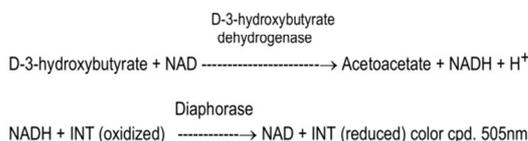
Ketosis is a common feature in acutely ill patients. In subjects suffering from starvation, acute alcohol abuse, or diabetes mellitus ketosis can result in severe life threatening metabolic acidosis.¹ The presence and degree of ketosis can be determined by measuring blood levels of β-hydroxybutyrate.

Ordinarily, β-hydroxybutyrate is the ketoacid present in the greatest amount in serum. It accounts for approximately 75% of the ketone bodies that also contain acetoacetate and acetone.^{2,3,4} During periods of ketosis, β-hydroxybutyrate increases even more than the other two ketoacids, acetoacetate and acetone, and has been shown to be a better index of ketoacidosis including the detection of subclinical ketosis.^{5,6,7,8}

In diabetics, the measurement of β-hydroxybutyrate as well as blood glucose is needed for the assessment of the severity of diabetic coma and is essential for the exclusion of hyperosmolar non-ketotic diabetic coma. Moreover, the insulin requirements are often based on the extent of the existing hyperketonemia shown by the blood levels of β-hydroxybutyrate.⁹ A specific enzymatic assay for β-hydroxybutyrate is therefore extremely important in the assessment of ketosis.

Principle

Enzymatic quantitation of β-hydroxybutyrate by β-hydroxybutyrate dehydrogenase has been reported.^{10,11,12} In the Pointe Scientific method, β-hydroxybutyrate (D-3-hydroxybutyrate) in the presence of NAD gets converted to acetoacetate and NADH at a pH 8.5 by β-hydroxybutyrate dehydrogenase (D-3-hydroxybutyrate dehydrogenase). At this pH, the reaction is favored to the right.¹² The NADH produced is converted to color using INT and diaphorase.



Reagents

The Pointe Scientific β-hydroxybutyrate reagent kit contains the following:

- 1 x 50ml R1 containing β-hydroxybutyrate dehydrogenase and diaphorase enzymes.
- 1 x 8ml R2 containing NAD, INT and oxalate.
- 1 x 3ml standard containing 1mM sodium D-3-hydroxybutyrate

Reagent Storage and Stability

All of the above reagents are stable stored at 2-8°C until the expiration date stated on the labels. Do not use the reagents past their expiration date. Alterations in the physical appearance of the reagents or values of control materials outside of the manufacturer's acceptable range may be an indication of reagent instability.

Reagent Preparation

R1 and R2 reagents are supplied as ready to use liquids. To prepare a single liquid working reagent mix 10 parts R1 with 1.5 parts R2 (ex. 10.0ml R1 with 1.5 ml R2).

Warnings and Precautions

For *in vitro* diagnostic use only. Avoid skin contact with reagents. If this occurs, wash immediately with water.

Specimen Collection and Preparation

Serum or plasma collected with EDTA, heparin or sodium fluoride can be used in the assay. Serum or plasma β-hydroxybutyrate levels are stable at least one week if kept refrigerated. (2-8°C)

Interferences

Lactate dehydrogenase and lactate have been shown to interfere with the assay. The incorporation of oxalic acid in this reagent eliminates this interference as reported.¹² No significant changes in values were observed when the following analytes were added to serum containing 0.5mM β-hydroxybutyrate.

Analyte	% Recovery
Glucose (2000 mg/dl)	96
Acetoacetic acid (5 mM)	96
Creatinine (5 mg/dl)	106
Ascorbate (3mg/dl)	106
Bilirubin (10 mg/dl)	96
Uric Acid (16 mg/dl)	102
Triglyceride (417 mg/dl)	104
Cholesterol (314 mg/dl)	94
Lactate Dehydrogenase (1515 U/ml)	93
Sodium Lactate (96 mg/dl)	99

In addition, hemolyzed serum with an OD_{540nm} of 2.0 was added to the test and found not to interfere.

Materials Provided

Refer to "Reagents"

Materials Required but not Provided

1. 10 ml Micropipettor
2. 1 ml Pipette or Dispenser
3. Glass or plastic Test Tubes to hold 1.0 ml
4. β-hydroxybutyrate controls
5. Temperature controlled incubator
6. Spectrophotometer capable of reading at 505nm.

Procedure (Automated)

Refer to specific instrument application instructions.

Procedure (Manual)

The Pointe Scientific enzymatic β-hydroxybutyrate reagent provided can be used in a five-minute procedure utilizing a spectrophotometer that reads at 505 nm.

Conditions:	Wavelength	505nm
	Temperature	37°C
	Mode	Endpoint
	Reagent Volume	1.0 ml
	Sample volume	25 ul
	Incubation	5 min.

β-Hydroxybutyrate Reagent Set

1. Prepare working reagent according to "Reagent Preparation" instructions.
2. Label tubes, "Standard", "Control", "Patient", etc.
3. Pipette 1.0 ml of working reagent into required number of labeled test tubes. Incubate at 37°C for 5 minutes.
4. Add 25 ul Standard, controls and patients to the appropriate tests and incubate at 37°C for 5 minutes.
5. Zero spectrophotometer with a reagent blank.
6. Read and record absorbances of all tubes at 505 nm.

NOTES:

- a) Precise measurement of temperature, wavelength, and time are required to obtain accurate results.
- b) The test can also be performed at 25°C for 10 minutes using the same procedure as above.

Calibration

Use the β-hydroxybutyrate standard provided.

Calculations

$$\beta\text{-hydroxybutyrate (mM)} = \frac{\text{OD (5min) serum}}{\text{OD (5min) standard}} \times \text{Standard concentration}$$

To convert results to mg/dL divide the value obtained in mM by 0.096

Limitations

1. See "Interferences".
2. The procedure described above is linear to 4.5mM (46.8 mg/dl) β-hydroxybutyrate. For higher concentrations dilute the sample with deionized water, repeat the assay and multiply the results by the dilution factor.

