



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Engenharia

# **Dispositivo portátil não invasivo para a monitorização contínua da concentração de álcool no sangue**

**Inês Raquel Pinheiro Seco**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Eletrotécnica e de Computadores**  
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Pedro Dinis Gaspar  
Co-orientador: Prof. Doutor Manuel Magrinho

**Covilhã, Outubro de 2016**

## **Agradecimentos**

O espaço limitado desta secção de agradecimentos, seguramente, não me permite agradecer devidamente, a todas as pessoas que, ao longo do meu Mestrado em Engenharia Eletrotécnica e de Computadores me ajudaram, direta ou indiretamente, a cumprir os meus objetivos e a realizar mais esta etapa da minha formação académica. Desta forma, deixo um profundo agradecimento aqueles sem os quais não seria possível a realização desta dissertação.

Ao Professor Doutor Pedro Dinis Gaspar, pela sua orientação, total apoio, disponibilidade, pelo saber que transmitiu, pelas opiniões e críticas, total colaboração no solucionar de dúvidas e problemas que foram surgindo ao longo da realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Manuel Magrinho, pela sua orientação e disponibilidade que me deu numa área em que era totalmente desconhecida, pelo saber que transmitiu, pelas opiniões e críticas, total colaboração no solucionar de dúvidas e problemas que foram surgindo ao longo da realização deste trabalho.

A todos os meus colegas de curso e amigos, que estiveram sempre ao meu lado durante esta fase, pelo companheirismo, força e apoio.

E por último, tendo consciência que sozinha nada disto teria sido possível, dirijo um agradecimento especial a toda a minha família, pelo seu apoio incondicional, incentivo e paciência e total ajuda na superação dos obstáculos que ao longo desta caminhada foram surgindo.



## Resumo

O álcool é um dos principais constituintes de bebidas alcoólicas e, seguramente, é a droga de abuso mais antiga de entre as conhecidas atualmente. Esta substância é uma das causas mais comuns de acidentes rodoviários e estes por sua vez têm-se tornado, no decorrer dos anos, uma questão de saúde pública.

O tema proposto tem por objetivo a criação de um dispositivo portátil não invasivo destinado à detecção em tempo real da concentração de álcool no sangue através do suor. Este dispositivo é constituído essencialmente por dois componentes primordiais: um biossensor amperométrico, que promove, recolhe e analisa uma amostra de suor, e a componente da cadeia de aquisição de dados e processamento, que faz a aquisição e conversão analógica/digital dos dados do biossensor e posterior processamento digital dos resultados. O suor é promovido aplicando a técnica de iontoforese. O objetivo reside em que o utilizador assim que comece a ingerir álcool, ligue o dispositivo de modo que as medições, executadas a cada 5 minutos, lhe permitam saber em tempo real e em qualquer lugar, quais os seus níveis de alcoolémia. O público-alvo deste estudo são os condutores profissionais, pois apesar da profissão incorrer em maior experiência de condução e responsabilidade, são o grupo onde a probabilidade de ocorrência de acidentes por efeito do álcool é mais elevada face ao número de horas ao volante. O dispositivo foi projetado para ser usado como um relógio de pulso, pois também oferece essa funcionalidade para manter a descrição da monitorização da concentração de álcool no sangue.

Todo o processo de promoção do suor na pele do utilizador foi apenas estudado teoricamente, não tendo sido um processo implementado no protótipo final. O utilizador é informado que o valor de alcoolémia está a aumentar com um sinal luminoso e sonoro, podendo visualizar no LCD do dispositivo o valor da concentração de álcool no sangue em g/l, pela pressão de um botão. Pretende-se que este protótipo possa servir como mais uma medida para consciencialização dos condutores para os efeitos nefastos da condução sob o efeito de álcool, assim como um meio de redução dos acidentes de viação daí decorrentes.

## Palavras-chave

Dispositivo de monitorização, não invasivo, portátil, concentração de álcool, Biossensor amperométrico, Eletroquímica, Iontoforese, MSP430fg4618, Potencióstato.



## Abstract

Alcohol is one of the main constituents of alcoholic beverages and, surely, is the drug of abuse among the oldest currently known. This substance is one of the most common causes of traffic accidents and these in turn have become, over the years, a public health issue.

The theme aims to create a portable non-invasive device intended for real-time detection of alcohol concentration in the blood through sweat. This device consists essentially of two primary components: an amperometric biosensor, which promotes, collects and analyses a sample of sweat, and the component of the data acquisition and processing system, which makes the acquisition and analogue-to-digital conversion of the bio-data and subsequent digital processing of the results. Sweat is promoted by applying the iontophoresis technique. As soon as the user starts to ingest alcohol, he/she will turn the device to perform measurements every 5 minutes, to know in real time and in any place, which are his/her alcohol levels. The target audience of this study are professional drivers, because despite the profession incur in greater driving experience and responsibility, this is the group where the probability of accidents by effect of alcohol is higher compared to the number of hours driving. The device is designed to be used as a wrist watch, because it also offers this functionality to keep a discrete monitoring of the concentration of alcohol in the blood.

The whole process of promotion of sweat on the skin of the user was only studied theoretically. It has not been implemented in the final prototype. The user is informed that the value of alcohol is increasing by luminous and audible signal, and the LCD of the device can show the value of alcohol concentration in the blood expressed in g/l, by pushing a button. It is intended that this prototype can additionally serve as a measure to drivers' awareness to the adverse effects of driving under the influence of alcohol, as well as a means of reducing traffic accidents.

## Keywords

Monitoring device, non-invasive, portable, concentration of alcohol, Amperometric biosensor, Electrochemistry, Iontophoresis, MSP430fg4618, Potentiostat.



# Índice

|  |           |
|--|-----------|
| Agradecimentos .....                                   | i         |
| Resumo .....   | iii       |
| Abstract .....   | v         |
| Índice .....   | vii       |
| Lista de Figuras.....                                  | ix        |
| Nomenclatura.....                                      | xi        |
| <b>1. Introdução .....</b>                             | <b>13</b> |
| 1.1. Enquadramento .....                               | 13        |
| 1.2. O problema em estudo e a sua relevância .....     | 16        |
| 1.3. Objetivos e contribuição da dissertação .....     | 20        |
| 1.4. Visão geral e organização da dissertação .....    | 21        |
| <b>2. Estado da Arte .....</b>                         | <b>22</b> |
| 2.1. Introdução .....                                  | 22        |
| 2.2. Métodos de sensorização de álcool no sangue.....  | 22        |
| 2.2.1. Biossensores.....                               | 22        |
| 2.2.1.1. Perspetiva histórica.....                     | 22        |
| 2.2.1.2. Conceito e definição.....                     | 23        |
| 2.2.1.3. Tipos de biossensores .....                   | 25        |
| 2.2.1.4. Desenvolvimento de Biossensores.....          | 27        |
| 2.2.2. Outras técnicas relevantes .....                | 28        |
| 2.2.2.1. Iontoforese.....                              | 28        |
| 2.2.2.2. Reação de oxidação-redução do etanol.....     | 30        |
| 2.3. Equipamentos de deteção de álcool no sangue ..... | 31        |
| 2.4. Nota conclusiva .....                             | 36        |
| <b>3. Biossensor .....</b>                             | <b>37</b> |
| 3.1. Introdução .....                                  | 37        |
| 3.2. Preparação dos eléctrodos .....                   | 38        |
| 3.2.1. Eléctrodo de referência .....                   | 38        |
| 3.2.2. Eléctrodo de trabalho .....                     | 39        |
| 3.2.2.1. Síntese do pirrol .....                       | 40        |
| 3.2.2.2. Imobilização das enzimas.....                 | 44        |
| 3.3. Retas de calibração .....                         | 51        |
| 3.4. Nota conclusiva .....                             | 53        |
| <b>4. Aquisição e Processamento de Sinal.....</b>      | <b>55</b> |

---

|  |           |
|--|-----------|
| 4.1. Introdução .....  | 55        |
| 4.2. Aquisição de dados .....                                  | 55        |
| 4.3. Hardware do dispositivo de monitorização .....            | 57        |
| 4.3.1. Características do MSP430FG4618 Texas Instruments ..... | 58        |
| 4.4. Software do dispositivo de monitorização .....            | 60        |
| 4.4.1. Fluxogramas.....  | 61        |
| 4.4.2. Configuração dos periféricos utilizados .....           | 63        |
| 4.4.2.1. Conversor Digital-Analógico (DAC).....                | 63        |
| 4.4.2.2. Conversor Analógico-Digital (ADC).....                | 63        |
| 4.4.2.3. LCD.....  | 65        |
| 4.4.2.4. Buzzer .....  | 65        |
| 4.4.2.5. LED.....  | 66        |
| 4.4.2.6. Botão on/off .....                                    | 66        |
| 4.5. Protótipo final do dispositivo de monitorização .....     | 66        |
| 4.6. Nota conclusiva .....                                     | 68        |
| <b>5. Análise e Discussão dos Resultados .....</b>             | <b>69</b> |
| 5.1. Introdução .....  | 69        |
| 5.2. Comparação dos resultados teóricos com os práticos.....   | 69        |
| 5.2.1. Análise e validação de resultados.....                  | 71        |
| 5.3. Projeto do dispositivo final .....                        | 72        |
| 5.4. Nota conclusiva .....                                     | 73        |
| <b>6. Conclusões.....</b>                                      | <b>75</b> |
| 6.1. Conclusões gerais .....                                   | 75        |
| 6.1.1. Biossensor .....  | 76        |
| 6.1.2. Dispositivo de monitorização .....                      | 77        |
| 6.2. Sugestões de trabalhos futuros.....                       | 78        |
| <b>7. Referências bibliográficas.....</b>                      | <b>79</b> |
| <b>8. Anexos.....</b>  | <b>83</b> |

## Lista de Figuras

|   |    |
|---|----|
| Fig. 1.1-Estimativa do consumo per capita de álcool de acordo com o país [1].....   | 14 |
| Fig. 1.2-Principais efeitos do álcool no organismo humano [3]. .....  | 15 |
| Fig. 1.3-Doenças e prejuízo total ou parcialmente decorrentes do uso do álcool (adaptado de [1]). .....   | 16 |
| Fig. 1.4-Número de vitimas mortais, por mês, em acidentes de viação - anos 2012 e 2013 [6].   | 17 |
| Fig. 1.5- Número de feridos, por mês, em acidentes de viação viação - anos 2012 e 2013 [6]..  | 17 |
| Fig. 2.1-Representação esquemática dos elementos que constituem um biossensor (adaptado [17]) . .....   | 24 |
| Fig. 2.2- Principais métodos de imobilização de enzimas (adaptado [17]). .....  | 27 |
| Fig. 2.3- Princípios de funcionamento da iontoforese [23]. .....  | 30 |
| Fig. 2.4- Produtos da oxidação de álcoois (adaptado [25]). .....  | 31 |
| Fig. 2.5- Dispositivo desenvolvido para a detecção do conteúdo de álcool em corpos humano através do suor secretado pelos dedos da mão [26]. .....  | 32 |
| Fig. 2.6- Dispositivo de detecção de estado de embriaguez capaz de detetar a concentração de álcool contido no suor através da palma da mão do condutor em contacto com um sensor localizado o volante da viatura [27]. ..... | 33 |
| Fig. 2.7 - Dispositivo capaz de detetar álcool no condutor de um veículo, através de um sensor colocado no interruptor de arranque do motor do veículo [28]. .....  | 33 |
| Fig. 2.8- Dispositivo para detecção de álcool através do suor secretado das mãos do condutor e detectado por um sensor localizado no volante do viatura( parte a tracejado) [29]. .....                                       | 34 |
| Fig. 2.9- Dispositivo para medir a embriaguez atarvés do suor secretado pelas maos do condutor e detectado com um sensor que se encontra no volante e na caixa de velocidades da viatura [31]. .....                          | 35 |
| Fig. 3.1- Esquema de montagem do elétrodo de referência. ....   | 39 |
| Fig. 3.2- Esquema de montagem para a preparação do eletrodo de trabalho (eletrólito -DBSS). .....   | 41 |
| Fig. 3.3- Gráfico da Voltametria de varrimento linear do Elétrodo de Platina em 25 ml de solução DBSS a 0,1 M. ....   | 41 |
| Fig. 3.4- Gráfico da voltametria de varrimento linear com o elétrodo de platina em 25 ml solução de DBSS 0,1 M com a adição de 200 µl de pirrole. ....  | 42 |
| Fig. 3.5- Gráfico da Cronocoulometria da síntese do pirrole a 300 mC. ....  | 43 |
| Fig.3.6-Gráfico da Voltametria linear com o elétrodo de pirrole e do elétrodo de Platina em tampão fosfato 0,1 M. ....  | 43 |
| Fig. 3.7- Diferença entre as superficies dos elétrodos (esquerda -elétrodo de platina; direita- elétrodo de pirrole). .....   | 44 |
| Fig. 3.8- Cronoamperometria com adição de 50 µl de peroxido concentrado de 0,1 M em 1000 ml. ....   | 46 |
| Fig. 3.9- Gráfico da cronoamperometria com adição de 500 µL de etanol puro aos 900s. ....   | 47 |
| Fig. 3.10- Voltametria linear do elétrodo de trabalho com enzima em 15 ml de solução tampão fosfato de 0,1 M e pH=7. ....   | 48 |
| Fig. 3.11- Cronoamperometria com adição de 100 µl de etanol a 95% numa solução tampão fosfato de 0,1 M e pH=7 de 15 ml. ....  | 49 |
| Fig. 3.12- Cronoamperometria do elétrodo de trabalho sem enzima, numa solução de tampão fosfato de 0,1 M e pH=7 e adição de 100 µl de etanol a 95%. ....  | 50 |

|  |    |
|--|----|
| Fig. 3.13- Eléctrodo impresso. Na parte circular(eléctrodo de trabalho) é onde é depositava a enzima. ....   | 50 |
| Fig. 3.14- Cronoamperometria com o eléctrodo impresso, 15 ml de solução tampão fosfato a 0,1 M e pH=7 e adição de 100 µl de etanol a 95%. ....                                   | 51 |
| Fig. 3.15- Reta linear e respetiva equação tensão/concentração. ....   | 52 |
| Fig. 3.16- Reta linear e respetiva equação corrente/concentração. ....   | 53 |
| Fig. 4.1- Potencióstato. ....  | 56 |
| Fig. 4.2- Esquema para saber o valor da resistência para o conversor corrente/tensão [41]. ...   | 56 |
| Fig. 4.3- Potencióstato mais conversor corrente/tensão. ....   | 57 |
| Fig. 4.4- Placa de desenvolvimento MSP430FG4618/F2013 Experimenter Board [39]. ....  | 59 |
| Fig. 4.5- Diagrama de bloco da placadesenvolvimento MSP430FG4618/F2013 Experimenter Board [39]. ....   | 59 |
| Fig. 4.6- Montagem dos dois botões adicionados à placa de desenvolvimento MSP430FG4618/F2013 Experimenter Board [39]. ....   | 60 |
| Fig. 4.7- Vista inicial do Code Composer Studio [44]. ....   | 60 |
| Fig. 4.8- Fluxograma representativo do processo de iontoforese. ....   | 61 |
| Fig. 4.9- Fluxograma representativo do processamento do sinal. ....  | 62 |
| Fig. 4.10- Diagrama de blocos do funcionamento geral de um ADC. ....   | 63 |
| Fig. 4.11- Protótipo final da montagem do dispositivo de monitorização. ....   | 67 |
| Fig. 4.12- Esquema de ligação do protótipo do dispositivo de monitorização. ....   | 68 |
| Fig. 5.1 - Cronoamperometria com o eléctrodo impresso, 15 ml de solução tampão fosfato a 0,1 M e pH=7 e adição de 100 µl de etanol a 95%. ....                                   | 70 |
| Fig. 5.2- Voltametria linear do eléctrodo de trabalho com enzima em 15 ml de solução tampão fosfato de 0,1 M e pH=7 (Figura 3.10 adaptada). ....                                 | 71 |
| Fig. 5.3 - Cronoamperometria do eléctrodo de trabalho sem enzima, numa solução de tampão fosfato de 0,1 M e pH=7 e adição de 100 µl de etanol a 95% (Figura 3.12 adaptada). .... | 72 |
| Fig. 5.4 - Projecção do dispositivo final. ....  | 73 |

## Nomenclatura

### Geral:

|             |                                     |
|-------------|-------------------------------------|
| Aux         | Auxiliar;                           |
| <i>h</i>    | Horas;                              |
| <i>op</i>   | <i>Amplificador operacional;</i>    |
| <i>R</i>    | Resistência elétrica, [ $\Omega$ ]; |
| Ref         | Referência;                         |
| <i>Trab</i> | <i>Trabalho;</i>                    |

### Índices inferiores:

|               |                |
|---------------|----------------|
| ( <i>aq</i> ) | Estado aquoso; |
| <i>Cel</i>    | Célula;        |
| <i>in</i>     | Entrada;       |
| <i>out</i>    | Saída;         |
| ( <i>g</i> )  | Estado gasoso; |
| ( <i>s</i> )  | Estado Sólido. |

### Simbologia grega:

|          |          |
|----------|----------|
| $\Delta$ | Varição; |
|----------|----------|

### Acrónimos:

|      |                                    |
|------|------------------------------------|
| ADC  | Analog/Digital Converter;          |
| ADH  | Álcool Desidrogenase;              |
| AOX  | Álcool Oxidase;                    |
| BAC  | Blood Alcohol Content;             |
| CCS  | Code Composer Studio;              |
| DAC  | Digital/Analog Converter;          |
| DBSS | Dodecil Bezeno Sulfonato de Sódio; |
| DNA  | Deoxyribonucleic Acid;             |
| FET  | Fied Effect Transitor;             |

|             |  |
|-------------|--|
| <i>GA</i>   | <i>Glutaraldeído;</i>                        |
| <i>I2C</i>  | Inter-Integrated Circuit;                    |
| <i>IRDA</i> | Infrared Data Association;                   |
| <i>JTAG</i> | Joint Test Action Group;                     |
| <i>LCD</i>  | Liquid-Crystal-Display;                      |
| <i>LED</i>  | Díodo Emissor de Luz;                        |
| <i>NAD</i>  | Dinucleótico de Nicotinamida e Adenina;      |
| <i>OMS</i>  | Organização Mundial de Saúde;                |
| <i>PNB</i>  | Produto Nacional Bruto;                      |
| <i>PPy</i>  | Polipirrol;                                  |
| <i>PSA</i>  | Albumina de Soro de Porco;                   |
| <i>RTC</i>  | Real Time Clock;                             |
| <i>SPI</i>  | Serial Peripheral Interface;                 |
| <i>SPR</i>  | Surface Plasman Resonance;                   |
| <i>TAS</i>  | Taxa de Alcoolemia no Sangue;                |
| <i>TI</i>   | Texas Instruments;                           |
| <i>UART</i> | Universal Asynchronous Receiver/Transmitter; |
| <i>UBI</i>  | Universidade da Beira Interior;              |
| <i>UE</i>   | União Europeia.                              |

# 1. Introdução

Este capítulo introdutório inicia-se com o enquadramento do tema, onde é descrito o impacto do consumo de álcool na sociedade e os seus efeitos no organismo. De seguida, é exposto o problema em estudo e a sua relevância, onde é abordada a problemática dos acidentes de viação em geral e dos acidentes de viação sofridos por profissionais condutores, causados pela ingestão de álcool, assim como as suas consequências. Posteriormente são referidos os objetivos e contribuição da dissertação, onde o principal objetivo consiste no desenvolvimento de um dispositivo portátil, não invasivo que permita a monitorização contínua da concentração de álcool no sangue.

Por fim é dada uma visão geral e organização da dissertação por capítulos.

## 1.1. Enquadramento

O etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$  ou  $\text{H}_6\text{OC}_2$ ), também chamado de álcool etílico e, na linguagem corrente, simplesmente álcool, é uma substância orgânica obtida da fermentação de açúcares, hidratação do etileno ou redução de acetaldeído. Este é um dos principais constituintes de bebidas alcoólicas e, seguramente, é a droga de abuso mais antiga de entre as conhecidas atualmente. É ainda considerada uma das substâncias psicoativas mais utilizadas pelas sociedades humanas e estima-se que é um dos principais fatores de contribuição para mortes prematuras e incapacidades, além de ser um causador de violência, de desemprego, entre outras consequências. Por todos estes motivos, o consumo de álcool é considerado um dos mais graves problemas de saúde pública da atualidade [1] [2].

A origem do álcool etílico é incerta, contudo, acredita-se que o uso desta matéria se iniciou a partir de um processo de fermentação natural ou espontânea de alguns produtos vegetais, como açúcares, ocorrido há aproximadamente 10.000 anos. Com o passar do tempo, novos formatos de bebidas alcoólicas foram sendo desenvolvidos e um produto que, no início era produzido artesanalmente, foi gradualmente transformado numa mercadoria industrial largamente disponível [3].

Atualmente, de acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), calcula-se que existam 2 mil milhões de consumidores de álcool no mundo, o que se traduz num potencial acréscimo de doenças e custos económicos [3].

Globalmente, estima-se que em 2010, indivíduos com idade superior a 15 anos consumiram em torno de 6,2 litros de álcool puro (equivalente a cerca de 13,5 gramas por dia) [1].

Em Portugal, o consumo de álcool é maior ou igual a 12,5 litros o que, por análise da Figura 1, o coloca no grupo mundial de países com maior consumo de álcool, muito acima da média mundial [1].

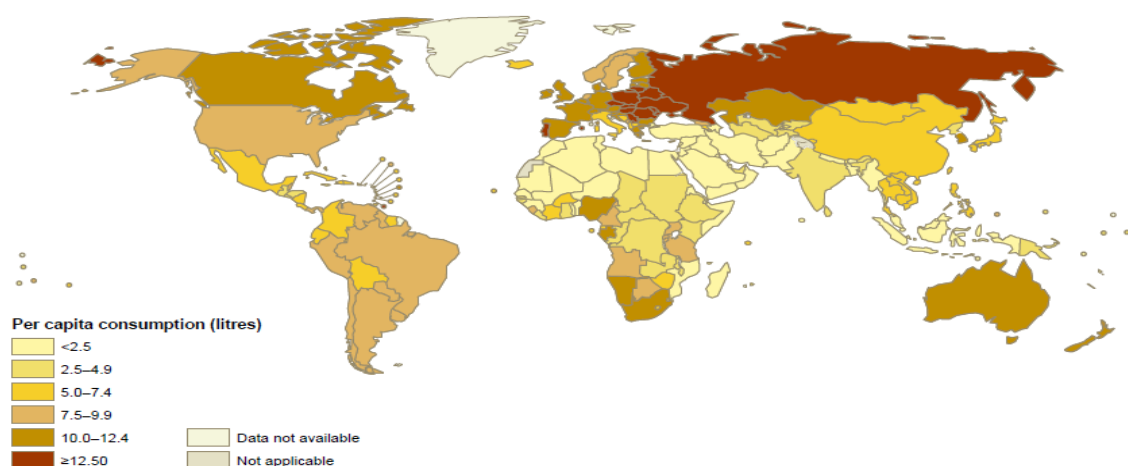


Fig. 1.1-Estimativa do consumo per capita de álcool de acordo com o país [1].

O Relatório Global sobre Álcool e Saúde publicado em 2014 revela ainda que quase  $\frac{1}{4}$  do álcool puro que é consumido no mundo é ilegal, e portanto, não regulamentado. Em alguns países, este valor chega mesmo a 50% (sudeste da Ásia e Região do Mediterrâneo, por exemplo). Este relatório refere também que as bebidas destiladas correspondem ao tipo de bebidas mais consumidas no mundo (50%), seguindo de cerveja (35%), enquanto que as bebidas vitivinícolas correspondem a 8% [1].

Como já foi referido, o uso nocivo de álcool é um dos fatores de risco de maior impacto para a morbidade, mortalidade e incapacidades em todo o mundo, e está também relacionado com 3,3 milhões de mortes a cada ano [1]. A Figura 1.2 mostra todos os efeitos nocivos que o álcool pode ter no organismo humano.

