



Universidade de Aveiro

2022

**Armando Flávio
Carneiro Lemos**

**Biossensores E-Tongue/ E-Nose para deteção de
analitos em fluídos humanos**

**E-Tongue/ E-Nose biosensors for the detection of
analytes in human fluids**



Universidade de Aveiro

2022

**Armando Flávio
Carneiro Lemos**

**Biossensores *E-Tongue/ E-Nose* para deteção de
analitos em fluídos humanos**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica, realizada sob a orientação científica do Doutor Professor Luiz Pereira do Departamento de Física da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho a toda a minha família, namorada e amigos.

O júri

presidente

Prof. Doutora Ana Luísa Monteiro da Silva

professora Auxiliar em Regime Laboral da Universidade de Aveiro

Vogal – arguente

Doutor Henrique Leonel Gomes

professor Associado Com Agregação da Universidade de Coimbra

Vogal – orientador

Prof. Doutor Luiz Fernando Ribeiro Pereira

professor Auxiliar da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Estou e estarei eternamente grato a todos aqueles que me ajudaram a realizar parte dos meus sonhos.

Quero agradecer em forma de desabafo especialmente às seguintes pessoas: Um obrigado especial ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Pereira, que esteve presente de corpo e alma desde o primeiro minuto desta dissertação e que arranhou sempre uma solução para todas as adversidades que foram aparecendo, tendo sempre uma palavra de motivação e incentivo. Ao professor José Germino, que mesmo não sendo o meu orientador sempre que necessário me auxiliava em qualquer tema.

A todos os meus amigos: Filipe, Celso, Nelson, Pacheco, Teodoro, Carvalho, Fa, Ju, Chico, Kiko, Vasco, Esteves, Ramos, Coutinho, Glória, Lara, Luís, Tomás, Brito, Vi, Zé e Jota, que sempre me apoiaram em todo este meu percurso e fizeram com que vivenciasse experiências inesquecíveis. Agradeço do fundo meu coração.

À minha família especialmente ao meu avô, avó, pai, mãe, Elsa e as minhas quatro irmãs (Ju, Ida, Liana e Ana) que são sangue do meu sangue e a minha razão de viver.

Não me posso esquecer da minha namorada Ana que sempre teve a paciência para ouvir todos os meus desabafos e dizer a palavra certa para me manter no rumo certo.

A todas as pessoas envolvidas na impressão dos sensores no Centro de Materiais Técnicos, Funcionais e Inteligentes (CeNTI) e ao Professor Doutor José Martinez de Oliveira, Professor Emérito da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior, e ao Doutor Nuno Santos, da Universidade de Aveiro, pelo fornecimento dos analitos, sem os quais não seria possível realizar este projeto.

Expresso o meu reconhecimento às facilidades encontradas no Complexo Interdisciplinar de Ciências Físicas Aplicadas à Nanotecnologia e Oceanografia (CICFANO) da Universidade de Aveiro realização do projeto e pelas condições excelentes que possuem.

palavras-chave

Artificial Neural Networks, E-Nose, E-Tongue, Patologias ginecológicas e do trato urinário, PCA

resumo

Os métodos convencionais atuais, no tratamento de certas doenças, como doenças ginecológicas e do trato urinário, são particularmente dispendiosos e demorados, o que não facilita o processo de diagnóstico precoce da doença, podendo originar efeitos colaterais mais graves e recuperações mais demoradas. As doenças ginecológicas, afetam uma grande parte da população feminina tornando-se um problema grave da sociedade e as do trato urinário são generalizadas. Normalmente, estas patologias não são fatais, podendo, no entanto, causar desconforto. Geralmente, o organismo humano apresenta uma grande quantidade de micro-organismos comensais que, dependendo do estado de imunidade do paciente, podem se tornar infecciosas. O presente trabalho, tem como objetivo a criação/utilização de sistemas, *eletronic nose (E-Nose)* e *eletronic tongue (E-Tongue)*, que consiga detetar e distinguir patologias do foro ginecológico e urinário, de forma eficiente, rápida, não invasiva, com baixo custo e potencial para aplicar num dispositivo *home care*. Os dados recolhidos da interação do sistema misto, com os analitos alvo, serão analisados através dos métodos: análise dos componentes principais (PCA) e técnicas de *Artificial Neural Networks (ANN)*, aferindo-se uma “impressão digital” do biomarcador e calibrar os sistemas para que se possam aplicar ao diagnóstico de patologias associadas. Os resultados obtidos, demonstraram que embora não seja difícil distinguir os biomarcadores através da técnica PCA, obtiveram-se bons indicadores com a criação de ANN, num biomarcador específico (*tiramina*), com uma probabilidade de 95% de acerto num teste cego.

keywords

Artificial Neural Networks, E-Nose, E-Tongue, Gynaecological and urinary tract pathologies, PCA

abstract

Current conventional methods for the treatment of certain diseases, such as gynaecological and urinary tract diseases, are particularly expensive and time-consuming, which does not facilitate the process of early diagnosis of the disease, and may lead to more serious side effects and longer recovery. Gynaecological diseases affect a large part of the female population, becoming a serious problem for society, while those of the urinary tract are widespread. Normally, these pathologies are not fatal, but they may cause discomfort. Generally, the human organism presents a large quantity of commensal microorganisms which, depending on the patient's state of immunity, may become infectious. This work aims to create/use systems, electronic nose (E-Nose) and electronic tongue (E-Tongue), that can detect and distinguish gynaecological and urinary pathologies, in an effective, fast, non-invasive, low cost and potential to be applied in a home care device. The data collected from the interaction of the mixed system, with the target analytes, will be analysed using the methods: principal component analysis (PCA) and techniques of Artificial Neural Networks (ANN), assessing a "fingerprint" of the biomarker and calibrate the systems so that they can be applied to the diagnosis of associated pathologies. The results obtained, demonstrated that although it is not difficult to distinguish the biomarkers through the PCA technique, good indicators were obtained with the creation of ANN, in a specific biomarker (tyramine), with a 95% probability of accuracy in a blind test.

Índice

Índice de Figuras.....	III
Índice de Tabelas.....	V
Lista de Abreviaturas	VI
1 Introdução.....	1
1.1 Enquadramento e motivação.....	1
1.2 Objetivo e fundamentação.....	1
1.3 Estrutura do trabalho	2
2 Estado de Arte dos sistemas de sensores	3
2.1 Conceito <i>E-Nose</i>	3
2.2 Arquitetura de um <i>E-Nose</i>	5
2.3 Tipos de sensores <i>E-Nose</i>	6
2.3.1 Sensores óxido metal (MOS)	6
2.3.2 Sensores de polímero condutor orgânico.....	6
2.4 Vantagens e desvantagens do <i>E-Nose</i>	6
2.5 Aplicações do sistema <i>E-Nose</i> na saúde	7
2.5.1 Deteção de doenças do sistema urinário.....	8
2.5.2 Deteção de aminas características de <i>vaginose bacteriana</i>	8
2.6 Conceito <i>E-Tongue</i>	10
2.7 Arquitetura do sistema <i>E-Tongue</i>	11
2.8 Vantagens do <i>E-Tongue</i>	12
2.9 Aplicações do sistema <i>E-tongue</i> na saúde.....	12
2.9.1 Análises clínicas	12
2.9.2 Deteção de disfunções do sistema urinário.....	13
2.9.3 Deteção de ácido ascórbico e ácido úrico.....	13
2.9.4 Diagnóstico de doenças gastrointestinais	13
2.9.5 Deteção de aminas características da <i>vaginose bacteriana</i>	13
3 Algoritmo de reconhecimento de padrões	14
3.1.1 Funcionamento do sistema <i>E-Nose</i> e <i>E-Tongue</i>	14
3.1.2 PCA – Análise dos componentes principais	16
3.1.3 <i>Artificial Neural Networks</i>	16
4 Procedimento experimental	19
4.1 <i>Screen Printing</i>	19
4.2 Técnicas de produção de filmes	19

4.2.1	<i>Spin Coating</i>	19
4.2.2	<i>Doctor blade</i>	20
4.2.3	<i>Slot-die</i>	21
4.3	Sensores	23
4.4	Polímeros utilizados na formação da camada ativa.....	24
4.4.1	PEDOT:PSS.....	24
4.4.2	MDMO-PPV / MEH-PPV.....	25
4.4.3	P3HT	25
4.4.4	PANi.....	25
4.5	Aquisição de dados.....	26
4.6	Analitos	27
5	Métodos experimentais	29
5.1	Desenvolvimento de elétrodos	29
5.2	Preparação dos polímeros.....	29
6	Resultados e discussão.....	30
6.1	Testes efetuados com o sistema <i>E-Nose</i> (aminas).....	30
6.1.1	<i>Spin coating</i>	30
6.1.2	<i>Doctor blade</i>	31
6.1.3	<i>Slot-die</i>	31
6.1.4	Síntese dos resultados obtidos do sistema <i>E-Nose</i>	32
6.2	Testes efetuado com o sistema <i>E-Tongue</i>	33
6.2.1	<i>Spin-coating</i>	33
6.2.2	<i>Doctor blade</i>	33
6.2.3	<i>Slot-die</i>	34
6.2.4	Síntese dos resultados obtidos do sistema <i>E-Tongue</i>	36
6.3	Discussão de todos resultados obtidos.....	37
6.4	Aplicação do método PCA	37
6.4.1	Dados obtidos através do sistema <i>E-Nose</i>	37
6.4.2	Dados obtidos através do sistema <i>E-Tongue</i>	38
6.4.3	Síntese de resultados.....	41
6.5	Criação de redes neuronais e teste das mesmas.....	42
7	Conclusões, Limitações e Linhas Futuras de Investigação.....	45
8	Referências.....	47

Índice de Figuras

Figura 1- Esquema representativo da analogia entre o E-Nose e o sistema olfativo humano. Adaptado de [8].	4
Figura 2- Aplicações atuais do sistema E-Nose. Adaptado de [7].	5
Figura 3- Representação esquemática de um nariz eletrónico. Adaptado de [8].	5
Figura 4- Esquema da força dos componentes voláteis H ₂ S e NH ₃ das amostras de urina. Normal: voluntários saudáveis; BT: cancro de bexiga; pedra: urolitíase; ITU: infeção do trato urinário. O erro padrão da média é indicado pelas barras. Adaptado de [20].	8
Figura 5- Modelação do Microambiente da flora genital por Comunidades Bacterianas Residentes. Retirado de [21].	9
Figura 6- Esquema representativo da analogia entre o E-Tongue e o sistema olfativo humano. Adaptado de [27].	11
Figura 7- Representação esquemática de uma E-Tongue. Adaptado de [4].	12
Figura 8- Esquema representativo dos processos de tratamento de dados num sistema E-Nose. Adaptado de [2].	14
Figura 9- Comparação entre a representação de rede de um modelo linear (a) e uma representação de um modelo mais complexo e aproximado de Deep Learning (b). Adaptado de [6].	18
Figura 10- Esquema de <i>Screen Printing</i> . Adaptado de [38].	19
Figura 11- Conjunto de elétrodos em Kapton/PET impresso pelo CeNTI.	19
Figura 12- Fases do Spin Coating (Midas Spin-1200D). Adaptado de [39].	20
Figura 13- Representação da técnica de doctor blade na preparação de um elétrodo de PEDOT:PSS. Adaptado de [41].	20
Figura 14- Esquema de uma slot-die (L2005A1-UK) da Ossila e os seus componentes. Adaptado de [43].	21
Figura 15- Esquematização da técnica slot-die. Adaptado de [45].	22
Figura 16- Estrutura típica do sensor orgânico: (a) vista superior do microelétrodo interdigital; (b) circuito elétrico simplificado do sensor orgânico. Adaptado de [17].	23
Figura 17- Estruturas químicas dos elementos (a) PEDOT e PSS [47], (b) MEH-PPV, (c) MDMO-PPV, (d) P3HT e (e) PANi [32].	25
Figura 18- Sistema utilizado na deteção e aquisição dos sinais.	26
Figura 19- Esquema representativo do sistema utilizado.	26
Figura 20- Esquema simplificado do funcionamento interno de um Multiplexer.	27
Figura 21- Esquema do processo de aquisição de dados.	27
Figura 22- Resposta resistiva do conjunto de sensores para a tiramina (1%).	30
Figura 23- Resposta resistiva do conjunto de sensores para a tiramina (1%).	31
Figura 24- Resposta resistiva do conjunto de sensores para (a) a tiramina (1%) e (b) trimetilamina (1%).	31
Figura 25- Resposta resistiva do conjunto de sensores para (a) tiramina (1%) e (b) putrescina (1%).	32
Figura 26- Resposta resistiva do conjunto de sensores para trimetilamina (1%).	32
Figura 27- Resposta resistiva do conjunto de sensores para a tiramina (1%).	33
Figura 28- Resposta resistiva do conjunto de sensores para tiramina (1%) (a) com PEDOT:PSS (AL4083) e (b) PEDOT:PSS (PH1000).	33

Figura 29- Gráfico da resistência do conjunto de sensores para (a) tiramina (1%) e (b) trimetilamina (1%).....	34
Figura 30- Gráfico da resistência com dois conjuntos de sensores para (a) tiramina (1%) e (b) trimetilamina (1%).....	35
Figura 31- Gráfico da resistência do conjunto de sensores para putrescina (1%).....	35
Figura 32- Gráfico da resistência do conjunto de sensores para (a) trimetilamina (1%) e (b) tiramina (1%).....	36
Figura 33- Gráfico da resistência do conjunto de sensores para (a) AU (100 μ M) e AA (100 μ M).....	36
Figura 34- Gráfico das componentes principais da resposta E-Nose (a) da tiramina (1%), (b) putrescina (1%), através do método slot-die, da representação simultânea (c) dos dois biomarcadores e (d) dos dados obtidos da tiramina (1%) com os métodos doctor blade e slot-die.	38
Figura 35- Gráfico das componentes principais da resposta. E-Tongue (a) da tiramina (1%), (b) trimetilamina (1%) e (c) representação simultânea dos biomarcadores, através do método slot-die.....	39
Figura 36- Gráfico das componentes principais da resposta E-Tongue em resistência dos sensores dos resultados obtidos através do método doctor blade. (a) PCA da tiramina, (b) trimetilamina.....	39
Figura 37- Gráfico das componentes principais da resposta E-Tongue com (a) tiramina (1%) e (b) trimetilamina (1%) com os métodos doctor blade e slot-die.....	40
Figura 38- Gráfico das componentes principais da resposta E-Tongue com (a) tiramina (1%) e (b) trimetilamina (1%) com o método slot-die.	40
Figura 39- Gráfico das componentes principais da resposta com E-Tongue AA (100 μ M) e AU (100 μ M) com o método slot-die.	41
Figura 40- Gráfico das componentes principais da resposta com tiramina (1%) (a) através de doctor blade e (b) slot-die.....	41
Figura 41- Sobreposição dos dados PCA (a) da tiramina (1%), trimetilamina (1%) e putrescina (1%) obtidos pelo sistema E-Nose/E-Tongue e (b) da tiramina (1%), trimetilamina (1%), AA e AU do sistema E-Tongue.	42
Figura 42- Criação da rede neuronal através da utilização do algoritmo nprtool do Matlab. Adaptado de [53].....	43
Figura 43- Confusion plot na (a) fase de treino, (b) validação, (c) teste e curvas ROC da fase de (d) validação e (e) teste, relativas à rede neuronal criada. De referir que nos gráficos ROC as linhas referentes às classes estão alinhadas segundo os true positive rate (1 ou 100%) e false positive rate (1 ou 100%) não se distinguindo nas marcações (só é visível uma das classes). A linha na diagonal representa (se alguma das linhas das classes se aproximarem dela) a situação de não validação da rede.	43

Índice de Tabelas

Tabela 1- Principais vantagens e desvantagens do sensor E-Nose no diagnóstico de doenças clínicas. Adaptado de [1].	7
Tabela 2- Características das técnicas de revestimento usadas. Adaptado de [45].	22
Tabela 3- Características gerais dos sensores utilizados como conjunto final	24
Tabela 4- Fórmula e estrutura química dos analitos. Adaptado de [51].	28
Tabela 5- Fórmula e estrutura química dos analitos do trato urinário. Adaptado de [52].	28

Lista de Abreviaturas

AA	Ácido ascórbico
AC	<i>Alternate current</i>
ADS	<i>American Dye Source</i>
ANN	<i>Artificial Neural Network</i>
ANSI	<i>American National Standards Institute</i>
API	Ingrediente farmacêutico ativo
AU	Ácido úrico
CA	Análise através de <i>clusters</i>
CB	Clorobenzeno
CDA	Análise discriminatória canónica
CeNTI	Centro de Materiais Técnicos, Funcionais e Inteligentes
CF	Clorofórmio
db	<i>Doctor blade</i>
DC	<i>Direct current</i>
DCB	Diclorobenzeno
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDOT	<i>3,4-ethylenedioxythiophene</i>
E-Nose	<i>Electronic nose</i>
E-Tongue	<i>Electronic tongue</i>
FPR	Relação positiva falsa
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
H₂S	Sulfeto de hidrogênio
IES	Eléttodos seletivos de iões
MDMO-PPV	Poly(2-methoxy-5-(3,7-dimethyloctyloxy)-1,4-phenylenevinylene)
MEH-PPV	Poly(2-methoxy-5-(2-ethylhexyloxy)-1,4-phenylenevinylene)
MOS	Sensores óxido metal
NH₃	Amoníaco
OFET	<i>Organic field-effect transistors</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PANi	Polianilina
PBS	Tampão de fosfato salino
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PET	<i>Poly(ethylene terephthalate)</i>
PEDOT	<i>Poly(3,4-ethylenedioxythiophene)</i>
PEDOT:PSS	<i>Poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-poly(styrenesulfonate)</i>
P3HT	Poly(3-hexylthiophene-2,5-diyl)

PPV	Poli(p-fenileno vinileno)
PSS	<i>Poly(styrenesulfonate)</i>
PVC	Policloreto de polivinila
PVK	Poly(9-vinylcarbozole
RC	<i>Regenrated Cellulose</i>
RNA	Redes Neurais Artificiais
ROC	<i>Receiver of charactristics</i>
RPM	Rotações por minuto
R2R	<i>Roll-to-Roll</i>
S_{Aout}	Saída do sensor A
S_{Bout}	Saída do sensor B
sd	<i>Slot-die</i>
SnO₂	Dióxido de estanho
THF	Tetraidrofurano
TiO₂	Dióxido de titânio
TPR	Relação positiva verdadeira
UTI	Infeções do trato urinário
VOC	Compostos orgânicos voláteis
ZnO	Óxido de zinco
ZrO₂	Dióxido de zircônia

1 Introdução

1.1 Enquadramento e motivação

Ao longo da história da Humanidade, este já foi muitas vezes confrontado, por doenças e epidemias que não conseguia contrariar, devido ao escasso conhecimento científico em várias épocas, onde não se conheciam os sintomas das diferentes doenças e até as patologias mais comuns, podiam ter consequências fatais. Atualmente, estas lacunas já não são tão problemáticas devido à evolução científica, permitindo à sociedade combater as patologias e melhorar as suas condições de vida.