Quality Control

The reliability of test results should be monitored whenever patient samples are assayed using a standard and quality control materials analyzed in the same manner employed for the unknowns. We suggest the use of commercially available β-hydroxybutyrate controls with an assayed range. If controls do not fall into the assayed range, patient values from that run should not be reported. The run should be repeated, making sure that all mixing and handling instructions are strictly followed. Linearity of the assay should be verified with a commercial linearity check set, or dilutions of a high specimen, at least every six months.

Expected Values

The quantitation of β-hydroxybutyrate is important in cases of ketoacidosis. In studies of healthy individuals who had fasted for 12 hours before blood collection, the range of β-hydroxybutyrate was found to be from 0.02 mM (0.2mg/dl) to 0.27mM (2.81mg/dl).^{4,5} Other ranges have also been reported.¹³

Performance

1. Linearity: The β-hydroxybutyrate assay is linear to 4.5 mM (46.8 mg/dl).
2. Comparison: A study of 57 samples using Pointe Scientific and the Sigma method gave the following correlation. (y=Pointe Scientific, x=Sigma): $y = 1.05x + 0.25\text{mM}$, $N = 57$, $r = 0.9922$, $S_{xy} = 0.1055\text{mM}$.
3. Precision: Studies were conducted using two serum pools containing 0.25mM (2.6 mg/dl) and 1.0mM (10.4 mg/dl) β-hydroxybutyrate. The following results are averages of eighteen determinations:

Within day:

Level	Mean (mM)	Std. Dev. (mM)	% C.V.
1	0.29	0.005	1.7
2	1.09	0.015	1.4

Day to day:

Level	Mean	Std. Dev.	% C.V.
1	0.26	0.014	5.2
2	1.05	0.018	1.7

4. Sensitivity: Concentrations of β-hydroxybutyrate of 0.18, 0.28, and 0.38 mM (1.8, 2.9, and 3.9 mg/dl) can be clearly distinguished at the 99% confidence limit.

References

1. Foster, D.W. and McGarry, N., Eng. J. Med. 309, 159 (1983).
2. Persson B., Scand. J. Clin. Lab. Invest. 25, 9 (1969).
3. Wildenhoff K.E., Clin. Chem. 24, 475 (1978).
4. Koch D.D. and Feldbruegge D.H., Clin. Chem. 33(10), 1761 (1987).
5. Li P.K., Lee J.T., MacGillivray M.H., Schaefer P.A. and Siegel J.H., Clin. Chem. 26(12), 1713 (1980).
6. Stephens J.M., Sulway M.J. and Watkins P.J., Diabetes 20(7), 485 (1971).
7. Harano Y., Kosugi K., Hyosu T., Uno S., Ichikawa Y. and Shigeta Y., Clin. Chem Acta 134, 327 (1983).
8. MacGillivray M.H., Li P.K., Lee J.T. et al, J Clin. Endocrinol. Metab. 54, 665 (1982).
9. Alberti K.G.M.M. and Hockaday T.D.R., Brit. Med. J.2, 565 (1972).
10. Williamson D.H. Mellenby J. and Krebs H.A., Biochem. J. 82, 90 (1962).
11. Zivin J.A. and Snarr J.F., Anal. Biochem. 52, 456 (1973).
12. McMurray C.H., Blanchflower W.J. and Rice D.A., Clin. Chem. 30/3, 421 (1984)
13. Hansen J.L. and Freier E.F., Clin. Chem. 24/3, 475 (1978).

Pointe Scientific maintains that this product conforms to the information contained in the insert. The purchaser must determine the suitability of the product for their particular use. Use only in accordance with labeling instructions.

Manufactured for Pointe Scientific, Inc.
5449 Research Drive, Canton, MI 48188

European Authorized Representative:

Obelis s.a.

Boulevard Général Wahis 53

1030 Brussels, BELGIUM

Tel: (32)2.732.59.54 Fax:(32)2.732.60.03 email: mail@obelis.net



Rev: 4/10 P803-H7587-01

Anexo I.V – Protocolo do reagente do Potássio.

POTASSIUM REAGENT (COLORIMETRIC METHOD)

Catalog Number: BQ043CR

INTENDED USE

For the colorimetric determination of potassium in human serum and plasma.

INTRODUCTION

Potassium is the principle cation of the intracellular fluid. It is also an important constituent of the extracellular fluid due to its influence on muscle activity. Its intracellular function parallels that of its extracellular function, namely influencing acid-base balance and osmotic pressure, including water retention.^{1,2}

Elevated potassium levels (hyperkalemia) are often associated with renal failure, dehydration shock or adrenal insufficiency. Decreased potassium levels (hypokalemia) are associated with malnutrition, negative nitrogen balance, gastrointestinal fluid losses and hyperactivity of the adrenal cortex.^{1,2}

In previously described colorimetric methods for determination of potassium or sodium, prior deproteinization of serum or plasma specimen was required. Our improved method is the direct spectrophotometric measurement of potassium in blood or plasma.

PRINCIPLE

The amount of potassium is determined by using sodium tetraphenylboron in a specifically prepared mixture to produce a colloidal suspension.³ The turbidity of which is proportional to potassium concentration in the range of 2 - 7 mEq/L.

REAGENT CONTENTS

1. Potassium Reagent: Sodium Tetraphenylboron 2.1 mM, preservatives and thickening agents.
2. Potassium Standard: Equivalent to 4 mEq/L.

WARNING AND PRECAUTION

1. Potassium Reagent Set is for "in vitro diagnostic use" only.
2. Sodium Tetraphenylboron is a corrosive substance. Avoid skin contact or ingestion. DO NOT PIPET BY MOUTH. Flush with water if contact occurs.

STORAGE AND STABILITY

Both reagents are stored at room temperature (18 – 30°C). The reagents are stable until expiration date indicated on the package label.