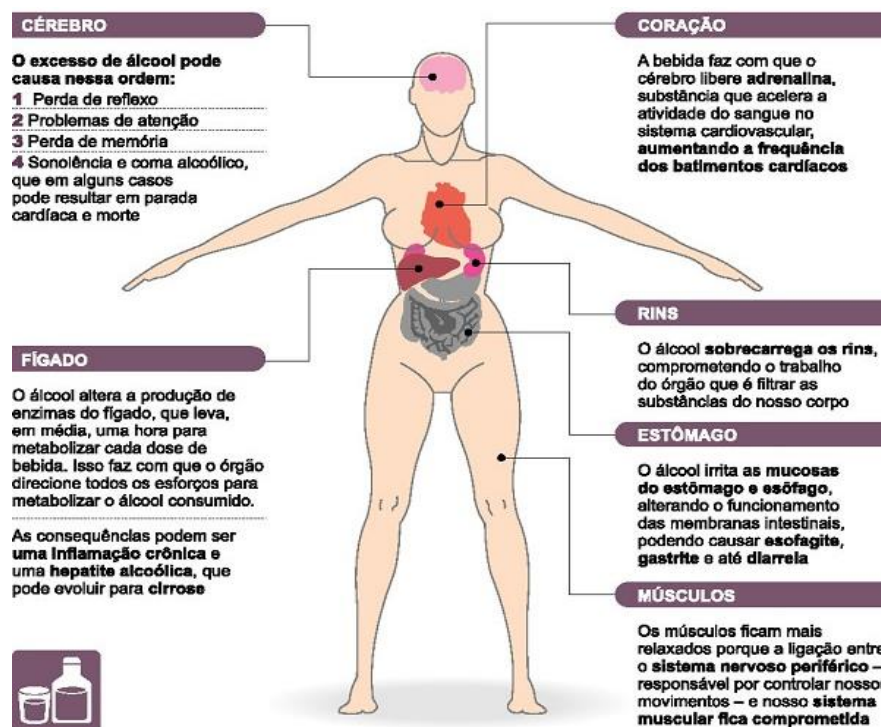
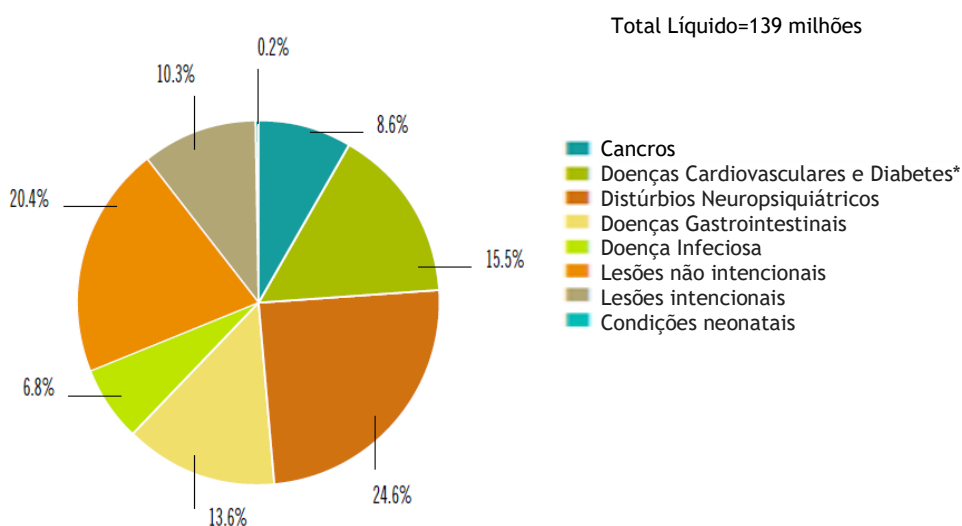


Fig. 1.2-Principais efeitos do álcool no organismo humano [3].

Desta forma, quase 6% das mortes em todo o mundo são atribuídas total ou parcialmente ao álcool. Na Figura 1.3 é possível verificar as principais perturbações e prejuízos associados ao álcool em diferentes níveis.



\*Incluindo os efeitos benéficos de padrões de consumo de baixo risco de algumas doenças  
Nota: Percentagens podem não somar 100 % devido ao arredondamento

Fig. 1.3-Doenças e prejuízo total ou parcialmente decorrentes do uso do álcool (*adaptado de [1]*).

A dependência de álcool (alcoolismo) é assim uma doença crónica e multifatorial. Diversos fatores contribuem para o seu desenvolvimento, incluindo a quantidade e frequência de consumo do álcool, a condição de saúde do indivíduo e fatores genéticos, psicossociais e ambientais. No entanto, não são estes fatores que definem o diagnóstico de dependência [1].

## 1.2. O problema em estudo e a sua relevância

Os acidentes de viação têm-se tornado, no decorrer dos anos, uma questão de saúde pública, pois além de provocarem vítimas mortais, deixam sequelas de graus variados entre os sobreviventes e efeitos adversos entre os membros das suas famílias. Entre os inúmeros fatores desencadeantes deste processo, destaca-se o uso de álcool [4] [5].

Dados de 2015 registam que nos países desenvolvidos, os acidentes rodoviários são a principal causa de morte na faixa etária dos 15 aos 24 anos. Consequentemente, por cada jovem condutor que morre num acidente de viação, perdem a vida, em média, outras 1,3 pessoas. Os acidentes que envolvem jovens condutores são frequentemente causados pela perda do controlo do veículo ou pelo excesso de velocidade e acontecem com maior frequência no período noturno [5]. A condução sob o efeito do álcool é um fator determinante em aproximadamente 25% dos acidentes mortais, tendo sido responsável por 6.500 mortes na Europa em 2012. O consumo tanto de medicamentos como de drogas ilegais representa um problema a nível da segurança rodoviária, quer isoladamente quer em combinação com o álcool [4].

Durante o ano 2013 foram registados em Portugal continental, 30.339 acidentes de viação (com vítimas), o que se traduz num acréscimo de 1,6% em relação ao ano anterior. Destes acidentes resultaram 39.390 vítimas (+1,5%), das quais 637 (-11,3%) foram mortais (peso de 1,6%) e as restantes 38.753 foram feridos (+1,7%). Entre os feridos, 1.946 foram graves (+0,3%) e 36.807 ligeiros (+1,8%). Os meses de setembro, dezembro e julho apresentaram os números mais elevados de acidentes com vítimas (2.915, 2.890 e 2.770 respetivamente), enquanto que o número de vítimas mortais foi mais elevado em agosto (73), janeiro (71) e outubro (69) [6]. Os gráficos das Figuras 1.4 e 1.5 ilustram os valores descritos.

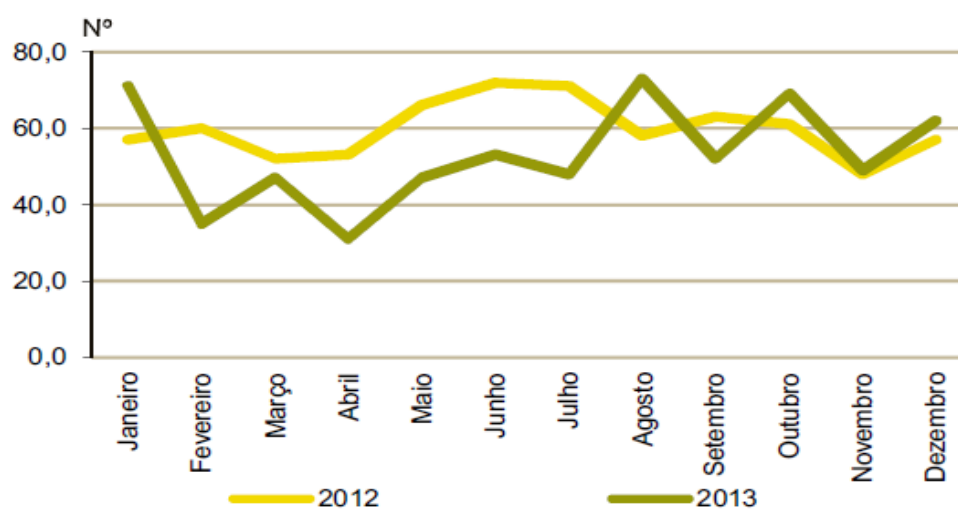


Fig. 1.4-Número de vítimas mortais, por mês, em acidentes de viação - anos 2012 e 2013 [6].

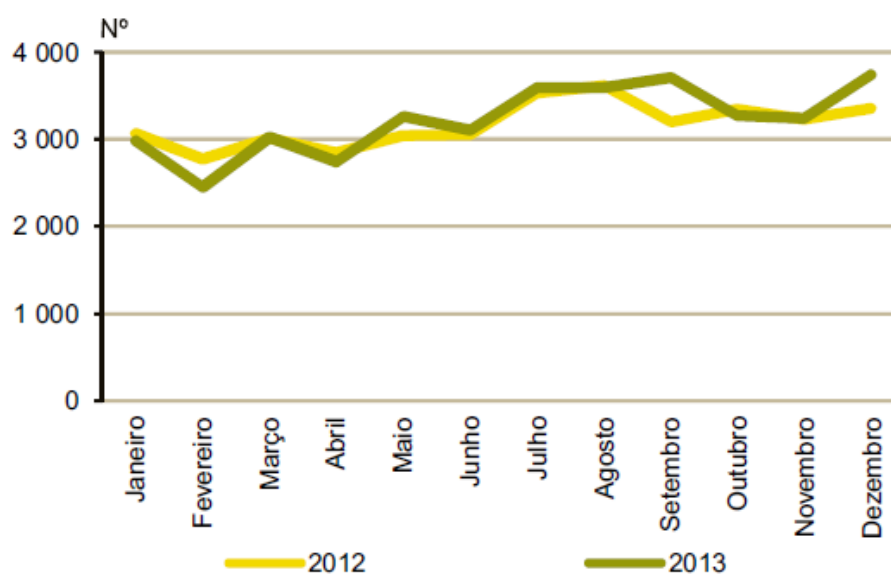


Fig. 1.5- Número de feridos, por mês, em acidentes de viação viação - anos 2012 e 2013 [6].

Para Portugal, apesar do número total de vítimas resultantes de acidentes de viação durante o ano de 2013 (41.129) ter aumentado 1,6%, registou-se contudo uma significativa redução de 8,9% no número de casos mortais (672), com contabilização mensal [6].

Como já foi referido, a condução sob o efeito do álcool é um fator determinante para os acidentes mortais. Tal ocorre porque esta substância pode provocar no corpo efeitos ao nível do sistema nervoso que prejudicam a condução [7].

A *Audácia* incontrolada é um dos primeiros efeitos do álcool. Este é o frequente estado de euforia, sensação de bem-estar e de otimismo, com a conseqüente tendência para sobrevalorizar as próprias capacidades, que, na realidade, já se encontram reduzidas. É, talvez, um dos estados mais perigosos. Outro efeito é a *Perda de vigilância* em relação ao meio envolvente, já que sob a influência do álcool, as capacidades de atenção e de concentração do condutor ficam diminuídas. Existe também a *Perturbação das capacidades sensoriais*, particularmente as visuais [7].

A presença de álcool no sangue reduz a acuidade visual, quer para perto, quer para longe e leva à alteração dos contornos dos objetos, quer estáticos, quer em movimento. A visão estereoscópica é prejudicada e o condutor fica incapaz de avaliar corretamente as distâncias e as velocidades. A visão noturna e crepuscular fica reduzida. O tempo de recuperação após encandeamento aumenta. Existe ainda o *Estreitamento do campo visual* - o campo visual vai diminuindo com a eliminação progressiva da visão periférica (lateral) podendo, com o aumento da intoxicação alcoólica, chegar à visão em túnel [7].

A *Perturbação das capacidades percetivas* é outro dos efeitos que o álcool pode causar, em que a identificação da informação, recebida pelos órgãos dos sentidos, fica prejudicada e torna-se mais lenta: Aumento do tempo de reação e diminuição da resistência à fadiga [7].

Assim, todos os países da União Europeia (UE) impõem limites à quantidade de álcool que os condutores podem ingerir. Em Portugal, os limites de taxas de alcoolémia são os seguintes [7]:

- ✓ 0,19 g/l - sem aplicação de multa;
- ✓ De 0,20 g/l a 0,49 g/l - 250 euros + inibição de condução 1 mês;
- ✓ De 0,50 g/l a 1,19 g/l - 500 euros + inibição de condução 2 meses;
- ✓ Mais de 1,20 g/l - crime, irá a julgamento posteriormente para aplicação de coimas e restrições à condução.
- ✓ E ainda no caso dos condutores profissionais, o consumo de álcool é proibido durante as horas de trabalho e nas oito horas anteriores ao início do período de trabalho.

Os acidentes rodoviários também são muito comuns no trabalho, ou seja, acidentes que afetam o sector dos transportes. Neste sector englobam-se os que se efetuam por via Terrestre (rodoviários e ferroviários), Marítima e Fluvial e Aérea. [8]. A todos eles estão associados acidentes de natureza diversa, cujas conseqüências acarretam custos

significativos para os intervenientes, empresas, seguradoras, com repercussões na economia e finanças dos países [8].

Em todo o mundo, os meios de transporte aéreo e ferroviário são os mais seguros, sendo os transportes rodoviários os que apresentam um maior nível de insegurança [8].

Em 2013 foram apurados 48.406 condutores implicados em acidentes de viação em Portugal continental com causa principal decorrente do consumo de álcool, dos quais 91,6% (44.332 indivíduos) foram submetidos ao teste do álcool. Destes, 4,7%, o que corresponde a 2082 Indivíduos, apresentaram uma taxa de alcoolemia no sangue (TAS) igual ou superior a 0,5 gramas por litro de sangue [7]. Entre os condutores de veículos pesados, apenas 0,7% dos condutores submetidos ao teste evidenciou TAS de 0,5 gramas por litro de sangue, o que representa 339 indivíduos a conduzir sob o efeito de álcool [7].

O cansaço e o excesso de velocidade são também algumas das causas mais comuns para a ocorrência de acidentes. Nos países industrializados, em 2015, os acidentes rodoviários são o tipo de acidente de trabalho com mais vítimas mortais. Em particular, o cansaço é um fator determinante em 10% a 20% dos acidentes rodoviários. Os camionistas têm mais probabilidades de virem a estar envolvidos num acidente relacionado com o cansaço [4]. Estes condutores merecem especial atenção, pois a sua profissão depende da condução de um veículo e na maioria dos casos este transporta sempre pessoas ou mercadoria, pelo que quando envolvidos em acidentes, os danos são maiores [8].

Naturalmente, os acidentes rodoviários têm consequências em termos Humanos, Materiais e Financeiros [8].

A nível humano, as consequências dos acidentes têm impacto a três grandes níveis: físico, psicológico e social [6]. O sofrimento físico e psicológico, na própria vítima, derivado das lesões que sofreu por perda ou limitação de órgãos, até à alteração do aspeto exterior e limitação de movimentos. Para além disso, as consequências dos acidentes também afetam os familiares com quem a vítima convive [6]. As consequências dos acidentes a nível material abrangem prejuízos essencialmente nas componentes veículo e infra-estruturas (Ex: pavimento) [8].

Os custos com os veículos constituem uma parcela significativa do custo económico e social dos acidentes rodoviários [8]. Os danos do veículo e do pavimento são os mais acentuados, no entanto muitos outros podem surgir, como por exemplo: Estragos na sinalização de trânsito, nos equipamentos de segurança das estradas (como as guardas e barreiras de segurança), destruição de postes (os suportes da iluminação pública, bem como do transporte de energia elétrica ou de telefone). Como todos estes estragos na via pública,

outros estragos podem surgir, como por exemplo: congestionamento da via e poluição do meio ambiente (mercadorias quimicamente perigosas), entre outros [8].

Por último, no que toca a consequências financeiras, é geralmente aceite que para países com o nível de desenvolvimento de Portugal, os acidentes rodoviários correspondem a cerca de 2% do Produto Nacional Bruto (PNB), o qual, para 2015, foi estimado em 181.068 milhões de Euros. Ou seja, em 2015 o custo económico e social dos acidentes na estrada terá correspondido a cerca de 3.600 milhões de Euros [8] [9]. Nestes custos estão incluídos: custos por vítima, custos com o socorro e transporte, custos do tratamento médico, custos de reabilitação, entre outros [8].

### **1.3. Objetivos e contribuição da dissertação**

O tema proposto tem por objetivo a criação de um dispositivo portátil não invasivo destinado à deteção em tempo real de alcoolémia. O álcool, após a sua ingestão, é absorvido 20% pelo estômago e 80% pelo intestino. Após ser absorvido é então libertado pelo suor, urina e respiração. O dispositivo desenvolvido no decorrer desta dissertação utiliza o suor para monitorizar o álcool ingerido.

Este dispositivo provoca a sudção no local da medição e posteriormente realiza a medição da quantidade de álcool que existe no suor e relaciona-a com a quantidade existente no sangue. O objetivo reside em que o utilizador assim que comece a ingerir álcool, ligue o dispositivo de modo que as medições, executadas a cada 5 minutos, lhe permitam saber em tempo real e em qualquer lugar, quais os seus níveis de alcoolémia. Os condutores de empresas de transportes, quer sejam, transportes de emergência médica, transportes públicos etc., são o público-alvo onde se pretende aplicar este dispositivo no futuro, embora a sua utilização por um público em geral, consciente no que toca aos malefícios do consumo de álcool, seja possível. O dispositivo irá ter um mecanismo baseado em biossensor amperimétrico.

A grande contribuição do desenvolvimento deste dispositivo reside na disponibilização de um método de controlo dos níveis de alcoolémia dos condutores, sendo que irá incidir primordialmente nos condutores profissionais, como por exemplo, de transporte rodoviário ligeiro ou pesado, nacional ou internacional, de mercadorias, ambulâncias, transportes públicos, táxis, Camiões etc., face ao número de acidentes por ano com este tipo de viaturas e ao fato de estas estarem diretamente relacionadas com os transportes de pessoas ou de mercadoria.

Depois de ser efetuada a medição aos condutores, cabe a estes terem a plena consciência de que poderão estar a colocar em risco não só a sua vida como a de muitas outras pessoas, e assim tomar a decisão de não iniciar ou então parar de conduzir.

Neste sentido, entende-se que a implementação deste dispositivo em condutores profissionais, poderá fornecer um contributo na identificação de condutores alcoolizados, consciencialização do perigo que é conduzir sob o efeito de álcool e posteriormente diminuir a sinistralidades nas estradas.

#### **1.4. Visão geral e organização da dissertação**

Como já explanado, o primeiro capítulo da presente dissertação é introdutório fazendo um devido enquadramento do trabalho a ser desenvolvido, salientando a sua importância com base em valores que alertam à preocupação do leitor perante o tema apresentado. Neste capítulo expõe-se o problema, fazendo referência aos pontos mais importantes para, seguidamente, apresentar os objetivos da dissertação bem como a contribuição esperada.

No segundo capítulo, intitulado como “Estado da arte”, são apresentados alguns métodos de sensorização de álcool no sangue e alguns equipamentos de deteção de álcool no sangue.

Posteriormente, no terceiro capítulo da dissertação, aborda-se a secção do processo de desenvolvimento do Biossensor e testes realizados ao mesmo. Deste modo, este capítulo integra uma explicação de toda a preparação dos elétrodos e soluções que integram o Biossensor. Em relação aos testes, são descritas todas as técnicas eletroquímicas aplicadas e resultados obtidos.

No quarto capítulo é descrito todo o software e hardware utilizado e/ou desenvolvido para a análise e processamento do sinal recolhido do biossensor. Sendo que em relação ao software é descrita toda a configuração dos circuitos integrados usado no hardware. Neste capítulo é também apresentado um desenho do protótipo do dispositivo desenvolvido.

O quinto capítulo contempla a discussão e análise dos resultados, onde é feita uma comparação dos resultados obtidos na prática com os esperados teoricamente, de modo a obter uma validação dos resultados.

No último capítulo, são apresentadas as conclusões gerais do trabalho de dissertação, tendo em consideração os resultados do protótipo desenvolvido. É também apresentado um conjunto de sugestões de trabalho futuro decorrentes dos resultados desta dissertação.

## 2. Estado da Arte

### 2.1. Introdução

Este capítulo inicia-se com a revisão das publicações científicas mais relevantes para o tema da dissertação, onde é abordada uma sistematização dos estudos já desenvolvidos com biossensores. É apresentado um pequeno enquadramento histórico, é exposto todo o conceito e definição de biossensor, é enumerada a maioria dos biossensores existentes e por fim é referido o desenvolvimento de um biossensor para a aplicação em particular desta dissertação. Posteriormente são expostas as técnicas relevantes para o desenvolvimento do dispositivo em estudo, onde é descrita a técnica de iontoforese, que no presente trabalho será utilizada para a promoção da produção de suor, e as reações de oxidação-redução, em especial, do etanol, que é a técnica empregue pelos biossensores amperimétricos.

Por último, são apresentados alguns dispositivos já patenteados que têm uma função idêntica ao dispositivo em desenvolvimento.

### 2.2. Métodos de sensorização de álcool no sangue

#### 2.2.1. Biossensores

A crescente expansão de pequenos dispositivos capazes de monitorizar a saúde, os alimentos, o meio ambiente e diversas novas aplicações que vêm surgindo a cada dia tem originado uma verdadeira revolução no meio científico. Os biossensores são uma forma simples, compacta, rápida e acessível no ramo de deteção química, bioquímica e imunológica [10].

##### 2.2.1.1. *Perspetiva histórica*

O primeiro biossensor foi preparado por Clark & Lyons [11] em 1962. Este biossensor utilizava a glicose oxidase imobilizada numa membrana de acrilamida em eléctrodos de platina. Este detetava o consumo de oxigénio sob altos potenciais de redução [10].

Mais tarde, em 1974 foi proposto o uso de transdutores térmicos em biossensores e em 1975 os biossensores sofreram outro avanço importante marcado por Divie [12], que imobilizou bactérias usando-as depois como elemento biológico criando um eléctrodo microbiano para a medição de álcool [10].

No ano seguinte, Clemens *et al.* [12] incorporam um biossensor de glucose num pâncreas artificial. Também nesse ano foi desenvolvido um sensor de lactato que recorria a um mediador solúvel, que, apesar de não ter sido comercializado, se revelou o precursor de uma nova geração de biossensores [13]. Uma das maiores inovações deu-se em 1982 quando Shichiri *et al.* [12] descreveram o primeiro eléctrodo enzimático em forma de agulha para implantação subcutânea [13].

Em 1990 foi lançado de um biossensor baseado em Ressonância Plasmática de Superfície (SPR -*Surface Plasmon Resonance*). Posteriormente em 1998 ocorre o lançamento do biossensor de glucose no sangue, o LifeScan FastTake [14]. Mais recentemente, em 2007, foram investidos 10,7 milhões de dólares na pesquisa e desenvolvimento de biossensores para várias aplicações (biodefesa, pesquisa médica e biofarmacêutica, monitorização ambiental e alimentos e bebidas) [15].

### 2.2.1.2. Conceito e definição

O que distingue os biossensores dos sensores comuns é a presença de um elemento biológico, o qual é responsável pela identificação do analito (componente de uma amostra que é alvo de análise ou tem interesse para uma análise). Assim, um biossensor é um dispositivo analítico, sem marcadores, composto por 3 partes distintas: uma biocamada (recetor), um transdutor elétrico, elementos de condicionamento e processamento do sinal elétrico [16]. Na Figura 2.1 encontra-se uma representação esquemática dos elementos que constituem um biossensor. O objetivo de um biossensor é produzir um sinal elétrico que é proporcional em amplitude ou frequência à concentração do analito [16].

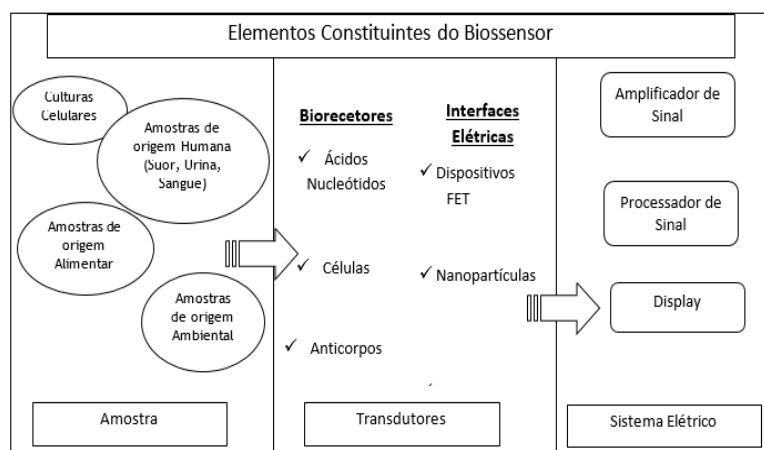


Fig. 2.1-Representação esquemática dos elementos que constituem um biossensor (adaptado [17]) .