No entanto, os métodos de diagnóstico convencionais, aplicados para diagnosticar certas doenças, apresentam lacunas, uma vez que, uma grande parte destes métodos implicam grandes custos, necessitam de instrumentos sofisticados de análise, e, por vezes, implicam abordagens invasivas, podendo causar desconforto e *stress* nos pacientes [1]. Para se obter uma resposta específica, os diagnósticos existentes, para além de dispendiosos e demorados, baseiam-se em técnicas laboratoriais concretas, conseguindo-se, por sua vez, respostas quantitativas eficientes. Neste âmbito, torna-se relevante criar métodos viáveis que permitam diminuir o tempo necessário, para se obter um diagnóstico concreto das patologias e simultaneamente aproximar ao conceito cada vez mais relevante do *home care* [2].

Assim sendo e de forma a melhorar a eficácia dos métodos de diagnóstico e diminuir os riscos associados aos pacientes, principalmente, deve-se, desenvolver equipamentos que aliem a eficiência e os baixos custos monetários, de forma a potenciar a classificação de diversas soluções químicas ou compostos orgânicos voláteis (VOC) [3]. De entre os diversos equipamentos, os sensores *electronic nose* ou “nariz eletrónico” (*E-Nose*), e *electronic tongue* ou “língua eletrónica” (*E-Tongue*) sobressaem, uma vez que, são sensores de diagnóstico precoce, não invasivos, através da análise de VOC, associados, geralmente, a processos metabólicos do corpo humano e que são libertados para o meio ambiente, respetivamente [1].

Posto tudo isto, o foco principal desta investigação passa, por desenvolver sistemas que consigam diferenciar, de forma eficaz, os analitos específicos de determinadas patologias ginecológicas e do trato urinário. De forma específica, pretende-se estudar a eficácia e a potencialidade da aplicação de biossensores do tipo *E-Tongue/E-Nose* para deteção de analitos de interesse médico.

1.2 Objetivo e fundamentação

Com a rápida propagação do conceito de *home care*, as medidas preventivas na despistagem de patologias comuns na sociedade atual, tem levado a uma necessidade de desenvolvimento de técnicas não invasivas, *low cost*, de utilização simples e de resultados confiáveis, na prevenção e/ou acompanhamento médico. Paralelamente, os conceitos de prevenção e despistagem de doenças assumiram um interesse sem precedentes, na medida em que, de forma prática e simples, é possível dar um contributo inequívoco ao aumento da qualidade de vida e bem-estar. Por último, sistemas eficientes e rápidos de diagnóstico – mesmo que apenas qualitativo – de patologias de toda a espécie, é algo claramente que a comunidade médica deseja, e assim indicado pela Organização Mundial de Saúde (OMS).

De entre os conceitos do tipo de diagnóstico descrito, os sistemas baseados em biossensores, são cada vez mais dominantes. Aliado ao desenvolvimento de novas tecnologias, novos materiais e novos conceitos de engenharia, numa forma multidisciplinar em áreas de conhecimento tão vasto como a física, a química, a biologia, a eletrónica e demais, atualmente é possível colocar-se ao dispor de cada um, um vasto conjunto de meios de diagnóstico / despistagem / acompanhamento de patologias que, naturalmente, impactam na vida quotidiana. Nesta perspetiva, e dentro do conceito de biossensores, os tradicionais sistemas de “nariz eletrónico” (*E-Nose*) e “língua eletrónica” (*E-Tongue*) começam a ganhar a credibilidade e fiabilidade necessárias à sua futura introdução no mercado como sistemas de *home care* e/ou rápido diagnóstico (essencialmente qualitativo), permitindo, assim uma rápida resposta às necessidades cada vez mais evidentes de simplificação de atos médicos de análise. A utilização de biossensores *E-Nose/E-Tongue*, baseados em semicondutores orgânicos, tem sido destacado dos restantes, dada a abundância, baixo custo, biocompatibilidade molecular com analitos orgânicos e facilidade de fabrico desta classe de biossensores. Paralelamente (e de extrema importância de mercado) a facilidade de *scaling-up* dos sistemas de fabrico (como por exemplo, já anteriormente foi por nós desenvolvido em técnicas de *Roll-to-Roll* – R2R) ajudam ao aumento da investigação científica e tecnológica deste tipo de biossensores.

Naturalmente que como todas as tecnologias (e em particular nas áreas que impactam na saúde) existem sempre dificuldades a serem superadas de forma a dar a confiabilidade necessária a um produto em que se pretende depositar a confiança de diagnóstico médico, ainda por cima com a perspectiva de poder ser utilizado por qualquer pessoa na sua própria casa e por si própria. A par destes desenvolvimentos, os sistemas *E-Nose/E-Tongue* não fogem à regra. Por princípio são sistemas simples (embora necessitem de uma “memória de dados” comum aliás a todos os sistemas equivalentes) mas onde um único sensor, que embora é facilmente de muito alta sensibilidade, é, infelizmente, de muito baixa seletividade (para os padrões médicos). O resultado, desde os primórdios destes sistemas, foi simplesmente acrescentar mais sensores ao sistema, formando um conjunto de sensores que, sendo todos altamente sensitivos, têm, dentro da sua baixa seletividade, uma resposta diferenciada. Com o conjunto destas respostas diferenciadas é então facilmente obtida uma alta seletividade pelo processo da informação (seletividade cruzada). Até alguns anos a esta parte, estes sistemas eram impensáveis de sair de um laboratório dada a dificuldade de processamento de toda a informação obtida em cada sensor individual e procurar, dentro da mesma, um padrão de reconhecimento, hoje, porém, o problema está ultrapassado pela capacidade computacional de um simples microcontrolador facilmente incorporado num sistema portátil e de baixo custo.

Os grandes desafios que se colocam na atualidade, relativamente à utilização deste tipo de biossensor, prendem-se com a necessidade de otimização dos sensores individuais (geometria, padrão, dimensões, semicondutor utilizado) e com o fato de, na generalidade das situações, a análise de fluidos orgânicos envolve os dois conceitos (*E-Nose / E-Tongue*) na medida em que, despistagens assertivas podem envolver odores (libertados pela ação, por exemplo bacteriana ou fúngica) mas também análise de moléculas não odoríferas e apenas presentes em fluidos líquidos. Desta forma, sistemas independentes (*E-Nose / E-Tongue*) parecem ser de fato o futuro deste tipo de biossensor nos conceitos acima indicados. Neste conceito, será desenvolvido então, o trabalho proposto.

1.3 Estrutura do trabalho

Nesta base, a presente investigação encontra-se dividida em oito capítulos. No capítulo 1 é descrito o enquadramento, motivação, objetivo e fundamentação do trabalho que se propõe a fazer. Por sua vez, o capítulo 2 dedica-se à revisão de literatura, onde se encontram expostas as características inerentes aos biossensores utilizados, nomeadamente, a arquitetura, os tipos de *E-Nose/E-Tongue*, as vantagens e desvantagens da utilização destes dispositivos, bem como as aplicações médicas mais relevantes nos últimos anos, dando maior importância ao ramo da deteção de patologias do foro ginecológico e do trato urinário. No capítulo 3, introduzem-se os algoritmos de reconhecimento de padrões, mais precisamente a análise dos componentes principais (PCA) e as redes neuronais artificiais (RNA), suporte teórico ao estudo desenvolvido. O capítulo 4 enaltece os procedimentos experimentais aplicados neste trabalho, detalhando a fabricação dos elétrodos, os métodos de formação de filmes, os vários polímeros utilizados na formação dos mesmos, entre outros. Complementarmente, o capítulo 6 aborda a parte prática dos métodos utilizados, mais especificamente, o desenvolvimento dos elétrodos e a forma como foram preparados os vários polímeros com os diversos solventes associados a cada um. Posteriormente, no capítulo 7, são explorados os resultados obtidos do sistema *E-Nose, E-Tongue*, numa primeira instância de forma individualizada e, por conseguinte, os resultados obtidos do sistema conjugado e a discussão dos mesmos, de seguida detalhados os valores dos componentes principais dos diferentes biomarcadores e por fim a criação das RNAs. Por último, no capítulo 8 são descritas as principais conclusões, indicadas as principais limitações ao estudo e sugeridas as futuras linhas de investigação.

2 Estado de Arte dos sistemas de sensores

O termo sensor começou a ganhar maior relevância na comunidade científica na década de 1970, sendo parte integrante de muitos produtos de engenharia, sistemas e processos de fabricação. A *American National Standards Institute* (ANSI) define sensor como “um dispositivo que fornece uma saída utilizável em resposta a um estímulo específico, onde a saída é definida como uma grandeza elétrica e o estímulo é definido como uma grandeza física, propriedade ou condição que é medida” [4].

Os sensores devem preencher certos requisitos para serem aplicados no âmbito de investigação, nomeadamente estar em contacto direto com o analito sob estudo, transformando (em geral e na maior parte dos casos) medidas não elétricas em sinais elétricos; ter uma resposta rápida aos estímulos; trabalhar em modo contínuo, ou pelo menos, em ciclos contínuos e de dimensões reduzidas [4].

Existem diversos tipos de sensores que podem ser utilizados, dependendo do tipo de aplicação/objetivo que o utilizador pretenda, sendo otimizados para uma aplicação específica [4]. Os sensores podem ser classificados de diversas formas, das mais simples às mais complexas, como, por exemplo, as propriedades do sensor, materiais e meios de deteção utilizados, especificações, fenómenos de conversão, campo de aplicações ou estímulos, entre outros.

O objetivo da realização deste trabalho, corresponde à discriminação de diferentes VOCs provenientes de diferentes patologias ou a monitorização de moléculas alvo em soluções. Relativamente ao segundo caso, torna-se relevante abordar os sensores químicos, que fornecem informações acerca da concentração e informações gerais acerca da matriz onde a molécula está inserida [4].

Idealmente, um sensor responde de forma imediata em contacto com o analito alvo no meio em análise, produzindo um sinal de *output* mensurável de acordo com uma determinada concentração de analito. Porém, os sensores químicos apresentam dificuldades técnicas relacionadas com as medições e especificidades do sensor ao analito pretendido.

Estes sensores são baseados em duas unidades funcionais, uma parte recetora e uma parte transdutora. A parte recetora é responsável pela transformação da informação química em energia que pode ser medida por um transdutor. O recetor pode apresentar diferentes funcionalidades e funciona de acordo com diferentes princípios: princípio físico, quando não há reação química, princípio químico, quando ocorre reação química com o analito que origina o sinal e princípio bioquímico, quando um processo bioquímico origina o sinal. Na parte do transdutor, o dispositivo transforma as informações químicas num sinal analítico útil (usualmente elétrico que será o tipo a ser empregue neste trabalho) [4].

2.1 Conceito *E-Nose*

O *E-Nose* foi idealizado e proposto por Dodd e Persaud na Universidade de Warwick no Reino Unido em 1982 [5][6]. Anos depois, mais precisamente em 1993, Gardner e Bartlett definiram-no como sendo um dispositivo que consegue, com um conjunto de dados obtidos por sensores com uma certa especificidade e com um sistema de reconhecimento de padrões, reconhecer odores simples ou até mesmo os mais complexos [5][7].

De forma geral, o *E-Nose* é usualmente um sistema com um conjunto de sensores que tentam mimetizar o sistema olfativo humano como é exemplificado na Figura 1, apresentando contudo uma menor funcionalidade em termos gerais, na medida em que tem como objetivo uma determinada aplicação, como por exemplo, um biossensor para um odor específico, o que significa que o mesmo não funcionaria de forma eficiente quando colocado sobre efeito de outras condicionantes, contrariamente ao sistema olfativo [8].

Quando o ser humano inspira as moléculas voláteis presentes no ar inspirado atingem o epitélio olfativo ao longo do trajeto nasal, onde ocorre a interação entre os compostos voláteis e os recetores químico-sensoriais (neurónios olfativos), o que origina estímulos elétricos. Estes estímulos são transmitidos para o cérebro (córtex olfativos), sendo comparados com a informação previamente armazenada no mesmo com o intuito de identificar o tipo de aroma [8].

De notar, que cada neurónio olfativo pode detetar diversos tipos de odores, tal como o mesmo odor pode ser detetado por diferentes neurónios olfativos, ou seja, os recetores olfativos têm baixa especificidade, uma vez que, o mesmo recetor é capaz de reagir a mais do que um tipo de molécula de odor. Os sensores *E-Nose* funcionam sob o mesmo princípio. Na prática, e a não ser que sejam, especificamente, dotados de recetores específicos, os sensores do tipo *E-Nose* são de baixa seletividade, mas de alta sensibilidade [8].

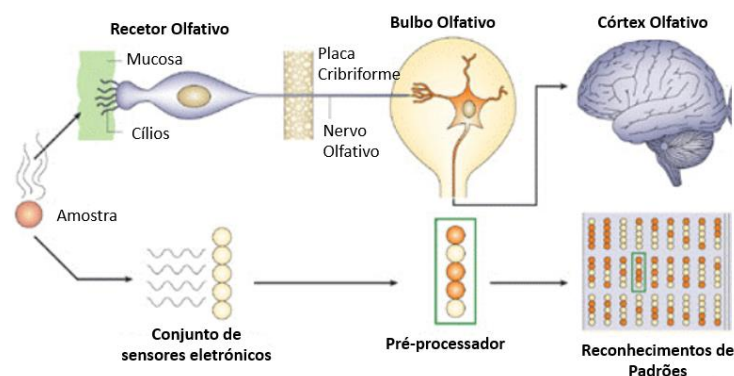


Figura 1- Esquema representativo da analogia entre o *E-Nose* e o sistema olfativo humano. Adaptado de [8].

Segundo M. T. Kalit et al, é necessário ter em especial atenção que este tipo de sensor não fornece informações acerca da constituição dos compostos, mas apenas fornece uma impressão digital (*fingerprint*) dos aromas/análito que se pretende detetar [8].

A interação entre os componentes voláteis e os sensores desencadeia uma série de sinais que são processados matematicamente por algoritmos de reconhecimento de padrões (adiante na secção 3) representado na Figura 1.

Este tipo de sensor pode ser aplicado em várias áreas, principalmente na indústria alimentar, como por exemplo, na área dos laticínios [8] e que apresentam muito potencial na área de diagnóstico médico, nomeadamente aplicado a patologias como diabetes [9] e gastrointestinais [1], uma vez que, com a utilização dos mesmos pode-se obter diagnósticos mais rápidos e em estágios mais precoces, sem abordagens invasivas e podendo ser aplicado num dispositivo portátil [10][11][12], onde a própria pessoa pode realizar os exames de rastreio. Já demonstrou ser eficaz em algumas áreas através testes extensivos, representado na Figura 2, como: controlo da qualidade da comida, nomeadamente, o estado de degradações da mesma e das bebidas alcoólicas; monitorização ambiental, como das águas residuais e de líquidos inflamáveis; em produtos de beleza, prevenção de bioterrorismo, fragâncias, classificação de diferentes tipos de medicamentos naturais [13] e em alguns diagnósticos médicos, através da deteção e classificação de VOC num fluido ou combinação de fluidos corporais liberados, podendo fornecer algumas informações sobre doenças, comportamento, estado emocional e estado de saúde de uma pessoa, como por exemplo, na deteção de biomarcadores cancerígenos que são muito importantes na deteção precoce desta doença [5][11][14][15].

As aplicações do *E-Nose*, em deteções de doenças cobrem várias áreas, e capacidades, como por exemplo, a identificação de distúrbios renais através da análise do odor da urina dos pacientes e ainda Phillips e seus colaboradores conseguiram comprovar através da respiração humana a deteção do cancro do pulmão e cancro da mama [5], entre outros que serão pormenorizados na secção 2.5.



Figura 2- Aplicações atuais do sistema *E-Nose*. Adaptado de [7].

2.2 Arquitetura de um *E-Nose*

A arquitetura dos diferentes tipos de *E-Nose* de uma forma genérica, representada na seguinte figura, pode ser subdividida em quatro elementos fundamentais[10][11][16]:

- I. *Um sistema de entrega da amostra, que alterna entre o ar testado e o ar de referência;*
- II. *Uma câmara de deteção, onde ocorre a interação entre os odores e os sensores produzindo os sinais elétricos;*
- III. *Um sistema de controlo e aquisição de dados, responsável pela colheita dos sinais gerados com a adsorção dos componentes voláteis na câmara de deteção para um computador;*
- IV. *Software para extração de features e algoritmos de reconhecimento de padrões.*

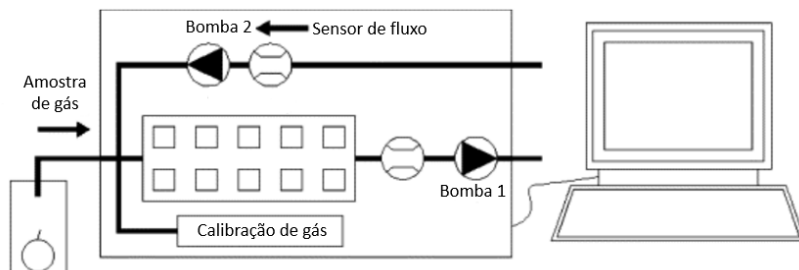


Figura 3– Representação esquemática de um nariz eletrônico. Adaptado de [8].

O sistema de entrega é formado por um compressor e um regulador de pressão dentro ou fora do dispositivo, como é exemplificado na Figura 3, onde o sistema é constituído por duas bombas de ar, tubos e conectores que transferem os componentes voláteis da amostra que se pretende analisar a partir da câmara de amostra (estado *on*) ou o ar ambiental (estado *off*) para a câmara de deteção. Um módulo de controlo muda o estado da bomba em cada período, tal como é representado na Figura 3 [10][11][16].

Relativamente, aos materiais de deteção de componentes voláteis, os mais usados são óxidos metálicos, polímeros condutores e compósitos. Além disso, sensores de ondas acústicas de superfície, transistores de efeito de campo sensíveis ao gás, sensores de quartzo, e sistemas microeletromecânicos associados com nanomateriais também podem ser usados na deteção de VOCs [16], como é detalhado em [10]. Existe ainda a opção de adicionar o controlo da temperatura e da humidade, dependendo das condições específicas para a realização dos testes [10].

2.3 Tipos de sensores *E-Nose*

2.3.1 Sensores óxido metal (MOS)

Os sensores de óxido de metal são constituídos por um substrato de cerâmica revestida com um filme semicondutor de óxido metálico que reage com o oxigênio do ar. Existem diferentes filmes semicondutores que podem ser utilizados neste tipo de sensor, como por exemplo, dióxido de titânio (TiO₂), dióxido de estanho (SnO₂), óxido de zinco (ZnO), dióxido de zircônia (ZrO₂), entre outros. Durante o funcionamento do sensor, quando este é exposto a componentes voláteis, a resistência do óxido de metal é alterada devido à adsorção dos componentes, reagindo com o oxigênio por reações de oxidação/redução. De forma ideal, a alteração do valor da resistência elétrica do sensor apenas deve acontecer quando este entra em contacto com uma amostra em específico. Sensores MOS interagem com diversos tipos de moléculas como álcoois, amônia, butano, monóxido de carbono, cloro, etileno, heptano, hexano, hidrogênio, sulfeto de hidrogênio, metano, dióxido de nitrogênio, ozono, propano, dióxido de enxofre e tolueno [8][16].