REAGENT DETERIORATION

Do not use if:

1. The reagent is very cloudy.
2. The reagent fails to achieve assigned value on fresh control serum.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE^{1,2}

1. Serum is recommended.
2. Potassium in serum is stable for at least 2 weeks at 2 – 8 °C.
3. Specimens for serum potassium analysis should be free from hemolysis since the high concentration of potassium released from red cells significantly increase the serum levels and this invalidates the test results. Blood specimens should also be separated from the red cells shortly after collection to prevent any leakage of potassium from the intracellular into the extracellular fluid. Plasma from anticoagulants not containing potassium is also suitable.

INTERFERENCES

Turbid or icteric samples produce falsely elevated results. Bilirubin above 40 mg/dl and Urea Nitrogen above 80 mg/dl will produce elevated results. Hemolyzed sera produce elevated results. Sera containing high levels of ammonia should be avoided.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Spectrophotometer.
2. Test tubes/rack.
3. Timer.

PROCEDURE

1. Label test tubes: standard, control, patients, etc. A blank is necessary.
2. Pipette 1.0 mL of Potassium Reagent to all tubes.
3. Add 0.01 mL (10 µl) of samples to respective tubes. Mix and let sit at room temperature for 3 minutes.
4. After 3 minutes, set the wavelength of spectrophotometer to 500 nm, zero spectrophotometer with reagent blank. Read and record the absorbance of all tubes.

*MULTI PURPOSE CALIBRATOR MAY BE USED TO REPLACE STANDARD.

Note: If the spectrophotometer being used requires 2.5 mL reagent, use 0.02 mL (20 µl) of sample to 2.5 mL of reagent. Perform the test as described above.

LIMITATIONS

Our method has been found to be linear between 2 - 7 mEq/L. It is important to note that our method may not produce accurate results when used with potassium calibrator other than that provided by us. Other products contain preservatives that interfere with this procedure and tend to produce false elevated results. Samples with values above 7 mEq/L should be diluted 1:1 with normal saline, re-assayed and results multiplied by two.

CALCULATIONS

Abs. = Absorbance
STD = Standard

$$\frac{\text{Abs. of unknown}}{\text{Abs. of STD}} \times \text{Conc. of STD (mEq/L)}$$

= Potassium Conc. (mEq/L)

Example: If the absorbance of the unknown = 0.200, the absorbance of the standard is 0.160 and standard concentration is 4 mEq/L, then

$$\frac{0.200}{0.160} \times 4 = 5 \text{ mEq/L}$$

QUALITY CONTROL

Serum controls with known normal and abnormal values should be run routinely to monitor the validity of the reaction.

EXPECTED VALUES²

3.4 – 5.3 mEq/L. It is strongly recommended that each laboratory establish its own normal range.

PERFORMANCE

1. Linearity: 2 - 7 mEq/L.
2. Sensitivity: Based on an instrument resolution of $A = 0.001$, the present method has a sensitivity of 0.006 mEq/L.
3. Comparison: A comparison study performed between our method and a similar method resulted in a correlation coefficient of 0.99 with a regression equation of $Y = 1.06X - 0.37$.
4. Precision Study:

Within Run:		
<u>Mean (mEq/L)</u>	<u>S.D.</u>	<u>C.V.%</u>
4.1	0.1	5
7.4	0.3	4

Run to Run:		
<u>Mean (mEq/L)</u>	<u>S.D.</u>	<u>C.V.%</u>
4.1	0.4	10
7.4	0.5	6

REFERENCES

1. Henry, R.F. et. al., Clinical Chemistry Principles and Techniques, 2nd Ed., Harper and Row, Hagerstown, M.D., (1974).
2. Tietz, N.W., Fundamentals of Clinical Chemistry, W.B., Saunders Co., Philadelphia, PA, p. 874.
3. Terri, A.E. and Sesin, P.G., Am. J. Clin. Path., 29:86 (1958).

Anexo I.VI – Protocolo do reagente da Creatinina no soro.



BIOLABO REAGENTS
www.biolabo.fr

MANUFACTURER:
BIOLABO SA,
02160, Maizy, France

CREATININE

Kinetic method

Reagent for quantitative determination of creatinine
in human serum, plasma or urines

REF 80107 R1 1 x 125 mL R2 1 x 125 mL R3 1 x 10 mL

TECHNICAL SUPPORT AND ORDERS

Tel : (33) 03 23 25 15 50

Fax : (33) 03 23 256 256



IVD IN VITRO DIAGNOSTIC USE

CLINICAL SIGNIFICANCE (1)

Interconversion of phosphocreatine and creatine is a particular feature of the metabolism processes of muscle contraction. Creatine and phosphocreatine partially convert to a waste product, creatinine. Thus, the amount of creatinine produced each day is related to the muscle mass (and body weight), age, sex, diet or exercise and does not greatly vary from day to day. Because creatinine is endogenously produced and released into body fluids at a constant rate and its plasma levels are maintained within narrow limits, its clearance can be measured as an indicator of glomerular filtration rate (GFR).

PRINCIPLE (4)(5)

Colorimetric reaction (Jaffe reaction) of creatinine with alkaline picrate measured kinetically at 490 nm (490-510), without any pretreatment step. This reaction has been improved (specificity, speed and adaptability) by the development of an initial-rate method.

REAGENTS COMPOSITION

Vial R1 BASE

Xi : IRRITANT
R36/38 : Irritating to eyes and skin.
S26 : In case of contact with eyes, thoroughly wash with plenty of water and seek medical advice.

Disodium Phosphate	6.4	mmol/L
Sodium hydroxide	150	mmol/L

Vial R2 DYE

Sodium dodecyl sulfate	0.75	mmol/L
Picric acid	4.0	mmol/L

pH 4.0

Vial R3 STANDARD

Creatinine 2 mg/dL (177 µmol/L)

SAFETY CAUTIONS

BIOLABO reagents are designated for professional, in vitro diagnostic use.