A biocamada, que inclui o bioreceptor, é o constituinte biologicamente ativo e é imobilizado no substrato do biossensor. Os bioreceptores podem ser: enzimas, micróbios, organelos, células de animais ou plantas, tecidos de plantas ou animais, anticorpos, receptores, ácidos nucleicos, Ácido desoxirribonucleico (ADN), entre outras substâncias. O substrato fluídico (gás ou líquido) ou sólido (filme fino, por exemplo), ao entrar em contato com o bioreceptor, imobilizado na superfície do biossensor, produz uma mudança físico-química (variação de calor, índice de refração, resistência, capacitância, etc...) que pode ser identificada por um transdutor elétrico [16].

A escolha do elemento transdutor depende do método de análise adotado e vice-versa. Estes métodos de análise podem ser divididos em três grupos: Métodos Eletroquímicos, Óticos ou Piezoelétricos [16].

O sinal elétrico resultante é depois adquirido e processado. O sistema de aquisição, processamento e visualização dos dados informa o utilizador se a amostra em análise foi ou não detetada e da quantidade de substância na amostra [16].

Existem algumas características que o biossensor tem de ser portador para que seja considerado um biossensor ideal.

- ✓ Sensibilidade - Definida como a alteração na amplitude do sinal de saída do biossensor como resposta à alteração da concentração de uma espécie química específica [17];
- ✓ Linearidade - Um biossensor perfeitamente linear apresentará a sua sensibilidade constante desde a concentração nula de substrato até à máxima concentração de substrato que possa ser fisicamente dissolvida no meio de medida. Na prática, a região de linearidade é normalmente restrita a um determinado intervalo de concentrações de substrato [17];
- ✓ Limite de deteção - A menor quantidade de substrato que pode ser detetada deverá ser apenas limitada pela resolução da instrumentação eletrónica utilizada para as medidas [17];
- ✓ Seletividade - Um biossensor ideal deverá responder unicamente a alterações na concentração do analito alvo não sendo assim influenciado pela presença de outras espécies químicas em solução [17];

- ✓ Tempo de vida - o tempo que o elemento biológico permanece sensível sob condições de operação normais. O tempo de vida pode ser dependente do número total de medições realizadas ou podem depender da amplitude das concentrações de analito medidas, ao passo que as concentrações mais altas podem conduzir a perdas mais rápidas na sensibilidade [17];
- ✓ Histerese - Um biossensor ideal não deverá ser afetado pelas medições anteriores. No entanto, quaisquer alterações que se observem no ambiente de medida poderão interferir nos resultados das leituras subsequentes [17];
- ✓ Resposta dinâmica - As propriedades físicas e o tamanho relativo do biossensor determinam a velocidade com que este responde às alterações de concentração do analito alvo [17].

### 2.2.1.3. Tipos de biossensores

Os biossensores podem ser classificados de acordo com a biocamada e o transdutor utilizado. Em relação à biocamada, os biossensores podem ser organizados em [17]:

*Biossensores enzimáticos:* Tal como o nome indica usam enzimas como elementos bioreceptores, tais como glicose oxidase que é usada para a deteção de glicose no sangue, a álcool oxidase que é usada para a deteção de álcool, entre muitas outras [17];

*Imunobiossensores:* São biossensores que monitoram as interações do par anticorpo-antígeno, nas quais o anticorpo ou o antígeno são imobilizados na superfície. Os imunobiossensores podem ajudar a regeneração do componente imobilizado, maximizando, assim, o uso do reagente, que no caso dos dispositivos convencionais pode ser utilizado apenas uma única vez. A sensibilidade de um imunobiossensor depende da afinidade e da especificidade da ligação e do ruído do sistema transdutor. Entre as amostras para análise as que podem ser investigadas pelos imunobiossensores estão as hormonas, drogas, vírus, bactérias e poluentes ambientais (pesticidas, por exemplo) [17];

*Biossensores celulares:* Estes biossensores utilizam microrganismos, especialmente, para a monitorização ambiental de poluentes. As células são incorporadas à superfície de um eletrodo, sendo o princípio de operação muito semelhante aos biossensores enzimáticos, porém apresentam custo reduzido, maior atividade catalítica e estabilidade [17].

Em relação ao tipo de transdutor que é utilizado subdividem-se em biossensores óticos, calorimétricos, piezoelétricos e eletroquímicos [10] [17]:

*Biossensores eletroquímicos:* O objetivo destes biossensores é gerar um sinal elétrico que esteja de algum modo relacionado com a concentração de analito. Assim, neste tipo de biossensores a capacidade analítica das técnicas eletroquímicas é combinada com a especificidade do processo de reconhecimento biológico. Nestes, o agente bio-específico é imobilizado à superfície de um eletrodo, o qual converte o processo de reconhecimento biológico numa resposta amperimétrica ou potenciométrica quantificável. A seletividade do biossensor é fornecida pela imobilização de um elemento biológico sensível e seletivo (tipicamente uma enzima) [17]. Os biossensores eletroquímicos podem ser de três tipos: amperométrico, condutimétrico ou potenciométrico [10].

*Biossensor amperométrico:* Nestes biossensores mede-se a corrente que passa entre dois eletrodos que são mantidos a um determinado potencial. A corrente varia com a concentração do substrato na amostra e resulta da oxidação ou redução duma espécie (substrato, produto, cofactor, etc.) num eletrodo. Estes biossensores podem ainda basear-se em sistemas diretos ou indiretos. Sistemas diretos envolvem uma reação oxidação-redução (redox) do elemento biológico, implicando a utilização de eletrodos modificados, usualmente um aceitador de eletrões no lugar de um dador de eletrões natural, já os sistemas indiretos exploram os detetores convencionais para medirem o substrato metabólico ou o produto. Podem também implicar o envolvimento de um mediador para a reação eletroquímica. Mediadores são agentes artificiais de transferência de eletrões que participam na reação redox com o componente biológico e auxiliam na transferência de eletrões [17].

*Biossensores condutimétrico:* Estes medem as alterações na condutância entre um par de eletrodos metálicos como consequência da ação do elemento biológico [17].

*Biossensores Potenciométricos:* Baseiam-se na medição da diferença de potencial do eletrodo de trabalho em relação a um eletrodo de referência [17].

*Biossensores óticos:* Estes são biossensores que se baseiam em mudanças nas propriedades óticas das substâncias, com o objetivo de monitorizar a concentração do substrato. Entre as propriedades óticas que podem ser utilizadas estão: luminescência, fluorescência e o índice de refração. Entre as vantagens desses biossensores estão o seu tamanho reduzido, a velocidade de resposta, a facilidade de integração, imunidade a ruído eletromagnético, boa biocompatibilidade e não-necessidade de elementos ativos na biocamada [10];

*Biossensores piezoelétrico:* Estes biossensores são baseados na propriedade da piezoelectricidade que os cristais anisotrópicos (quartzo, por exemplo) possuem. Quando é

aplicada uma tensão alternada a este biossensor, o cristal oscila com uma determinada frequência, sendo tal frequência associada à massa e às constantes elásticas do cristal [10];

**Biossensores Calorimétricos:** Estes biossensores usam o calor gerado por reações catalisadoras de enzimas exotérmicas para medir a concentração do analito. As mudanças de temperatura são geralmente determinadas por termístores de alta sensibilidade [10].

#### 2.2.1.4. *Desenvolvimento de Biossensores*

A etapa de imobilização do material biológico na superfície do sensor é uma das partes mais importantes no desenvolvimento do biossensor, pois proporciona a reutilização das enzimas, aumenta a estabilidade, reduz custos e pode aumentar a atividade enzimática. Estes fatores dependem principalmente da escolha apropriada do suporte e dos reagentes utilizados no processo de imobilização [17].

O objetivo de qualquer metodologia de imobilização é reter a máxima atividade da biomolécula na superfície do transdutor. Contudo, existem três parâmetros que condicionam ou melhoram a imobilização: a cinética da reação, o pH e a temperatura [10].

Os métodos de imobilizações são divididos como representa o esquema da Figura 2.2:

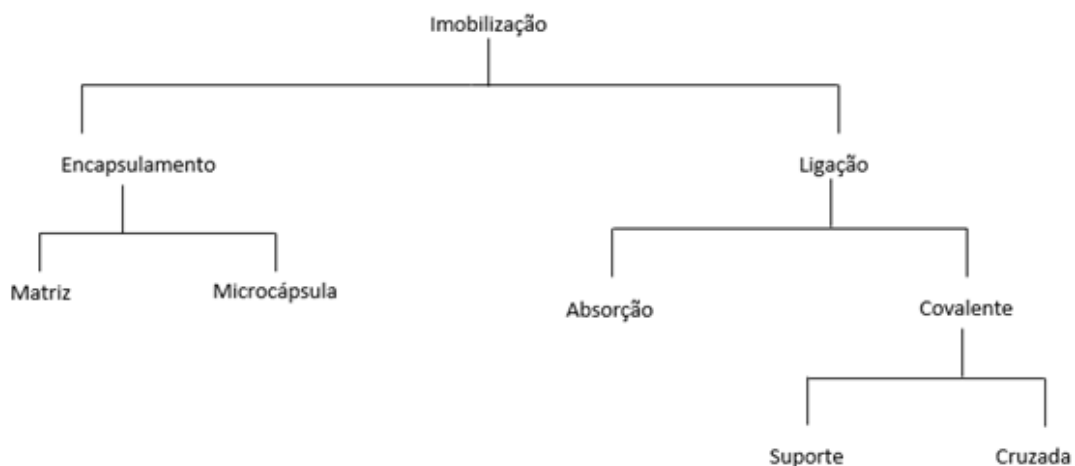


Fig. 2.2- Principais métodos de imobilização de enzimas (adaptado [17]).

Relativamente ao encapsulamento, este consiste em limitar a enzima em um polímero insolúvel ou numa microcápsula. Neste sistema é criada uma membrana seletiva que impede

que as enzimas se difundam através da membrana polimérica, enquanto que moléculas pequenas (substratos e produtos) se difundem facilmente. A vantagem deste método é que a enzima não reage quimicamente com o suporte [17].

A ligação por adsorção é um método simples e muito empregado para imobilização de enzimas. Nesse método, as enzimas são imobilizadas no suporte por meio ligações de baixa energia, tais como interações hidrofóbicas, forças de van der Waals, ligações de hidrogénio e ligações iónicas [17].

Por fim, a ligação covalente envolve a formação de uma ligação covalente entre a enzima/célula e o material do suporte. A reação ocorre entre grupos funcionais terminais da enzima, não essenciais à atividade catalítica, e grupos reativos da superfície [17].

## 2.2.2. Outras técnicas relevantes

### 2.2.2.1. Iontoforese

A iontoforese é uma técnica não invasiva que usa uma diferença de potencial (< 5 V) ou corrente elétrica (0,1 a 1,0 mA/cm<sup>2</sup>) para possibilitar de uma maneira controlada, o aumento da transferência transdérmica de uma variedade de drogas [18] [19]. Assim, a corrente elétrica originada no aparelho é transferida do eletrodo para a pele por meio de uma solução contendo agentes ativos [19]. Este processo é particularmente benéfico quando usado drogas hidrofílicas e também aquelas que possuem alto peso molecular [18].

#### *Perspetiva histórica*

Esta técnica foi inicialmente descrita por Pivati [20] em 1747, porém, só começou a ser usada na administração de drogas no início do século XX, quando Le Duc [20] introduziu o termo iontoterapia e descreveu todo o processo. Este demonstrou que os iões eram transferidos para a pele pela ação de corrente elétrica contínua e comprovou que essa transferência dependia da polaridade do ião e do eletrodo sob o qual era colocado [19].

Em 1967, Harris [20] descreveu as primeiras aplicações da iontoforese na medicina, utilizando a técnica para o transporte das seguintes substâncias: sulfato de cobre para o tratamento do pé de atleta, sulfato de zinco para o tratamento da rinite vasomotora, nitrato de prata para o tratamento de osteoartrite e artrite reumatoide [19].

O principal benefício do uso da iontoforese é a perspectiva do aumento de libertação de drogas ionizáveis quando comparada com a absorção percutânea passiva. Na iontoforese, além da difusão passiva, a penetração da droga é aumentada pelos mecanismos de eletrorepulsão, eletrosmose e aumento da permeabilidade da pele [21].

#### *Princípios básicos*

A corrente elétrica é fornecida por uma fonte de energia ou bateria e distribuída com o auxílio de um eletrodo positivo (ânodo) e um eletrodo negativo (cátodo) através de uma solução eletrolítica que segue para a pele e vai para o sistema circulatório. Quando a corrente é aplicada, os cátions presentes na solução em contato com o ânodo movem-se em direção ao cátodo, enquanto os ânodos presentes no cátodo se movem na direção oposta [22] conforme exposto na Figura 2.3.

Os eletrodos que são convencionalmente utilizados na iontoforese podem ser classificados como inertes (metais como aço inoxidável, platina ou alumínio) ou reversíveis (prata, Ag, e cloreto de prata, AgCl), sendo os últimos mais estudados e utilizados. Os eletrodos inertes provocam a hidrólise da água, produzindo íons hidroxilo e hidrônio, que ao competirem com o fármaco ionizado, é reduzido o número de transporte deste e, desta forma, a sua penetração na pele. Além disso, a eletrólise da água pode alterar o pH da solução dadora, degradar o fármaco ou alterar a sua ionização, afetando assim o controle da libertação. A diminuição do pH pode também causar uma sensação de ardor no local de aplicação do fármaco [22].

Por outro lado, os eletrodos reversíveis de Ag/AgCl são mais funcionais do que os eletrodos inertes devido a sua cinética extremamente rápida e à relativamente alta condutividade do cloreto de prata. Estes não causam variação de pH, pois as trocas eletroquímicas ocorrem numa tensão elétrica inferior à necessária para que haja a eletrólise da água [22].

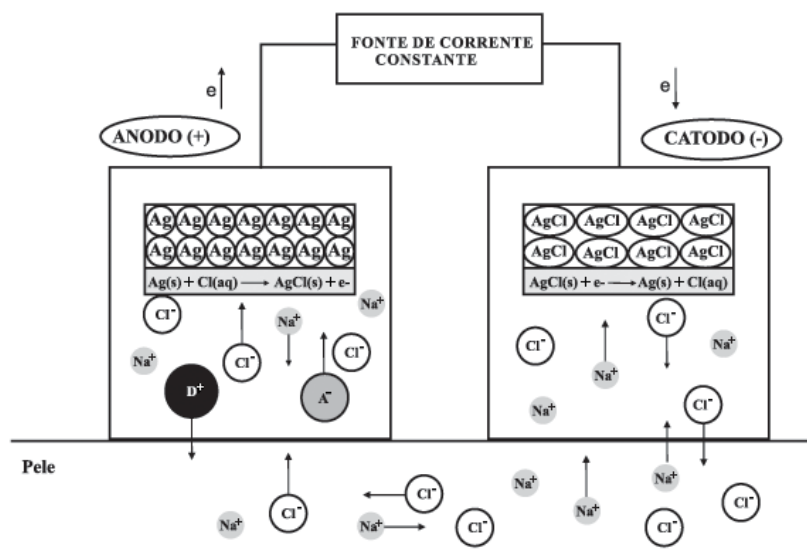


Fig. 2.3- Princípios de funcionamento da iontoforese [23].

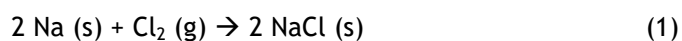
#### 2.2.2.2. Reação de oxidação-redução do etanol

Uma reação oxidação-redução é uma reação onde ocorre a transferência de elétrons entre os átomos. Assim, uma oxidação ocorre quando uma espécie química perde elétrons e uma redução ocorre quando uma substância recebe elétrons. É importante salientar que não ocorre oxidação sem redução e vice-versa, pois o elétron que é cedido pela substância que oxida é recebido pela substância que reduz. A área que estuda estas reações é chamada de eletroquímica [24].

#### Perspetiva histórica

O termo “oxidação” foi usado pela primeira vez por Lavoiser [24], para descrever a reação que ocorre em algumas substâncias, como por exemplo o oxigénio. Antigamente, o termo oxidação significava o ganho de oxigénio e o termo redução significava a perda de oxigénio [24].

Posteriormente, veio a verificar-se que havia reações nas quais o oxigénio não participava como por exemplo a reação do cloreto de sódio exposta na Equação (1) [24]:



Atualmente sabe-se que as reações de oxidação-redução envolvem a transferência de elétrons, como já foi referido [24].

### Princípios básicos

Dependendo do tipo de álcool que reage, a oxidação dos álcoois pode originar aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos, gás carbónico e água [24].

Os álcoois podem sofrer oxidação quando expostos a um agente oxidante, como uma solução aquosa de dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ) ou permanganato de potássio ( $KMnO_4$ ) em meio ácido [24].

Assim sendo, existem assim 3 tipos de produtos da oxidação de álcoois: ácido carbónico, ácidos carboxílicos e cetonas, tal como indicado na Figura 2.4.

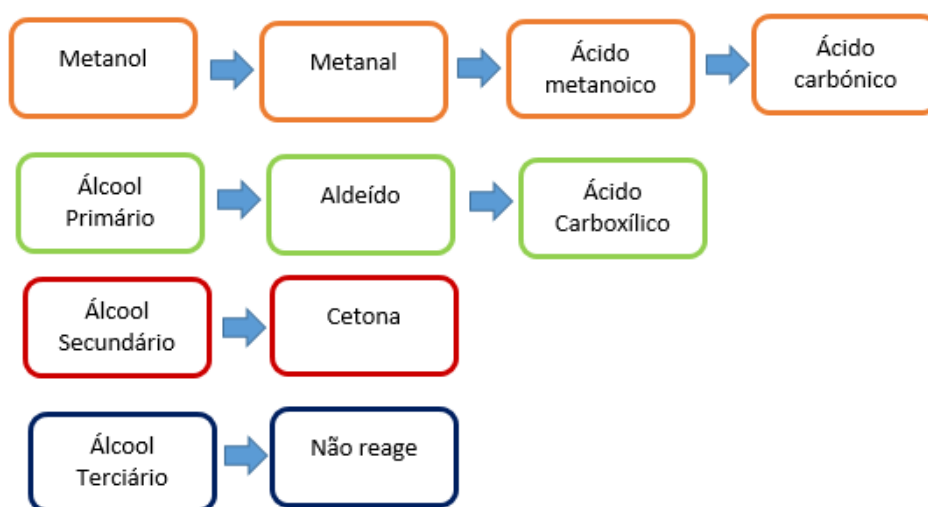


Fig. 2.4- Produtos da oxidação de álcoois (adaptado [25]).

## 2.3. Equipamentos de deteção de álcool no sangue

Como foi descrito no capítulo anterior, conduzir alcoolizado é muito perigoso, colocando em risco, não só a própria vida como a de todos os outros utentes da via pública. Na atualidade já existem alguns dispositivos que ajudam a monitorizar o álcool no sangue para impedir ou informar o condutor quando está a conduzir alcoolizado. Deste modo, segue-se agora a

descrição de alguns dispositivos que têm a finalidade de monitorizar a alcoolémia através do suor.

Um dispositivo desenvolvido para a deteção do conteúdo de álcool em corpos humano é caracterizado pela determinação da concentração de álcool no sangue do corpo humano através da deteção do suor evaporado nos dedos. O suor evaporado nos dedos é amostrado e analisado automaticamente pelo dispositivo para determinação da concentração de álcool no sangue [26].

Este dispositivo (ver Figura 2.5) contém uma tela de dígitos no lado direito do invólucro, um interruptor de controlo, uma janela de recolha de vapor de suor que é disposta sobre a face lateral do invólucro, um sensor de álcool, uma fonte de corrente contínua estável, um sistema de regulação e de conversão analógico-digital (A/D) e um microprocessador, montados no corpo do invólucro. Este é capaz de detetar com precisão e convenientemente a concentração de álcool em corpos humanos, sendo simples, prático e preciso. Pode ainda ser aplicável na segurança pública, e departamentos judiciais [26].



Fig. 2.5- Dispositivo desenvolvido para a deteção do conteúdo de álcool em corpos humano através do suor secretado pelos dedos da mão [26].

Um dispositivo de deteção de estado de embriaguez capaz de detetar a concentração de álcool contido no suor de um indivíduo a um nível viável e num curto espaço de tempo foi desenvolvido por Osamu [27]. A transpiração na palma da mão do condutor em contacto com o volante é promovida por um sistema de geração de calor. Deste modo, a concentração de álcool contida no suor é detetada a um nível praticável num curto período de tempo por um sensor de álcool instalado no volante [27] (ver Figura 2.6).



Fig. 2.6- Dispositivo de detecção de estado de embriaguez capaz de detetar a concentração de álcool contido no suor através da palma da mão do condutor em contacto com um sensor localizado o volante da viatura [27].

Jun & Hideo [28] desenvolveram um dispositivo preventivo, capaz de detetar álcool no condutor de um veículo, e prevenir a condução sob a influência de álcool ou condução em estado de embriaguez. É constituído por um interruptor de arranque do motor do veículo que é fornecido com uma fonte de luz infravermelha com um comprimento de onda que é absorvido pela hemoglobina reduzida do sangue, e por elemento de captação de imagem que recebe o feixe infravermelho e capta uma imagem correspondente a uma autenticação individual por um padrão dos vasos sanguíneos. O interruptor de arranque é fornecido como um sensor para detetar o álcool (ver Figura 2.7). O feixe infravermelho é irradiado aos dedos do condutor, de modo a que a transpiração seja promovida, e para que o álcool presente no suor vaporizado possa ser detetado. A autenticação individual e a deteção de álcool são realizadas simultaneamente aos dedos do condutor ao acionar o interruptor de arranque, e o motor do veículo só é iniciado quando a autenticação do indivíduo for bem-sucedida e álcool não seja detetado [28].



Fig. 2.7 - Dispositivo capaz de detetar álcool no condutor de um veículo, através de um sensor colocado no interruptor de arranque do motor do veículo [28].

Cheng [29] desenvolveu um dispositivo para detecção de álcool através do suor em automóveis. Este é caracterizado por um sensor e um microprocessador. O sensor é utilizado para a aquisição do suor secretado das mãos do condutor. O microprocessador é ligado ao circuito de ignição do motor e a um circuito de iluminação. O sensor é conectado ao microprocessador via amplificador para condicionamento do sinal antes da conversão A/D. O sensor é montado no volante (ver Figura 2.8), e o microprocessador, o transformador e o amplificador são integrados num invólucro a instalar na tampa do motor do veículo [29].

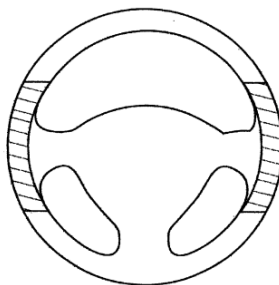


Fig. 2.8- Dispositivo para detecção de álcool através do suor secretado das mãos do condutor e detectado por um sensor localizado no volante do viatura ( parte a tracejado) [29].

Huijun [30] desenvolveu um dispositivo de detecção de álcool agregado ao automóvel. O sistema é constituído por um sistema de controlo conectado ao automóvel, um dispositivo de detecção de álcool, um sistema de ignição, um sistema de reconhecimento facial e um sistema de alerta por voz. O dispositivo para a detecção de álcool, o sistema de ignição, o sistema de reconhecimento facial e o sistema de alerta por voz estão conectados ao sistema de controlo. O sistema de controlo do corpo é ainda conectado a um botão de on-off. O botão on-off está localizado na ranhura da chave de ignição do automóvel [30].