2.3.2 Sensores de polímero condutor orgânico

Certos polímeros apresentam algumas características que permitem que os mesmos conduzam corrente elétrica, conjugando a estrutura característica de um polímero com as propriedades elétricas típicas encontradas nos metais ou semicondutores, podendo-se denominar estes materiais como polímeros condutores [17], como por exemplo, a polianilina (PANi), o *regio-regular* poly(3-hexylthiophene-2,5-diyl) (P3HT), o *Poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-poly(styrenesulfonate)* (PEDOT:PSS), entre outros, e devido a essa característica são amplamente utilizados na indústria de sensores.

Estes sensores são constituídos por polímeros depositados num substrato de cerâmica, vidro ou poliestireno (ou outro polímero termoplástico), e ficam entre dois elétrodos (no substrato) condutores. Quando são expostos a moléculas voláteis alteram consideravelmente o valor da condutividade, o que permite com que os mesmos respondam a vários estímulos químicos e/ou físicos [8]. Uma desvantagem destes sensores é a sua alta absorção de vapor de água, que diminui o número de ligações disponíveis para os componentes voláteis. Pode-se contrariar esta desvantagem através da utilização de filtros.

Quando estes elementos estão num estado puro, sem dopantes, podem não exibir uma boa condutividade, e para se poder contrariar tal aspeto, existe a necessidade de o dopar através de elementos específicos, que permitem aumentar a sua condutividade em várias ordens de grandeza. Este processo ocorre através de reações de redução e oxidação ou através de processos de protonação ou desprotonação. A oxidação/redução, através da introdução de dopantes, remove/adiciona eletrões que atuam como transportadores de carga [17].

A característica mais interessante destes materiais corresponde à sua capacidade de reverter o seu comportamento de *redox*, o que significa que se pode reverter o seu estado dopado através da compensação dos transportadores de carga [17].

É relevante, ainda referir que a interação entre os polímeros condutíveis e os analitos gasosos ocorre principalmente através de fenómenos de absorção e adsorção. No primeiro caso, após os sensores entrarem em contacto com os analitos não conseguem reverter o estado de absorção, apenas podendo ser usados uma vez [17].

2.4 Vantagens e desvantagens do *E-Nose*

Na escolha da utilização de determinado sensor, é sempre tido em conta um balanço entre as potencialidades e falhas do mesmo aplicadas ao objetivo pretendido. No caso do *E-Nose*, é relevante abordar algumas das características como a sensibilidade, a seletividade e o custo [18].

A principal vantagem de um sensor *E-Nose* consiste, no facto, de este, uma vez calibrado, poder avaliar de forma continua o analito/aroma ao longo de todo o processo de produção, com custos mínimos [8]. Combinado com técnicas de reconhecimento de padrões, um nariz eletrônico representa uma ferramenta rápida e eficiente para a classificação de compostos voláteis, sem necessidade de procedimentos de separação.

Estes são relativamente simples, de fácil transporte, *low cost* e ainda podem ser aplicados numa grande variedade de áreas, como demonstrado na Figura 2, o que fez com que os mesmos ganhassem cada vez mais relevância na comunidade científica [7].

As características mais relevantes a ter em consideração são, a sensibilidade e a seletividade dos mesmos. Os sensores presentes neste sistema, apresentam uma ampla sensibilidade e uma reduzida seletividade, como já referido, o que pode ser um problema quando se pretende que os mesmos reagem apenas a um determinado odor. Existe ainda um potencial mínimo necessário para que o mesmo acione o seu funcionamento, o que não facilita a sua utilização quando as concentrações dos odores são muito baixas [19]. A fim de aumentar a seletividade, cada sistema *E-Nose* é constituído por um conjunto de matrizes de sensores únicos, que, contudo, não podem ser substituídos sem que ocorra primeiramente a recalibração do novo sensor.

2.5 Aplicações do sistema *E-Nose* na saúde

A Tabela 1, evidencia as vantagens e desvantagens da aplicação do sistema *E-Nose* aplicado na deteção de doenças do trato intestinal:

Tabela 1- Principais vantagens e desvantagens do sensor *E-Nose* no diagnóstico de doenças clínicas. Adaptado de [1].

Critério de avaliação ¹	Vantagens	Desvantagens
Custos de análise	Baixos custos; Fornecer um perfil coletivo mais simples de todos os metabolitos VOC presentes na amostra.	VOCs individuais não identificados (exceto com técnicas combinadas de Instrumentos <i>E-Nose</i>).
Aplicação clínica e de campo	Altamente aplicável para uso clínico, alto rendimento de amostra, portátil para uso clínico, em ambientes hospitalares ou em campo.	A mobilidade pode ser limitada por potência, peso ou requisitos de espaço.
Análise de dados	Análises mais simples e diretas com interpretações mais fáceis dos resultados.	O nível de discriminação da amostra é crítico.
Nível de dificuldade	Relativamente fácil de operar e obter resultados com base em perfis VOC (em comparação com bancos de dados de referência).	Comparações de dados entre dispositivos (de resultados) geralmente não é possível.
Tempo necessário para o diagnóstico	Diagnósticos preliminares relativamente rápidos; Resultados em tempo real.	Confirmações com outros dados de diagnóstico podem ser necessárias.
Reprodutibilidade	A precisão nos valores da saída do sensor é uma das características do nariz eletrônico, mas os resultados podem variar sem o QA / QC adequado.	A deriva do sensor ao longo do tempo afeta a reprodutibilidade.

¹QA / QC = garantia de qualidade / controlo de qualidade.

Os tipos específicos de elementos patogênicos, envolvidos no desenvolvimento da doença, determinam amplamente os mecanismos da doença, os processos metabólicos do hospedeiro e as vias afetadas pela patologia. Desta forma, é muito importante identificar os biomarcadores metabólicos voláteis [1].

A evolução da descoberta de biomarcadores, associados a certas doenças nas áreas veterinária e aquacultura, tem facilitado o diagnóstico de doenças de animais e fornecido pistas para identificar possíveis biomarcadores de doenças semelhantes em humanos [1].

Paralelamente, a detecção de biomarcadores VOC de doença por meio de métodos metabólicos, usados individualmente ou em combinação com várias tecnologias de *E-Nose*, tem-se mostrado uma ferramenta poderosa e complementar para diagnóstico eficaz de doenças [1].

2.5.1 Detecção de doenças do sistema urinário

A urina tem muitos componentes e varia dependendo vários fatores, incluindo idade, condição hormonal, atividade física, consumo de alimentos e condição do sistema do trato urinário. A identificação de biomarcadores na urina de forma a obter diagnósticos precoces e de forma não invasiva tem sido alvo de muitas pesquisas, nomeadamente no diagnóstico do cancro da bexiga [20].

De forma, a estudar a eficácia da detecção de doenças do sistema urinário efetuou-se um estudo com amostras de urina de 36 pacientes com cancro da bexiga, 29 pessoas com litíase urinária, mais vulgarmente conhecida como doença da pedra dos rins, dez pacientes com infeções do trato urinário (UTI) e 27 voluntários saudáveis do Hospital da Universidade de Kitasato [20].

O modelo de *E-Nose*, usado para a realização desta investigação, corresponde a um modelo disponível comercialmente denominado *E-Nose R* integral, constituído por quatro sensores eletroquímicos com um óxido semiconductor metálico [20].

O sensor *A* é, principalmente, sensível a moléculas voláteis de grandes dimensões e o sensor *B* é sensível a pequenas moléculas voláteis. A saída do sensor *A* (*SAout*) determina a posição no eixo *X* e a saída do sensor *B* (*SBout*) no eixo *Y*, resultando num vetor de odor (*V*). A intensidade do odor é determinado, matematicamente, pelo comprimento do *V* determinado pelos dois sensores [20].

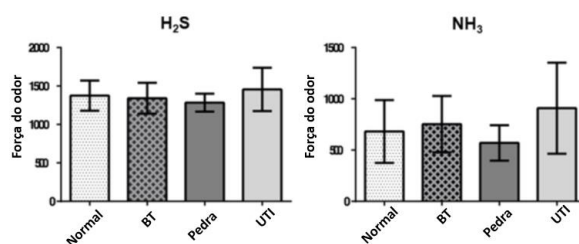


Figura 4- Esquema da força dos componentes voláteis H₂S e NH₃ das amostras de urina. Normal: voluntários saudáveis; BT: cancro de bexiga; pedra: urolitíase; ITU: infeção do trato urinário. O erro padrão da média é indicado pelas barras. Adaptado de [20].

A força de odor é definida pelo número de *features* presentes durante uma medição. Este sensor contou o número de cada *feature* de odor durante uma medição. A intensidade de NH₃ volátil (sensor C) e H₂S (sensor D) também foram medidos. O ar ambiente foi usado como gás de transporte. O dispositivo foi conectado a um computador com software para monitorizar e registar os dados. OS resultados obtidos estão representados na Figura 4.

Este estudo, evidenciou que é possível distinguir o cancro da bexiga das restantes condições estudadas. O diagnóstico precoce pode originar um tratamento mais adequado e antecipado, o que resulta em menos perdas de função, e uma maior taxa de sobrevivência. Desta forma, o estudo pode afirmar que o sistema *E-Nose* pode-se tornar uma ferramenta de diagnóstico para excluir pacientes com litíase urinária e ITU, ou então para a seleção de pacientes que necessitam de procedimentos mais invasivos, como a cistoscopia[20].

2.5.2 Detecção de amins características de vaginose bacteriana

A *vaginose bacteriana* é uma das doenças mais comuns nas mulheres em idade fértil, causada pela variação do pH vaginal acompanhado de um crescimento bacteriano excessivo, produzindo amins características como a *tiramina*, *trimetilamina*, *putrescina*, *cadaverina*, entre outras. A *vaginose bacteriana* corresponde à transição entre uma comunidade bacteriana dominante de *Lactobacillus* para uma

comunidade com maior diversidade e abundância de bactérias anaeróbicas. Esta doença é caracterizada por um mau odor vaginal (semelhante a “peixe”) e um corrimento aguado/acinzentado [21], e se não tratada de forma rápida pode-se tornar recorrente, causando desconforto e dores. Esta doença é associada a uma vasta gama de problemas de saúde como doenças inflamatórias pélvicas, aumento da suscetibilidade à infecção do vírus da imunodeficiência Humana (HIV), nascimento prematuros, entre outros problemas de saúde [21].

O órgão genital feminino apresenta um pH de cerca de 4. A manutenção do pH ácido nesta região é essencial na prevenção e controlo de doenças [22], papel desempenhado pelas colónias de bactérias de *Lactobacillus* no estado de eubiose.

A flora vaginal, apresenta cerca de 50 estirpes bacterianas num estado de harmonia, entre os agentes patogénicos e não patogénicos. Cerca de 95% dessas bactérias correspondem a *Lactobacillus* que mantêm o pH da flora vaginal. Estas bactérias produzem produtos metabólicos com o objetivo de criar condições favoráveis à sua sobrevivência e terem vantagem sobre outros tipos de bactérias. Em específico, a espécie *Lactobacillus* produz ácido láctico, peróxido de hidrogénio, entre outros, representada na Figura 5, apresentando uma comunidade bacteriana dominante de *Lactobacillus crispus*.

Quando existe um desequilíbrio imunológico, certos fungos, nomeadamente a *Candida species* presentes no trato da flora vaginal possuem a capacidade de deixarem de serem comensais para se tornarem patogénicas, aproveitando-se desse estado de imunossupressão, multiplicando-se de forma anormal provocando uma infecção vaginal. Através desta produção bacteriana anormal ocorre a produção de produtos químicos (aminas), tais como *cadaverina* e *putrescina*, que originam o cheiro característico desta doença. Esta transição inclui a formação de biofilme resistente ao combate imunológico característico do hospedeiro e até mesmo a capacidade de evasão do mesmo, aderência à camada da superfície do hospedeiro e a transição de levedura (fungo comensal) para hifas, o que agrava a patologia [23], representado na Figura 5.

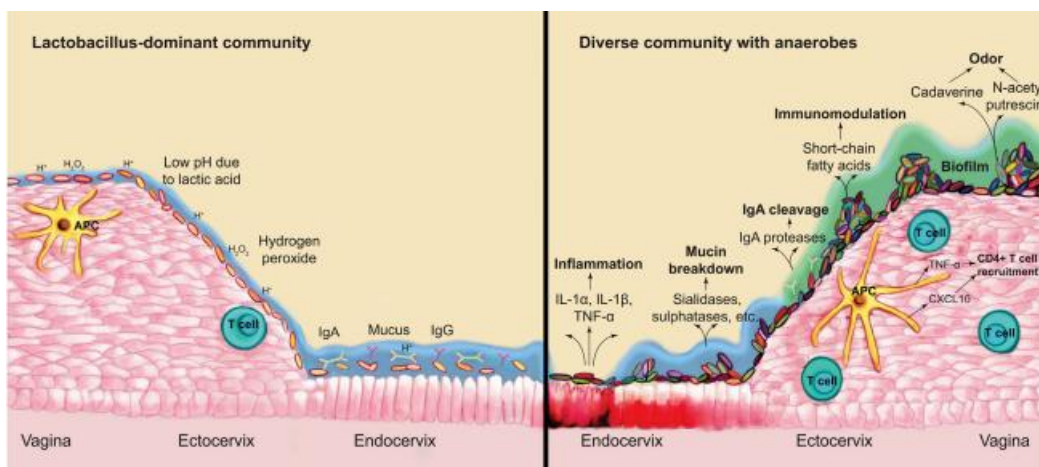


Figura 5- Modelação do Microambiente da flora genital por Comunidades Bacterianas Residentes. Retirado de [21].

A lista de possíveis agentes, que podem despoletar a *vaginose bacteriana*, inclui colónias de vários géneros, incluindo *Gardnerella*, *Atopobium*, *Prevotella*, *Peptostreptococcus*, *Mobiluncus*, *Sneathia*, *Leptotrichia*, *Mycoplasma*, a bactéria associada à BV 1 (BVAB1) a BVAB3, *Enterococcus* e *Escherichia coli* (E.coli) [21].

O BVAB1 encontra-se associado à produção de poliaminas, como a *putrescina*, *cadaverina*, e *trimetilamina*, que podem aumentar o pH vaginal e promover o crescimento de outras bactérias anaeróbicas. Desta forma, este é normalmente associado a BVAB3 e *Prevotella*, representando uma relação de sinergia entre estas bactérias [21]. Os testes, por sua vez, associam *Gardnerella vaginalis*, ao odor de amina, com a produção de *putrescina*, pH > 4.5 e à produção de biofilme no trato vaginal. Estas colónias normalmente são detetadas juntamente com colónias de *Atopobium vaginae*, que através de danos diretos nos tecidos e inflamação fragilizam a barreira do epitélio vaginal. As espécies de *Prevotella* são capazes de produzir poliaminas incluindo *putrescina*, *cadaverina* e *trimetilamina* durante a atividade metabólica normal. Devido

à heterogeneidade genética e fenotípica do *Peptostreptococcus*, foram propostos vários novos géneros, incluindo *Fingoldia*, *Parvimonas*, *Gallicola*, *Peptoniphilus* e *Anaerococcus*. O *Peptoniphilus*, que inclui espécies produtoras de butirato, está associado a casos sistemáticos de *vaginose bacteriana* [21]. A *tiramina* é sintetizada por várias espécies de *Enterococcus* pela descarboxilação da tirosina [24]. A *E.coli* produz *cadaverina*, durante o crescimento anaeróbico, na presença do precursor lisina. *Mobiluncus mulieris* e *Mobiluncu curtisii* produzem *tirametilamina*, a partir da redução do óxido de *trimetilamina*. Estas são as principais vias anaeróbicas da produção das aminas, biomarcadores da *vaginose bacteriana*. Certas colónias produzem certos tipos de aminas e desta forma é importante distingui-las com precisão, de forma a melhorar os diagnósticos.

Relativamente aos testes da deteção de aminas utilizando o sistema *E-Nose*, não existem, tanto quanto se saiba, aplicações (específicas em tipo de aminas e mesmo na generalidade) na literatura relativas à *vaginose bacteriana*.

Um sistema eletrónico portátil *E-Nose*, baseado em sete sensores piezoelétricos, foi utilizado para a deteção de biomoléculas voláteis (aminas, cetonas, aldeídos, ácidos carbónicos) através da análise dos compostos voláteis do muco cervical (principal componente do corrimento vaginal), amostras retiradas obtidas diretamente no consultório [25]. Foram ainda desenvolvidos, biossensores de odores orgânicos baseados em PEDOT:PSS em grandes escalas através do método R2R, semelhantes aos utilizados neste trabalho, conseguindo-se detetar colónias de *Lactobacillus* [26].

De grosso modo, esta investigação pretende detetar as aminas características de doenças ginecológicas como *putrescina*, *tiramina* e *trimetilamina*, de modo a obter diagnósticos precoces e de forma não invasiva. Neste âmbito e visto que a maioria dos métodos utilizados, atualmente, demoram em média um a seis dias para se obterem resultados, como inoculação bacteriológica, análise microscópica, imunoensaio enzimático e reação de polimerização em cadeia [25].

2.6 Conceito *E-Tongue*

O sensor denominado *E-Tongue*, foi criado pela primeira vez em 1990, por Hayashi *et al*, sendo construído o seu primeiro protótipo, surgindo da necessidade da deteção, classificação e distinção de diferentes substratos, funcionando de acordo com conceitos semelhantes ao *E-Nose*, mas para análise de líquidos [8]. Este sensor apresenta diversas vantagens relativamente a sensores mais sofisticados aplicados em investigação, sendo, nomeadamente, um sensor barato, rápido e aplica métodos objetivos na avaliação dos componentes das diferentes matrizes [4].

Os sistemas de *sensing* da língua eletrónica tentam mimetizar a língua do ser humano, que pode detetar cinco sabores diferentes: salgado, azedo, doce, amargo e umami e a sua comunicação com o cérebro humano [4][8]. Estes sentidos da língua humana correspondem a reações físico-químicas originados pelas moléculas dos alimentos presentes nas papilas gustativas (órgãos recetores gustativos), correspondendo este processo à sensação do paladar.

No processo de deteção do sabor, uma série de impulsos elétricos são produzidos com diferentes intensidades, dependendo do tipo de alimento presente nos órgãos recetores, sendo transmitidos para o cérebro (transdutor) onde são comparados com a informação previamente armazenada no mesmo, com o intuito de realizar a codificação do tipo de sabor. O sensor *E-Tongue*, funciona de forma análoga, através de um conjunto de sensores que medem sinais elétricos que podem ser interpretados por diversos métodos matemáticos, que serão detalhados numa secção seguinte, fornecendo informações sobre a presença da molécula alvo e o valor da sua concentração na matriz complexa das soluções [4]. Esta analogia entre o sensor *E-Tongue* está representada na Figura 6.

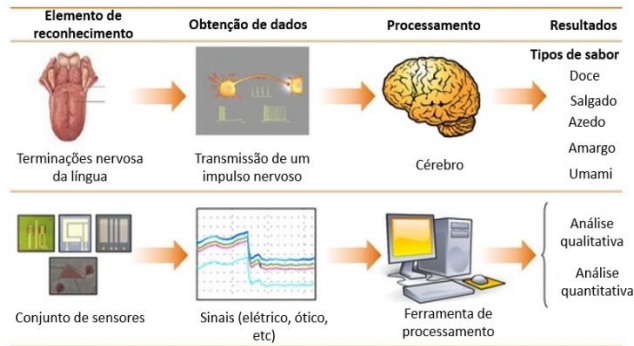


Figura 6- Esquema representativo da analogia entre o *E-Tongue* e o sistema olfativo humano. Adaptado de [27].