- ∞ Verify the integrity of the contents before use.
 - ∞ Use adequate protections (overall, gloves, glasses).
 - ∞ Do not pipette by mouth.
 - ∞ In case of contact with skin or eyes, thoroughly wash affected areas with plenty of water and seek medical advice.
 - ∞ Material Safety Data Sheet is available upon request.
 - ∞ Waste disposal : Respect legislation in force in the country.
- All specimens should be handled as potentially infectious, in accordance with good laboratory practices using appropriate precautions. Respect legislation in force in the country.

REAGENTS PREPARATION

Mix vial R1 and vial R2 contents (1 volume/1 volume). A graduated test-tube may be used.
Automated instrument : reagent R1 and R2 may be added separately (see § **MANUAL PROCEDURE**).

STABILITY AND STORAGE

Store at 18-25°C, well cap in the original vial and away from light.

- ∞ **Standard (vial R3) :** Transfer the requested quantity, recap and store at 18-25°C
- ∞ Reagents are stable until expiry date stated on the label of the kit when free from contamination, stored and used as described in the insert.
- ∞ Once reconstituted, working reagent is stable for 30 days at 2-8°C when free from contamination.
- ∞ Discard any reagent if cloudy or if the absorbance of working reagent is > 0.300 at 490 nm.
- ∞ Don't use working reagent after expiry date stated on the label of the Kit.

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING (2)

Serum or heparinised plasma.

- ∞ **Urines :** Collecte during precisely timed intervals (4, 12 or 24 h). Dilute 1+19 in distilled or demineralised water before determination.
- ∞ Creatinine is stable in specimen : for 24 h at 2-8°C (freeze for longer storage).

INTERFERENCES (1) (2) (3) (5)

Hemolysis, bilirubin and lipemia may cause falsely negative results.
Bilirubin : See § **MANUAL PROCEDURE**, Procedure n°2.
Ascorbic acid, glucose and some antibiotics interfere also with the determination of creatinine according to Jaffe method.
Reading interval is the main determinant for the specificity of the Jaffe reaction ; some interferents act quickly (acetoacetate) and others slowly (proteins). The majority of kinetic methods recommends a reading interval between 30 and 150 seconds.
For a more comprehensive review of factors affecting this assay refer to the publication of Young D.S.

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Basic medical analysis laboratory equipment.
2. Normal and pathological control sera.

CALIBRATION

- ∞ Kit Standard (vial R3) or BIOLABO-Multicalibrator, REF 95015.
 - ∞ Or any calibrator traceable to a reference method or material.
- The calibration frequency depends on proper instrument functions and on the preservation of the reagent.
It is recommended to calibrate in the following cases :
1. When changing batch of reagent.
 2. After maintenance operations on the instrument .
 3. When control values obtained are out of range, even after using a new vial of fresh serum .

Version : AT 80107 12 09 2008

QUALITY CONTROL

- ∞ BIOLABO EXATROL-N (Level I), REF 95010.
- ∞ BIOLABO EXATROL-P (Level II), REF 95011.
- ∞ Assayed control sera referring to the same method.
- ∞ External quality control program.

It is recommended to control in the following cases :

- ∞ At least once a run.
- ∞ At least once within 24 hours.
- ∞ When changing vial of reagent.
- ∞ After maintenance operations on the instrument.

If control is out of range, apply following actions :

1. Repeat the test with the same control.
2. If control is still out of range, prepare a fresh control serum and repeat the test.
3. If control is still out of range, use a new vial of calibrator or a fresh calibrator and repeat the test.
4. If control is still out of range, calibrate with a new vial of reagent.
5. If control is still out of range, please contact BIOLABO technical support or your local Agent.

EXPECTED VALUES (2)

Serum or plasma

Creatinine	mg/dL	[μmol / L]
Male	0.9 to 1.3	[80-115]
Female	0.6 to 1.1	[53-97]

Urines

Creatinine	mg / kg / 24 h	[μmol / kg / 24 h]
Male	14 to 26	[124-230]
Female	11 to 20	[97-177]

GFR (Glomerular filtration rate) mL per minute

Adult < 40 years 120 (100 – 140)

Adult > 40 years Physiologically decreased approx. 1% every year.

Each laboratory should establish its own normal ranges for the population that it serves.

PERFORMANCES (PROCEDURE N°1)

	Within run n = 20	Medium level	High level		Between run n = 20	Medium level	High level
Mean mg/dL	1.32	3.65		Mean mg/dL	1.09	4.63	
S.D. mg/dL	0.016	0.03		S.D. mg/dL	0.065	0.125	
C.V. %	1.2	0.8		C.V. %	5.9	2.7	

Detection limit : approximately 0.2 mg/dL at 37°C.

Sensitivity for 1 mg/dL : approximately 18 mAbs/min at 37°C.

Comparison study with commercially available reagent:

$$y = 1.06 x - 0.051 \quad r = 1.000$$

LINEARITY

The assay is linear up to 15 mg/dL (1327 μmol/L). Above, dilute the specimen with saline solution and re-assay taking into account the dilution factor. Linearity limit depends on specimen/reagent ratio.

MANUAL PROCEDURE

Let stand reagents and specimens at temperature of measurement.

Perform all the assays at constant temperature (see note 4).

Procedure n°1 : For non icteric specimen using “Working reagent”

Pipette in a 1 cm pathlength cuvette :	Blank (optional)	Standard	Assay
Working reagent	1 mL	1 mL	1 mL
Demineralised water	100 μL		
Standard		100 μL	
Specimen (Note 1)			100 μL

Mix well. After 30 secondes, record absorbance A1 at 490 nm (490-510) against reagent blank or distilled water. Exactly 2 minutes after the first reading, record absorbance A2.

Procedure n°2 : For icteric specimen using “Bi-reagent”

Pipette in a 1 cm pathlength cuvette :	Blank (optional)	Standard	Assay
Reagent R1	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL
Demineralised water	100 μL		
Standard		100 μL	
Specimen (Note 1)			100 μL

Incubate for 5 minutes at constant temperature, then add:

Reagent R2	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL
------------	--------	--------	--------

Mix well. After 30 secondes, record absorbance A1 at 490 nm (490-510) against reagent blank or distilled water. Exactly 2 minutes after the first reading, record absorbance A2.