O sistema de controlo de condução em estado de embriaguez realiza simultaneamente a detecção de álcool e o reconhecimento facial do condutor. Após a ignição da viatura e sua condução, o sistema de reconhecimento facial reconhece novamente as características faciais do condutor para garantir que o condutor atual é o mesmo que foi sujeito à detecção de álcool [30].

Shuichi [31] desenvolveu um dispositivo para medir a embriaguez ao volante de condutores de veículos como automóveis, autocarros, metros, comboios, navios e aviões e vários tipos de máquinas motorizadas. Este dispositivo está equipado com um elemento sensor cujas características físicas são alteradas na presença de álcool e com um dispositivo de medição da concentração de álcool no sangue de um indivíduo. O elemento sensor encontra-se localizado na parte de operação de condução, mais precisamente pelo toque das mãos do

utilizador no volante do veículo (ver Figura 2.9). Uma vez que a concentração de álcool no ar expirado não é medida, mas a concentração de álcool no sangue contido no suor do motorista, mesmo que um passageiro possua algum nível de embriaguez, o resultado da medição não é erróneo [31].

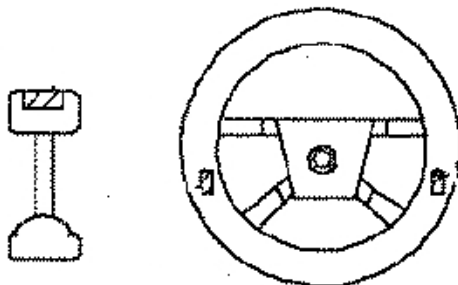


Fig. 2.9- Dispositivo para medir a embriaguez através do suor secretado pelas mãos do condutor e detectado com um sensor que se encontra no volante e na caixa de velocidades da viatura [31].

Por último, Tongtong *et al.* [32] desenvolveram um dispositivo para prevenir que um indivíduo embriagado conduza uma bicicleta.

A bicicleta está hoje em dia cada vez mais inserida na sociedade como um meio de transporte saudável, económico, não poluente do meio ambiente. Conduzir uma bicicleta embriagado não se torna menos relevante por se tratar de uma bicicleta, muito pelo contrário, muitas vezes quando se anda de bicicleta nem sempre se usa equipamento de proteção, o que à visão de um possível acidente potencia a probabilidade de ocorrerem ferimentos [32].

Assim, este dispositivo é caracterizado por um módulo de energia usado para fornecer energia ao dispositivo para assegurar o seu funcionamento normal; um módulo de deteção de álcool que está localizado no guiador de modo a detetar a concentração de álcool no suor na palma da mão do condutor; um módulo de conversão A/D que está conectado ao módulo de deteção de álcool. Um módulo de controlo que está conectado ao módulo de conversão A/D, ao módulo de alarme por voz e ao módulo de controlo de velocidade, pode receber, analisar e comparar os sinais do módulo de conversão A/D, e pode fornecer comandos aos módulos de alarme por voz e de controlo de velocidade [32].

## **2.4. Nota conclusiva**

Os estudos dos biossensores são ainda muito recentes, com menos de 50 anos, contudo atualmente já existe um leque muito variado, para diferentes aplicações. Estes podem ser divididos quanto ao tipo de biocamada e de transdutor. Assim, para o dispositivo em estudo o biossensor que irá ser estudado é eletroquímico quanto à sua biocamada, e amperométrico quanto ao tipo de transdutor.

A iontoforese é uma técnica já bem sedimentada, porém a sua aplicação é mais recente. No presente trabalho pretende-se usar esta técnica para provocar a sudação no local da medição, para que posteriormente a medição da quantidade de álcool que existe no suor seja baseada nas reações oxidação redução dos álcoois.

Por fim, na revisão que foi abordada aos dispositivos patenteados com o mesmo objetivo, é bastante notório que já existem alguns dispositivos desenvolvidos, porém é de salientar que nenhum deles é portátil. Assim, uma das principais inovações do dispositivo em estudo é torná-lo portátil e pessoal para que a pessoa que está a usá-lo saiba em qualquer lugar e em qualquer instante qual o seu nível de alcoolémia.

## 3. Biossensor

### 3.1. Introdução

Neste capítulo será abordado todo o procedimento do desenvolvimento do Biossensor. Este inicia-se com a descrição da preparação do eléctrodo de referência, passando depois para a preparação do eléctrodo de trabalho e por último são descritos todos os testes necessários à validação do biossensor.

A eletroquímica envolve fenómenos químicos associados à separação das cargas. Muitas vezes, esta separação das cargas leva à transferência de carga que pode correr homogeneamente em solução, ou heterogeneamente na superfície do eléctrodo. Na realidade, a eletroquímica estuda desde as reações que produzem corrente eléctrica através de reações chamadas de oxidação e redução (abordadas no capítulo anterior), até às reações que ocorrem por intermédio do fornecimento de corrente eléctrica, conhecidas como electrólise, isto é, lida com uso de reações químicas espontâneas para produzir electricidade, e com o uso da electricidade para fazer com que reações químicas não-espontâneas aconteçam [33].

Como já foi referido no capítulo anterior, o biossensor desenvolvido no presente trabalho é eletroquímico, assim é necessário a preparação de uma célula eletroquímica. Para tal são necessários 3 eléctrodos [33].

Existe uma grande variedade de eléctrodos consoante a sua utilização, sendo que os principais são o eléctrodo de referência, o eléctrodo de trabalho e o eléctrodo auxiliar [33].

O eléctrodo de referência, como o seu nome sugere, é usado para dar um valor de potencial ao qual outros potenciais podem ser referidos em termos duma diferença de potencial - os potenciais só podem ser registados como diferenças relativamente a um valor de referência escolhido. Assim, um bom eléctrodo de referência necessita de ter um potencial que seja estável com o tempo e com a temperatura e que não seja alterado por pequenas perturbações do sistema, ou seja, por uma pequena passagem de corrente. Um exemplo é o eléctrodo de cloreto de prata (AgCl) [33] [34].

O eléctrodo de trabalho é o eléctrodo que controla o potencial e em que se mede a intensidade da corrente eléctrica. Este em geral é de um material inerte, estável nos potenciais de trabalho, como o ouro, platina, ou carbono vítreo [33] [34].

O eléctrodo auxiliar ou também conhecido como o contra-eléctrodo que fecha o circuito na célula. Este é um condutor inerte como platina ou grafite, com superfície consideravelmente

superior ao eletrodo trabalho, de forma a permitir uma transferência de elétrons com uma sobretensão mínima [33] [34].

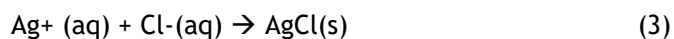
## 3.2. Preparação dos eletrodos

### 3.2.1. Eletrodo de referência

No caso em estudo, escolheu-se como eletrodo de referência, um eletrodo de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl).

Para a preparação do mesmo, um fio de prata foi limpo com sulfato de nitrato a 20% e enrolado em forma de espiral. Posteriormente foi preparada uma solução de Cloreto de Potássio (KCl) de 0,1 M num volume de 250 ml, o eletrólito. O eletrólito é toda a substância que, dissociada ou ionizada, origina íons positivos (cátodos) e íons negativos (ânodos), pela adição de um solvente ou aquecimento [33].

Em seguida, o fio de prata foi imerso no eletrólito juntamente com o eletrodo auxiliar (platina). Desta forma deposita-se sobre o fio de prata uma camada de cloreto de prata, (AgCl), por via eletroquímica, onde o fio de prata atua como ânodo. Para tal foi fornecida uma corrente positiva à reação para que o eletrodo de prata se oxidasse. Para que uma oxidação ocorra, existe uma energia máxima que o nível desocupado no eletrodo pode ter de forma a receber elétrons de espécies em solução, a qual corresponde a um potencial suficientemente positivo (em Volt) [33]. As reações que ocorrem são:



Assim, usou-se um medidor de pH e aplicou-se entre os eletrodos uma tensão de 400 mV, valor ideal para que a camada de cloreto ficasse bem depositada na prata, e esperou-se que a corrente aplicada baixasse para zero (garantia de que o eletrodo de cloreto de prata estava preparado corretamente) [33].

O esquema da Figura 3.1 mostra como foi montado o sistema (o eletrodo de trabalho era o que viria no final a ser o eletrodo de referência):



multicamadas, como no caso da tionina. Por outro lado, a aplicação dum potencial elétrico, nas condições corretas e na presença duma molécula suscetível de polimerizar, pode produzir radicais, iniciando a polimerização e a subsequente modificação do eléctrodo. Exemplos destes monómeros de polímeros condutores são: pirrol, N-fenilpirrol e N-metilpirrol, anilina e tiofeno [33].

A caracterização de eléctrodos modificados pode ser efetuada por métodos eletroquímicos, espectroscópicos e microscópicos.

#### **3.2.2.1. Síntese do pirrol**

No presente trabalho a superfície do eléctrodo de platina foi modificada com polipirrol por Eletroadsorção para que posteriormente pudesse ocorrer a fixação das enzimas.

O polipirrole (PPy) é um dos polímeros condutores (classe de “metais sintéticos” que combinam as propriedades químicas e mecânicas dos polímeros com as propriedades eletrónicas de metais e semicondutor) mais estudados atualmente. Para que este se depositasse na superfície do eléctrodo, foi necessário primeiramente a preparação de uma solução de DBSS (Dodecil Bezeno Sulfonato de Sódio) a 0,1 M num volume de 25 ml. Esta solução é um detergente com uma cadeia de 12 carbonos que para além de ajudar a estabilizar o polímero, compensa a carga do pirrol oxidado (contra-íão). A solução de DBSS foi preparada com uma solução tampão de fosfato de 0,1 M para 1000 ml e com um pH neutro (pH=7), preparada previamente [35].

O eléctrodo de trabalho foi imerso em 25 ml de solução (eletrólito de DBSS) juntamente com o eléctrodo auxiliar e o eléctrodo de referência já anteriormente preparado. O esquema da Figura 3.2 representa a montagem feita para a preparação do eléctrodo de trabalho.

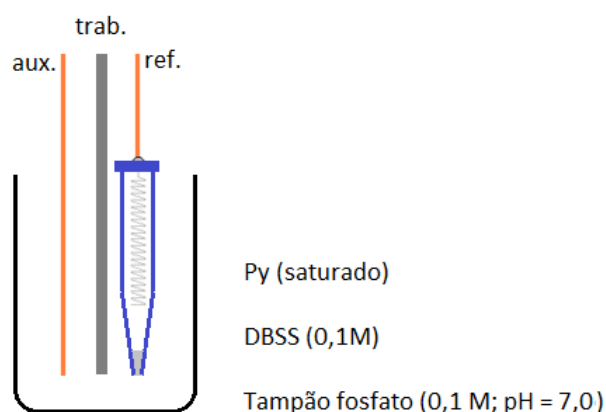


Fig. 3.2- Esquema de montagem para a preparação do eletrodo de trabalho (eletrolito - DBSS).

A técnica eletroquímica de voltametria de varrimento linear foi utilizada para determinar a corrente elétrica que surge no eletrodo de trabalho pela aplicação de uma diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar. Na voltametria de varrimento linear, a diferença de potencial (parâmetro ajustado) é aplicada ao eletrodo de trabalho, com variação linear com o tempo. Neste estudo, com valor de diferença de potencial de 1800 mV [33], é determinada uma corrente de 200  $\mu\text{A}$  no eletrodo, como pode ser observado no gráfico da Figura 3.3.

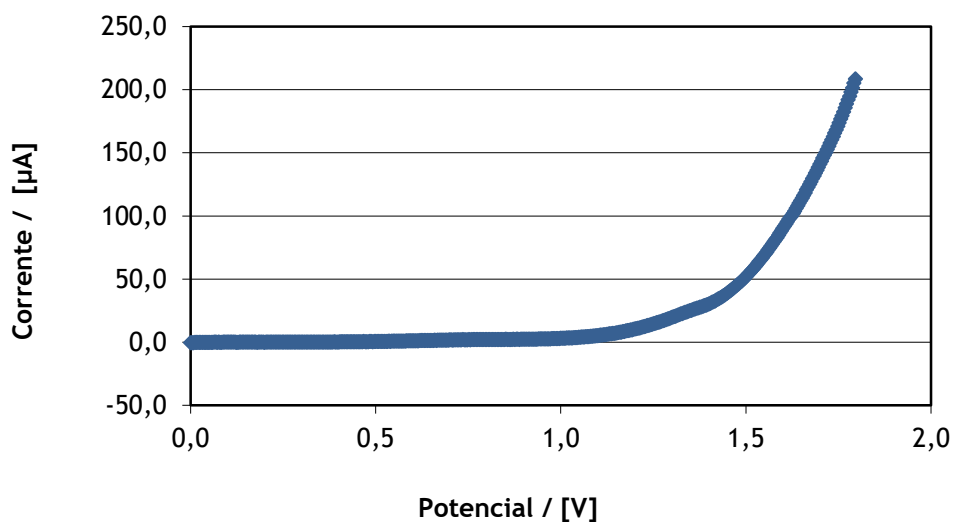


Fig. 3.3- Gráfico da Voltametria de varrimento linear do Eletrodo de Platina em 25 ml de solução DBSS a 0,1 M.

Em seguida, adiciona-se mais 200  $\mu\text{l}$  de pirrole à solução de DBSS e aplica-se novamente a técnica de voltametria de varrimento linear com o mesmo potencial. Neste caso, a passagem de corrente elétrica ocorre quando esta atinge um potencial de 800 mV, o que corresponde a uma corrente de aproximadamente 0,4  $\mu\text{A}$ . O gráfico da Figura 3.4 mostra o gráfico da voltametria linear com a adição de pirrole.

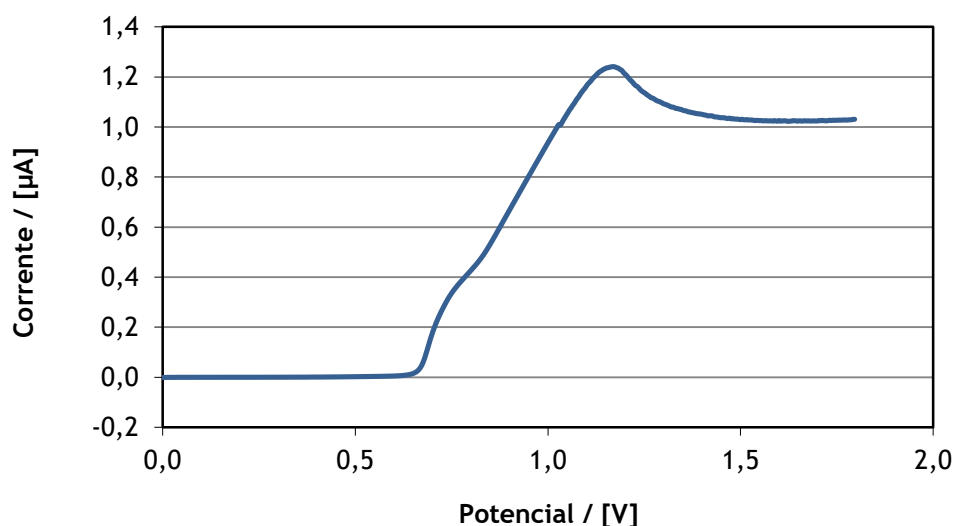


Fig. 3.4- Gráfico da voltametria de varrimento linear com o eletrodo de platina em 25 ml solução de DBSS 0,1 M com a adição de 200  $\mu\text{l}$  de pirrole.

Sucessivamente avançou-se para a polimerização do pirrol, isto é, cobertura da superfície do eletrodo com pirrole [35]. Este procedimento está representado no gráfico da Figura 3.5 e foi feito usando a técnica da cronocoulometria até que o eletrodo ficasse coberto de pirrole correspondente a uma transferência de carga de 300 mC, com uma diferença de potencial de 800 mV para um eletrólito de DBSS num volume de 25 ml com uma concentração de 0,1 M, mais 200  $\mu\text{l}$  de pirrole. A carga transferida no processo é diretamente proporcional à massa de pirrol depositada sobre a superfície do eletrodo [33].

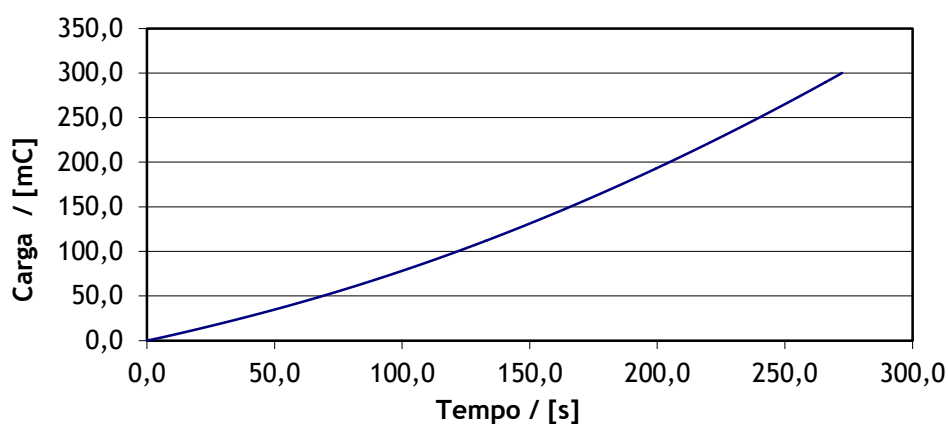


Fig. 3.5- Gráfico da Cronocoulometria da síntese do pirrole a 300 mC.

Posteriormente foi necessário passar aos testes de verificação da correta síntese do pirrole. Para tal, a célula foi mantida tal como estava e apenas foi trocado o eletrólito de DBSS mais pirrole por uma solução tampão de fosfato de 0,1 M, e sendo utilizada novamente a técnica de voltametria de varrimento linear. Com a mesma técnica eletroquímica, testou-se o eletrodo de polipirrole comparando-o com o eletrodo de platina. O gráfico da Figura 3.6 apresenta a sobreposição das curvas de ambas as voltametrias de varrimento linear. Como pode ser observado são bem diferentes o que significa que o pirrole polimerizou corretamente na superfície do eletrodo de platina.

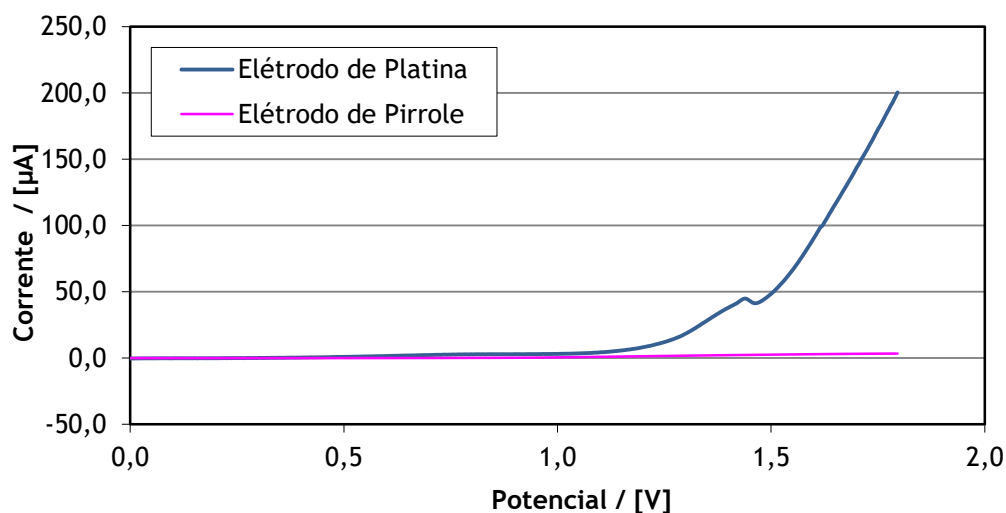


Fig.3.6-Gráfico da Voltametria linear com o eletrodo de pirrole e do eletrodo de Platina em tampão fosfato 0,1 M.

Para além das técnicas eletroquímicas enunciadas anteriormente, também foram obtidos registos fotográficos do eléctrodo de platina e do eléctrodo com o pirrole. Verifica-se facilmente a existência de uma macha preta no eléctrodo de pirrole. Esta comparação entre a superfície do eléctrodo está representada na Figura 3.7, onde a imagem da esquerda representa o eléctrodo de platina e a da direita o eléctrodo com o pirrole (superfície do eléctrodo preta).

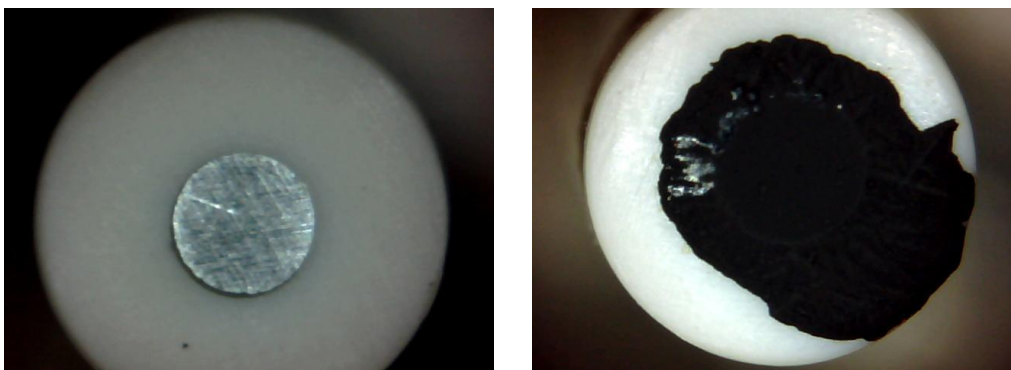


Fig. 3.7- Diferença entre as superfícies dos eléctrodos (esquerda -eléctrodo de platina; direita-eléctrodo de pirrole).

A carga utilizada na deposição de polipirrole foi nitidamente excessiva pelo que se reduziu este valor na síntese de novos eléctrodos para metade do tempo.

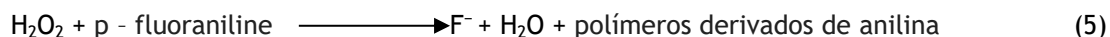
### 3.2.2.2. *Imobilização das enzimas*

Para que o eléctrodo detetasse o etanol foi necessário fixar-lhe enzimas. As enzimas utilizadas foram a peroxidase e a álcool-oxidase.

*Álcool-oxidase (AOX):* A enzima álcool-oxidase oxida álcoois de baixo peso molar utilizando como recetor de electrões o oxigénio molecular. A equação 4 representa a oxidação do etanol por esta enzima, tendo como produtos da reacção o peróxido de hidrogénio [36].



*Peroxidase (HRP):* A *peroxidase* é uma enzima que oxida substratos orgânicos, tendo o peróxido de hidrogénio como molécula aceitadora de electrões (ver equação 5) [36].



A técnica usada para a imobilização enzimática na superfície do eléctrodo foi a ligação cruzada, descrita no capítulo 2.

De modo a preparar a enzima peroxidase, foram adicionados 100  $\mu\text{l}$  de solução tampão fosfato de 0,1 M diretamente no frasco da enzima peroxidase. O eléctrodo de trabalho com o pirrole foi colocado dentro do frasco a repousar a temperaturas entre 2°C a 8°C durante 1 hora.

Posteriormente procederam-se a alguns testes de verificação da correta imobilização da enzima peroxidase. Para tal, preparou-se uma solução de peróxido de 0,1 M para um volume de 1000 ml e usando a técnica eletroquímica cronoamperometria testou-se o eléctrodo de trabalho com a enzima peroxidase. A cronoamperometria é uma técnica eletroquímica com a qual é medida, como uma função tempo, a corrente eléctrica que flui através de um eléctrodo [33]. Assim, a célula eletroquímica foi montada com os 3 eléctrodos e com o eletrólito de solução tampão mais KCl (cloreto de potássio) e depois da estabilização num período de aproximadamente 3 minutos, foram adicionados 50  $\mu\text{l}$  da solução de peróxido de 50 em 50 segundos. O resultado da aplicação da cronoamperometria está representado no gráfico da Figura 3.8. Neste gráfico é possível verificar que à medida que a solução de peróxido era adicionada, com intervalos de 1 minuto, existia uma diminuição da corrente eléctrica entre 5  $\mu\text{A}$  a 10  $\mu\text{A}$ . Isto ocorre devido à oxidação do substrato por parte da enzima peroxidase.