A matriz de sensores produz sinais que não são necessariamente específicos para uma determinada espécie, mas formam um padrão que pode ser correlacionado a certos recursos ou qualidades da amostra [8].

Em suma, o *E-Tongue* encontra-se em conformidade com o *E-Nose*, baseado em sensores químicos de alta sensibilidade mas com baixa seletividade, exibindo sensibilidade cruzada para diversos componentes em líquidos e pode ser considerado como “um sistema multisensorial formado por uma série de sensores de baixa seletividade, combinados com processamentos matemáticos avançados para processamento de sinal, com base no reconhecimento de padrões e/ou análise de dados multivariada” [4].

Os sensores químicos, podem ser aplicados em diferentes áreas e desde a sua criação, já foram aplicados para análise de água [4], análise de alimentos, como por exemplo, cerveja, leite, sumo, café e chá, e é muito utilizado para monitorização ambiental [28], demonstrando a sua capacidade de obter informações analíticas de multicomponentes, em tempo real, com um procedimento de medição direto e relativamente simples, apresentando robustez, baixo preço, versatilidade e velocidade de resposta [29]. Pode-se ainda, combinar sistemas de sensores *E-Tongue* e *E-Nose* que foram aplicados na classificação de amostras de urina [4].

2.7 Arquitetura do sistema *E-Tongue*

Os componentes básicos do sistema de *E-Tongue*, e que se encontram representados na Figura 7, podem ser subdivididos nas seguintes componentes:

- I. Matriz de sensores imersos ou cobertos com amostras líquidas [4];
- II. Transdutor responsável pela transformação das componentes detetadas no recetor do sensor num sinal elétrico [4];
- III. Um sistema de controlo e aquisição de dados, responsável pela colheita dos sinais gerados com a adsorção dos componentes para um computador[4];
- IV. Software para extração de *features* e algoritmos de reconhecimento de padrões [4].

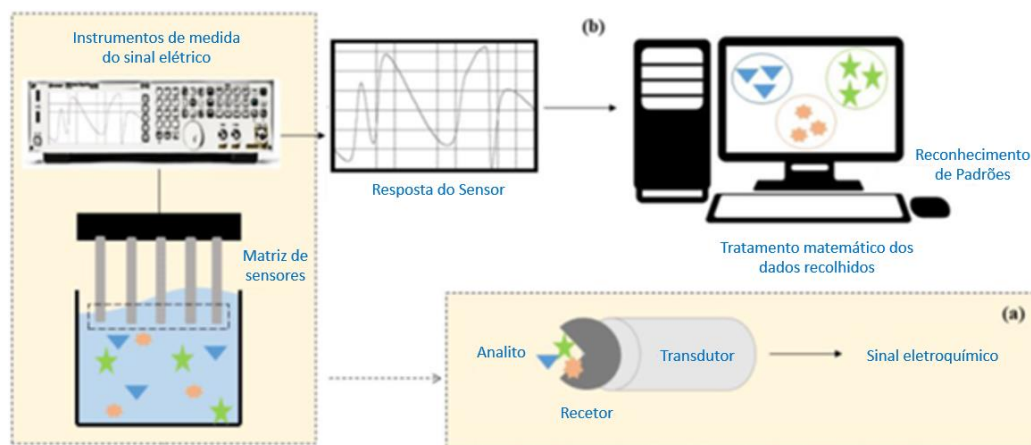


Figura 7- Representação esquemática de uma *E-Tongue*. Adaptado de [4].

Geralmente, os sinais elétricos medidos numa matriz de sensores imersos ou cobertos com soluções líquidas são adquiridos e processados por modelos matemáticos, detalhados na secção 3, de forma a obter um padrão [4]. Tal como referido anteriormente, os padrões permitem comparar os resultados obtidos a partir dos dados usados para calibrar o sistema com bases de dados já recolhidas a partir de soluções complexas testadas previamente, em que a composição das mesmas foi cuidadosamente estudada/analísada. Cada matriz de sensores apresenta uma base de dados diferente e deve ser obtida para cada matriz de sensores antes de ser aplicada em qualquer área que a mesma se enquadre [4]. Neste tipo de sensores, é muito importante controlar a temperatura ou o fluxo a que a amostra líquida está sujeita, uma vez que, as propriedades elétricas dependem da temperatura ou do ambiente à sua volta. Uma variedade de sensores, desde óticos a baseados em espectrometria de massa, têm sido empregues no *design* de *E-Tongue*, mas os dispositivos eletroquímicos são os mais comuns, em particular com base em dispositivos baseados em potenciométrica e voltamétrica [30].

2.8 Vantagens do *E-Tongue*

A *E-Tongue* apresenta vantagens potenciais para além das referidas anteriormente:

- I. O pré-tratamento da amostra pode não ser obrigatório;
- II. A fonte de erros devido ao transporte ou armazenamento da amostra pode ser drasticamente reduzido ou eliminado;
- III. Uma resposta rápida pode ser alcançada em emergências ambientais. A possibilidade de monitorização ambiental em tempo real, operando em escalas de longo prazo pode habilitar a coleta de dados, que pode ser crucial para a compreensão de toda a gama de contaminação potencial em todos as suas fases.

2.9 Aplicações do sistema *E-tongue* na saúde

2.9.1 Análises clínicas

No campo da saúde, várias matrizes *E-Tongue* de sensores potenciométricos, voltamétricos e/ou impedimétricos foram relatados, destacando assim a sua versatilidade para aplicações médicas [30].

Dispositivos potenciométricos têm sido usados para analisar vários fluidos biológicos, incluindo sangue, urina e suor, através da utilização de um dispositivo com eléctrodos seletivos de iões (IES) para a determinação simultânea de iões de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , HCO_3^- , Cl^- , H^+ e HPO_4^{2-} . A matriz de sensores utilizada tinha como base materiais de policloreto de polivinila (PVC) [30].

2.9.2 Detecção de disfunções do sistema urinário

Através da análise de amostras de urina, é possível avaliar a concentração de sódio, que apresenta grande relevância clínica, uma vez que dependo da concentração deste elemento na urina pode indicar diferentes disfunções. Especificamente, baixas concentrações de sódio na urina podem indicar desidratação, enquanto concentrações elevadas de sódio na urina sugerem insuficiência renal aguda [30].

Pode-se adotar um sistema *E-Tongue* constituído por sensores metálicos miniaturizados e IES com membranas poliméricas de PVC de forma a detetar disfunções do sistema urinário e níveis de creatina. Este sistema mostrou-se eficaz no diagnóstico e monitorização de pacientes com tumor na bexiga, através da análise quantitativa de sódio, potássio, amónia, cálcio, cloreto, sulfato, fosfato, urato e creatina.

2.9.3 Detecção de ácido ascórbico e ácido úrico

O ácido ascórbico (AA), vulgarmente conhecida como vitamina C, utilizado como antioxidante, é uma vitamina hidrossolúvel presente em diversos alimentos (frutas e legumes), tendo como função, no corpo humano, a produção de colágeno, a absorção de ferro e o funcionamento do sistema imunológico [31]. A concentração do AA pode variar no corpo do ser humano de acordo com a alimentação tendo efeitos adversos em concentrações excessivas de AA, o que originar dores de cabeça, problemas de sono, desconforto gastrointestinal, entre outros, e em concentrações baixas, pode provocar escorbuto, caracterizado pela anemia e gengivite [32]. O ácido úrico (AU) é uma substância produzida no fígado resultante da composição da purina. Concentrações anormais são indícios de hiperuricemia, o que pode resultar em gota, ou seja, o acúmulo de cristais de AU nas articulações, entre outras [32]. Os dois analitos coexistem em fluidos biológicos, sendo fulcral criar um método que os discrimine, de forma, a facilitar o diagnóstico de certas doenças [32].

A literatura não demonstra aplicações com o sistema *E-Tongue*, com o método que se pretende utilizar, sendo que a maior parte da deteção individual ou simultânea é efetuada por outros métodos dispendiosos como: espectrofluorimetria (espectroscopia de fluorescência), espectrofotometria (método de análise ótico), cromatografia (técnica analítica) e eletroforese de zona capilar. Para além, destes métodos dispendiosos na literatura ainda se utiliza outra técnica denominada voltametria cíclica, onde se deteta os picos de oxidação e redução dos diversos biomarcadores [31] [32].

2.9.4 Diagnóstico de doenças gastrointestinais

Um dispositivo multieléctrodo *E-Tongue wireless* engolível, incorporando diferentes técnicas de deteção voltamétrica, como por exemplo, voltametria cíclica, que permite a caracterização não específica em tempo real de fluidos intestinais, auxiliando no processo de diagnóstico de doenças gastrointestinais, como a doença de *Crohn* e colite ulcerativa. Os resultados satisfatórios obtidos, através dos testes, comparáveis à técnicas convencionais, nomeadamente o exame eletroquímico de águas fecais, comprovam o potencial da língua eletrónica como uma ferramenta de diagnóstico do trato gastrointestinal *in vitro* ou *in vivo* [30].

2.9.5 Detecção de aminas características da *vaginose bacteriana*

Relativamente, a estudos efetuados anteriormente com o sistema *E-Tongue*, de forma a detetar aminas características da *vaginose bacteriana* a maior parte deste testes são relacionados com a avaliação da qualidade dos alimentos frescos [33]. Na literatura, ainda se encontram testes efetuados com *Organic field-effect transistors* (OFET), mais especificamente um OFET do tipo *extended-gate* utilizado na deteção de aminas (*putrescina*, *cadaverina* e *tiramina*) numa solução aquosa [34]. Por último, a elaboração de sensores enzimáticos baseados no mesmo tipo de OFET realizando experiências de titulação para a *putrescina*, *cadaverina* e *tiramina*, entre outras aminas [35].

3 Algoritmo de reconhecimento de padrões

Independentemente da escolha de qual sistema usar para monitorar matrizes em solução ou de componentes voláteis, as complexidades das informações extraídas envolverão uma análise de um grande número de variáveis. Algumas dessas variáveis, não são significativas na interpretação dos resultados, e apenas as informações relevantes são armazenadas, reduzindo assim o volume de dados. Assim, sem perder informações, os dados relevantes podem ser obtidos usando métodos estatísticos que irão reduzir o volume de informação, permitindo simultaneamente manter o padrão de caracterização [4].

Os algoritmos de reconhecimento de padrões, consistem nas seguintes etapas sequenciais: pré processamento do sinal; redução da dimensão dos dados; previsão e validação. Na etapa de pré processamento é efetuada uma calibração do sistema, ou seja, é preparado o vetor das *features* para o processamento efetuado a seguir [4].

A escolha do método, depende do tipo de dados de entrada disponíveis adquiridos dos sensores e o tipo de informação que se pretende apurar. As saídas analógicas geradas pelos sensores precisam ser analisadas e interpretadas, de forma a que forneçam informações úteis [4].

Existem diferentes métodos avançados com base no tratamento estatístico de dados que podem ser usados para efetuar a extração de *features* e para encontrar os parâmetros mais importantes, que são detalhadas nos seguintes subtópicos.

A primeira abordagem para a classificação da amostra envolve tipicamente análise gráfica e comparação de amostras ou comparação da identificação de elementos desconhecidos com a informação de fontes conhecidas em bibliotecas[4].

3.1.1 Funcionamento do sistema *E-Nose* e *E-Tongue*

Tal como referido, um sistema *E-Nose* ou *E-Tongue* é formado por um conjunto de sensores de gás ou de soluções, correspondentemente, com seletividades diferentes, uma unidade de aquisição de sinal e um software de reconhecimento de padrões adequado, todos controlados e executados por um *software*[16].

O processo pode ser dividido em três etapas principais, demonstrada na Figura 8, exemplificando o *E-Nose*, nomeadamente:

- I. *Matriz de sensores múltiplos;*
- II. *Sistema de aquisição de dados;*
- III. *Algoritmo de reconhecimento de padrões.*

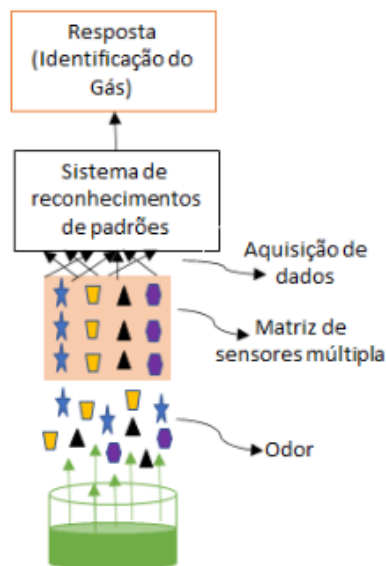


Figura 8- Esquema representativo dos processos de tratamento de dados num sistema *E-Nose*. Adaptado de [2].

I. Matriz de sensores múltiplos

A base deste método, a matriz de sensores múltiplos, consiste num conjunto de sensores químicos capazes de transformar alterações químicas em sinais mensuráveis, medidos em resistência ou em capacidade [7], assemelhando-se ao efeito que ocorre nos recetores olfativos/gustativos.

Os elementos que constituem os sensores dependem do tipo de analito que se pretende detetar. Para que se possa, retirar conclusões dos dados adquiridos, é necessário que exista uma combinação equilibrada de tipos de sensores, controlando os graus de liberdade [7].

Atualmente, vários sensores ou, mais especificamente, as fusões de dados com sensores são mais favoráveis que um único sensor devido a vantagens significativas em relação a um único, aumentando-se a seletividade [36].

Considerando, por exemplo, sensores à base de semicondutores orgânicos, quando se utiliza um conjunto de sensores podemos variar duas das suas características, a estrutura e/ou o tipo de polímero utilizado. Normalmente, uma das variáveis mantém-se constante e varia-se a outra, para se poder ter resultados singulares diferentes entre sensores, controlando os graus de liberdade para compreender os resultados obtidos.

Outra decisão que pode variar consoante a aplicação pretendida, baseia-se na quantidade de sensores que irá constituir o sistema, sabendo que se certas condições se verificarem, como a presença de um gás/odor totalmente desconhecido, de misturas de gases/odores ou até mesmo se existe variação do gás/odor de referência ao longo do tempo, será necessário utilizar um número maior de sensores para que se possa evitar ambiguidades e resultados enganadores de forma a podermos ter um padrão de reconhecimento útil [7].

II. Sistema de aquisição de dados

Este sistema tem uma grande importância, uma vez que, funciona como uma ponte que deve ser capaz de manipular e armazenar dados de vários sensores simultaneamente e transmiti-los ao sistema responsável pelo processamento do mesmo ou a um computador que terá o *software* apropriado [7]. O grupo desses dados, é inicialmente usado para a preparação da base de dados, tal como ocorre no cérebro de um ser humano que recebe os estímulos, guardando um compilado dos mesmos ao longo dos anos, como exemplificado na Figura 1. Portanto, um banco de dados pode ser criado a partir dos dados e padrões dos odores (no caso do *E-Nose*, por exemplo) conhecidos e desta forma treinar o equipamento, tornando possível detetar novos odores e classificá-los [16].

III. Algoritmo de reconhecimento de padrões

Quando se descreve o reconhecimento de padrões pode-se fazer uma analogia com o processo que ocorre no cérebro do ser humano, que ao receber um potencial elétrico despoletado pelas reações químicas ocorridas, por exemplo, no bulbo olfativo, onde ocorre o processamento neuronal fazendo-se uma interligação com a base de dados já obtida com o impulso, decifrando-se o odor, se houver correspondência com a informação contida na base de dados.

Esta parte do *E-Nose* tenta mimetizar o processamento neuronal, para obter uma resposta concreta do impulso. O objetivo consiste em classificar, identificar e quantificar os odores, através da calibração dos mesmos e com base nos dados armazenados no banco de dados [7][14]. Naturalmente, que semelhante conceito, é igualmente válido para o *E-Tongue*, que tenta mimetizar os sabores.

A forma mais simples de visualizar os dados é através da demonstração gráfica dos mesmos, que possibilita a comparação entre as respostas dos diferentes sensores, fornecendo informações úteis que podem ser comparadas com fontes conhecidas [2]. Salienta-se que cada sensor responde a uma variedade de gases (ou sabores), mas o padrão de respostas ao longo da matriz de dados produz um padrão único para cada gás (ou sabor), ou seja, uma impressão digital diferenciada para cada tipo de odor/líquido [7][14].

Quando se pretende reduzir o número de dados, sem que se perca informações relevantes sobre o odor/sabor, pode-se realizar uma análise de dados multivariada, reduzindo as dimensões dos dados, quando as várias são parcialmente correlacionadas, reduzindo-as em duas ou três dimensões, facilitando possíveis

conclusões dos dados. Existe uma grande variedade de métodos de análise que se poderiam utilizar como [3][7]:

- Análise dos componentes principais (PCA);
- Análise discriminatória canónica (CDA);
- Análise através de *clusters* (CA).

É ainda, possível, reduzir-se o tamanho dos dados que aparentemente não apresentam associações entre eles, sendo considerados peças isoladas de um todo, tornando o processamento de dados mais eficiente. Existem várias técnicas, como a Rede Neuronal Artificial (RNA), mais comumente conhecido como *Artificial Neural Network* (ANN) [3].

Uma rede neuronal artificial, geralmente chamada rede neural, é um modelo matemático inspirado em redes neuronais biológicas. Em termos gerais e de forma simplificada, a ANN tem normalmente a capacidade de adaptação consoante a fase de aprendizagem, ou seja, as redes neuronais permitem a modelação de relacionamentos complexos entre as entradas e saídas, de forma a encontrar padrões nos dados [2].

3.1.2 PCA – Análise dos componentes principais

O PCA foi descrito de forma teórica, pela primeira vez por Karl Pearson em 1901, porém a descrição de métodos computacionais foi demonstrada, apenas em 1933, por Harold Hotelling [37].

Quando se aplica o método de PCA têm-se como objetivo a diminuição de p entradas originais em k variáveis ($k \leq p$), não observáveis denominadas como componentes principais, mantendo a variação das entradas originais [36][37]. A matriz de entrada contém p variáveis, que não podem ser representadas todas em simultâneo, uma vez que não é possível representar os dados para além de um espaço 3D. Através da matriz de dados adquiridos e transmitidos ao sistema de processamento, o PCA irá representá-los num espaço reduzido, ou seja, num espaço 3D ou até mesmo num espaço 2D, tal variação depende do grau de importância de cada uma das componentes.

Para conseguir esta redução de componentes é necessário transformar os dados adquiridos numa nova matriz, ou seja, é criado um conjunto de novas variáveis, que correspondem a combinações lineares das variáveis (X 's), originando os denominados componentes principais ortogonais [36][37]. A primeira componente representa a variável com maior variância, a segunda componente a segunda com maior variância e assim por conseguinte [36][37]. As componentes primárias e secundárias representam quase na totalidade a informação original.

3.1.3 Artificial Neural Networks

Os modelos de *Artificial Neural Networks*, fornecem uma maneira de imitar o efeito do cérebro no processo do olfato/paladar biológico. Este método permite a obtenção de *features* e encontrar padrões em dados com muitas informações, possibilitando a classificação dos odores, sendo mais eficazes que os métodos detalhados na secção anterior [6].