Notes :

1. Specimen : serum, plasma or diluted urines 1+19 in distilled water.
2. Specific procedures are available upon request for automated instruments. Please contact BIOLABO technical support.
3. Working reagent (see § REAGENT PREPARATION).
4. Perform this test at 37°C to optimise the sensitivity.

CALCULATION

Calculate the result as follows :

$$\text{Serum or plasma : Result} = \frac{(A2 - A1) \text{ Assay}}{(A2 - A1) \text{ Standard}} \times \text{Standard Concentration}$$

Urines diluted with 1+19 : Multiply the above result by dilution factor 20.

GFR (by creatinine clearance determination):

Using 24 h urine and serum creatinine	
Corrected Creatinine Clearance (mL/min)	$\frac{UCr \times V \times 1.73}{SCr \times BSA}$
=	
UCr = Urine Creatinine in mg/dL or μmol/L	
SCr = Serum Creatinine in mg/dL or μmol/L	
V = Urine volume excreted in mL/min (24 h urine volume/1440)	
BSA = Body Surface Area in m ²	

OR

Using only serum creatinine (by Cockcroft and Gault formula)	
Creatinine Clearance =	$\frac{140 - \text{age in years} \times 2.12 \times \text{weight in Kg} \times K}{\text{Serum Creatinine} (\mu\text{mol/L}) \times BSA (m^2)}$
K = 1.00 for men or K = 0.85 for women	

REFERENCES

- (1) TIETZ N.W. Text book of clinical chemistry, 3rd Ed. C.A. Burtis, E.R. Ashwood, W.B. Saunders (1999) p. 1241-1245.
- (2) Clinical Guide to Laboratory Test, 3rd Ed., N.W. TIETZ (1995) p. 186-188.
- (3) YOUNG D.S., Effect of Drugs on Clinical laboratory Tests, 4th Ed. (1995) p.3-190 to 3-211
- (4) Fabry D. L., et Ertingshausen G., Clin. Chem. (1971), 17, p.696-700.
- (5) D. Labbé et al., Ann. Biol. Clin. (1996), 54, p. 285 – 298

Made in France Version : AT 80107 12 09 2008

Anexo I.VII – Folheto informativo do Lyphochek Quantitative Urine Control.

BIO-RAD 376 5140A

Lyphochek®
Quantitative Urine Control

A human urine assayed chemistry control.
Urinkontrolle (human), mit Zielwertangaben.
Contrôle chimique titré d'urine humaine.
Controllo di chimica, dosato, su urine umane.
Orina control humana valorada para bioquímica.
Uma urina humana ensaiada de controlo para química.
En analyserad kontroll för kliniskt kemiska analyser, framställt av humanurin.
En analysereet human urin kemikontroll.

1
Normal

Level 1
12 x 10 mL

IVD 62291 2012-12-31

UNITED STATES, Bio-Rad Laboratories, Irvine, CA
FRANCE, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette

***M235Q3762/\$\$2123112622919**

BIO-RAD 377 5140B

Lyphochek®
Quantitative Urine Control

A human urine assayed chemistry control.
Urinkontrolle (human), mit Zielwertangaben.
Contrôle chimique titré d'urine humaine.
Controllo di chimica, dosato, su urine umane.
Orina control humana valorada para bioquímica.
Uma urina humana ensaiada de controlo para química.
En analyserad kontroll för kliniskt kemiska analyser, framställt av humanurin.
En analysereet human urin kemikontroll.

2
Abnormal

Level 2
12 x 10 mL

T.K. 65-86
IVD 62292 2012-12-31

UNITED STATES, Bio-Rad Laboratories, Irvine, CA
FRANCE, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette