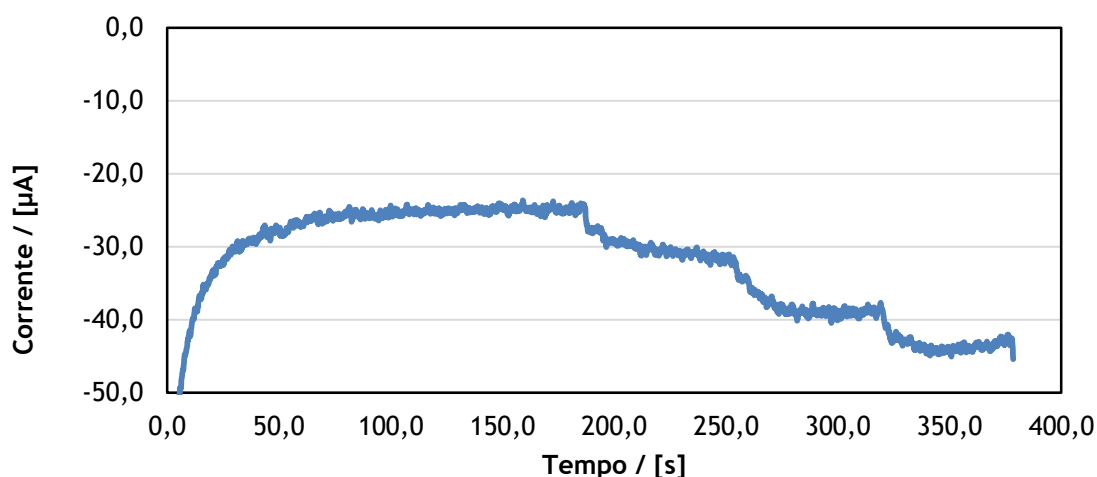


Fig. 3.8- Cronoamperometria com adição de 50 µl de peróxido concentrado de 0,1 M em 1000 ml.

Uma vez verificado que a enzima peroxidase estava bem imobilizada e estava a detetar bem o peróxido, passou-se à imobilização, por ligação cruzada, da enzima álcool oxidase. Para tal foi necessário preparar 4 soluções, uma solução de albumina do soro de porco (PSA) com 0,1 g e solução tampão fosfato até perfazer 1 g, uma solução de Glutaraldeído de 0,25 g e solução tampão fosfato até perfazer 10 g, uma solução de Ferroceno com uma concentração de 2 µg/µl e solução tampão fosfato até perfazer um volume de 25 ml. Estas 3 soluções foram mantidas a uma temperatura de 2°C a 8°C para uma melhor conservação das mesmas. Por último foi ainda preparada a solução de álcool oxidase (AOX) com 45 mg de AOX, 0,1 g de PSA e solução tampão até perfazer 1 g. Esta solução foi mantida a -20°C para melhor conservação da mesma.

O Glutaraldeído funciona como a argamassa que une os diferentes componentes de uma imobilização enzimática. Este composto tem dois pontos de ligação e reage facilmente com os grupos amina das proteínas, como é o caso das enzimas e da PSA [37].

No caso da enzima peroxidase, esta foi usada como mediador redox, isto é, ajuda a enzima álcool oxidase no processo de oxidação/redução [38].

Por fim, são retirados 5 µl de cada solução, misturados e pipetados sobre a superfície do eletrodo e deixados durante 2 horas a secar a uma temperatura entre 2°C e 8°C.

Para testar o eletrodo de trabalho finalizado com a enzima álcool oxidase, usa-se a técnica eletroquímica de cronoamperometria e monta-se a célula com os 3 eletrodos utilizando-se a solução tampão fosfato de 0,1 M como eletrólito. Aos 900 segundos é adicionado 500 µl de

etanol puro, tendo-se observado um pequeno incremento de corrente elétrica que pode ser analisado no gráfico da Figura 3.9.

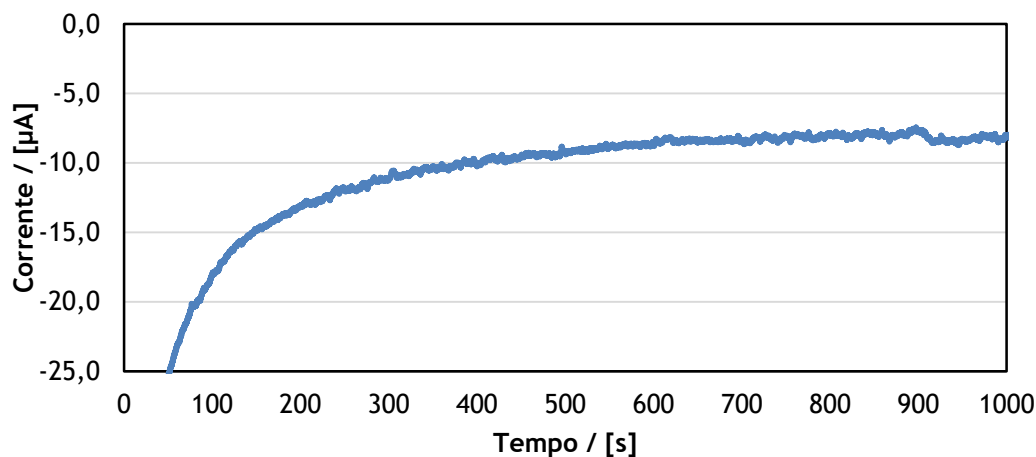
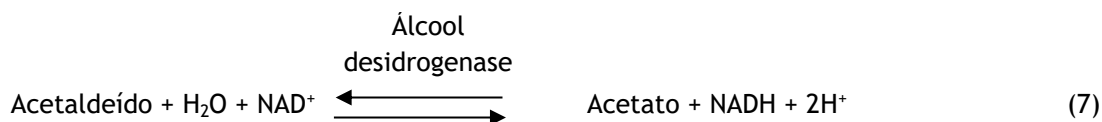
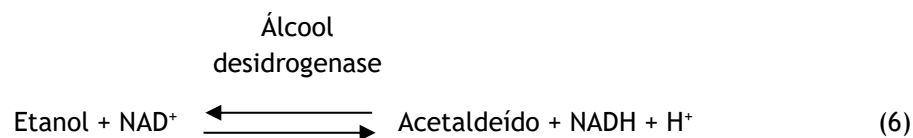


Fig. 3.9- Gráfico da cronoamperometria com adição de 500 µL de etanol puro aos 900 segundos.

Como os resultados com a enzima álcool oxidase não foram os esperados, passou-se de seguida ao uso de outra enzima, a álcool desidrogenase, tendo como co-enzima a NADH (Dinucleótido de nicotinamida e adenina).

*Álcool-desidrogenase (ADH):* A enzima álcool-desidrogenase oxida álcoois de baixo peso molecular originando acetaldeído. As equações 6 e 7 representam as equações químicas baseadas na conversão enzimática do etanol a acetaldeído, através de reação de óxido-redução, tendo o NAD<sup>+</sup> como recetor de eletrões.



Como já foi referido, a técnica usada para a imobilização enzimática na superfície do eléctrodo foi a ligação covalente cruzada. Assim, foi necessária a preparação de algumas soluções.

A enzima álcool-desidrogenase foi diluída na sua totalidade em solução tampão (0,1 M e pH=7) num balão volumétrico de 25 ml. De seguida foi preparada uma solução de NADH com uma concentração de 0,0015 M num volume de 25 ml. Ambas as soluções foram colocadas a uma temperatura -20°C para conservação das mesmas. Para a correta imobilização da enzima foi necessário ainda a preparação de uma solução de PSA (Albumina do soro de porco), com 0,1 g de PSA e solução tampão até perfazer 1 g. Por último foi ainda preparada uma solução de Glutaraldeído (GA), com 0,25 g e solução tampão até perfazer 10 g.

Depois de todas as soluções devidamente preparadas, foi misturado 5 µL de cada. De seguida o eléctrodo de trabalho com o pirrole foi colocado dentro da mistura a repousar a temperaturas entre 2°C a 8°C durante 1 hora. Passado este tempo, o eléctrodo foi colocado a secar à mesma temperatura durante 2 horas.

Posteriormente procederam-se novamente a alguns testes de verificação da correta imobilização da enzima álcool-desidrogenase. Assim, a célula eletroquímica foi montada com os 3 eléctrodos e com 15 ml de eletrólito de solução tampão mais KCl (cloreto de potássio). Recorreu-se previamente à técnica de voltametria para ver qual o potencial eléctrico a que a enzima oxidava. Na Figura 3.10 pode-se verificar que o potencial a que a enzima oxida menos é aproximadamente 600 mV.

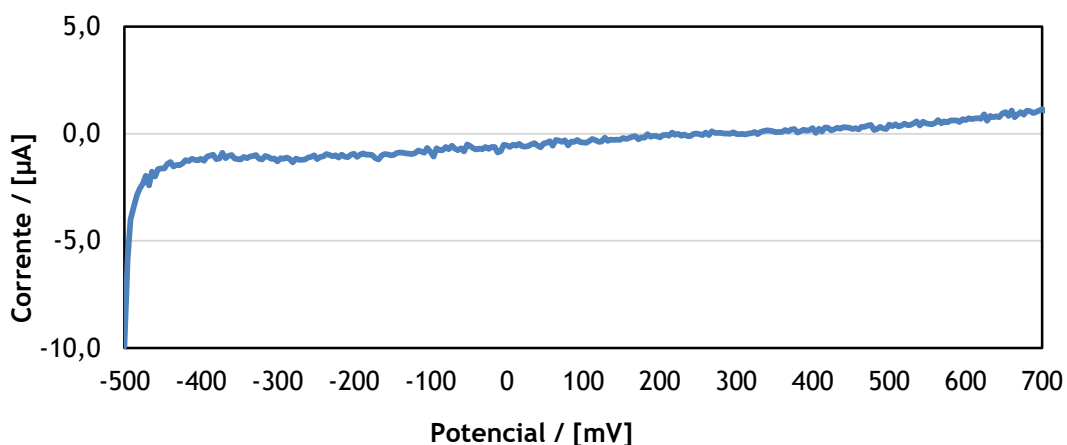


Fig. 3.10- Voltametria linear do eléctrodo de trabalho com enzima em 15 ml de solução tampão fosfato de 0,1 M e pH=7.

Posteriormente recorreu-se novamente à técnica de cronoamperometria, em que se aplicou o potencial de 600 mV e depois da estabilização num período de aproximadamente 3 min, foram adicionados 100 µl de etanol a 95%. O resultado está representado no gráfico da Figura 3.11, onde é possível verificar que quando é adicionado o etanol, existe uma diminuição de

aproximadamente  $4 \mu\text{A}$  da corrente elétrica. Isto ocorre devido à oxidação do substrato por parte da enzima.

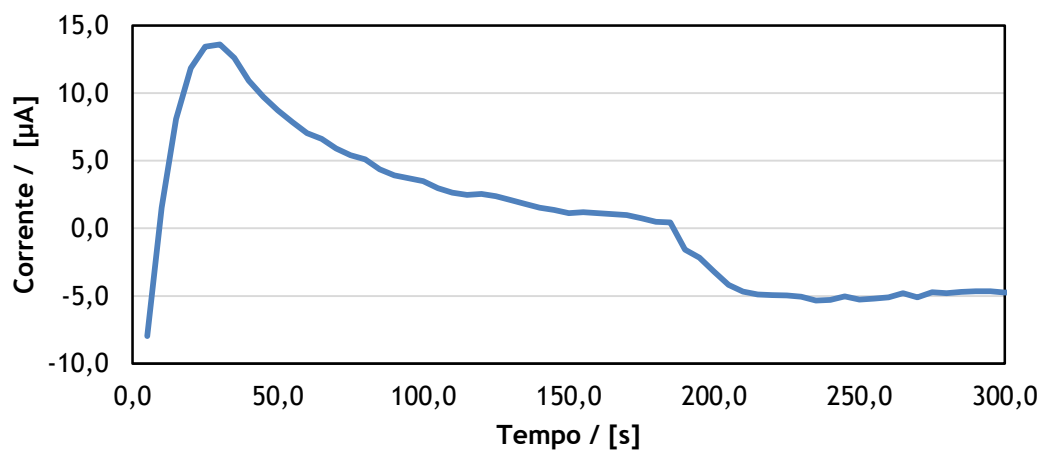


Fig. 3.11- Cronoamperometria com adição de  $100 \mu\text{l}$  de etanol a 95% numa solução tampão fosfato de  $0,1 \text{ M}$  e  $\text{pH}=7$  de  $15 \text{ ml}$ .

Para que se verificasse que era a enzima que estava a oxidar o etanol e não o etanol a oxidar sozinho devido ao elevado potencial a que foi sujeito, repetiu-se a mesma técnica eletroquímica com o mesmo potencial e com a mesma adição de etanol, mas com um eletrodo de trabalho sem enzima fixada na sua superfície. Na Figura 3.12 verifica-se a corrente elétrica não diminui quando são adicionados os  $100 \mu\text{l}$  etanol a 95%, o que significa que é a enzima que oxida o etanol, quando sujeito a um potencial de  $600 \text{ mV}$ .

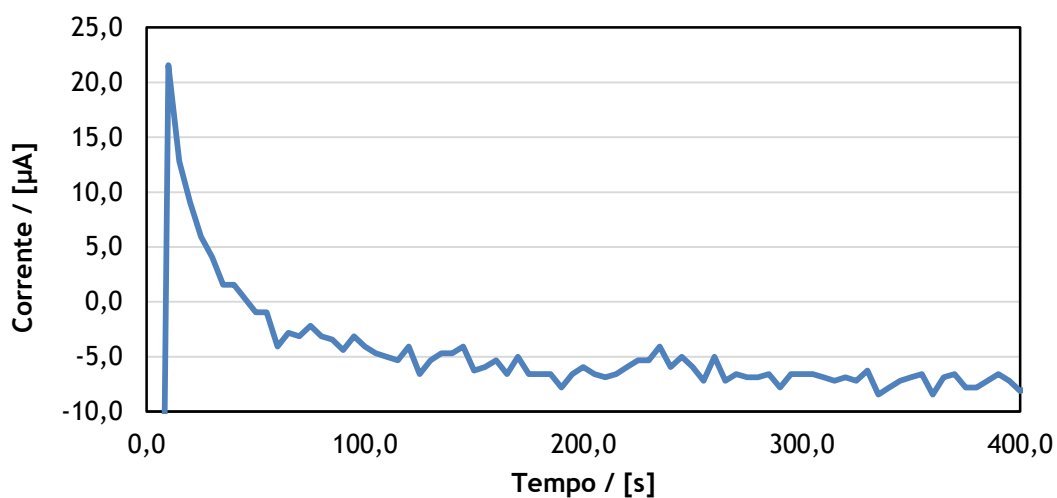


Fig. 3.12- Cronoamperometria do eletrodo de trabalho sem enzima, numa solução de tampão fosfato de 0,1 M e pH=7 e adição de 100 µl de etanol a 95%.

Em seguida, para que fosse possível recolher e analisar a amostra de suor sobre a pele, foi necessário repetir todo procedimento na preparação do eletrodo impresso. Contudo não foi necessário cobrir o eletrodo impresso com pirrole, pois a superfície deste é de grafite, o que faz com que não oxide a água tão facilmente (tal como acontecia com o eletrodo de pirrole) como a platina. A Figura 3.13 representa o eletrodo impresso, onde se encontram os 3 eletrodos num só. O eletrodo impresso tem 40 mm de comprimento e 10 mm de largura.



Fig. 3.13- Eletrodo impresso. Na parte circular (eletrodo de trabalho) é onde é depositava a enzima.

Depois de repetido todo o processo para a fixação da enzima na superfície do eletrodo de trabalho, recorreu-se novamente à técnica eletroquímica de cronoamperometria, com o mesmo potencial de 600 mV e com a mesma solução tampão fosfato. Foi necessário deixar passar o mesmo tempo para a estabilização do eletrodo e depois adicionou-se 100  $\mu$ l de etanol a 95%. Na Figura 3.14. está representado o gráfico da cronoamperometria com o eletrodo impresso. Nesta Figura é possível observar que quando é adicionado o etanol, a diminuição da corrente elétrica é o dobro (8  $\mu$ A) em comparação ao gráfico da Figura 3.11. Esta situação ocorre porque a área do eletrodo de trabalho no eletrodo impresso é o dobro da área do outro eletrodo.

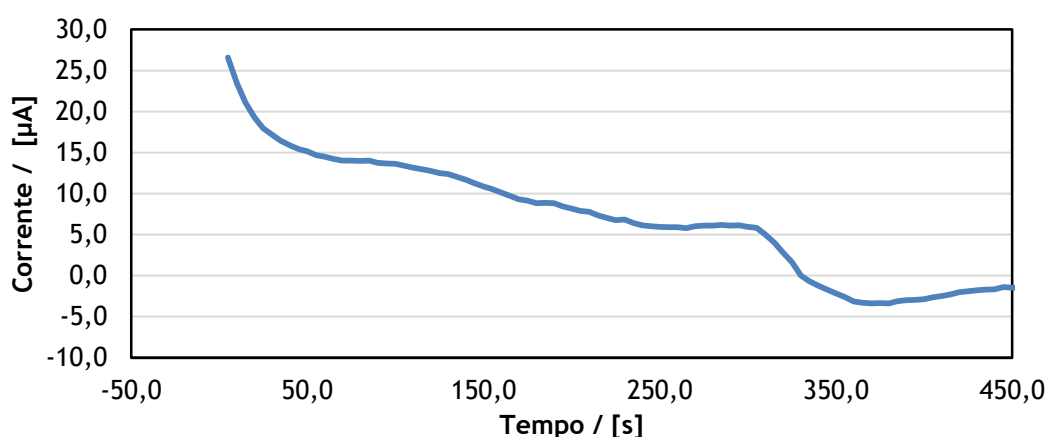


Fig. 3.14- Cronoamperometria com o eletrodo impresso, 15 ml de solução tampão fosfato a 0,1 M e pH=7 e adição de 100  $\mu$ l de etanol a 95%.

Um sinal com uma amplitude de 8  $\mu$ A é muito pequeno, o que irá dificultar todo o processo de aquisição e processamento do sinal. Contudo, como é possível ver nos gráficos das figuras acima, é um sinal com pouco ruído o que facilita por sua vez a sua aquisição.

### 3.3. Retas de calibração

Recorrendo à análise do gráfico da Figura 3.14 foi possível observar que quando se adicionava 100  $\mu$ l de etanol a 95%, correspondia que num volume de 15,1 ml tinha uma concentração de 4,96 g/l de etanol.

Considerando que uma garrafa de vinho de 1 litro (8 bicas) com 13% de volume de etanol corresponde a 130 ml de etanol num litro, e sabendo que um ser humano tem

aproximadamente 5 litros de sangue, ao ser ingerido o litro de vinho iremos obter uma concentração de 20,6 g/l de sangue. Contudo, o álcool é digerido e só 13% é absorvido pelo sangue sendo os restantes 87% filtrados pelo fígado. Assim, a concentração final existente no sangue é de 2,68 g/l. Fazendo corresponder os valores para um copo de vinho de 50 ml, em que conclui que a concentração final por copo de vinho é de 0,134 g/l.

De seguida foi necessário fazer corresponder estas concentrações a um determinado valor de tensão elétrica. Sabendo que com a adição 100 µl de etanol a 95% a solução fica saturada, conclui-se que a concentração de 4,96 g/l corresponde ao máximo de tensão que entra no microcontrolador ou seja 3,3 V. Fazendo os cálculos para 1 litro de vinho obtém-se para uma concentração de 2,68 g/l uma tensão elétrica de 1,78 V e respetivamente com uma concentração de 0,13 g/l uma tensão elétrica de 0,09 V.

Estes resultados também foram calculados para valores de corrente elétrica, concluindo que o valor de concentração 4,96 g/l corresponde a um valor de corrente de -1,72 µA e que -0,09 µA corresponde a uma concentração de 0,133 g/l.

Tendo em conta estes valores, foram geradas 2 retas de calibração. Uma relaciona Tensão/Concentração e outra Corrente/Concentração.

Na Figura 3.15 é representada a reta linear e respetiva equação que descreve a relação entre a concentração de álcool e a tensão elétrica.

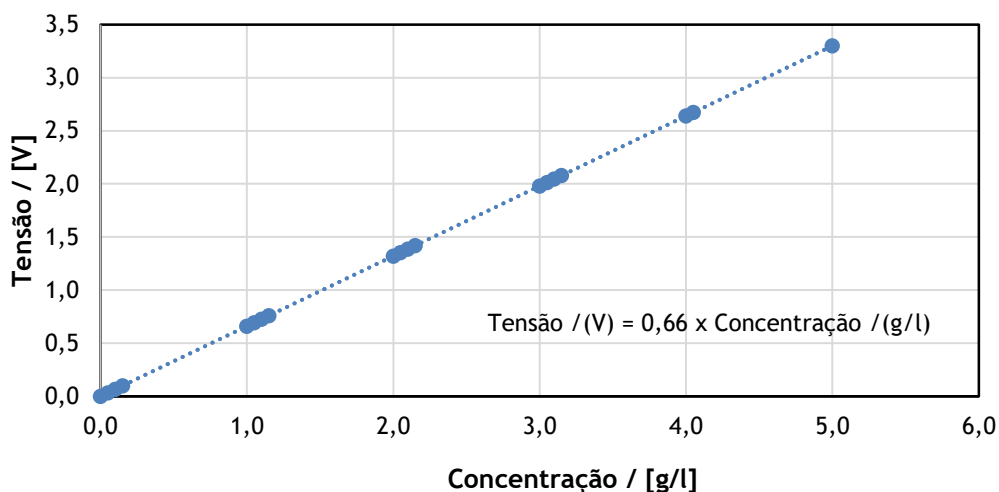


Fig. 3.15- Reta linear e respetiva equação tensão/concentração.

Analisando o gráfico da Figura 3.15, é possível observar que a tensão aumenta linearmente com o aumento da concentração. Analisando a equação referente a reta linear pode-se

concluir que para qualquer valor de concentração de álcool no sangue, o valor de tensão tem de ser dividido por 0,66.

Na Figura 3.16 é representada a reta linear e respetiva equação que descreve a relação entre a concentração de álcool e a corrente elétrica.

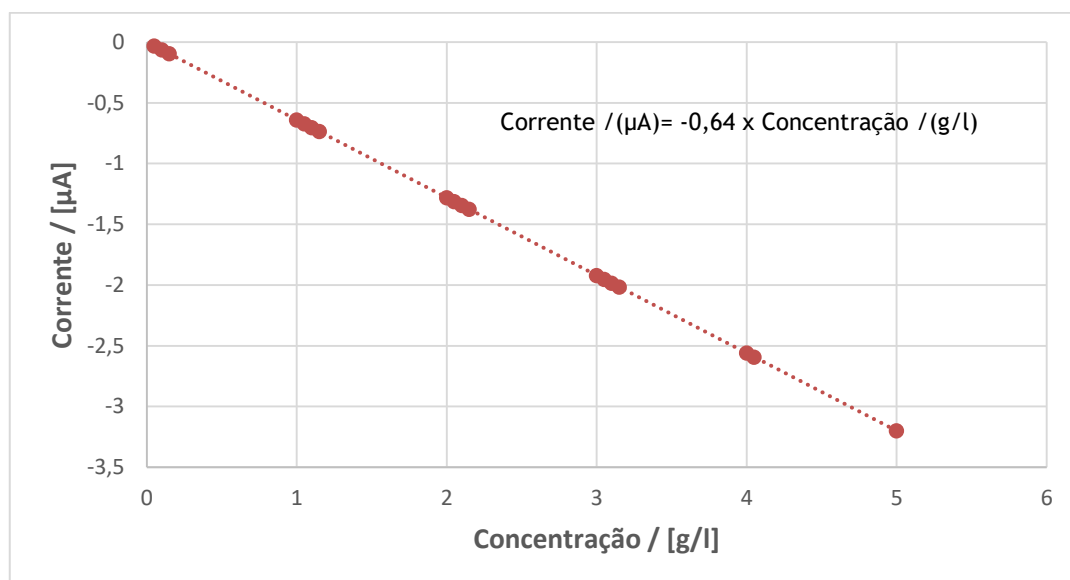


Fig. 3.16- Reta linear e respetiva equação corrente/concentração.