As Redes Neuronais Artificiais são compostas por sistemas paralelos com subunidades, denominadas por nós, que simbolizam neurónios, sendo unidades de processamento simples que realizam funções matemáticas, que se regem por modelos matemáticos simples que definem a função $f: X \rightarrow Y$. Entre os nós ocorrem ligações que simbolizam as sinapses humanas, porém estas apenas apresentam ligações unidireccionais [3]. O termo *weight* refere-se aos valores das diversas sinapses, que fornece informações do *weight* de cada neurónio, informações estas relevantes para o modelo matemático que o sistema utiliza [3].

O *weight* das conexões da rede pode ser alterado, através da aplicação de algoritmos de forma a alterar a rede produzindo o resultado desejado de acordo com o objetivo previamente definido. Nesse sentido, a RNA deve ser sujeita a um processo de aprendizagem antes da utilização efetiva da rede. O processo de aprendizagem consiste em fornecer um grupo de exemplos à rede de forma que a mesma se adapte a esses dados e seja capaz de os analisar na fase de análise. Desta forma, a rede extrai as

características dos dados previamente fornecidos, de forma a representar a informação num conjunto de dados, como realizado no processo de aprendizagem [3].

Este sistema apresenta a capacidade de manter o conhecimento prévio dos *weights* das conexões entre os nós que são utilizadas como base para resolver problemas futuros, sendo capaz de gerar um conjunto de dados de entrada, produzindo respostas sempre que é incorporado novos dados no sistema. No entanto, este sistema para ser completamente funcional necessita de um conjunto de dados prévios para pré processamento no seu processo de aprendizagem [3].

Para prevenir qualquer tipo de erro no processo de aprendizagem é necessário, contudo, um possível ajuste de acordo com os objetivos que se pretendem [6].

Um algoritmo de *Back-propagation* decide como alterar os *weights* para se aproximar do emparelhamento correto de entrada/saída. Se for fornecido o poder de processamento suficiente, tempo de treino e, razoavelmente, bons dados, esses modelos podem atingir altos níveis de precisão na classificação dos dados de treino e mesmo para amostras de dados não incluídas no conjunto do processo do treino inicial [37]. Este processo é conhecido como aprendizagem supervisionada, uma vez que o modelo recebe entradas e faz a classificação correta, permitindo ao sistema cometer erros e o próprio sistema corrige quando ocorre uma classificação incorreta [6].

3.1.3.1 Constituição de um RNA

Número de camadas: a rede pode ser constituída apenas com uma camada denominada de camada de entrada que se projeta na camada de saída. A camada de entrada é constituída por neurónios onde a rede não realiza nenhum cálculo, onde apenas são atribuídos os valores de entrada. RNA com múltiplas camadas tem mais de um neurónio (nó) que conecta a entrada e a saída da rede. Os nós das camadas ocultas servem de elo entre a camada externa e a saída, mais especificamente, os resultados obtidos [3];

Números de nós em cada camada: o número de neurónios contidos em cada camada [3];

Tipo de conexão entre nós: a rede pode ser classificada de acordo com o tipo de conexão entre os nós da rede, podendo ser classificada como rede completamente conectada onde cada nó está conectado com todos os nós da seguinte camada ou rede não completamente conectada, se falhar pelo menos uma conexão na rede [3].

Topologia: este parâmetro fornece informações acerca da forma como os neurónios se ligam entre si. Se as conexões entre os nós não formam ciclos, e cada neurónio saída está conectado com um neurónio entrada de qualquer outro neurónio na mesma camada ou na camada anterior, esta conexão entre neurónios correspondendo a uma conexão *feedforward*. Outra possibilidade corresponde à conexão *feedback*, onde o valor da saída de um neurónio de uma camada é usado como valor de entrada em neurónios da mesma camada ou da camada anterior, ou seja, o valor da saída de um neurónio de uma camada i_{th} é usado como valor de entrada da camada j_{th} , com $j \leq i$ [3].

3.1.3.2 Processo de aprendizagem

O sistema RNA requer treino antes da sua utilização efetiva. Ao longo do processo de aprendizagem, o sistema extrai informações sobre os padrões inseridos no mesmo, consistindo no ajuste iterativo dos *weights* associados às conexões [3]. Existem vários algoritmos de aprendizagem, cada um usando um processo pedagógico diferente para ajustar os *weights* de conexão [6]. As principais abordagens desenvolvidas são: supervisionada e não supervisionada [3]. Num sistema de *Deep Learning* não existem regras formais que assegurem que o modelo apresenta as configurações certas. Em vez disso, existe um processo iterativo, por meio de tentativa e erro, para encontrar uma configuração dos parâmetros que se aproximam da função desejada, em vez de derivar de uma solução única e perfeita, como é representado na Figura 9.

A maioria dos algoritmos de aprendizagem, funcionam corretamente na fase de treino, quando são sujeitos a um determinado conjunto de dados fixos com os *weights* bem definidos. No entanto, selecionar e ajustar um algoritmo com dados invisíveis requer uma quantidade de testes significativa. O algoritmo de

aprendizagem escolhido para a investigação corresponde ao *Back-propagation*, que é usado em redes de camadas múltiplas [3].

A Figura 9, permite comparar um modelo linear com um modelo mais evolutivo. No modelo linear simples, a rede é constituída por dois nós de entrada. O primeiro nó corresponde aos valores x e o segundo nó de entrada assume sempre um *input* de 1. Multiplicando os valores dos nós pelos *weights* da rede (da esquerda para a direita), obtém-se a equação característica dos modelos lineares. Na Figura 9 (b) esquematiza uma rede neuronal conectada com quatro camadas. A rede consiste em uma camada de entrada, que está conectada com a cada nó da próxima camada. Neste exemplo, a rede está a realizar um processo de aprendizagem para classificar as entradas de acordo com duas classes, ou seja, fornece um valor para cada classe na última camada do sistema [6].

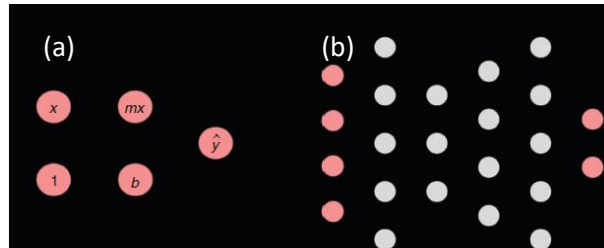


Figura 9- Comparação entre a representação de rede de um modelo linear (a) e uma representação de um modelo mais complexo e aproximado de *Deep Learning* (b). Adaptado de [6].

O processo de treino, ocorre em duas fases, ou seja, “para a frente” usada para definir a saída da rede resultantes dos dados de entrada e “para trás” usando a saída esperada e a saída obtida, informação importante para atualizar o valor dos *weights* das várias conexões. Para além destas duas fases, é ainda aplicado o termo de impulso, acelerando o processo de treino evitando mínimos locais. O uso deste auxiliar reduz a instabilidade e aumenta a taxa de aprendizagem da rede [3].

4 Procedimento experimental

O presente capítulo, destina-se à apresentação dos métodos necessários para o fabrico dos sensores e do sistema de aquisição de dados.

4.1 *Screen Printing*

O *Screen Printing* apresenta características interessantes quando aplicadas à indústria, uma vez que, é simples, de fácil adaptação, rápido, multifacetado e de baixo custo. Este método permite ainda a utilização em grandes escalas e de forma automatizada [38].

De forma genérica, esta metodologia baseia-se no processo de impressão que resulta do efeito de uma pressão que obriga uma tinta a passar por uma tela (com uma máscara da impressão) para um substrato. No caso específico, desta investigação, foi utilizado um substrato flexível de *Poly(ethylene terephthalate)* (PET) e *Kapton* [38].

Este método (Figura 10), inicia-se com a submersão da matriz por tinta. Através de movimentos horizontais da lâmina, é realizada uma força vertical na matriz que força a tinta a passar pela máscara no padrão desenhado, definindo-se assim a estrutura final [38]. Todo este processo foi realizado no Centro de Materiais Técnicos, Funcionais e Inteligentes (CeNTI) com um sistema de impressão Roku-Print 2.2. A Figura 11, exemplifica um conjunto de elétrodos obtidos por esta técnica.

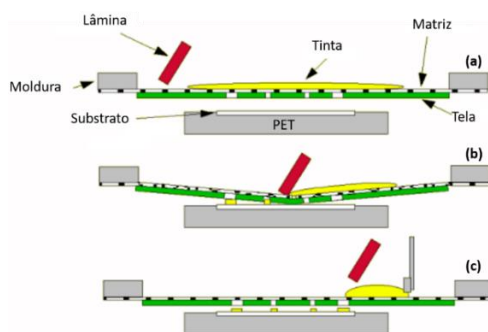


Figura 10- Esquema de *Screen Printing*. Adaptado de [38].

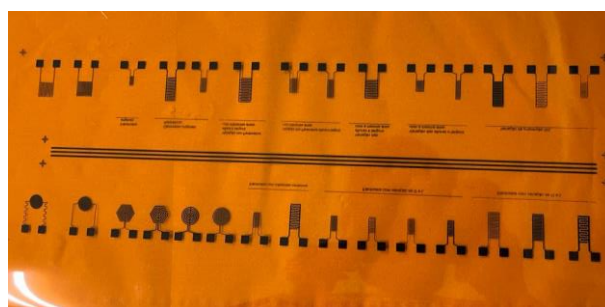


Figura 11- Conjunto de elétrodos em Kapton/PET impresso pelo CeNTI.

4.2 Técnicas de produção de filmes

4.2.1 *Spin Coating*

O *spin coating* é utilizado na produção de filmes finos resultantes da deposição de uma solução por ação centrífuga em substratos planos. Neste projeto, efetuou-se, principalmente, a deposição do polímero PEDOT:PSS nos sensores obtidos por *Screen Printing*, embora outros polímeros tenham igualmente sido testados, como será detalhado na secção 4.4 [39].

Este está dividido em quatro etapas, como representado na seguinte figura:

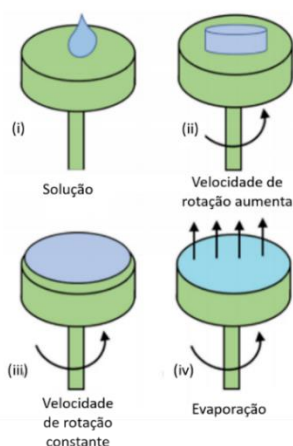


Figura 12- Fases do *Spin Coating* (*Midas Spin-1200D*). Adaptado de [39].

- Na primeira etapa, a solução foi depositada sobre o substrato no centro da plataforma giratória;
- Na segunda etapa, aumenta a velocidade de rotação da placa giratória;
- Na terceira etapa, a velocidade de rotação da placa giratória é mantida constante;
- Na quarta etapa, ocorre a evaporação do solvente.

Após a conclusão do processo, o solvente foi removido através da sua evaporação feita em estufa a uma temperatura e tempo dependentes do tipo de materiais depositados e respetivo solvente [39].

Os parâmetros de deposição são dependentes da solução. Neste trabalho, foram realizadas experiências, de forma a se obter filmes com espessuras o mais similares possíveis. Desta forma, os elétrodos foram sujeitos a uma velocidade de rotação, mais precisamente, de 1500 rotações por minuto (rpm), durante trinta segundos (rampa inicial 5 s), o que resultou numa espessura do polímero na ordem de 60 a 80 nanômetros, conforme medidas anteriormente efetuadas de perfilometria.

4.2.2 *Doctor blade*

O *doctor blade* é uma outra técnica utilizada na produção de filmes finos, que consiste no deslizamento de uma lâmina de raspagem (lamela) de forma transversal à superfície plana, quando revestida (suporte retangular de vidro e elétrodos) tem a capacidade de criar um filme, ou deslizar o substrato por baixo da lâmina estática [40]. No presente trabalho, utilizou-se a técnica do deslizamento da lâmina de raspagem na produção de sensores de filmes finos.

Durante o revestimento existe um pequeno intervalo entre a lâmina e o substrato que determina a quantidade de solução que pode ser atravessada. A espessura final do filme é uma fração da fenda, entre o substrato e a lâmina, que é influenciada pelas propriedades viscoelásticas da solução e pela velocidade do revestimento. Esta técnica pode ser dividida em três etapas, como representado na seguinte Figura 13:

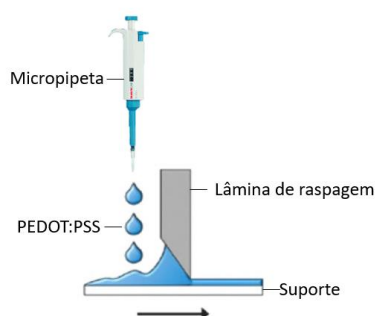


Figura 13- Representação da técnica de *doctor blade* na preparação de um elétrodo de PEDOT:PSS. Adaptado de [41].

- Na primeira etapa, uma gota de solução de PEDOT:PSS foi depositada sobre o substrato na base do elétrodo através do auxílio de uma micropipeta;
- Na segunda etapa, efetua-se o espalhamento da gota de PEDOT:PSS no elétrodo através do contacto da lamela com o sensor sobre o suporte retangular;
- Na terceira etapa, efetua-se um movimento único de deslizamento da lamela em direção contrária aos contactos do sensor.

O movimento único de deslizamento é muito importante para quando se repetir o método nos outros sensores, estes terem espessuras de filme semelhantes entre eles, uma vez que, cada elétrodo foi efetuado de forma individual, o que pode ter algumas complicações que serão detalhadas na secção de discussão de resultados. Após a conclusão deste método remove-se o solvente de forma análoga ao descrito na secção anterior.

4.2.3 *Slot-die*

A *slot-die* é uma ferramenta utilizada na produção de filmes finos com alta reprodutibilidade através de uma técnica de deposição multifacetada, que possibilita a deposição de diferentes substratos [42]. É importante destacar, que a parte mais importante de todo o sistema da *slot-die*, representado na Figura 14, é a cabeça da *slot-die*, que apresenta uma ranhura, através da qual flui a solução do material pretendido para o substrato [43]. Assim sendo, o método consiste na deposição de uma solução do polímero a depositar, através de uma ranhura estreita perto da superfície sobre os substratos [42], representada na Figura 15. A abertura da ranhura pode variar de acordo com a espessura do filme que se pretende obter, colocando-se, para além da máscara, *shims* de diferentes espessuras.



Figura 14- Esquema de uma *slot-die* (L2005A1-UK) da Ossila e os seus componentes. Adaptado de [43].

Esta técnica apresenta vantagens, relativamente, às técnicas abordadas nos pontos 4.2.1 e 4.2.2, sendo compatível com processos de produção de substratos em grandes escalas, como acontece, por exemplo, nos sistemas de deposição *R2R* e *sheet-to-sheet* [44]. A técnica faz parte de uma classe de técnicas de revestimento denominada “técnicas de revestimento por medição”, em que a espessura das camadas depositadas depende unicamente de dois fatores: da taxa de fluxo da solução e da velocidade a que o substrato se desloca [44].

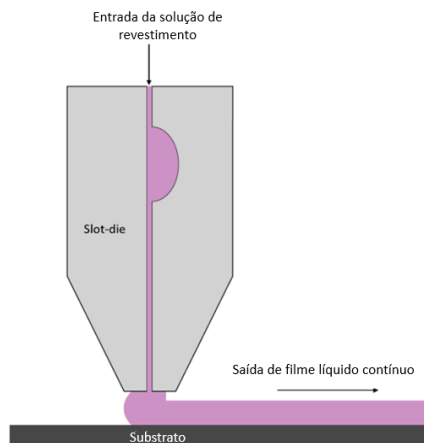


Figura 15- Esquematização da técnica *slot-die*. Adaptado de [45].

Os parâmetros utilizados na *slot-die* na formação de filmes foram iguais para os diferentes polímeros, com uma velocidade de revestimento de 2,085 mm/s e com uma taxa de distribuição do filme de 4,926 $\mu\text{L/s}$. Este valor foi obtido de forma empírica consoante os testes efetuados.

A tabela seguinte, mostra, em termos comparativos, as características essenciais das técnicas de impressão utilizadas.

Tabela 2- Características das técnicas de revestimento usadas. Adaptado de [45].

	<i>Spin Coating</i>	<i>Doctor Blade</i>	<i>Slot-die</i>
Custo	Médio.	Baixo.	Elevado.
Produção em escala	Não é possível.	Possível.	Possível.
Produção de filmes	Finos e uniformes.	Finos e uniformes.	Finos e uniformes (menor grau que outras técnicas).
Complexidade	Baixo.	Médio.	Elevado.
Superfícies revestidas	Substratos pequenos e planos.	Substratos flexíveis ou rígido; Métodos R2R.	Substratos flexíveis ou rígido; Métodos R2R.
Desperdício de solução	Elevado.	Moderado.	Baixo.
Tempo de secagem	Rápido.	Lento; Pode ser acelerado através de aquecimento.	Lento; Pode ser acelerado através de aquecimento.
Parâmetros que afetam o revestimento	Velocidade de rotação; Tempo de rotação; Propriedades da solução.	Tamanho da lacuna; Velocidade do revestimento; Propriedades da solução.	Taxa de fluxo da solução; Velocidade do substrato; Altura da lacuna; Largura do revestimento; Espessura da saída; Diferença de pressão a montante; Ângulo de ataque; Desenho da cabeça; Propriedades da solução.

4.3 Sensores

Tal como foi referido na secção 2.3.2, certos polímeros (particularmente – mas não só – os conjugados) apresentam propriedades semicondutoras, conjugando a estrutura característica de um polímero com as propriedades elétricas típicas encontradas nos metais ou semicondutores, podendo-se denominar estes materiais como polímeros condutores [46].

Polímeros condutores intrínsecos podem apresentar estruturas variadas possuindo um sistema conjugado de ligações carbónicas singulares ou duplas de forma alternada. Neste tipo de polímeros, quando ocorre uma ligação química com orbitais sp^2pz despoleta uma sobreposição das orbitais moleculares do material que promovem a deslocalização de uma nuvem de eletrões através da cadeia principal da molécula do polímetro semiconductor. Este fenómeno permite a criação das condições necessárias para que ocorra a condutividade através do polímero, por efeito de *hopping* [46].

Existem vários tipos de polímeros orgânicos que podem ser utilizados como semicondutores, descritos na secção 2.3.2. Estes polímeros são amplamente aplicados em sensores. Neste trabalho serão testados vários tipos de polímeros orgânicos para a produção de camadas ativas dos sensores[46].

É relevante ainda dizer que a interação entre os polímeros condutíveis e os analitos na fase gasosa ocorre, principalmente, através de fenómenos de absorção e/ou adsorção dos analitos; na fase líquida, a maior parte, são efeitos de absorção, não conseguindo reverter o estado de absorção, apenas podendo ser usados uma vez [46].