***M235Q3772/\$\$212311262292B**

Anexos

	Units ⁽³⁾	Level 1 - 62291 ⁽⁴⁾		Level 2 - 62292 ⁽⁴⁾		SI	Level 1 - 62291 ⁽⁴⁾		Level 2 - 62292 ⁽⁴⁾	
		Mean	Range	Mean	Range		Mean	Range	Mean	Range
17-HYDROXYCORTICOSTEROIDS										
Biochemical Diagnostics 17-OH Corticosteroid Skreen	mg/L	3.00	1.90 – 4.10	16.0	12.0 – 20.0	µmol/L	8.28	5.24 – 11.3	44.2	33.1 – 55.2
17-KETOGENIC STEROIDS										
Biochemical Diagnostics 17-Ketogenic Steroid Skreen	mg/L	3.30	2.10 – 4.50	8.20	5.80 – 10.6	µmol/L	11.5	7.29 – 15.6	28.5	20.1 – 36.8
17-KETOSTEROIDS										
Biochemical Diagnostics 17-Ketosteroid Skreen	mg/L	5.30	3.90 – 6.70	19.0	14.5 – 23.5	µmol/L	18.4	13.5 – 23.2	65.9	50.3 – 81.5
3-METHOXYTYRAMINE										
Bio-Rad HPLC (195-6019/195-6068/195-6069)	ng/mL	61.0	49.0 – 73.0	509	407 – 611	µmol/L	0.365	0.293 – 0.437	3.04	2.43 – 3.65
5-HYDROXY-INDOLEACETIC ACID (5-HIAA)										
Bio-Rad HPLC (195-5216)	mg/L	3.40	2.70 – 4.10	26.2	21.0 – 31.4	µmol/L	17.8	14.1 – 21.5	137	110 – 164
LDN EA	mg/L	3.10	1.50 – 4.70	19.0	8.00 – 30.1	µmol/L	16.2	7.85 – 24.6	99.5	41.9 – 158
ALDOSTERONE										
Immunotach Beckman Coulter RIA (DSL8600)	µg/L	35.9	26.1 – 45.6	>49.0		nmol/L	99.4	72.3 – 126	>133	
Siemens Coat-A-Count RIA	µg/L	28.1	14.0 – 42.3	75.0	50.2 – 99.8	nmol/L	77.8	38.8 – 117	208	139 – 276
ARSENIC										
Atomic Absorption	µg/L	42.2	24.5 – 59.8	241	192 – 289	µmol/L	0.561	0.325 – 0.797	3.20	2.56 – 3.84
CALCIUM										
Abbott ARCHITECT cSystem/AEROSET (Arsenazo III) (3L79)	mg/dL	4.69	4.22 – 5.16	10.6	9.50 – 11.6	mmol/L	1.17	1.06 – 1.29	2.64	2.38 – 2.90
Abbott ARCHITECT cSystem/AEROSET (Arsenazo III) (7D61)	mg/dL	4.65	4.19 – 5.12	10.5	9.44 – 11.5	mmol/L	1.16	1.05 – 1.28	2.62	2.36 – 2.89
Arsenazo III	mg/dL	4.71	4.24 – 5.18	10.7	9.62 – 11.8	mmol/L	1.18	1.06 – 1.30	2.67	2.40 – 2.94
Atomic Absorption	mg/dL	\$	\$	\$	\$	mmol/L	\$	\$	\$	\$
Beckman Coulter AU 400/600/640/680/2700/5400 (Arsenazo III)	mg/dL	4.85	4.37 – 5.34	11.3	10.1 – 12.4	mmol/L	1.21	1.09 – 1.33	2.81	2.53 – 3.09
Beckman Coulter CX Series (Arsenazo III) (CA)	mg/dL	\$	\$	\$	\$	mmol/L	\$	\$	\$	\$
Beckman Coulter CX Series (ISE Indirect)	mg/dL	\$	\$	\$	\$	mmol/L	\$	\$	\$	\$
Beckman Coulter Synchron LX/UniCel DxC Series (ISE Indirect) (CALC)	mg/dL	4.65	4.19 – 5.12	10.5	9.43 – 11.5	mmol/L	1.16	1.05 – 1.28	2.62	2.36 – 2.88
Flame Photometry	mg/dL	4.87	4.38 – 5.36	10.7	9.67 – 11.8	mmol/L	1.22	1.10 – 1.34	2.69	2.42 – 2.96
ISE Indirect (5)	mg/dL	4.51	4.06 – 4.96	10.3	9.26 – 11.3	mmol/L	1.13	1.01 – 1.24	2.57	2.32 – 2.83
O-Cresolphthalein Complexone (5)	mg/dL	4.80	4.32 – 5.28	11.7	10.5 – 12.8	mmol/L	1.20	1.08 – 1.32	2.92	2.63 – 3.21
Ortho Vitros/Vitros 5.1 FS (Arsenazo III)	mg/dL	4.73	4.26 – 5.21	11.7	10.5 – 12.9	mmol/L	1.18	1.06 – 1.30	2.92	2.63 – 3.22
Roche Cobas Integra (o-cresolphthalein complexone)	mg/dL	4.79	4.31 – 5.26	12.2	10.9 – 13.4	mmol/L	1.20	1.08 – 1.32	3.04	2.73 – 3.34
Roche Hitachi/Modular (o-cresolphthalein complexone)	mg/dL	4.63	4.16 – 5.09	11.4	10.2 – 12.5	mmol/L	1.16	1.04 – 1.27	2.84	2.56 – 3.13
Roche Hitachi Cobas c Systems (o-cresolphthalein complexone)	mg/dL	4.62	4.16 – 5.08	11.7	10.5 – 12.8	mmol/L	1.15	1.04 – 1.27	2.92	2.63 – 3.21
Siemens ADVIA Chemistry Systems (CA, CA_c) (CPC)	mg/dL	4.78	3.59 – 5.98	11.6	8.69 – 14.5	mmol/L	1.20	0.896 – 1.49	2.90	2.17 – 3.62
Siemens ADVIA Chemistry Systems (CA_2, CA_2c) (Arsenazo III)	mg/dL	5.05	4.04 – 6.06	11.5	9.17 – 13.8	mmol/L	1.26	1.01 – 1.52	2.87	2.29 – 3.44
Siemens Dimension Series (o-cresolphthalein complexone)	mg/dL	5.08	4.57 – 5.58	11.4	10.3 – 12.6	mmol/L	1.27	1.14 – 1.40	2.86	2.57 – 3.15
Siemens Dimension Vista Systems (o-cresolphthalein complexone)	mg/dL	▲	▲	▲	▲	mmol/L	▲	▲	▲	▲
CHLORIDE										
Abbott ARCHITECT cSystem/AEROSET (ISE Indirect)	mEq/L	61.2	55.1 – 67.3	245	220 – 269	mmol/L	61.2	55.1 – 67.3	245	220 – 269
Beckman Coulter AU 400/600/640/680/2700/5400 (ISE Indirect)	mEq/L	65.0	58.5 – 71.5	248	223 – 273	mmol/L	65.0	58.5 – 71.5	248	223 – 273
Beckman Coulter CX Series (ISE Indirect) (CL)	mEq/L	\$	\$	\$	\$	mmol/L	\$	\$	\$	\$
Beckman Coulter Synchron LX/UniCel DxC Series (ISE Indirect) (CL)	mEq/L	60.5	54.5 – 66.6	237	214 – 261	mmol/L	60.5	54.5 – 66.6	237	214 – 261