Analisando o gráfico da Figura 3.16, é possível observar que a corrente elétrica diminui linearmente com o aumento da concentração. Analisando a equação referente a reta linear chega-se rapidamente a uma equação que relaciona qualquer valor de concentração com a corrente gerada.  $\text{Concentração} = - (\text{Corrente} / 0,64)$ .

### 3.4. Nota conclusiva

Os resultados com o álcool oxidase não foram os esperados teoricamente, podendo-se concluir que muito provavelmente a enzima já não se encontrava ativa quando foi imobilizada na superfície do eletrodo.

Contudo, pode-se concluir que a técnica de imobilização da enzima estava a ser aplicada corretamente pois foi a técnica usada na imobilização da enzima álcool desidrogenase e com esta enzima os resultados já foram os esperados.

A técnica de ligação covalente cruzada é uma técnica de imobilização relativamente simples e com resultados visíveis.

Por último, em relação às retas de calibração é possível concluir que a tensão evolui inversamente à corrente com o aumento da concentração do etanol, contudo ambas evoluem linearmente.

## 4. Aquisição e Processamento de Sinal

### 4.1. Introdução

Com o biossensor finalizado passou-se à elaboração da componente eletrônica do equipamento. Assim, neste capítulo é abordada a componente da aquisição e processamento dos dados adquiridos pelo biossensor. Este capítulo inicia-se com a descrição do equipamento necessário à aquisição de dados, sendo de seguida descrito todo o hardware necessário no protótipo do dispositivo e por fim é descrito todo o software.

Para a realização da aquisição de dados foi construído um potencióstato, para o processamento de sinal usou-se como hardware uma placa de desenvolvimento MSP430FG4618/F2013 Experimenter Board [39] da Texas Instruments que contém um microcontrolador MSP430gf4618 e para a programação do mesmo o ambiente de desenvolvimento integrado (*Integrated Development Environment* - IDE) Code Composer Studio usando linguagem C.

### 4.2. Aquisição de dados

O princípio de funcionamento do potencióstato é baseado num amplificador operacional. Um amplificador operacional típico possui duas entradas e uma saída, onde o valor de potencial elétrico na saída é igual à diferença de potencial das suas entradas multiplicadas pelo ganho de malha aberta do amplificador operacional que é muito grande, em geral maior que  $10^6$  vezes [40].

Esta grande diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar provoca uma corrente elétrica.

A Figura 4.1 representa o potencióstato montado para recolher a corrente existente na célula eletroquímica. Em  $V_{in}$  é aplicado o potencial a que a enzima oxida o etanol, ou seja, 600 mV.

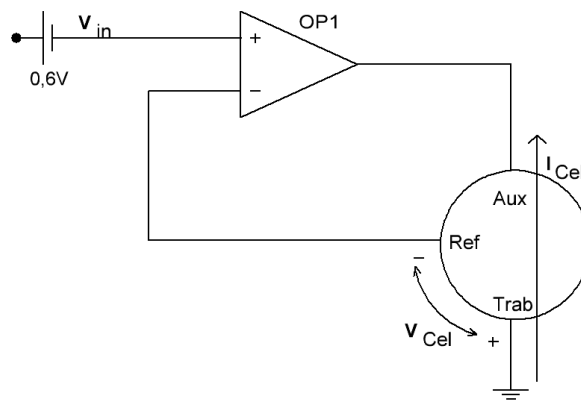


Fig. 4.1- Potencióstato.

De seguida foi necessário converter a corrente em tensão elétrica, para que esta pudesse ser lida e convertida pelo conversor analógico/digital incluído no microcontrolador MSP430fg4618. Para tal foi montado um conversor de corrente/tensão.

Para a construção do conversor corrente/tensão foi necessário o uso de um amplificador operacional e de uma resistência elétrica. O valor da resistência foi determinado através da Lei de Ohm descrita na Figura 4.2.

$$V_{out} = -R_1 \cdot I_{in} \quad (8)$$

$$V_{out} = R_1 \cdot I_1 \quad (9)$$

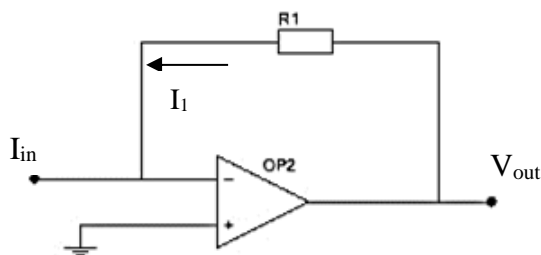


Fig. 4.2- Esquema para saber o valor da resistência para o conversor corrente/tensão [41].

Sabendo à partida que o valor mínimo de corrente elétrica que o biossensor atinge antes de adicionar o etanol é de 5,942  $\mu$ A, o que corresponde a uma tensão de 0 V de entrada no

microcontrolador e que o valor máximo de corrente é de  $-3,191 \mu\text{A}$ , o que corresponde a uma tensão de  $3,3 \text{ V}$  de entrada no microcontrolador, obtém-se que:  $V_{\text{out}} = 3,3 \text{ V}$ ;  $I_{\text{in}} = -3 \mu\text{A}$ ;  $R1 = 1,1 \text{ M}\Omega$ . O esquema do conversor está representado na Figura 4.3. Nesta imagem ao entrada  $V_{\text{in}}$  está ligada a uma fonte de tensão enquanto que a saída  $V_{\text{out}}$  está ligada à placa de desenvolvimento.

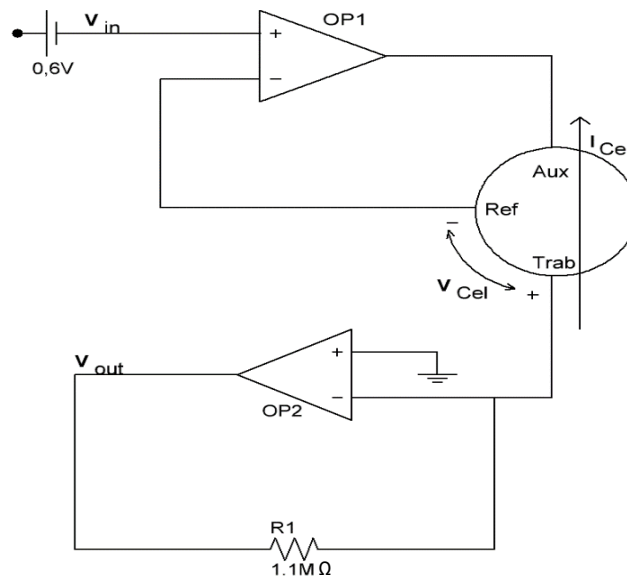


Fig. 4.3- Potenciômetro mais conversor corrente/tensão.

### 4.3. Hardware do dispositivo de monitorização

O hardware utilizado no dispositivo em estudo compreende uma placa de desenvolvimento constituída por microcontroladores. Um microcontrolador consiste num microprocessador orientado para o controlo (interação entre sensores e atuadores, comunicação entre dispositivos e utilizadores) e está presente na grande maioria dos equipamentos eletrónicos utilizados atualmente (principalmente em sistemas embutidos) [42]. Este, por sua vez, também pode ser visto como um computador e como tal tem um processador (normalmente até 32 bits), memória de programa (Flash) e de dados (RAM) e dispositivos de entrada e saída de informação, sendo por isso autónomo. O primeiro microprocessador foi o 4-bit Intel 4004 lançado em 1971 [43].

Os microcontroladores têm uma utilização muito específica e incluem algumas ou a totalidade das seguintes características: Inclusão de diversos periféricos: temporizadores, conversores analógicos/digitais, conversores digitais/analógicos, watchdog, geradores de relógio e dispositivos de comunicação série; Inclusão de memória de dados e de programa

no mesmo circuito integrado; Possibilidade do programador ter acesso direto aos pinos do circuito; Existência de instruções especializadas para operações comuns em sistemas embutidos tais como manipulação de bits. Isto permite melhorar o desempenho do sistema [43].

O facto dos periféricos e a memória estarem localizados no mesmo circuito integrado, permite reduzir o número de componentes, diminuindo a área, o consumo e o preço da implementação. O acesso aos pinos do microcontrolador permite aos programas monitorizarem de uma forma mais simples e direta os diversos sensores, controlar os atuadores e transferir dados entre outros dispositivos. Um microcontrolador deve ser escolhido de acordo com a funcionalidade pretendida e devem ser tidos em conta aspetos como o custo, consumo de energia e software necessário ao desenvolvimento das aplicações [43].

#### **4.3.1. Caraterísticas do MSP430FG4618 Texas Instruments**

Para o desenvolvimento de todo o hardware do dispositivo, foi selecionada a placa de desenvolvimento MSP430FG4618/F2013 Experimenter Board [39] da Texas Instruments, tendo em conta que é placa que contém as soluções mais viáveis para o caso em estudo (ver Figuras 4.4 e 4.5). Esta é caracterizada por:

*Periféricos integrados:* Conversor analógico-digital de 12-bit, conversor analógico-digital 12-bit do tipo de aproximações sucessivas (*Successive Approximation Register - SAR*), conversor analógico-digital 16- bits do tipo Sigma Delta, amplificadores operacionais, Acesso direto à memória (*Direct Memory Access - DMA*), Multiplicador, controlador LCD, interfaces e protocolos de comunicação: Serial Peripheral Interface (SPI), Universal Asynchronous Receiver/Transmitter (UART), Inter-Integrated Circuit (I2C), Infrared Data Association (IrDA) [39].

*Recursos do microcontrolador:* microfone, buzzer, display de cristais líquidos (*Liquid-crystal display - LCD*), *touch-pad* capacitivo, 2 botões, espaço de prototipagem, interface de comunicação RS232, 2 JTAG - interfaces de programação, 3,5 mm para auscultadores (saída de áudio). Tanto na Figura 4.1 como na Figura 4.2 é possível observar todos os periféricos e recursos disponíveis na placa e qual o microcontrolador usado para os programar [39].



Fig. 4.4- Placa de desenvolvimento MSP430FG4618/F2013 Experimenter Board [39].

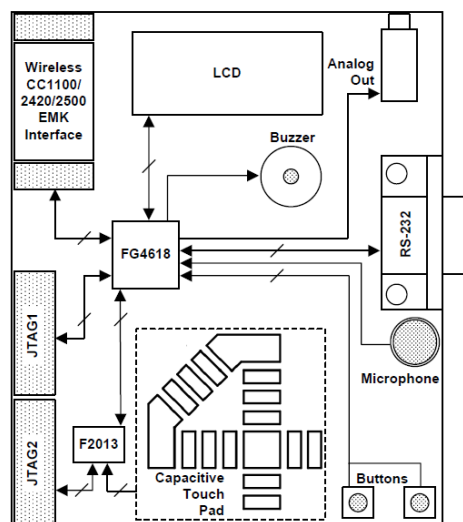


Fig. 4.5- Diagrama de bloco da placa de desenvolvimento MSP430FG4618/F2013 Experimenter Board [39].

Para conseguir fazer face a todas as características do dispositivo em estudo, foi necessário adicionar mais dois botões ao microcontrolador. Para a sua montagem foi necessário apenas uma placa de prototipagem, 2 resistências de 10 kΩ e alguns fios de ligação conforme exposto na Figura 4.6.

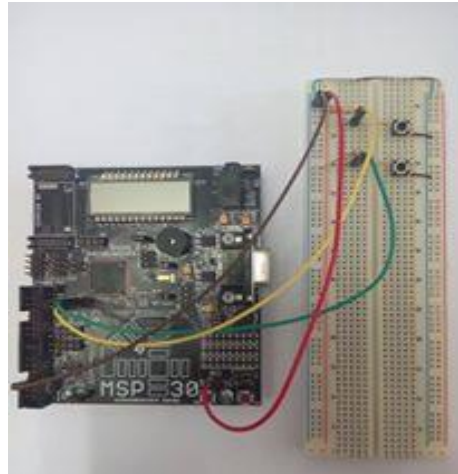


Fig. 4.6- Montagem dos dois botões adicionados à placa de desenvolvimento MSP430FG4618/F2013 Experimenter Board [39].

#### 4.4. Software do dispositivo de monitorização

A nível de software utilizado para a devida programação do hardware, foi necessário recorrer ao Code Composer Studio (CCS) [44]. Este consiste num ambiente de desenvolvimento integrado (*Integrated development environment* - IDE) para desenvolver aplicativos para aplicações embutidas da Texas Instruments (TI). O CCS está projetado principalmente para sistemas embutidos e de baixo nível (BareMetal) com programação baseada em JTAG [44]. A Figura 4.7 mostra a janela de arranque do CCS.



Fig. 4.7- Vista inicial do Code Composer Studio [44].

A linguagem C foi a usada na programação do dispositivo de monitorização. É uma linguagem adequada à programação estruturada e pertence a uma família de linguagens cujas características são: portabilidade, modularidade, compilação separada, recursos de baixo nível, geração de código eficiente, confiabilidade, regularidade, simplicidade e facilidade de uso [44].

#### 4.4.1. Fluxogramas

O fluxograma exposto na Figura 4.8 representa o processo de iontoforese. Este inicia-se com a ativação do botão on/off, que dá início a todo o processo. O conversor digital/análogo (*Digital/Analog Converter* - DAC) é ativado e durante 5 minutos é fornecida uma tensão elétrica de 1 V, para que depois de convertida em corrente seja aplicada sobre a pele e assim promovida a sudação. O botão on/off só ativa e desativa o DAC, o RTC permanece sempre ligado. A variável dos 5 minutos é usada no RTC.

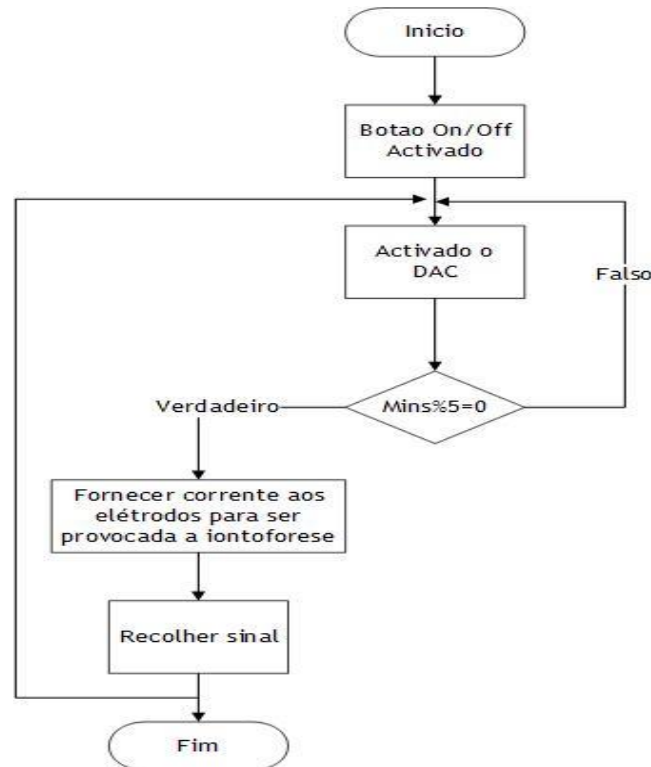


Fig. 4.8- Fluxograma representativo do processo de iontoforese.

O fluxograma exposto na Figura 4.9 diz respeito à análise do sinal, isto é, depois de ser promovido o suor pelo DAC, é necessário fazer o processamento do sinal com o acionamento do conversor analógico/digital (*Analog/Digital Converter* - ADC). Este recolhe 50 leituras da mesma amostra, elabora uma média, converte para um valor equivalente ao de álcool no sangue (g/l) e guarda na memória do microcontrolador. Depois de guardado, compara com a leitura anterior e se a diferença entre os valores das medições foi igual ou superior a 0,1 g/l, o microcontrolador emite um sinal sonoro através do *buzzer* e um sinal luminoso através de um LED vermelho. Estes alarmes param assim que o utilizador carrega no botão. Este botão também permite ao utilizador ver o valor de alcoolémia no LCD.

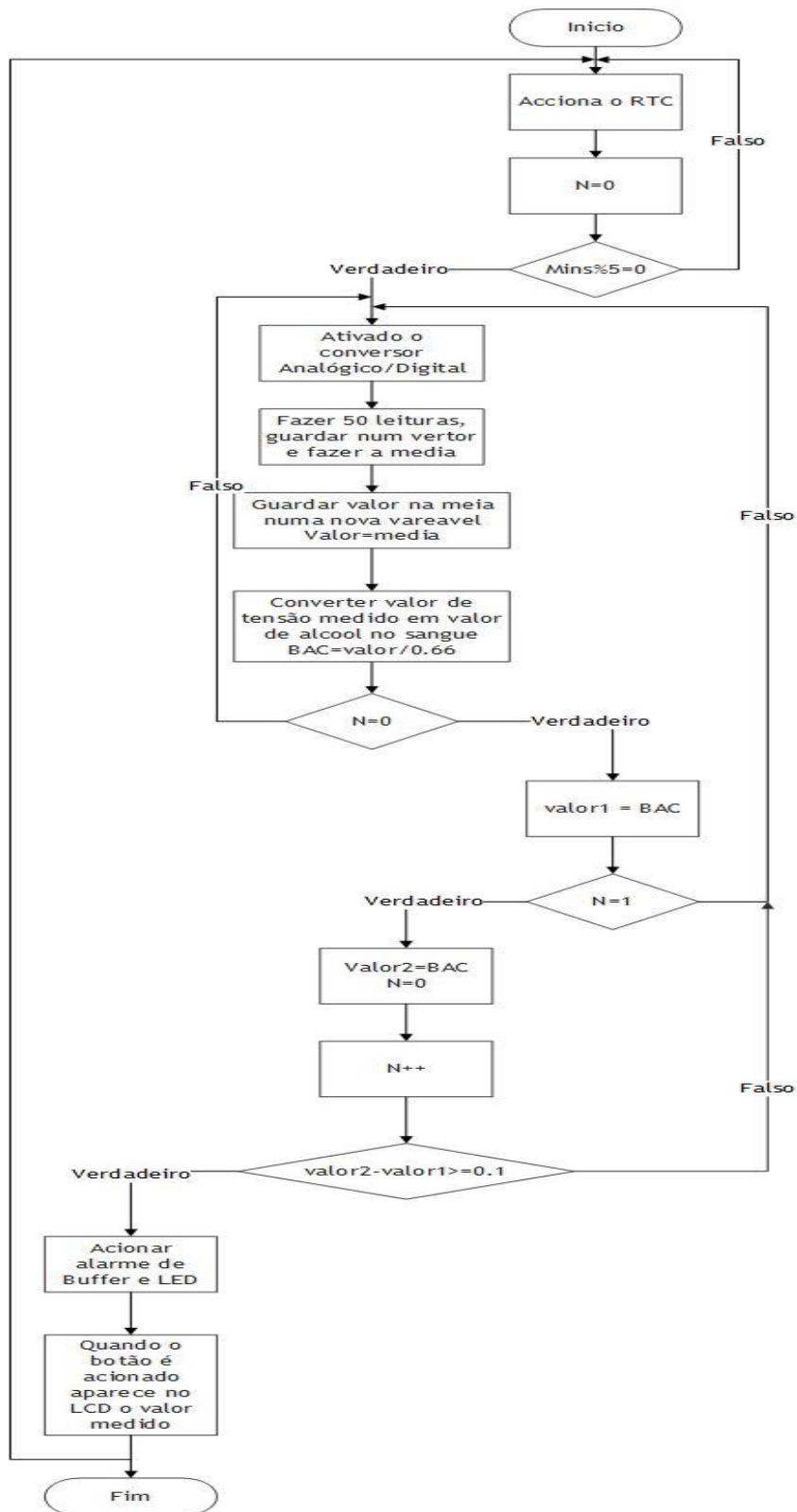


Fig. 4.9- Fluxograma representativo do processamento do sinal.

## 4.4.2. Configuração dos periféricos utilizados

### 4.4.2.1. Conversor Digital-Analógico (DAC)

O microcontrolador usado no dispositivo em estudo possui integrados dois módulos DAC de 12 bits configuráveis via software. Este módulo pode funcionar com uma resolução de 8 ou 12 bits, definida utilizando o bit DAC12RES.

Para configurar o módulo DAC, utiliza-se o registo DAC12\_xCTL onde se define a tensão de referência, a resolução do DAC e o trigger para iniciar uma nova conversão. Depois de configurado, o seu funcionamento de base é simples e para realizar uma conversão apenas é necessário escrever num registo o valor a converter [45].

```
DAC12_0CTL = DAC12IR + DAC12AMP_5 + DAC12ENC; // Ganho unitário de ref
DAC12_0DAT = 0x0666;                          // 1.0V
```

Tendo em consideração a configuração do DAC assim representada (tensão fornecida pelo DAC = 1 V = 1000 mV) e considerando que a corrente necessária à iontoforese é de 0,5 mA, usando a Lei de Ohm, tem de ser usada uma resistência de  $2\Omega$ .

### 4.4.2.2. Conversor Analógico-Digital (ADC)

A utilização de um módulo ADC é fundamental para a tradução do sinal extraído do Biossensor.

O funcionamento geral de um ADC pode ser entendido melhor através do esquema da Figura 4.10 [45].

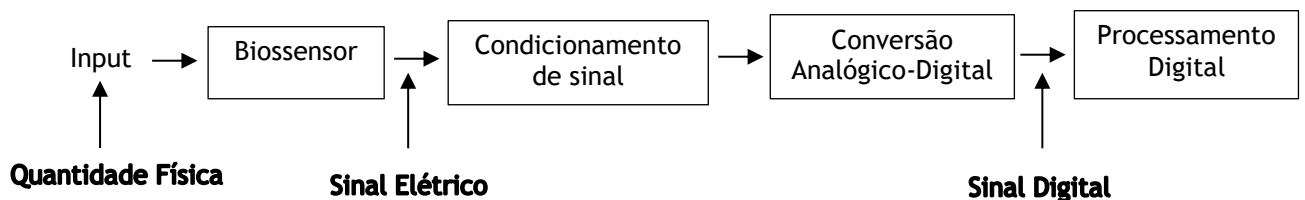


Fig. 4.10- Diagrama de blocos do funcionamento geral de um ADC.

O ADC integrado neste microcontrolador é completamente configurável por software utilizando os registos ADC12CTL0 e ADC12CTL1. A frequência de relógio de funcionamento do ADC é configurada selecionando um clock do microcontrolador através dos bits ADC12SSELx, sendo possível aplicar-lhe um divisor através dos bits ADC12DIVx, ambos no registo ADC12CTL1. Podem ser selecionadas como fonte de relógio o SMCLK, MCLK, ACLK ou o ADC12OSC, oscilador gerado internamente no módulo do ADC com uma frequência de 5 MHz [45].

Este módulo integra ainda um gerador de tensões de referência de 2 níveis (1,5 V e 2,5 V). Definindo o bit REFON do registo ADC12CTL0, ativa-se o gerador e a tensão de 2,5 V pode ser selecionada definindo REF2\_5V = 1. No caso de REF2\_5 = 0, a tensão de referência é de 1,5 V. O registo ADCCTL0 permite configurar ainda os intervalos de amostragem para os registos 8 a 15 e para os registos 0 a 7 utilizando os bits SHT1x e SHT0x respetivamente, assim como interrupções associadas à conversão e modo de amostragem e conversão. O bit Enc ativa o ADC e o bit ADC12SC dá início à conversão [45].

A memória de conversão está dividida em duas partes, uma para armazenar os valores convertidos (ADC12MEMx) e outra para armazenar configurações (ADC12MCTLx). A cada registo ADC12MEMx corresponde um registo ADC12MCTLx que guarda as configurações para a conversão. Os registos ADC12MCTLx definem a tensão de referência e o canal do ADC a converter e têm ainda mais um bit (EOS) que indica o fim da sequência, utilizado nalguns modos de conversão. Existem quatro modos de conversão disponíveis, configuráveis através dos bits CONSEQx do registo ADC12CTL1 [45].