Os sensores são constituídos por uma base polimérica transdutora e um sistema eletrónico. O sensor é constituído por uma rede interdigitada de eléctrodos ligados a dois contactos que permitem a aplicação de um potencial de uma fonte *direct current* (DC) ou *alternate current* (AC) [18]. A Figura 16 (a), mostra um exemplo destes sensores. Sobre o eléctrodo é depositado uma camada de um polímero condutor/semicondutor, que funciona como uma camada ativa de *sensing*. Quando se aplica um campo elétrico através dos contatos do sensor o sistema “microeléctrodo+polímero” irá modular o fluxo/acumulação de carga elétrica em função da presença do analito. Através da aplicação de uma corrente DC constante pode-se medir facilmente o valor da resistência elétrica; em modo AC, podemos aceder à capacidade elétrica. Neste trabalho, iremos apenas focar o sistema em modo DC, não só dada a sua viabilidade, mas também pela mais rápida resposta. O sistema “microeléctrodo + polímero” é análogo a um transdutor elétrico [17].

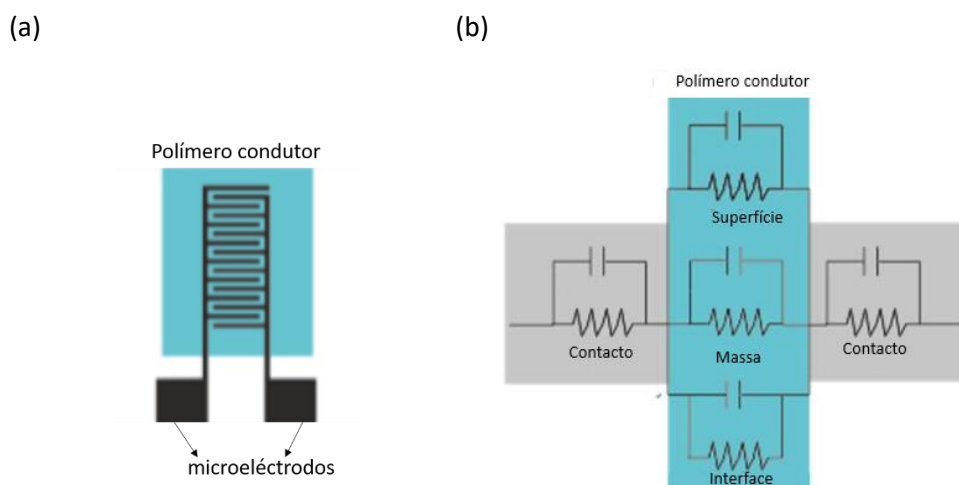


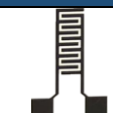


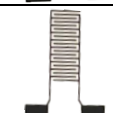
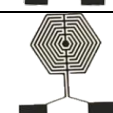
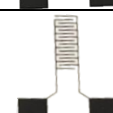
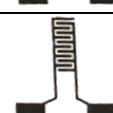
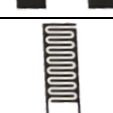
Figura 16- Estrutura típica do sensor orgânico: (a) vista superior do microeléctrodo interdigitado; (b) circuito elétrico simplificado do sensor orgânico. Adaptado de [17].

Na Figura 16 (b), está representada de forma simplificada o modelo elétrico global do sensor. Os sinais de entrada nos contactos do sensor serão divididos por um grupo de três contribuições (superfície,

massa e interface) que estão conectadas em paralelo, dependendo do tipo de condutibilidade do polímero [17].

A tabela seguinte apresenta as características das estruturas dos sensores utilizados neste trabalho.

Tabela 3- Características gerais dos sensores utilizados como conjunto final

Sensor	Área (cm ²)	Nº de pistas interdigitadas	Largura dos elétrodos (mm)	Altura dos elétrodos (mm)	Largura do Gap (mm)	Espessura das pistas (mm)	Imagem
1	0,96	12	4,82	19,5	0,5	0,5	
2	0,96	16	6,50	15,5	0,5	0,5	
3	0,96	16	6,50	15,5	0,5	0,3	
4	0,96	20	6	16	0,5	0,5	
5	0,95	9	R=11	0,3	0,3	0,3	
6	0,96	16	3	11,5	0,3	0,3	
7	0,96	12	2,97	11,7	0,5	0,5	
8	0,96	16	6,50	16,0	0,5	0,5	

4.4 Polímeros utilizados na formação da camada ativa

4.4.1 PEDOT:PSS

O *Poly(3,4-ethylenedioxythiophene)* (PEDOT), é um polímero semicondutor intrínseco utilizado em diversas áreas na eletrônica orgânica, como por exemplo, nos sensores, em revestimentos ativos, entre outros. Como este material puro é instável e não solúvel, é necessário adicionar um elemento, neste caso o *poly(styrenesulfonate)* (PSS) para facilitar a sua manipulação e simultaneamente dopar, de forma a tornar o material semicondutor [17]. A Figura 17 (a), representa a unidade básica de repetição (monómero) do polímero PEDOT:PSS.

O PEDOT é sintetizado através da oxidação do elemento EDOT (*3,4-ethylenedioxythiophene*), que pode ser efetuada utilizando diferentes elementos. O PSS é um polímero isolador facilmente solúvel em água que ao se conectar com o PEDOT permite que o mesmo se dissolva e funciona como estabilizador do mesmo.

O PEDOT:PSS é um polímero semicondutor do tipo *p*, ou seja, as cargas positivas serão as responsáveis pelo transporte de carga [17][47]. A escolha deste semicondutor baseia-se na sua grande estabilidade, maleabilidade e baixo custo associado. O semicondutor do PEDOT:PSS (AL 4083-100 ml) e PEDOT:PSS (PH1000-100 ml) foram obtidos na Ossila.

4.4.2 MDMO-PPV / MEH-PPV

O poly(2-methoxy-5-(2-ethylhexyloxy)-1,4-phenylenevinylene) (MEH-PPV) e o poly(2-methoxy-5-(3,7-dimethyloctyloxy)-1,4-phenylenevinylene) (MDMO-PPV) representados na Figura 17 (b) e (c), respetivamente, são polímeros semicondutores conjugados do tipo *p*, derivados de poli(*p*-fenileno vinileno) (PPV) [48]. Solúveis em solventes orgânicos, como clorobenzeno (CB), clorofórmio (CF), diclorobenzeno (DCB) e tetraidrofurano (THF), que tem longas cadeias laterais. A escolha destes semicondutores foi baseada numa tentativa de substituir o PEDOT:PSS, que tem como solvente a água, o que dificulta os resultados quando se efetua os testes com o sistema *E-Tongue*. Dado que os derivados do PPV são hidrofóbicos, não se deterioram tão facilmente. O MEH-PPV (ADS100RE) e MDMO-PPV (ADS104RE) foram adquiridos na *American Dye Source* (ADS).

4.4.3 P3HT

O *regio-regular* poly(3-hexylthiophene-2,5-diyl) (P3HT), tal como os outros polímeros descritos anteriormente, enquadra-se nos semicondutores do tipo *p* esquematizado na Figura 17 (d). Este polímero pode ser utilizado em diversas áreas, mas atualmente é amplamente aplicado em campos da investigação em eletrónica orgânica, na formação de dispositivos optoeletrónicos [49]. São solúveis em solventes orgânicos, como clorofórmio (CF) e clorobenzeno (CB). A escolha deste polímero, deve-se à sua grande condutibilidade, estabilidade, a possibilidade de fazer filmes flexíveis e, ainda, por possuir uma resposta hidrofóbica com a água, o que pode auxiliar nos testes com o sistema *E-Tongue*. O P3HT (M107) (*regio-regular*) foi adquirido na Ossila.

4.4.4 PANi

A polianilina (PANi), cuja estrutura química está representada na Figura 17 (e), é um polímero semicondutor do tipo *p*, que é sintetizada a partir da oxidação da anilina (base) quando sujeita a um ambiente ácido, resultando assim do produto polimérico da oxidação [50]. A escolha deste polímero deve-se à sua fácil síntese, apresentar estabilidade eletroquímica e térmica, permitir a dopagem através de um ambiente ácido (como por exemplo, ácido clorídrico) ou o processo inverso sob um ambiente básico, que altera a condutividade do PANi, permitindo a formação de filmes finos e homogéneos [50] e também por ter uma reação hidrofóbica com a água. Estas características tornam este polímero muito utilizado numa grande gama de aplicações, nomeadamente, em aplicações industriais (revestimentos anticorrosivos, armazenamento de energia e sistemas de conversão, sensores de gás, entre outros) e de sensores (material potencial para *biosensing*) [50] [32]. A PANi foi adquirida na Sigma-Aldrich (556386).

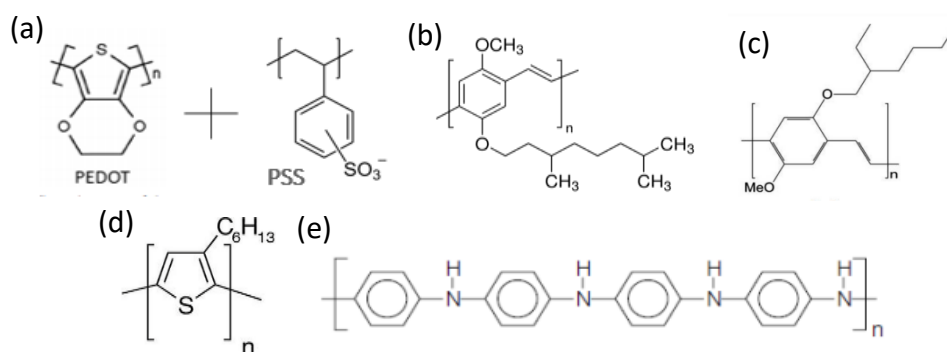


Figura 17- Estruturas químicas dos elementos (a) PEDOT e PSS [47], (b) MEH-PPV, (c) MDMO-PPV, (d) P3HT e (e) PANi [32].

4.5 Aquisição de dados

Recorreu-se ao auxílio de sistema, representados na Figura 18, para se medir os sinais que os variados sensores apresentam ao longo das diversas experiências.

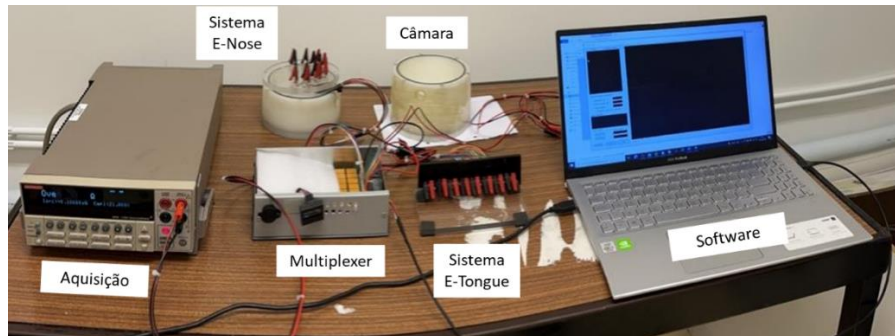


Figura 18- Sistema utilizado na detecção e aquisição dos sinais.

O sistema utilizado neste projeto foi anteriormente desenvolvido no laboratório, contendo uma câmara com o analito (*E-Nose*) ou um suporte de sensores (sistema *E-Tongue*), um *Multiplexer* (para um conjunto até 16 sensores), um *Source Meter*, que medirá valores de resistência (aplicando um potencial fixo e medindo a corrente –Lei de Ohm), e um computador que terá um software que controla todos os parâmetros da aquisição (e sincronização). De seguida, encontra-se uma representação esquemática da interligação entre os diferentes equipamentos do sistema utilizado.

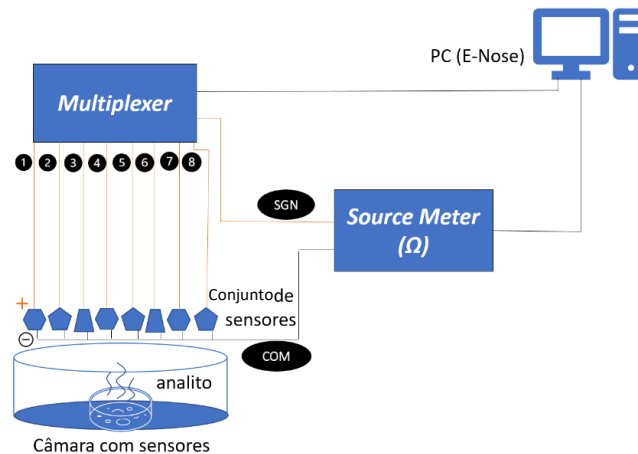


Figura 19- Esquema representativo do sistema utilizado.

A Figura 19, evidencia as conexões entre os sensores, o *Multiplexer*, o *Source Meter* e o computador. Cada sensor está ligado de forma individual ao *Multiplexer* (sinal *SGN*), que por sua vez, se irá conectar ao *Source Meter*. Por outro lado, os sensores estão conectados entre si formando o canal *COM*. Por fim, o computador recebe informações dos valores dos diferentes sensores através do *Source Meter*, controlando todo este processo através do *Multiplexer*, que permite o controlo da ativação/desativação de cada sensor. A Figura 20, mostra um esquema simplificado do funcionamento do *Multiplexer*, que é constituído por um conjunto de n interruptores analógicos/digitais.

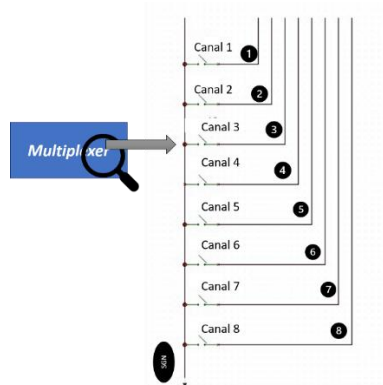


Figura 20- Esquema simplificado do funcionamento interno de um Multiplexer.

Por fim, este sistema funciona num ciclo repetitivo de acordo com o seguinte processo:

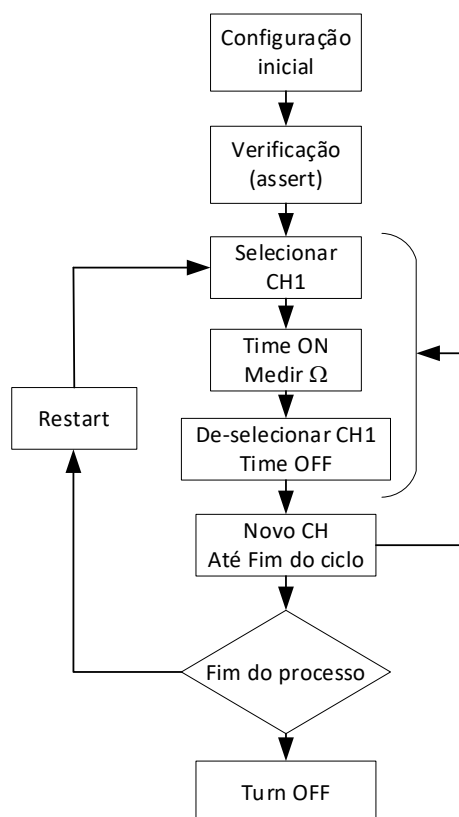


Figura 21- Esquema do processo de aquisição de dados.

Os dados são armazenados no computador, podendo-se proceder à aplicação do algoritmo de reconhecimento de padrões.

4.6 Analitos

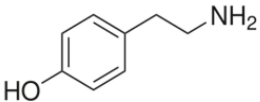
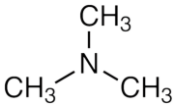
No presente trabalho, serão estudadas as respostas dos sensores do tipo *E-Nose/E-Tongue* a analitos de patologias do foro ginecológico e do trato urinário, como referido nas secções 2.5.2 e 2.5.2, respetivamente.

Relativamente a amostras ginecológicas serão estudados biomarcadores de aminas do tipo *putrescina* (Sigma-Aldrich 51799), *tiramina* (Sigma-Aldrich 80345) e *trimetilamina* (Sigma-Aldrich 73487) com a mesma concentração (1%) fornecidas pela Faculdade das Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior. Os analitos foram dissolvidos em água desionizada. Estes analitos são, fundamentalmente, os mais importantes

biomarcadores da *Vaginose Bacteriana*, estando associados à atividade de determinados tipos de culturas de microrganismos na flora vaginal.

Estas podem ser distinguidas com diferentes parâmetros: conforme as estruturas químicas em aminas alifáticas (*putrescina* e *trimetilamina*) tendo apenas ligações simples na estrutura química e aromáticas (*tiramina*) apresentando pelo menos um anel benzênico, de acordo com o número de grupos de aminas, em monoaminas (*tiramina*), diamina (*putrescina* e *cadaverina*) e em poliamina (não tendo nenhuma amina em estudo que esteja em conformidade com este parâmetro) [51]. As fórmulas e estruturas químicas estão representadas na Tabela 4.

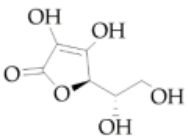
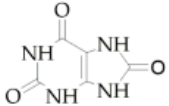
Tabela 4- Fórmula e estrutura química dos analitos. Adaptado de [51].

Amina biogênica	Fórmula	Estrutura química
Tiramina		Aromática
Putrescina	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$	Alifática
Trimetilamina		Alifática

Paralelamente aos testes realizados com biomarcadores ginecológicos, serão ainda testadas as respostas dos sensores a biomarcadores característicos de patologias do trato urinário, nomeadamente o AA e o AU, descritos na secção 2.9.3. Estes analitos coexistem em fluidos biológicos, sendo fulcral criar um método que os discrimine, de forma a facilitar o diagnóstico de certas patologias.

O AA, adquirido na Fisher Chemical (A/8882/42), foi preparado a partir da base em pó (com um grau de reagente analítico de 99,7%) dissolvida num tampão de fosfato salino (PBS), que mimetiza o ambiente fisiológico do ser humano, de forma a obter uma solução de AA, com uma concentração de 100 µM. Relativamente ao AU a preparação do analito seguiu os mesmos parâmetros. Este analito foi obtido a partir da Alfa Aesar (A13346) em pó, com um grau de reagente analítico de 99%. Estes dois biomarcadores serão testados apenas com o sistema *E-Tongue*, pois não apresentam odor.

Tabela 5- Fórmula e estrutura química dos analitos do trato urinário. Adaptado de [52].

Biomarcador do trato urinário	Fórmula	Estrutura química
AA		Aromática
AU		Aromática

5 Métodos experimentais

5.1 Desenvolvimento de elétrodos

O primeiro objetivo para o desenvolvimento de um dispositivo *homecare* passa por definir um conjunto de oito sensores para o sistema *E-Nose* e *E-Tongue* diferenciados (diferentes *features* que neste caso será fundamentalmente a geometria) que permitam obter sinais bem definidos e variados consoante os diferentes analitos. Desta forma, tal como foi referido anteriormente na secção 3.1.1, será possível obter um padrão característico dos analitos.

Numa primeira etapa foi realizado, o desenvolvimento de elétrodos com recurso à técnica de *screen printing* a partir de *polymer/metal inks*, com geometria, distribuição em substrato e composição, compatíveis com as medições propostas a realizar. Para tal, realizou-se vários testes com conjuntos de sensores com diferentes geometrias, com elétrodos em carbono e diferentes polímeros (PEDOT-PSS, MDMO-PPV, MEH-PPV, P3HT, PANi), como será detalhado na próxima secção. O conceito foi de medidas simples com elétrodos individualizados, com vista a definir um padrão de sinal coerente e “limpo” que sirva de modelo de base indicativo para futuros tipo de elétrodos. O “substrato” com os elétrodos incorporados, é flexível, adequado ao enquadramento mecânico no sistema de suporte, bem como deverá evitar efeitos de ruído próprio devido a possíveis tensões mecânicas.