Chloridometer	mEq/L	58.2	52.4 – 64.0	239	215 – 263	mmol/L	58.2	52.4 – 64.0	239	215 – 263
ISE Indirect (5)	mEq/L	61.2	49.0 – 73.4	245	196 – 294	mmol/L	61.2	49.0 – 73.4	245	196 – 294
Roche Cobas Integra (ISE Indirect)	mEq/L	63.5	57.2 – 69.9	252	226 – 277	mmol/L	63.5	57.2 – 69.9	252	226 – 277
Roche Hitachi/Modular (ISE Indirect)	mEq/L	55.6	50.0 – 61.1	245	220 – 269	mmol/L	55.6	50.0 – 61.1	245	220 – 269
Roche Hitachi Cobas c Systems (ISE Indirect)	mEq/L	54.9	49.4 – 60.4	251	226 – 276	mmol/L	54.9	49.4 – 60.4	251	226 – 276
Siemens ADVIA Chemistry Systems (CL) (ISE)	mEq/L	63.2	56.9 – 69.5	243	219 – 268	mmol/L	63.2	56.9 – 69.5	243	219 – 268
Siemens Dimension Series (ISE Indirect)	mEq/L	73.8	66.5 – 81.2	252	226 – 277	mmol/L	73.8	66.5 – 81.2	252	226 – 277
Siemens Dimension Vista Systems (ISE Indirect)	mEq/L	64.8	58.3 – 71.3	256	230 – 282	mmol/L	64.8	58.3 – 71.3	256	230 – 282
COPROPORPHYRIN										
HPLC (Fluorometric)	µg/L	▲	▲	▲	▲	nmol/L	▲	▲	▲	▲
CORTISOL										
Beckman Coulter Access / 2 / 2i (Chemiluminescence)	µg/dL	6.36	5.09 – 7.63	>60.0		nmol/L	176	140 – 211	>1656	
Beckman Coulter UniCel Dxi (Chemiluminescence)	µg/dL	7.40	5.92 – 8.88	>60.0		nmol/L	204	163 – 245	>1656	
DiaSorin GammaCoat Cortisol RIA	µg/dL	6.60	4.60 – 8.60	>60.0		nmol/L	182	127 – 237	>1656	
Roche Elecsys/E170/Cobas e Systems	µg/dL	3.16	2.21 – 4.09	>63.4		nmol/L	87.3	61.1 – 113	>1750	
Siemens ADVIA Centaur CP (COR)	µg/dL	▲	▲	▲	▲	nmol/L	▲	▲	▲	▲
Siemens ADVIA Centaur CP (COR) (Rgt. Lot 250 and above)	µg/dL	6.08	4.13 – 8.04	>75.0		nmol/L	168	114 – 222	>75.0	
Siemens ADVIA Centaur/Centaur XP (COR)	µg/dL	9.86	6.77 – 13.0	>75.0		nmol/L	272	187 – 359	>75.0	
Siemens ADVIA Centaur/Centaur XP (COR) (Rgt. Lot 250 and above)	µg/dL	6.58	4.46 – 8.70	>75.0		nmol/L	182	123 – 240	>75.0	
Siemens Coat-A-Count RIA	µg/dL	3.50	2.50 – 4.50	1340	992 – 1688	nmol/L	96.6	69.0 – 124	36984	27379 – 46589
CREATININE										
Abbott ARCHITECT cSystem/AEROSET (Alkaline picrate kinetic; IDMS-traceable) (3L81)	mg/dL	79.2	63.4 – 95.1	222	178 – 266	mmol/L	7.00	5.60 – 8.41	19.6	15.7 – 23.5
Abbott ARCHITECT cSystem/AEROSET (Alkaline picrate-kinetic) (7D64)	mg/dL	\$	\$	\$	\$	mmol/L	\$	\$	\$	\$
Alkaline picrate-kinetic (Jaffe Reaction) (5)	mg/dL	82.9	66.3 – 99.5	231	185 – 277	mmol/L	7.33	5.86 – 8.79	20.4	16.3 – 24.5
Beckman Coulter AU 400/600/640/680/2700/5400 (Alkaline picrate-kinetic)	mg/dL	89.5	71.6 – 107	234	187 – 281	mmol/L	7.91	6.33 – 9.49	20.7	16.6 – 24.6
Beckman Coulter CX Series-Cardridge (Alkaline picrate-kinetic) (CR-S)	mg/dL	83.4	66.7 – 100	235	188 – 282	mmol/L	7.37	5.90 – 8.85	20.7	16.6 – 24.9
Beckman Coulter CX Series-Modular (Alkaline picrate-kinetic) (CRm)	mg/dL	\$	\$	\$	\$	mmol/L	\$	\$	\$	\$
Beckman Coulter Synchron LX/UniCel DxC Series (Alkaline picrate-kinetic) (CREm)	mg/dL	85.0	68.0 – 102	240	192 – 288	mmol/L	7.51	6.01 – 9.02	21.2	16.9 – 25.4
Enzymatic (5)	mg/dL	79.3	63.4 – 95.1	225	180 – 270	mmol/L	7.01	5.61 – 8.41	19.9	15.9 – 23.8
Ortho Vitros/Vitros 5.1 FS (Enzymatic)	mg/dL	78.8	63.1 – 94.6	226	181 – 272	mmol/L	6.97	5.57 – 8.36	20.0	16.0 – 24.0
Roche Cobas Integra (Alkaline picrate-kinetic)	mg/dL	80.1	64.0 – 96.1	220	176 – 264	mmol/L	7.08	5.66 – 8.49	19.4	15.6 – 23.3
Roche Cobas Integra (Enzymatic)	mg/dL	75.9	60.7 – 91.0	217	173 – 260	mmol/L	6.71	5.36 – 8.05	19.1	15.3 – 23.0
Roche Hitachi/Modular (Alkaline picrate-kinetic)	mg/dL	80.9	64.7 – 97.0	229	184 – 275	mmol/L	7.15	5.72 – 8.58	20.3	16.2 – 24.3
Roche Hitachi Cobas c Systems (Alkaline picrate-kinetic)	mg/dL	83.1	66.5 – 99.7	233	187 – 280	mmol/L	7.34	5.87 – 8.81	20.6	16.5 – 24.8
Roche Hitachi Cobas c Systems (Enzymatic)	mg/dL	83.3	66.6 – 99.9	234	187 – 281	mmol/L	7.36	5.89 – 8.83	20.7	16.6 – 24.9
Siemens ADVIA Chemistry Systems (CREA) (Jaffe)	mg/dL	77.7	62.2 – 93.3	218	175 – 262	mmol/L	6.87	5.50 – 8.24	19.3	15.4 – 23.2
Siemens ADVIA Chemistry Systems (ECRE_2 enzymatic) (Creatininase)	mg/dL	90.3	72.2 – 108	256	205 – 307	mmol/L	7.98	6.38 – 9.57	22.6	18.1 – 27.1
Siemens Dimension Series (Alkaline picrate-kinetic)	mg/dL	82.8	66.2 – 99.3	234	187 – 280	mmol/L	7.32	5.85 – 8.78	20.7	16.5 – 24.8
Siemens Dimension Vista Systems (Alkaline picrate-kinetic)	mg/dL	80.1	64.0 – 96.1	221	176 – 265	mmol/L	7.08	5.66 – 8.49	19.5	15.6 – 23.4