Os bits CSTARTADDx definem o registo em que irá ser iniciada a conversão, ou seja, o primeiro ADC12MCTLx utilizado para qualquer conversão que se inicie. Se o modo de conversão escolhido for sequencial, a conversão é iniciada neste registo e termina no primeiro registo que tiver o bit EOS ativo [45].

Tendo em conta este registo, o ADC no dispositivo em estudo foi configurado do seguinte modo:

```
P6SEL |= 0x01; // ADC amostrado no pino P6.0
ADC12CTL0 = ADC12ON|SHT0_8|MSC; // 256 ADC12CLK
ADC12CTL1 = SHP|CONSEQ_1; // Temporizador de amostragem, set mode

ADC12CTL0|=ENC+ ADC12SC;
while(!(ADC12CTL0 & ADC12IFG)); // inicio do ciclo de conversões
ADC12CTL0 &=~ADC12IFG; // Levantar a flag do ADC
```

#### 4.4.2.3. LCD

O valor da conversão será mostrado no LDC, assim a configuração deste módulo é igualmente importante.

O LCD deste microcontrolador tem como outputs 40 segmentos que seleciona os pinos em grupos e tem 4 COM multiplexadas e ligadas ao Pino 5 do microcontrolador, o que pode chegar até 160 segmentos. O registo LCDAPCTL controla os portos [45].

O controlador de LCD integrado no MSP430FG4618 tem capacidade para controlar até 160 segmentos multiplexados quatro a quatro, possui memória dedicada para o *display*, inclui bomba de carga regulada e permite controlar o contraste do LCD via *software*. O registo LCDACTL serve para controlar todos os registos do LCD, sendo que LCDAVCTL0 controla a tensão. Para alimentar o LCD através da bomba de carga é necessário definir VLCDEXT = 0, VLCDPEN = 1 e em VLCDx selecionar a tensão a aplicar ao LCD. Através dos bits VLCDx é possível selecionar uma tensão de 2,6 V a 3,44 V para alimentar o LCD [45].

Assim sendo a configuração do LCD foi feita do seguinte modo:

```
// Configuração COM0-COM3 e R03-R33 pins
P5SEL |= (BIT4 | BIT3 | BIT2);
P5DIR |= (BIT4 | BIT3 | BIT2);

// Configuração LCD_A
LCDACTL = LCDFREQ_128 | LCDMX1 | LCDMX0 | LCDSON | LCDON;
LCDAPCTL0 = LCDS4 | LCDS8 | LCDS12 | LCDS16 | LCDS20 | LCDS24;
LCDAPCTL1 = 0;
LCDAVCTL0 = LCDPEN;
LCDAVCTL1 = VLCD_2_60;
```

#### 4.4.2.4. Buzzer

Depois da conversão do sinal do biossensor, este é introduzido numa fórmula ( $BAC = \text{valor}/0,66$ ) que transforma um valor de tensão (valor) para um valor de álcool no sangue (BAC). Posteriormente, o valor de BAC é comparado com o valor de referência (se for a primeira leitura) ou com o valor lido anteriormente. Caso a diferença entre os valores for acima de  $\Delta BAC = 0,1$ , ocorre um sinal sonoro. O Buzzer foi configurado usando o timer B:

```
P3DIR |= BIT5; // P3.5 output
P3SEL |= BIT5;
TBCCR0 = 432-1; // Periodo PWM
TBCCTL4 = OUTMOD_7; // CCR4 reset/set
TBCCR4 = 218; // CCR4 PWM duty cycle
TBCTL = TBSSEL_2+MC_1; // SMCLK, up mode
```

#### 4.4.2.5. LED

Do mesmo modo que é ouvido um sinal sonoro é também ativado o LED para que o aviso de que o valor de álcool no sangue está a subir seja com maior intensidade. Assim a ativação do LED é feita do seguinte modo:

```
P5DIR |= BIT1; // Ligar o LED do Pino P5.1
```

#### 4.4.2.6. Botão on/off

O botão on/off é usado para ativar a iontoforese e as posteriores de medições do teor de álcool. Este foi implementado para que o dispositivo só funciona-se quando o utilizador assim o permite-se, desta forma existe uma rentabilização da bateria do dispositivo.

A implementação deste foi simples, foi necessário apenas usar uma interrupção para o botão e uma variável que assim que a interrupção fosse ativada esta acionava o ADC e o DAC.

## 4.5. Protótipo final do dispositivo de monitorização

Com o biossensor e a parte eletrónica pronta, passou-se à montagem do protótipo final do dispositivo de monitorização.

Recorreu-se ao software fritzing [46], versão 0.9.3.0, para desenhar toda a montagem do protótipo e respetivo esquema de ligação, em que todos os componentes foram desenhados à escala. Para tal foi necessário uma fonte de tensão, o biossensor, breadboard, 2 amplificadores operacionais LM386, 3 resistências com valores de 10 k $\Omega$  (2 resistências) e 1,1 M $\Omega$ , 2 botões, placa de desenvolvimento MSP430FG4618/F2013 Experimenter Board e fios de ligação.

Assim, nas Figuras 4.11 e 4.12 está representada a montagem e o esquema de ligação do protótipo do dispositivo de monitorização, respetivamente. Nestas Figuras é possível observar o biossensor amperométrico que devido à modificação da superfície do eletrodo de trabalho com a enzima álcool desidrogenase recolhe o suor e reage com o álcool existente no mesmo. Para que esta reação ocorra é necessário o uso de uma fonte de tensão, cujo valor é mantido constante a 0,6 V.

Na montagem existe também um potencióstato que é composto por um amplificador que se liga ao biossensor amperométrico e que, tal como o nome indica, recolhe a corrente que é

gerada entre o biossensor e o álcool. Um conversor Corrente/Tensão que é composto por um amplificador e uma resistência de  $1,1\text{ M}\Omega$ , converte a corrente do potenciômetro para tensão para que esta possa ser analisada pelo microcontrolador. Assim existe toda a ligação ao MSP430Fg4618 para o processamento do sinal, isto é, conversão em tensão elétrica para um respetivo valor de álcool.

Por último, os 2 botões e as respetivas resistências pull-up, são adicionados a toda a montagem, um é botão on/off que funciona para que exista um maior rendimento da bateria do dispositivo e o outro que serve para mostrar o valor de álcool só quando o utilizador assim o desejar.

Todo o processo de produção de suor, iontoforese, não está representado nas Figuras 4.11 e 4.12.

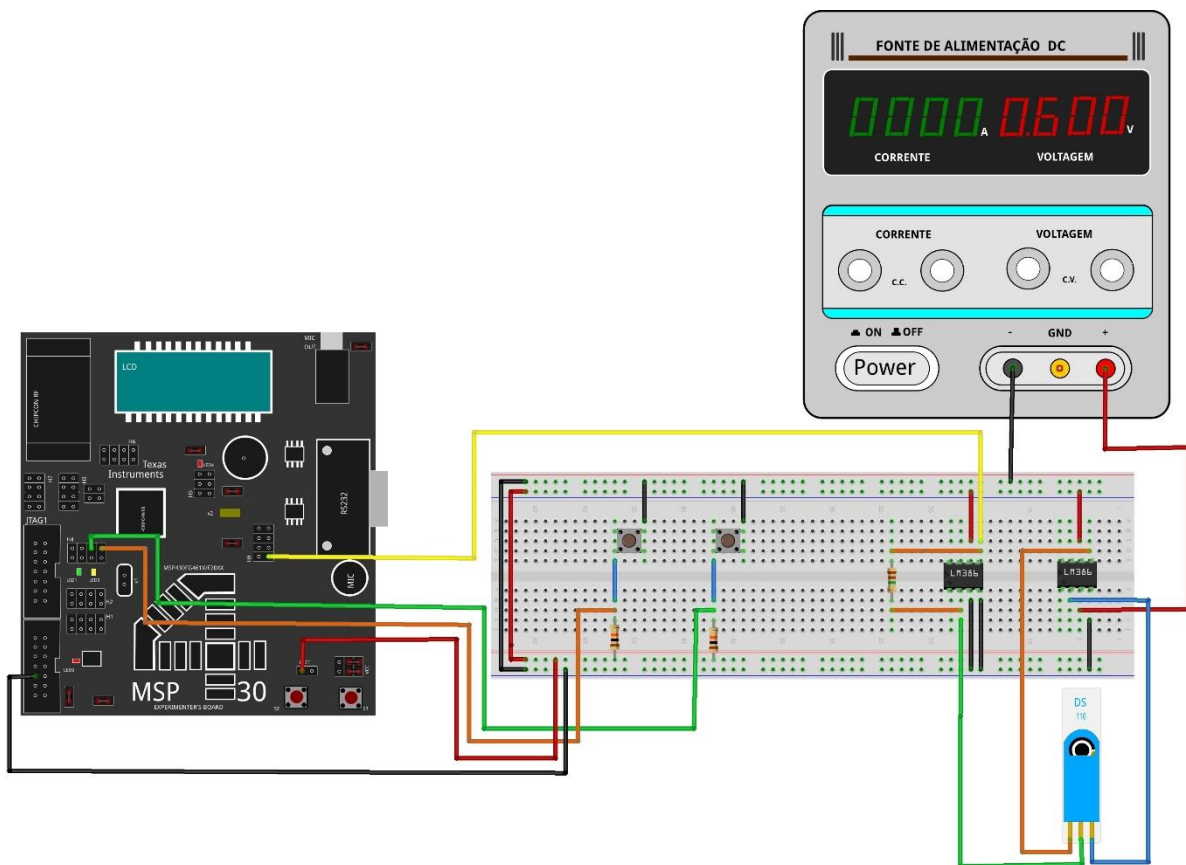


Fig. 4.11- Protótipo final da montagem do dispositivo de monitorização.

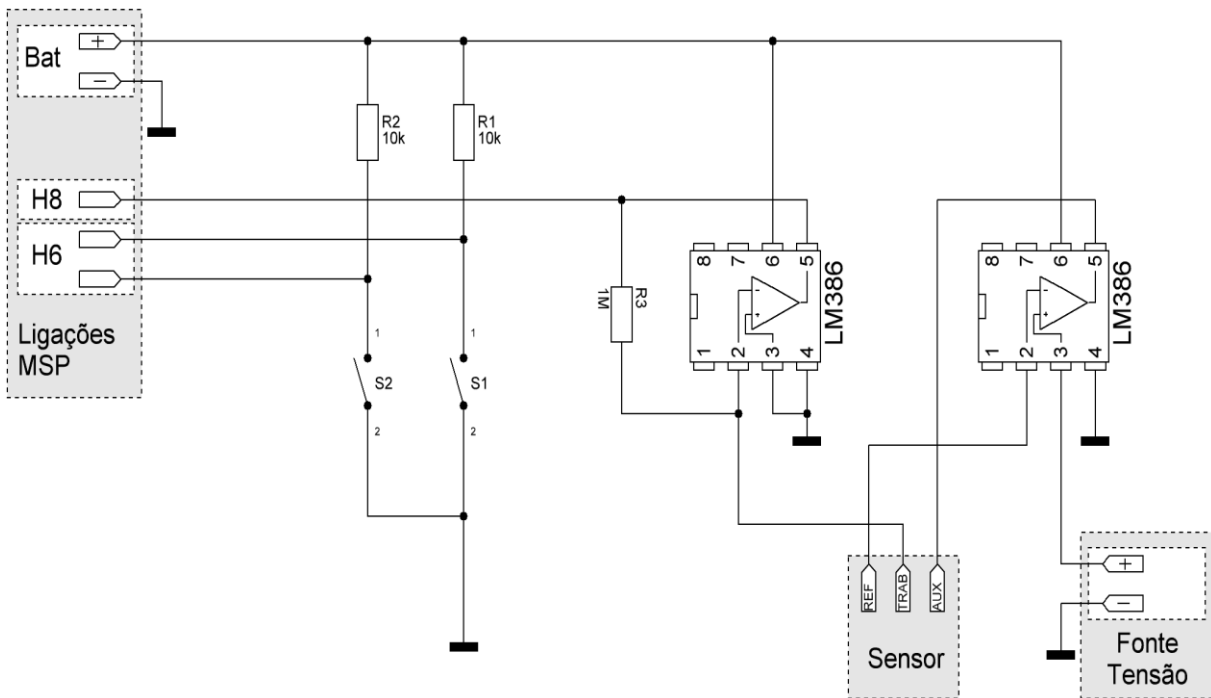


Fig. 4.12- Esquema de ligação do protótipo do dispositivo de monitorização.

#### 4.6. Nota conclusiva

Apesar dos valores de corrente originados no biossensor serem muito pequenos, ao ser convertidos para tensão resultam em valores igualmente pequenos, mas suficiente para que possam ser lidos e processados pelo MSP430fg4618.

Toda a programação desenvolvida, para que fosse possível o processamento do sinal, funciona como esperado, isto é, o microcontrolador lê o sinal do Biossensor já convertido para tensão, verifica se é mais elevado que o medido anteriormente. Posteriormente, lança um alerta sonoro e luminoso. Este alerta termina assim que se carrega no botão e se verifica o valor exato da concentração de álcool no sangue. Neste processo verificou-se também que a fórmula ( $BAC = \text{valor} / 0,66$ ) usada para fazer corresponder a tensão a um valor de concentração de álcool apresenta conversões corretas.

Na montagem do protótipo final no dispositivo, apenas não foi tida em conta a componente da produção de suor, que nesta dissertação foi estudada apenas teoricamente.

## 5. Análise e Discussão dos Resultados

### 5.1. Introdução

Para o desenvolvimento do biossensor descrito no capítulo 3, foram usados como base alguns artigos científicos em que usava a mesma enzima (álcool desidrogenase) e a mesma técnica de imobilização.

Como tal, neste capítulo é feita uma análise e discussão dos valores teóricos (retirados dos artigos científicos) comparando com os valores obtidos na prática, podendo assim fazer também uma validação dos resultados.

### 5.2. Comparação dos resultados teóricos com os práticos

Analisando o trabalho desenvolvido por Samphao *et al.* [47], os melhores resultados foram obtidos com as seguintes condições: pH da solução tampão de 6,8, em que a quantidade de enzima ideal foi de 60 unidades/cm<sup>2</sup>, a concentração de NAD<sup>+</sup> foi de 0,25 mM e o potencial usado para obter melhores resultados foi de 0,1 V.

No artigo é possível também analisar que entre o primeiro valor de corrente, antes da adição de etanol, e o último valor, depois da saturação da solução com etanol, a diferença é apenas de 10 µA. Sendo que o primeiro valor corresponde a -15 µA e com a adição de etanol estabiliza em -5 µA.

Comparando com os valores obtidos na componente prática exposta no capítulo 3 e mantendo as condições de pH, quantidade de enzima e quantidade de NAD<sup>+</sup>, é possível analisar que para se obter resultados eficazes é necessário usar um potencial mais elevado, de aproximadamente 0,6 V. Quanto à diferença entre os valores de corrente, antes e depois da adição de etanol, essa é relativamente idêntica, pois como é referido no capítulo 3, entre os valores existe uma diferença de 8 µA. Contudo, no que toca aos valores em específico, existe uma diferença, uma vez que em [47] [48] a corrente vai aumentando com a adição de etanol e na prática desenvolvida no capítulo 3, corrente vai diminuindo. Como pode ser analisado na Figura 5.1 (Figura 3.14 adaptada), o valor de corrente elétrica antes da adição do etanol é de 5,9 µA e depois ao saturar em etanol estabiliza em -3,2 µA (zona assinalada com círculo vermelho). Isto ocorre devido à oxidação do substrato (etanol) por parte da enzima. Quanto mais etanol existir na solução, mais oxidação do mesmo irá existir e consequentemente maior será a diminuição na corrente elétrica.

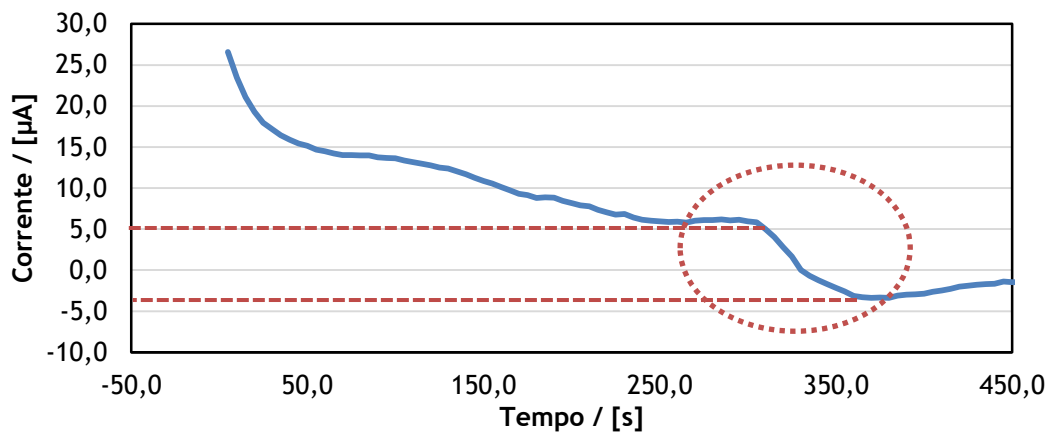


Fig. 5.1 - Cronoamperometria com o eletrodo impresso, 15 ml de solução tampão fosfato a 0,1 M e pH=7 e adição de 100 µl de etanol a 95%.

Com a prática desenvolvida no capítulo 3, foi possível também analisar que o biossensor depois de exposto a 0,6 V demora cerca de 4 minutos a estabilizar o valor de corrente elétrica. Assim, no protótipo final este tempo de estabilização tem de existir antes de começarem a ser feitas as medições. Este tempo de estabilização é também referido e tido em conta na análise teórica.

Passando agora à comparação dos resultados das duas enzimas, é possível analisar que são bastante contraditórios. Apesar das condições de pH e da técnica de imobilização da enzima se manterem constantes para as duas enzimas, os resultados com a enzima álcool oxidase não foram os esperados. Era esperado que quando se adiciona o etanol, o valor da corrente elétrica também ficasse cada vez mais negativo, mas o mesmo não ocorreu.

As enzimas são muito sensíveis, necessitam de ser conservadas a temperatura  $-20^{\circ}\text{C}$  para manterem as suas características. Estas condições não são mantidas durante o transporte das enzimas e por isso, quando a enzima álcool oxidase foi usada possivelmente já não se encontrava ativa. Contudo, os ensaios feitos com a enzima álcool oxidase, não foram em vão. Foi possível praticar a preparação dos eletrodos e a técnica de imobilização da enzima na superfície do eletrodo.

### 5.2.1. Análise e validação de resultados

Apesar do valor de potencial de oxidação do etanol pela enzima ser diferente do referido pela análise teórica [47], é possível admitir que este valor é válido tendo em conta a análise do gráfico da Figura 5.1 (Figura 3.10 adaptada), em que é usada a técnica de voltametria para determinar o potencial a que a enzima começa a oxidar o etanol. Nesta figura é possível avaliar (zona rodeada com um círculo vermelho) que o potencial a que a corrente elétrica atinge um valor positivo é de 0,6 V. Isto significa que para que a enzima álcool desidrogenase oxide o etanol existente na solução é necessário fornecer um potencial mínimo de 0,6 V.

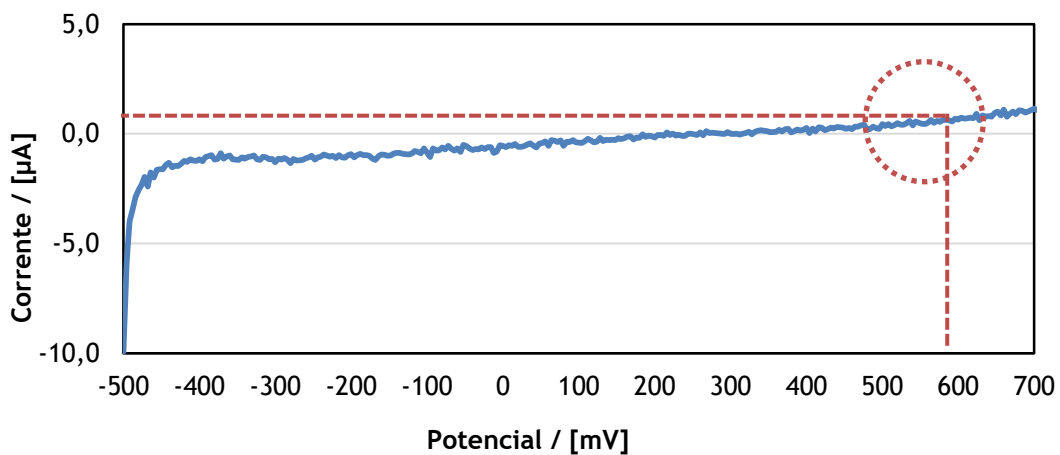


Fig. 5.2- Voltametria linear do eletrodo de trabalho com enzima em 15 ml de solução tampão fosfato de 0,1 M e pH=7 (Figura 3.10 adaptada).

Se o potencial fornecido fosse menor, a enzima não iria oxidar o etanol, contudo o potencial também não podia ser mais elevado, porque depois o etanol era oxidado sozinho em vez de ser oxidado pela enzima. Analisando adicionalmente o gráfico da Figura 5.2 (Figura 3.12 adaptada), em que é usada a técnica de cronoamperometria e um eletrodo sem enzima imobilizada na sua superfície, é possível verificar (zona rodeada com um círculo vermelho) que usando este potencial de 0,6 V o etanol não é oxidado. Esta situação ocorre porque a corrente, mesmo com a adição de etanol à solução, apresenta sempre valores de aproximadamente -5 µA.

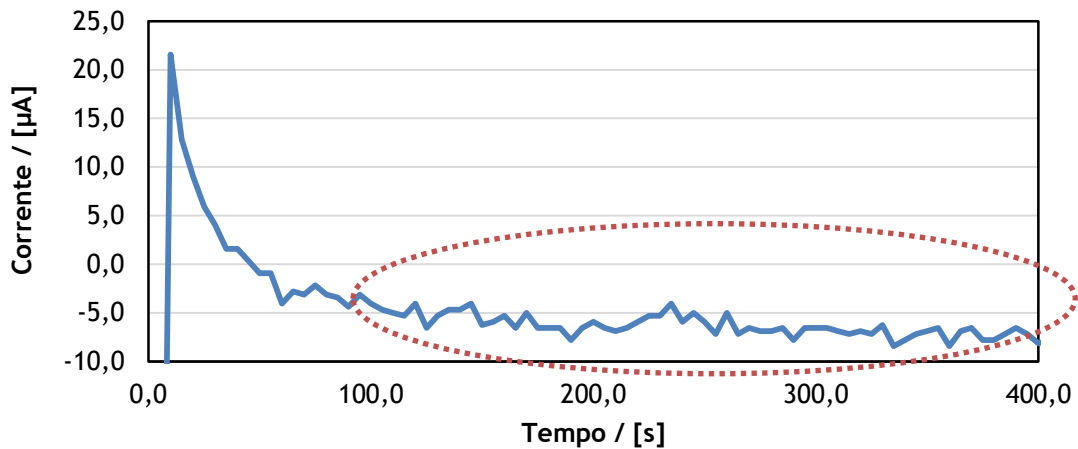


Fig. 5.3 - Cronoamperometria do elétrodo de trabalho sem enzima, numa solução de tampão fosfato de 0,1 M e pH=7 e adição de 100 µl de etanol a 95% (Figura 3.12 adaptada).

Apesar dos valores de corrente elétrica em específico serem completamente contraditórios dos referidos na análise teórica [47] [48], é possível analisar que os obtidos na prática são corretos, pois ao analisar a reação de oxidação-redução que ocorre entre o elétrodo com a enzima e o etanol, verifica-se que quanto mais etanol existe na reação mais negativa fica a corrente porque mais etanol é oxidado.

Assim, é possível analisar que apesar dos resultados obtidos na prática não estarem completamente de acordo com os referidos na teórica, são resultados válidos.

### 5.3. Projeto do dispositivo final

No decorrer desta dissertação foi desenvolvido um protótipo do dispositivo em estudo. Contudo, o objetivo final será projetar o protótipo para um dispositivo portátil e inovador.