5.2 Preparação dos polímeros

O PEDOT:PSS é preparado filtrando a solução de PEDOT:PSS (AL4083) e PEDOT:PSS (PH100) adicionando 10 μL de Triton-X (surfactante) por cada 10 mL de PEDOT:PSS, de forma a aumentar a molhabilidade da solução nos substratos.

A solução de P3HT é preparado através da junção de P3HT com o solvente CF, de forma a se obter uma solução com uma concentração de 10 mg mL^{-1} . De seguida, é colocada a agitar e por fim filtra-se com filtro RC de 0,45 μm para retirar qualquer tipo de partículas que não tenham sido completamente dissolvidas, o que poderia resultar numa diminuição da uniformidade do filme aquando da criação do mesmo. Este passo é comum entre o P3HT e o MEH-PPV.

A solução de dicloreto de PANi é preparado adicionando ao material DMSO, de forma a obter uma solução com 5 mg mL^{-1} . Para a solução criada com PANi de base livre o processo é o mesmo, mas a concentração da mesma muda para 10 mg mL^{-1} . Nesta solução foi adicionado < 10 μL de ácido acético de forma a aumentar a condutividade.

A solução de MEH-PPV é preparada usando CB, de forma a se obter uma solução com uma concentração de 10 mg mL^{-1} .

6 Resultados e discussão

Nesta secção, serão demonstrados os resultados obtidos das diferentes interações do conjunto de sensores com os analitos provenientes dos biomarcadores, característicos das diferentes patologias ginecológicas e do trato urinário. O objetivo final deste trabalho consiste em verificar se é possível distinguir os diferentes biomarcadores de forma precisa, através das respostas obtidas dos sistemas *E-Nose/E-Tongue*, fornecendo um diagnóstico rápido e confiável, através de PCA ou de RNA.

O procedimento experimental encontra-se dividido em três partes. Primeiramente, os sensores foram usados para detetar amostras puras dos diferentes analitos com o método de *spin coating*, testando quatro polímeros (PEDOT:PSS, P3HT, MEH-PPV, PANi) com *tiramina* (1%). De seguida, foram testados sensores efetuados através do método de *doctor blade* com PEDOT:PSS e P3HT em contacto com *tiramina* (1%), *trimetilamina* (1%) e *putrescina* (1%). Por último, os sensores foram fabricados, através do método *slot-die*, testando, essencialmente, os polímeros PEDOT:PSS e P3HT para análise com *tiramina* (1%), *trimetilamina* (1%), *putrescina* (1%), AA (100 μ M) e AU (100 μ M) nos sistemas *E-Nose/E-Tongue*. Importa referir, que os valores de resistência dos sensores, medidos no estado *off*, podem diferir de sensor para sensor. Desta forma, os resultados devem ser analisados, não pelo valor absoluto de resistência detetado durante o teste, mas pela variância relativa dos valores de resistência.

6.1 Testes efetuados com o sistema *E-Nose* (aminas)

6.1.1 *Spin coating*

Numa primeira fase, foi selecionado um conjunto de sensores com o polímero PEDOT:PSS, com a finalidade de constatar a variação absoluta dos valores das resistências dos sensores no estado *on* e *off* ao interagir com *tiramina* 1%, como se pode observar na Figura 22. Nesta mesma figura, é possível detetar que a resistência dos sensores diminui quando são expostos ao analito, estabilizando após um certo tempo.

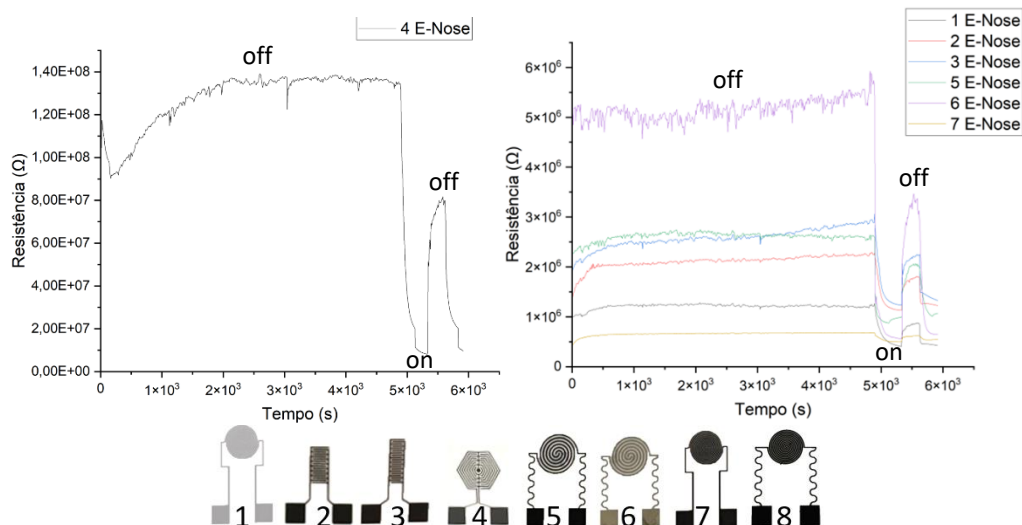


Figura 22- Resposta resistiva do conjunto de sensores para a *tiramina* (1%).

Em conformidade com os resultados obtidos, e tendo em conta a Figura 22, é possível verificar a variação absoluta dos valores das resistências dos sensores 3 e 5 no estado *on* e *off*, que apresentam valores muito próximos, de $1,63 \times 10^6 \Omega$ e $1,62 \times 10^6 \Omega$, respetivamente. Assim sendo, e de forma a obter a máxima variedade de respostas dos sensores, optou-se por substituir elétrodos com respostas similares ao mesmo estímulo, por outro elétrodo que permita uma maior variabilidade, para otimizar o conjunto de sensores intrinsecamente associado a cada um dos sistemas *E-Nose* e *E-Tongue*. O conjunto de sensores, com maior variabilidade, encontra-se detalhado na Tabela 3.

De seguida, efetuaram-se testes com o polímero P3HT e os resultados demonstraram (Figura 23), que a variação absoluta dos valores das resistências dos sensores no estado *on* e *off* é praticamente nula.

Este resultado permitiu concluir que os sensores não apresentam uma resposta significativa, em contacto com o analito.

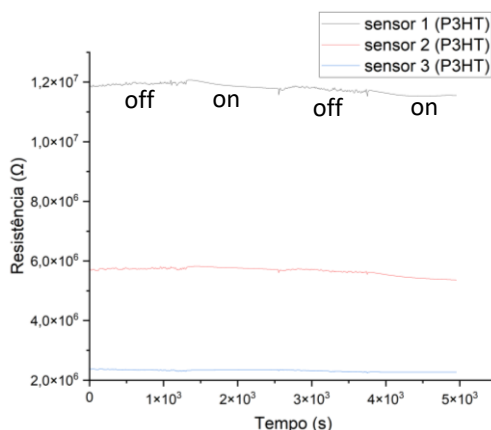


Figura 23- Resposta resistiva do conjunto de sensores para a *tiramina* (1%).

O polímero PANi apresentou um comportamento instável, aumentando indefinidamente a sua resistência, para valores elevados, o que acabou por resultar na sua exclusão da formação da camada ativa. No que se refere, aos testes efetuados com sensores com camadas ativas de polímeros, da família do PPV, é de extrema importância referir, que somente se conseguiu obter resultados com a camada ativa de MEH-PPV. Relativamente, ao polímero MDMO-PPV, este, por sua vez, não apresentou nenhum resultado e a própria solução exibiu um comportamento muito viscoso/gelatinoso.

6.1.2 Doctor blade

No que concerne, ao método de *doctor blade*, foram efetuados testes com PEDOT:PSS, testando o conjunto de sensores, descrito na Tabela 3, com *tiramina* (1%) e *trimetilamina* (1%). Desta forma, e a partir dos resultados representados na Figura 24 (a), com a *tiramina* (1%), constatou-se que os sensores 7 e 8 apresentam respostas incoerentes, ou seja, a variação absoluta dos valores das resistências destes sensores no estado *on* e *off* é, aproximadamente zero.

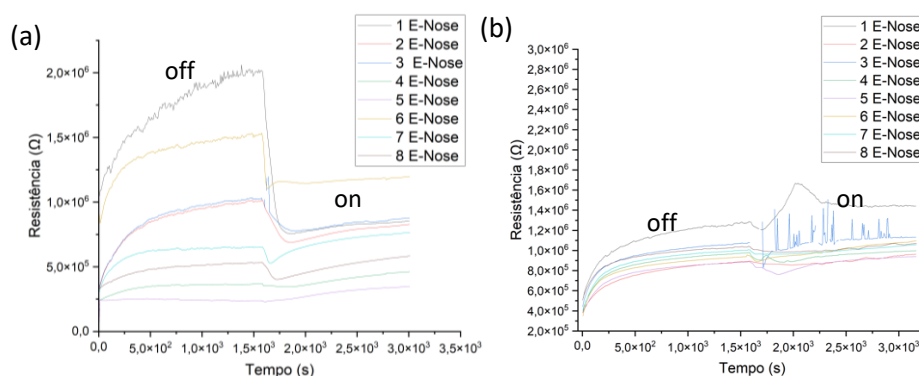


Figura 24- Resposta resistiva do conjunto de sensores para (a) a *tiramina* (1%) e (b) *trimetilamina* (1%).

A resistência dos restantes sensores, demonstrou uma acentuada diminuição, quando expostos ao analito, conforme evidenciado na Figura 22. Por outro lado, os resultados obtidos da interação com a *trimetilamina* (1%), representados na Figura 24 (b), não se mostraram estáveis, indicando que o sistema não demonstra capacidade para detetar esta amina.

6.1.3 Slot-die

Em relação, ao método *slot-die* foram conduzidos testes com PEDOT:PSS, testando, particularmente, o conjunto de sensores, com *tiramina* (1%) e *putrescina* (1%). Como resultado, e a partir da Figura 25 (a), é

possível, somente, observar, resultados em seis dos oito sensores da totalidade do conjunto. Importa realçar, que esta anomalia, deve-se à interação dos sensores com o analito *tiramina* (1%), visto que o sensor 6, durante a realização do teste, demonstrou um comportamento irregular, não estabilizando no estado *on*.

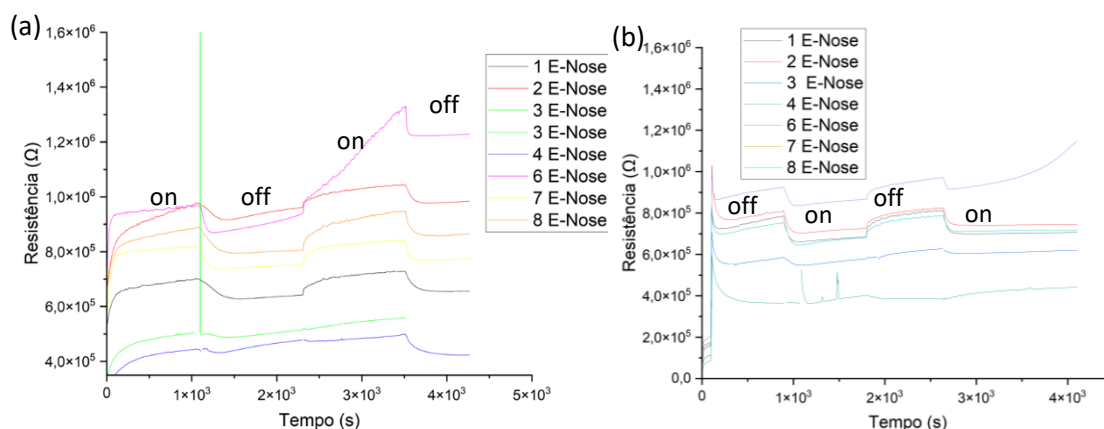


Figura 25- Resposta resistiva do conjunto de sensores para (a) *tiramina* (1%) e (b) *putrescina* (1%).

Quando se compara a resposta do mesmo conjunto de sensores com *putrescina* (1%), representada na Figura 25 (b), verifica-se uma resposta semelhante ao obtido com a *tiramina* (1%). Mais uma vez, apenas foi possível obter resultados em seis dos oito sensores. A variação absoluta dos valores da resistência do conjunto do sensor 1, é praticamente nula e não foi perceptível obter resultados com o sensor 5. Relativamente, aos testes efetuados com *trimetilamina* (1%) não se obteve resultados, derivado ao facto, desta amina apresentar um comportamento demasiado volátil, saturando rapidamente os sensores.

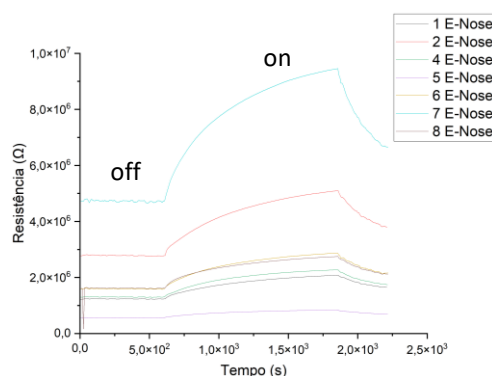


Figura 26- Resposta resistiva do conjunto de sensores para *trimetilamina* (1%).

Posteriormente, efetuaram-se testes com o polímero P3HT, onde se verificou uma resposta (Figura 26), por parte, do conjunto de sensores, que esteve em contacto direto com os gases voláteis, provenientes da *trimetilamina* (1%). Em conformidade com o referido nos testes com o PEDOT:PSS, a *trimetilamina* satura os sensores e não é possível determinar a variação absoluta dos valores da resistência do conjunto dos sensores.

6.1.4 Síntese dos resultados obtidos do sistema *E-Nose*

De forma geral, os resultados obtidos com o sistema *E-Nose* foram melhores com o método de *slot-die* em relação aos outros dois métodos. Verifica-se também que o polímero que mais se adapta ao sistema corresponde ao PEDOT:PSS, visto que se obtiveram resultados mais concisos relativamente aos restantes. Não se obteve resultados com o MEH-PPV e a PANi. Com este sistema não foi possível obter uma resposta clara com o analito *trimetilamina* (1%).

6.2 Testes efetuado com o sistema *E-Tongue*

6.2.1 *Spin-coating*

De forma similar ao sistema *E-Nose*, foram efetuados testes através da técnica de *spin coating* utilizando diversos analitos do foro ginecológico com o PEDOT:PSS, porém a maioria apresentou muito ruído. Assim sendo, os resultados não foram considerados para o trabalho. Estes ruídos podem ser justificados pela interação entre o analito e o filme, que poderá dissolver o mesmo, dada a sua muito pouca espessura.

De seguida, foram efetuados testes com o P3HT com a *tiramina* (1%). Através dos dados representados na Figura 27, verifica-se um comportamento totalmente diferente ao verificado no *E-Nose*, na qual, está bem clara a diferenciação entre o estado *on/off*.

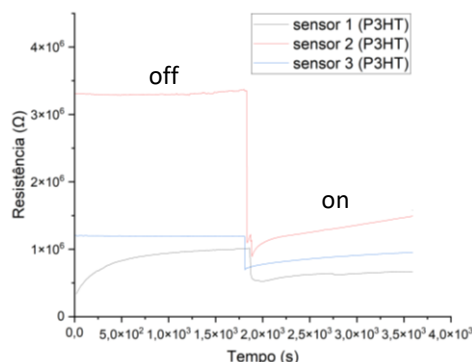


Figura 27- Resposta resistiva do conjunto de sensores para a *tiramina* (1%).

Constatou-se, ainda, que após o processo de secagem era necessário esperar duas horas, de forma a que a camada ativa apresentasse uma resposta estável no estado *off*.

6.2.2 *Doctor blade*

No que concerne, ao método de *doctor blade*, foram efetuados testes com PEDOT:PSS. Primeiramente, foram testadas duas soluções de PEDOT:PSS com diferentes condutividades, mais precisamente, PEDOT:PSS (PH 1000), que apresenta uma maior condutividade comparativamente ao PEDOT:PSS (AL4083), solução usada nos testes anteriores. Desta forma, é possível verificar qual das soluções se adapta melhor ao biossensor. Neste teste, foram utilizados os sensores relativos ao teste número 1, representados na Figura 22.

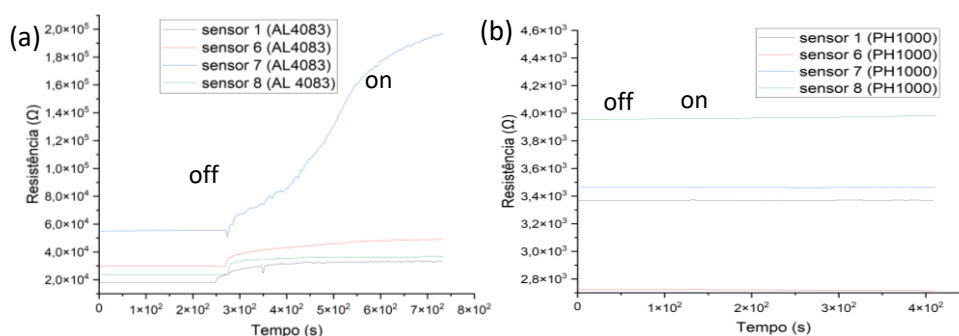


Figura 28- Resposta resistiva do conjunto de sensores para *tiramina* (1%) (a) com PEDOT:PSS (AL4083) e (b) PEDOT:PSS (PH1000).

Desta forma, e a partir dos resultados representados na Figura 28, a variação absoluta dos valores da resistência do conjunto dos sensores com PEDOT:PSS (PH1000) é praticamente nula. De acordo com este resultado, pode-se afirmar que este polímero não é o melhor para a formação das camadas ativas dos elétrodos, mantendo-se a utilização do PEDOT:PSS (AL4083) para os restantes testes. Neste primeiro teste, verifica-se que os sensores com PEDOT:PSS (AL4083) reagem de forma diferente quando em contacto com o

analito, uma vez que, a resistência dos sensores aumenta quando são expostos ao analito, informação contrária ao obtido na generalidade dos resultados. Este resultado pode estar relacionado com alguma danificação dos elétrodos ao se proceder à deposição.

Assim sendo, efetuaram-se testes com o PEDOT:PSS com *tiramina* (1%) e *trimetilamina* (1%). A partir da Figura 29 (a), referente aos dados da *tiramina* (1%), é possível, observar, que os sensores 4 e 8 apresentam respostas incoerentes. Estes sensores, no estado *on*, não atingem a estabilidade verificada nos outros testes. Relativamente, aos resultados obtidos na Figura 29 (b), em contacto com *trimetilamina* (1%), comparativamente à *tiramina* (1%), verifica-se uma resposta semelhante entre si, porém numa região distinta de valores da resistência. Neste teste não se verificaram incongruências nas respostas dos sensores e a resistência dos sensores diminui quando são expostos ao analito, o que é um comportamento expectável e contrário ao verificado no teste descrito anteriormente.