Anexo II – Reta calibração do ADC

Na figura II.I é apresentada a reta de calibração do ADC determinada, que permite fazer a conversão do valor de tensão adquirido pelo ADC do microcontrolador para o valor de tensão real existente à entrada do ADC. Esta reta de calibração foi obtida inserindo uma gama de valores de tensão à entrada do ADC e lendo o valor adquirido para cada um desses valores de tensão. É importante referir que a gama de valores de tensão inserida está dentro dos limites de tensão admitidos pelo microcontrolador à entrada do ADC (0V a 3,6V).

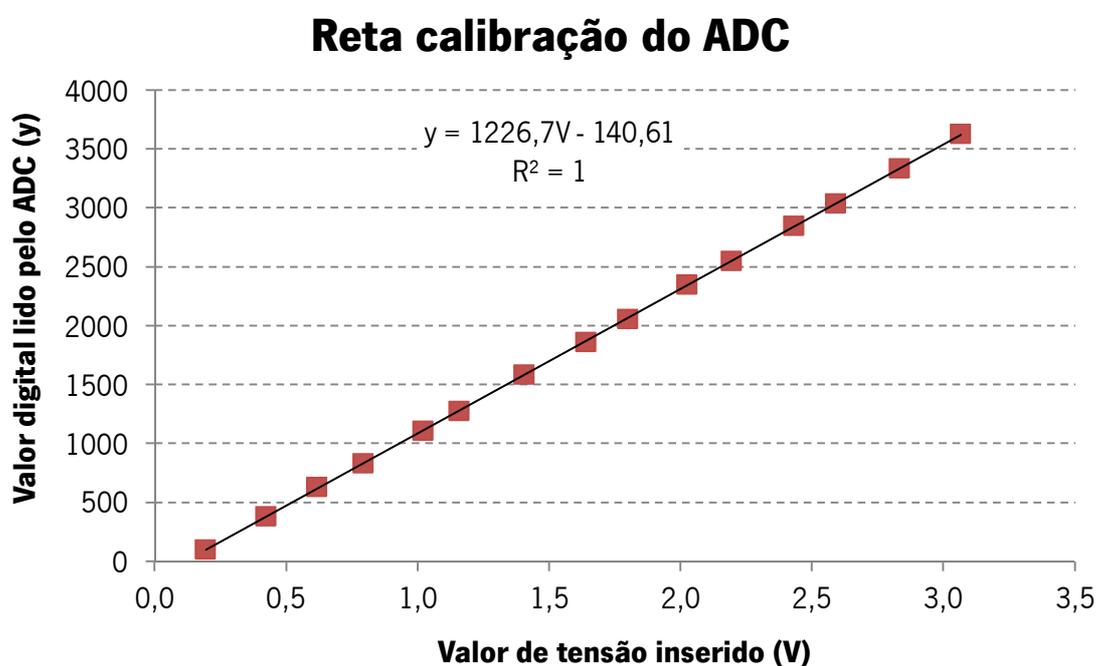


Figura II.I – Reta calibração do ADC

Anexo III – Orçamento detalhado do dispositivo final

Na tabela III.I é apresentado o orçamento detalhado do dispositivo final. Este orçamento tem apenas em conta o custo dos componentes que estão implementados no dispositivo, não tendo em conta os custos colaterais.

Tabela III.I – Orçamento detalhado do dispositivo final

Descrição	Preço unitário (€)	Quantidade	Preço final (€)
Microcontrolador	55	1	55
LED's	0,69	9	6,21
Fotodíodos	2,59	9	23,31
Amplificadores	5,92	6	35,52
Multiplexers	2,97	2	5,94
Regulador 5V	1,81	1	1,81
Regulador 3,3 V	1,68	1	1,68
Condensadores	0,27	4	1,08
Resistências	0,013	9	0,117
Cabo flexível	4,45	0,2	0,89
Terminais cabo flexível	1,74	2	3,48
Conetor cabo flexível	1,62	1	1,62
Conetores	0,50	15	7,50
Interrutor	1,53	1	1,53
Cabos Comunicação	0,05	22	1,10
Fabrico da Caixa	50	1	50
Fabrico PCB's	5	3	15
Bateria	60	1	60
Total			271,79

Anexo IV – Orçamento das diferentes análises

Preço unitário do disco de análise em PDMS – 2,22 €

Na tabela IV.I são apresentados os custos unitários de cada uma das análises efetuadas com os quatro discos existentes e o custo das duas análises realizadas em simultâneo em dois dos quatro discos (incluindo o custo do disco). É importante referir que estes custos foram calculados com base no custo de apenas um *kit* de cada reagente. A compra desses reagentes em larga escala permite minimizar significativamente os custos dos diversos testes referidos. Além disso, a produção do disco de análise em larga escala permite também minimizar o preço unitário de cada disco e consequentemente o custo dos testes referidos.

Tabela IV.I – Custos das diferentes combinações de análises que é possível efetuar no dispositivo.

Nome do disco	1ª Análise	Custo (€)	2ª Análise	Custo (€)	Custo das duas análises em simultâneo (€)
Glucose	Glicose (Soro)	2,36	–	–	–
Creatinine & Albumin/Creatinine Ratio	Creatinina (Urina)	2,50	Razão Albumina/Creatinina (Urina)	34,87	34,87
Diabetic Ketoacidosis (DKA)	Beta-Hidroxibutirato (Soro)	26,99	Potássio (Soro)	12,34	37,11
Glomerular Filtration Rate (GFR)	Creatinina (Soro)	2,50	–	–	–