Na Figura 5.4, está representado o desenho do dispositivo final. Este irá ter um *design* moderno e prático para ser usado no dia-a-dia como se fosse um relógio normal. Este foi projetado para que o elétrodo impresso fosse colocado na parte inferior do dispositivo de modo a que ficasse em contacto com a pele do utilizador. Toda a parte eletrónica (bateria, potencióstato, amplificadores etc.) foi projetada para ficar no interior do dispositivo. No ecrã do dispositivo apareceriam as horas e o valor de álcool no sangue em g/l, sendo que este último é opcional para o utilizador. Na Figura 5.4 é possível analisar que o dispositivo

contém ainda um led e um *buzzer* indicadores de alerta de que a concentração de álcool no sangue esta a aumentar. Inclui também 4 botões, um botão on/off e um botão de apresentação do valor de álcool no ecrã e 2 botões de acerto das horas no relógio. O objetivo do botão on/off reside em possibilitar ao utilizador a opção de usar o dispositivo simplesmente como relógio (sem efetuar quaisquer medições de álcool), ou uma vez pressionado, ter a opção de que o suor seja induzido na pele do utilizador e posteriormente as medições de álcool comecem a ser efetuadas. Esta condição permite ainda uma poupança na bateria, pois quando as medições não estão a ser efetuadas é usada uma menor quantidade de energia. O botão de apresentação do valor de álcool no ecrã tem o objetivo de informar o utilizador do valor em concreto da concentração de álcool no sangue, isto é, sempre que a concentração de álcool no sangue aumenta 0,1 g/l o utilizador é informado através do sinal sonoro e luminoso. Contudo, cabe ao utilizador carregar no botão e ver o valor da concentração no ecrã. Os 2 botões de acerto de horas servem para, como o próprio nome indica, acertar as horas no relógio sempre que necessário.

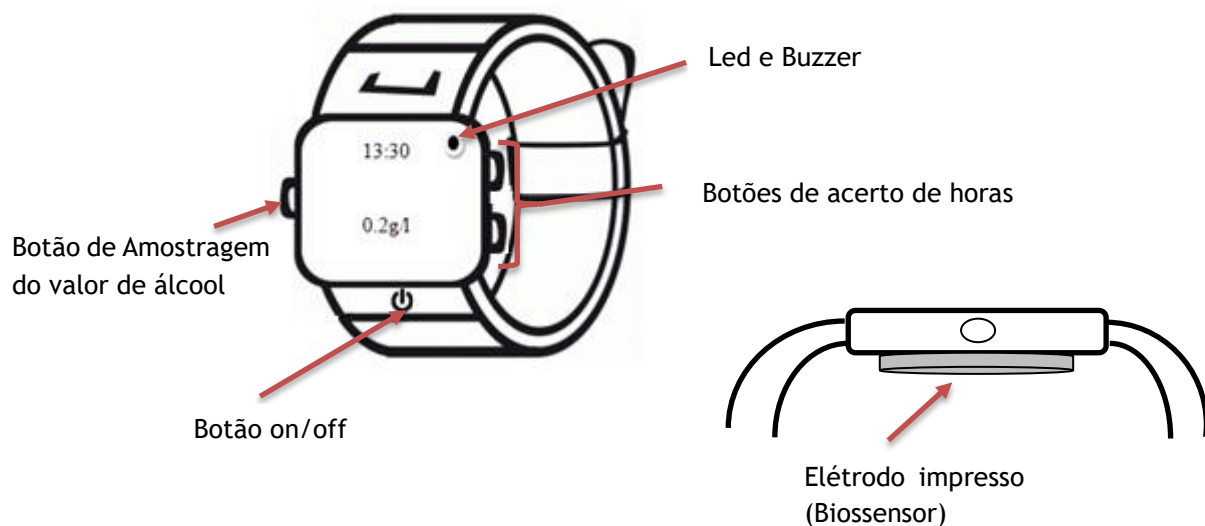


Fig. 5.4 - Projecção do dispositivo final.

## 5.4. Nota conclusiva

Em suma, é possível concluir que os resultados obtidos na prática desta dissertação não foram na sua totalidade ao encontro do que se esperava com o estudo teórico.

Contudo foi conseguida com sucesso a construção de um biossensor amperométrico. Conseguiu-se positivamente a modificação dos eléctrodos e correta imobilização da enzima.

Verificou-se posteriormente que os valores de corrente diminuía com a adição de etanol, ou seja, que a enzima estava a oxidar o etanol corretamente.

De seguida, e como já referido no capítulo 4, foi possível converter estes valores de corrente elétrica, converte-los para valores de tensão elétrica e processá-los devidamente de modo a obter valores de concentração de álcool no sangue.

Por ultimo foi ainda possível projetar um protótipo pártico, portátil e com um *design* moderado do dispositivo final.

## 6. Conclusões

### 6.1. Conclusões gerais

No início desta dissertação foi apresentada uma análise do problema em estudo, em que se concluiu que os acidentes de viação têm-se tornado, no decorrer dos anos, uma questão de saúde pública, pois além de provocarem vítimas mortais, deixam sequelas de graus variados entre os sobreviventes e efeitos adversos entre os membros das suas famílias. Entre os inúmeros fatores desencadeantes deste processo, destacava-se o consumo de álcool, tendo sido um fator determinante em aproximadamente 25% dos acidentes mortais. Além disso, foi concluído que o consumo tanto de medicamentos como de drogas ilegais representa um problema a nível da segurança rodoviária, quer isoladamente quer em combinação com o álcool.

Assim, o objetivo inicial desta dissertação consistia na criação de um dispositivo portátil não invasivo destinado à deteção em tempo real de alcoolémia através do suor.

Com o estudo feito inicialmente, concluiu-se que os condutores profissionais estão fortemente implicados em acidentes rodoviários em que a causa é o consumo de álcool, o que acarreta custos significativos para os intervenientes, empresas, seguradoras, com repercussões na economia e finanças dos países, tendo portanto sido escolhido como público alvo deste estudo os condutores profissionais.

Para que fosse possível cumprir os objetivos estabelecidos inicialmente na dissertação, procedeu-se à criação de um protótipo de um dispositivo portátil não invasivo destinado à deteção em tempo real de alcoolémia através do suor. Este dispositivo permite ao utilizador, neste caso um condutor profissional, saber a qualquer momento e em qualquer lugar o valor de alcoolémia e assim ter a consciência das condições físicas e psicológicas em que vai conduzir.

O dispositivo desenvolvido ao longo desta dissertação realiza a recolha e análise e processamento do sinal (suor). Todo o processo de promoção do suor na pele do utilizador foi apenas estudado teoricamente, não tendo sido um processo implementado no protótipo final. Contudo, conclui-se que o dispositivo final cumpre todos os objetivos inicialmente estabelecidos pois consegue apresentar valores credíveis e precisos de alcoolémia.

Todo o protótipo desenvolvido está também otimizado ao máximo no rendimento da bateria, isto é, só começa a realizar medições de alcoolémia quando o utilizador carrega no botão on/off. O utilizador é informado que o valor de alcoolemia está a subir com um sinal

luminoso e sonoro. Se for do seu interesse verificar o valor de álcool em g/l basta carregar no botão e aparecerá o valor no LCD do dispositivo.

Para a consumação do protótipo dividiu-se o estudo em duas grandes partes, o Biossensor que recolhe e analisa o suor e a componente eletrônica, na qual se usou um MSP430fg4618 que faz todo o processamento e amostragem do sinal.

### **6.1.1. Biossensor**

Em relação ao desenvolvimento do biossensor, conclui-se que cumpre os objetivos estabelecidos inicialmente.

Todos os ensaios feitos com o biossensor foram elaborados apenas em laboratório, em que se preparou uma solução tampão de pH=7 e a esta foi adicionado etanol a 95%. O biossensor detetava sempre que o etanol era adicionado.

Estes ensaios foram feitos usando técnicas eletroquímicas como a voltametria de varrimento linear e a cronoamperometria. A voltametria de varrimento linear foi usada quando o objetivo consistia na aplicação de uma diferença de potencial ao eletrodo e avaliar a sua variação ao longo do tempo. A cronoamperometria foi usada para quando era necessário medir a corrente elétrica que fluía no eletrodo de trabalho. Verificou-se com estas técnicas que sempre que o etanol era adicionado à solução tampão, a corrente que fluía no eletrodo diminuía.

No desenvolvimento do biossensor nem tudo correu como era esperado. A preparação do eletrodo de referência foi realizada diversas vezes, e chegou-se à conclusão que não se podia usar a ponte salina mas sim adicionar o sal diretamente na solução tampão, pois a ponte salina provocava demasiado ruído no sinal. O eletrodo de trabalho também foi preparado diversas vezes, inclusive foram usadas duas enzimas diferentes na preparação do mesmo.

Os primeiros eletrodos de trabalho foram desenvolvidos usando a enzima álcool oxidase. Nos testes desenvolvidos a este eletrodo, conclui-se que a enzima já não se encontrava ativa quando foi imobilizada na superfície do eletrodo, pois quando foi adicionado o álcool à solução tampão, não ocorreu qualquer alteração na corrente elétrica que fluía no eletrodo.

Contudo, pode-se concluir-se que a técnica de imobilização da enzima estava correta, pois foi a técnica usada na imobilização da enzima álcool desidrogenase. Com esta enzima os

resultados já foram os esperados, ou seja, a corrente elétrica que passava no eletrodo de trabalho diminuiu. Esta condição ocorre devido à oxidação do etanol por parte da enzima.

### 6.1.2. Dispositivo de monitorização

Em relação ao desenvolvimento do dispositivo de monitorização conclui-se que cumpre os objetivos estabelecidos inicialmente.

Para a elaboração do protótipo do dispositivo de monitorização considerou-se o biossensor já concluído e procedeu-se à elaboração de toda a componente eletrónica. Para tal usou-se uma fonte de tensão, o biossensor, amplificadores operacionais LM386, botões, e a placa de desenvolvimento MSP430FG4618/F2013 Experimenter Board, para além de diversos consumíveis elétricos e eletrónicos.

Para a análise e processamento do sinal usou-se a placa de desenvolvimento MSP430FG4618/F213 Experimenter Board. Nesta placa de desenvolvimento procedeu-se à programação de um conversor Digital-Analógico que serviu para colocar tensão elétrica aos eletrodos que ficariam responsáveis por realizar a iontoforese e induzir o suor na superfície da pele. Um conversor Analógico-Digital serviu para converter a corrente de saída do biossensor em tensão e assim poder ser lida pelo microcontrolador. Um LCD (integrado na placa de desenvolvimento MSP430FG4618/F213 Experimenter Board), que para além de mostrar as horas (usando um RTC), faz também a amostragem do valor de álcool na solução tampão em g/l. Um Buzzer e um LED são ativados sempre que o resultado da subtração entre os sinais é igual ou superior a 0,1. Por último foram também programados 2 botões, um on/off que liga e desliga o dispositivo e o outro que serve para que o utilizador veja o valor de álcool em g/l no LCD.

Assim, todo o dispositivo de monitorização ficou maior (pouco portátil) do era esperado no início do estudo desta dissertação, mas tal objetivo é possível cumprir se todo o desenvolvimento for feito com microeletrónica. Desse modo, o dispositivo final ficará com um *design* moderno e prático para ser usado no dia-a-dia como se fosse um relógio normal. Este foi projetado para que o eletrodo impresso fosse colocado na parte inferior do dispositivo de modo a que ficasse em contacto com a pele do utilizador. Todos os componentes eletrónicos (bateria, potencióstato, amplificadores etc.) foram projetados para ficar no interior do dispositivo.

## 6.2. Sugestões de trabalhos futuros

Como sugestões de trabalhos futuros, sugere-se otimizar resultados para que o biossensor tenha o maior tempo de utilização possível, sendo que o tempo atual é de apenas 8 horas.

Pretende-se também amplificar e filtrar o sinal à saída do potenciômetro para assim melhorar a sensibilidade e precisão dos resultados providenciados pelo dispositivo.

Para tornar o dispositivo portátil é necessário substituir a placa de desenvolvimento MSP430FG4618/F2013 Experimenter Board, por um relógio Ez430 Chronos da Texas Instruments.

Como trabalho futuro pretende-se também efetuar a validação do funcionamento do protótipo final num grupo de testes com um número de indivíduos suficientes (mínimo 10 indivíduos com diferentes idades e estaturas) para que os resultados permitam a aprovação do dispositivo para comercialização.

Por último, é ainda possível usar este dispositivo para a detecção de outras substâncias, isto é, modificar a superfície do eletrodo com outras enzimas e assim possibilitar a detecção, de por exemplo, a glicemia no suor.

## 7. Referências bibliográficas

- [1] Organização Mundial da Saúde (OMS), “Relatório Global sobre Álcool e Saúde”, World Health Organization, 2014, p. 27-57.
- [2] J. Breda, “Problemas Ligados ao Álcool em Portugal”, Tese de Doutoramento em Ciências da nutrição alimentação, Faculdade de ciências da nutrição e alimentação- Universidade do Porto, 2010, p.24-29.
- [3] G. Torquato, “Álcool: As reais consequências do consumo”, Ler Saúde, 2013.
- [4] Comissão Europeia, “Mobilidade e Transportes - Segurança Rodoviária”, Aptidão para Conduzir, 2013.
- [5] Comissão Europeia, “Mobilidade e Transportes - Segurança Rodoviária”, Novos Condutores, 2013.
- [6] INE, “Estatísticas dos Transportes e Comunicações 2013”, Instituto Nacional de Estatísticas (INE), 2013, p. 33-46.
- [7] ANSR, “O Álcool e Condução”, Autoridade Nacional de Segurança Rodoviária (ANSR), 2015, p. 4-8.
- [8] IMTT, “Manual de Sinistralidade de Veículos Pesados de Mercadorias”, Instituto da Mobilidade dos Transportes Terrestres (IMTT), 2010, p. 1-3.
- [9] E. Rosa, “Como os outros países contribuem para o enriquecimento da Alemanha”, 2015, p. 2.
- [10] R. Patacas, “Desenvolvimento, Caracterização e Optimização de um biossensor amperométrico para a determinação de Nitrato baseado em microinterfaces gelificadas”, Tese de Mestrado em Química, Faculdade de Ciências - Universidade do Porto, 2007, p. 1-28.
- [11] L.C. Clark, C. Lyons, “Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery”, Annals of the New York Academy of Sciences, 102, 1962, p. 2.
- [12] A.H. Clemens, P.H. Chang, R.W. Myers, “The development of Biostator, a glucose-controlled insulin infusion system (GCIS)”, Hormone and Metabolic Research [Suppl. 7], 1977, p. 23-33.
- [13] P.T. Kissinger, “Biosensors—a perspective”, Biosensors and Bioelectronics, 20(12), 2005, p. 2512-2516.
- [14] A. Tang, “The World Congress on Biosensors—Biosensors 2010”, Biosensors and Bioelectronics, 26(4), 2010, p. 1129-1774.

- [15] A. Amine, H. Mohammadi, I. Bourais e G. Palleschi, “Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring”, *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 2006, p. 1405-1423.
- [16] T. Monteiro, “Desenho e otimização do processo de fabrico de um biossensor piezoelétrico de base polimérica”, Tese de Mestrado em Micro e Nanotecnologias, Escola de Engenharia- Universidade do Minho, 2011, p. 6-10.
- [17] A. Barbosa, “Construção de um biossensor para o doseamento de ureia baseado na inibição enzimática da amidase de *pseudomonas aeruginosa* com recurso a um eléctrodo selectivo de iões amónio”, Tese de Mestrado em Engenharia Química, Instituto Politécnico de Engenharia de Lisboa, 2008, p. 4-22.
- [18] B. Barry, “Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery”, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14, 2001, p. 101-114.
- [19] C. Costello, A. Jeske, “Iontophoresis: applications in transdermal medication delivery”, *Physical Therapy*, 75, 1995, p. 554-563.
- [20] S. Leduc, “Electric ions and their use in medicine”, vol. 7, London, London Rebman Ltd., 1988, p. 1-24.
- [21] B. Barry, “Drug delivery routes in skin: a novel approach”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(1), 2002, p. 31-40.
- [22] K. Ita, “Transdermal iontophoretic drug delivery: advances and challenges”, *Journal of Drug Targeting*, 24(5), . 2016, p. 386-391.
- [23] T. Gratieri, G. Martins, R. Lopez, “Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos”, *Química Nova*, 31, 2008.
- [24] W. Chang, “Química”, Setima edição, 2012, p. 116-128.
- [25] “OXIDAÇÃO DOS ÁLCOOIS”, Acedido em 29 de Setembro de 2015, em: <http://brasilecola.uol.com.br/quimica/oxidacao-dos-alcoois.htm>.
- [26] Z. Hou, Z. Li, H. Ren, Z. Shang, Y. Yan, “Detection device for detecting alcohol contents in human bodies”, CN201508360 (U), 2010.
- [27] O. Osamu, “Drunken state detection device”, JP2009073422 (A), 2009.
- [28] O. Jun, M. Hideo, “Drunk driving preventive device”, JP2008308037 (A), 2008.
- [29] G. Cheng, “Drunk-driving sweat detection driving-forbidding and alarming device for motor vehicles”, CN201792752 (U), 2011.

- [30] J. Huijun, “Drunk driving preventing control system for automobiles”, CN202952831 (U), 2013.
- [31] G. Shuichi, “Checking device for drunk driving”, JP2005224319 (A), 2005.
- [32] C. Tongtong, M. Xingle, X. Qian, W. Haiyang, Z. Yu, Y. Guowei, “Device for preventing drunk driving of motorcycle”, CN202669496 (U), 2013.
- [33] A. Brett, C. Brett, “Eletroquímica - Princípios, Métodos e Aplicações”, 1996, p. 1-6, 21-26, 149-155, 193-210, 340-348.
- [34] J. Pereira, “Como Interpretar o Potencial Normal de Redução”, Tese de Mestrado nas Áreas de Física e Química, Universidade da Beira Interior, 2010, p. 18-19.
- [35] D. Carelli, D. Centonze, A. Giglio, M. Quinto, “An interference-free first generation alcohol biosensor based on a gold”, *Analytica Chimica Acta*, 565(1), 2006, p. 27-35.
- [36] A. Azevedo, D. Prazeres, J. Cabral, L. Fonseca, “Ethanol biosensors based on alcohol oxidase”, *Biosensors and Bioelectronics*, 21(2), 2005, p. 235-247.
- [37] I. Migneault, C. Dartiguenave, M. Bertrand, K. Waldron, “Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking”, *BioTechniques*, 37, 2004, p. 790-802.
- [38] S. Chinnadayala, N. Kakoti, M. Santhosh, P. Goswami, “A novel amperometric alcohol biosensor developed in a 3rd generation bioelectrode platform using peroxidase coupled ferrocene activated alcohol oxidase as biorecognition system”, *Biosensors and Bioelectronics*, 15(55), 2014, p. 120-126.
- [39] Texas Instruments, “MSP430FG4618/F2013 Experimenter’s Board”, User Guide, 2007.
- [40] L. Rab, A. Munteanu, “Considerations and measurements regarding a didactic portable potentiostat”, *Bulletin of the Transilvania University of Brasov*, 2, 2009, p. 319-324.
- [41] “Instituto Newton C. Braga”, Acedido em 20 de Maio de 2016, em: <http://www.newtoncbraga.com.br/index.php/matematica-para-eletronica/3691-m233.html>.
- [42] E. Ordonez, C. Penteado, A. Silva, “Microcontroladores e FPGAs - Microcontroladores e FPGAs - Aplicações em Automação”, Novatec, 2006, p. 15-17.
- [43] F. Pinto, “Desenvolvimento de um Protótipo de um Sistema Domótico”, Tese de Mestrado em Engenharia Electrotécnica e de Computadores, Universidade Técnica de Lisboa, 2010, p. 16-18.

- [44] Texas Instruments, “Code Composer Studio (CCS) Integrated Development Environment (IDE)”, Software.
- [45] Texas Instruments, “MSP430FG4618/F2013 Experimenter’s Board”, Data Sheet.
- [46] “Fritzing”, Software, Acedido em 20 de Julho de 2016, em: <http://fritzing.org/download>.
- [47] A. Samphao, K. Kunpatee, S. Prayoonpokarach, J. Wittayakun, L. Svorc, D. Stankovic, K. Zagar, M. Ceh, K. Kalcher, "An Ethanol Biosensor Based on Simple Immobilization of Alcohol Dehydrogenase on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au Nanoparticles", *Eletoanalysis*, 27, 2015, p. 2829-2837.
- [48] S. Piermarini, G. Volpe, M. Esti, M. Simonetti, G. Palleschi, “Real time monitoring of alcoholic fermentation with low-cost amperometric biosensors”, *Food Chemistry*, 127(2), 2011, p. 749-754.

## 8. Anexos

### 8.1. Tabela das características dos reagentes usados

| Nome   | Formula Química  | Estado             | Massa Molar [g/mol] | Densidade [kg/m <sup>3</sup> ] | Temperatura de conservação           | Fornecedor     | Função   |
|--|--|--------------------|---------------------|--------------------------------|--------------------------------------|----------------|--|
| Fosfato de Potássio Dibásico                 | $\text{HK}_2\text{O}_4\text{P}$                                      | Sólido (Branco)    | 174.18              | 2300                           | Temperatura Ambiente                 | Sigma-Aldrich  | Base   |
| Fosfato de Potássio Monobásico               | $\text{H}_2\text{KO}_4\text{P}$                                      | Sólido (Branco)    | 136.09              | 2338                           | Temperatura Ambiente                 | Sigma-Aldrich  | Ácido  |
| Dodecilbenzeno sulfonato de sódio (DBSS)     | $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{Na}$ | Sólido (Amarelo)   | 348.48              | 1980                           | Temperatura Ambiente                 | Sigma-Aldrich  | Detergente   |
| Cloreto de Sódio                             | $\text{NaCl}$  | Sólido (Branco)    | 58.44               | 2160                           | Temperatura Ambiente                 | Pareac         | Sal  |
| Cloreto de Potássio                          | $\text{KCl}$   | Sólido (Branco)    | 74.56               | 1980                           | Temperatura Ambiente                 | Pareac         | Sal  |
| Ferroceno (99%)                              | $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{Fe}$                                | Sólido (Amarelo)   | 186,04              | 1110                           | Árgon ou $-20\text{ }^\circ\text{C}$ |                | Composto Organometálico                              |
| Peroxido de Hidrogénio (30% w/v)             | $\text{H}_2\text{O}_2$   | Líquido (Incolor)  | 34,01               | 1450                           | $2-8\text{ }^\circ\text{C}$          | Pareac         | Oxidante   |
| Pirrol                                       | $\text{C}_4\text{H}_5\text{N}$                                       | Líquido (castanho) | 67.09               | 967                            | $-20\text{ }^\circ\text{C}$          | Pareac         | Composto orgânico heterocíclico aromático insaturado |
| Glutaraldeído                                | $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$                                     | Líquido (Incolor)  | 100.11              | 1060                           | $2-8\text{ }^\circ\text{C}$          | Sigma- Aldrich | Dialdeído Saturado                                   |
| Albumina do soro de porco (PSA)              | PSA  | Sólido (branco)    | -66 kDa             | _____                          | $2-8\text{ }^\circ\text{C}$          | Sigma- Aldrich | Proteína globular                                    |
| Alcool Oxidase (AOX)                         | AOX  | Líquido (Amarelo)  | -675 kDa            | _____                          | $-20\text{ }^\circ\text{C}$          | Sigma- Aldrich | Enzima   |
| Peroxidase                                   | HRP  | Líquido (Incolor)  | -44 kDa             | _____                          | $2-8\text{ }^\circ\text{C}$          | Sigma- Aldrich | Enzima   |
| Etanol (99%)                                 | $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$                                    | Líquido (Incolor)  | 46.06               | 789                            | Temperatura Ambiente                 | Pareac         | Alcool   |
| Alcool Desidrogenase (ADH)                   | ADH  | Líquido (incolor)  | 151 kDa             | _____                          | $-20\text{ }^\circ\text{C}$          | Sigma- Aldrich | Enzima   |
| Dinucleotido de nicotinamida e adenina (NAD) | $\text{NAD}^+$   | Sólido (Amarelo)   | 709.41              | _____                          | $-20\text{ }^\circ\text{C}$          | Sigma- Aldrich | Co-enzima  |