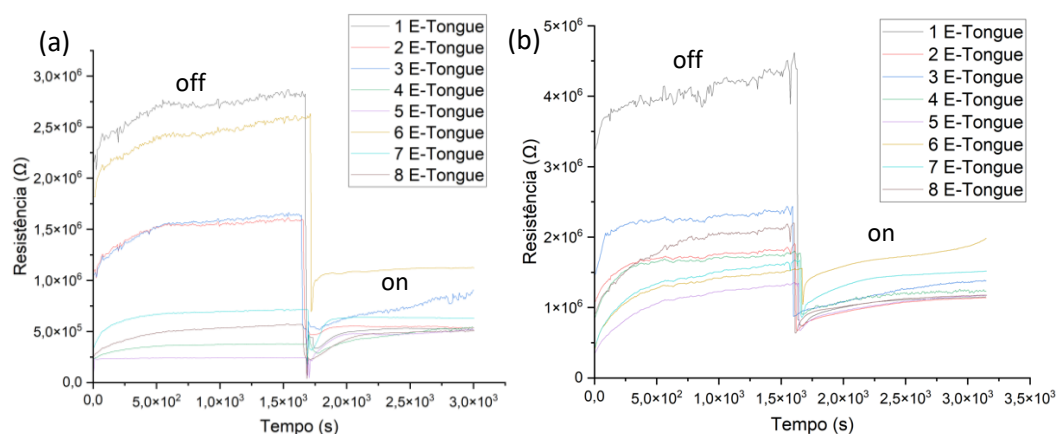


Figura 29- Gráfico da resistência do conjunto de sensores para (a) *tiramina* (1%) e (b) *trimetilamina* (1%).

6.2.3 Slot-die

6.2.3.1 Biomarcadores do trato ginecológico

Em relação ao método *slot-die* foram conduzidos testes com PEDOT:PSS, sendo estudada a reprodutibilidade entre as diferentes respostas de vários conjuntos de sensores idênticos, exposto a um mesmo estímulo. Deste modo, foram efetuados testes idênticos com dois conjuntos de sensores em contacto com *tiramina* (1%) e *trimetilamina* (1%). A partir dos dados representados na Figura 30 (a), constata-se que os sensores do primeiro conjunto tiveram uma maior discrepância, relativamente ao segundo conjunto de sensores, particularmente, a resposta do sensor 5. Comportamento este, que pode ser justificado pela danificação da camada ativa aquando da deposição do filme. Mesmo com esta diferença, os conjuntos comportam-se de forma semelhante. Este resultado é um bom indicador da reprodutibilidade entre testes, efetuados através deste método. Em conformidade, os resultados do teste com *trimetilamina* (1%), representados na Figura 30 (b), apresentam respostas similares entre os dois conjuntos de sensores.

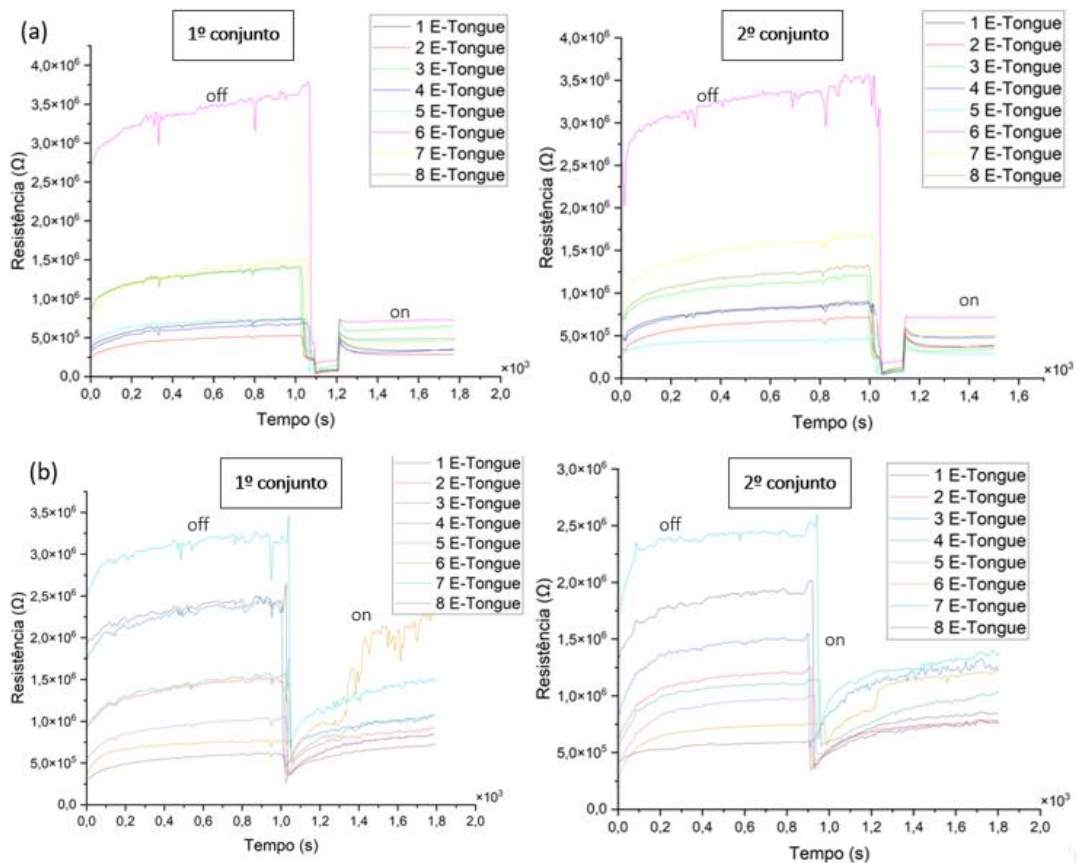


Figura 30- Gráfico da resistência com dois conjuntos de sensores para (a) tiramina (1%) e (b) trimetilamina (1%).

Para além dos testes referidos anteriormente, ainda foram realizados testes com a *putrescina* (1%), representado na Figura 31. A partir dos dados apresentados nessa figura, constata-se que as resistências dos diferentes sensores no estado *on* não estabilizaram e foram obtidos resultados contrários relativamente aos apresentados até ao momento, com este polímero, sendo expectável que a resistência dos sensores diminua quando são expostos ao analito.

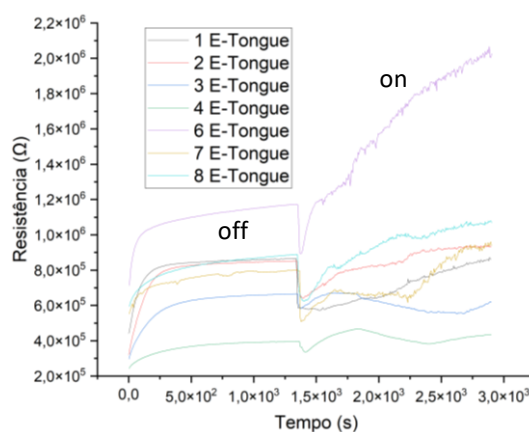


Figura 31- Gráfico da resistência do conjunto de sensores para *putrescina* (1%).

Posteriormente, foram efetuados testes com o P3HT com *trimetilamina* (1%) e *tiramina* (1%). A partir da Figura 32 (a), referente aos dados da *tiramina* (1%), é possível observar, que o conjunto de sensores apresenta respostas muito estáveis no estado *off*, utilizando P3HT, comparativamente ao PEDOT:PSS. Apenas

foi possível obter resultados em quatro dos oito sensores da totalidade do conjunto. Nem todos os sensores reagem da mesma forma em contacto com o analito. Relativamente aos resultados obtidos com *trimetilamina* (1%), representados na Figura 32 (b), comparativamente à *tiramina* (1%), apresentam uma resposta semelhante. Contrariamente aos resultados obtidos com PEDOT:PSS, nos testes anteriores, a variação absoluta dos valores da resistência da maioria do conjunto de sensores, com P3HT, aumenta quando são expostos ao analito (Figura 27).

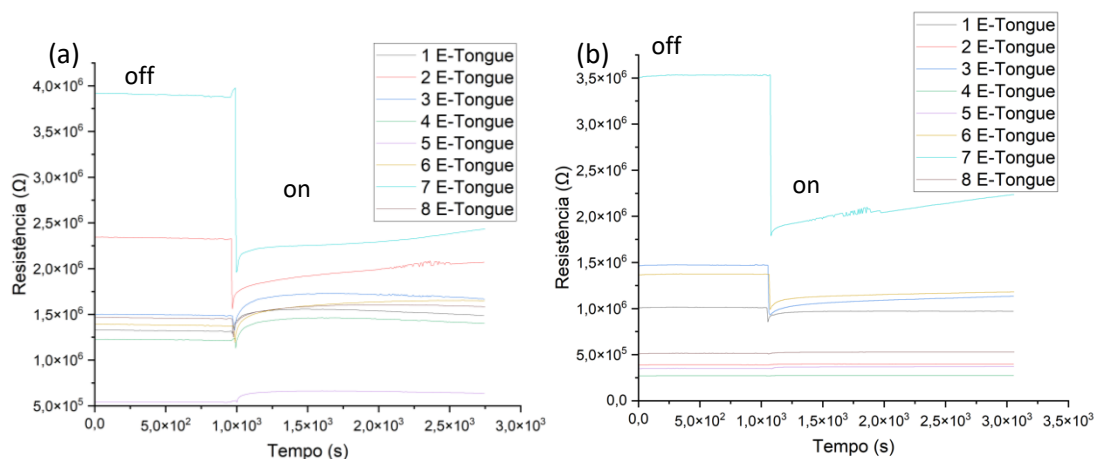


Figura 32- Gráfico da resistência do conjunto de sensores para (a) *trimetilamina* (1%) e (b) *tiramina* (1%).

6.2.3.2 Biomarcadores do trato urinário

Em relação, aos analitos do trato urinário foram realizados testes, apenas, com o polímero PEDOT:PSS em contacto com o AU e o AA, ambos com concentrações de 100 μM. Relativamente, aos dados da resposta do conjunto de sensores em contacto com o AU, Figura 33 (a), é possível, observar, somente, resultados em quatro dos oito sensores da totalidade do conjunto de sensores. A variação absoluta dos valores das resistências dos sensores 2, 4 e 7, no estado *on* e *off*, é praticamente nula. Por outro lado, obtém-se respostas com todo o conjunto de sensores com o AA, Figura 33 (b). As resistências dos sensores, em contacto com os biomarcadores do trato urinário reagem de forma semelhante ao verificado com as aminas, diminuindo a resistência dos sensores em interação com o biomarcador.

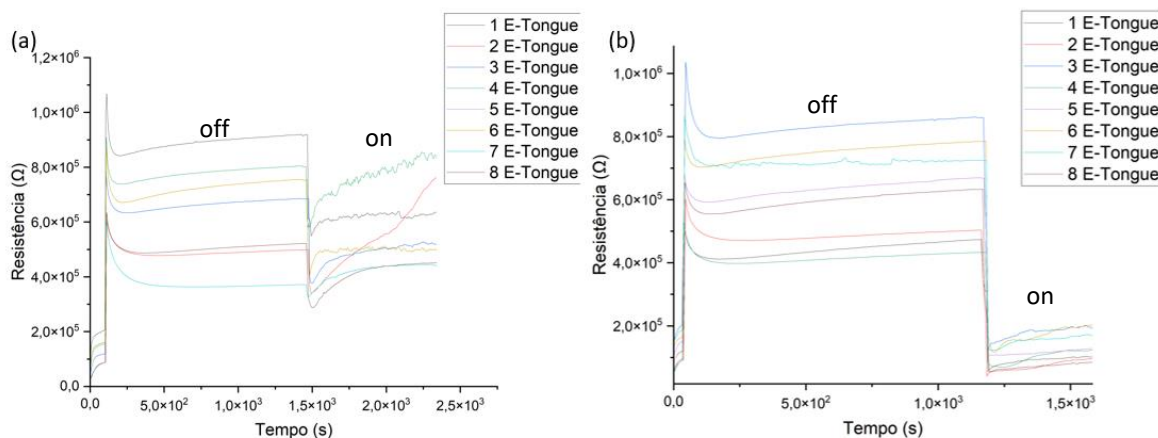


Figura 33- Gráfico da resistência do conjunto de sensores para (a) AU (100 μM) e (b) AA (100 μM).

6.2.4 Síntese dos resultados obtidos do sistema E-Tongue

Em suma, os resultados obtidos com o sistema *E-Tongue* foram melhores com o método *slot-die*, em relação aos outros dois métodos, tal como se inferiu com o sistema *E-Nose*. Verifica-se também que os polímeros que melhor se adaptaram ao sistema correspondem ao PEDOT:PSS e o P3HT, pois obtiveram

resultados mais concisos relativamente aos restantes. Com este sistema não foi possível obter uma resposta clara com o analito *putrescina* (1%).

6.3 Discussão de todos resultados obtidos

Primeiramente, através do *método spin coating*, independentemente do polímero semiconductor e do biossensor utilizado, verifica-se que as espessuras das camadas ativas são muito finas, não existindo garantia de que o filme criado é uniforme em toda a área da camada ativa. Esta desuniformidade pode ser causada por diversos fatores, como por exemplo, o erro humano no momento da deposição do filme, afetado pela sincronização da deposição com o *spin coater*, entre outros fatores. Desta forma, não se garante a reprodutibilidade entre testes com este método.

Em segundo lugar, os sensores preparados com *doctor blade*, apresentam, um comportamento muito mais regular e constante na fase *off*, principalmente, utilizando o P3HT no sistema *E-Tongue*. Dessa forma, pode-se diminuir o tempo necessário para alcançar a estabilidade dos sensores no estado *off*, tornando o processo mais eficaz para a deteção das diferentes patologias. Apesar desta técnica colmatar o problema da uniformidade do filme formado, não se consegue, ainda, obter reprodutibilidade entre testes.

Por último, recorreu-se ao método de *slot die*, processo com produção de filmes rápido, preciso e com uma grande eficiência. A principal vantagem desta técnica, relativamente às restantes aplicadas, consiste na capacidade de definir uma largura precisa da deposição, efetuando um revestimento uniforme, em termos de espessura e homogeneidade. Constatou-se que através desta técnica e a partir dos resultados obtidos para dois conjuntos de sensores iguais, com um mesmo estímulo, apresentam respostas reprodutíveis. Para além disso, o polímero P3HT apresentou resultados promissores no sistema *E-Tongue*, apresentando um comportamento mais estável no estado *off*, como foi referido anteriormente. Desta forma, existe a possibilidade de utilizar ou o PEDOT:PSS ou o P3HT, na formação das camadas ativas, na realização de testes com o sistema *E-Tongue*. A utilização do P3HT apresenta uma vantagem face ao PEDOT:PSS, devido ao comportamento hidrofóbico deste polímero no contacto direto com os diversos analitos, não “dissolvendo” a camada ativa durante a deteção das respostas dos sensores. No entanto, o P3HT carece de mais resultados para confirmar a sua utilização na deteção dos biomarcadores.

6.4 Aplicação do método PCA

6.4.1 Dados obtidos através do sistema *E-Nose*

Após a obtenção de todos os dados, relativos às respostas do conjunto de sensores em contacto com os diferentes analitos, nos dois sistemas, procedeu-se à aplicação do método PCA.

Primeiramente, é necessário efetuar um pré-processamento dos dados, delimitando-os em duas zonas, estados *on* e *off*, para suprimir dados que não correspondam à zona estável do sensor. A partir dessas delimitações, retira-se o valor médio da resistência no estado *off* dos diferentes sensores. Esse valor é subtraído aos valores detetados no estado *on*, considerando-se a variação absoluta dos valores das resistências. Após todo este processo, aplica-se o método de PCA à matriz dos $|\Delta R's|$ de todos os sensores, obtidos nos diferentes testes, descritos anteriormente.

Em relação, aos dados obtidos a partir do sistema *E-Nose*, foram determinados os padrões característicos da resposta com a *tiramina* (1%), obtidos através dos métodos *doctor blade*, *spin coating* e a *putrescina* (1%), com o método de *spin-coating*. Não foi possível determinar o padrão para a *trimetilamina*.

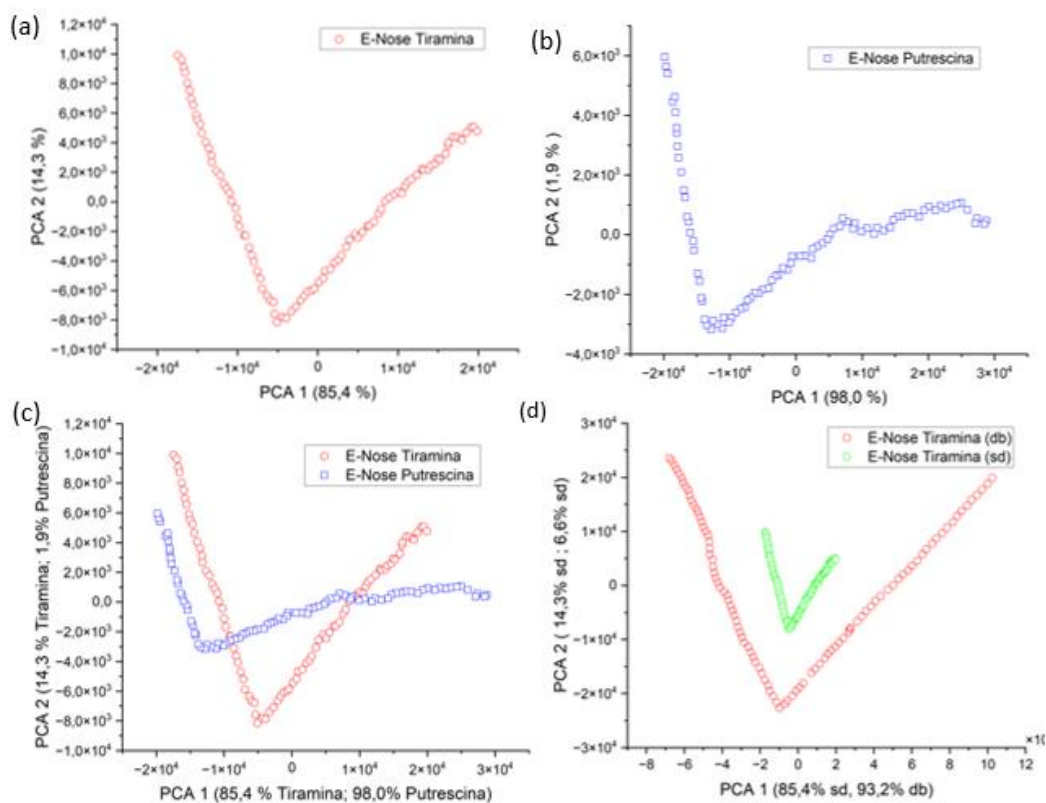


Figura 34- Gráfico das componentes principais da resposta *E-Nose* (a) da *tiramina* (1%), (b) *putrescina* (1%), através do método *slot-die*, da representação simultânea (c) dos dois biomarcadores e (d) dos dados obtidos da *tiramina* (1%) com os métodos *doctor blade* e *slot-die*.

A partir do padrão, associado à *tiramina* (1%), Figura 34 (a), constata-se uma elevada percentagem das componentes principais 1 e 2, mais precisamente de 99,7%. Relativamente, ao padrão obtido para a *putrescina* (1%), verifica-se uma resposta semelhante, Figura 34 (b), com um somatório das componentes 1 e 2, de 99,9%. Através da representação simultânea do PCA destas duas aminas, Figura 34 (c), infere-se que estas estão sobrepostas em duas regiões, estando caracterizadas em zonas idênticas do PCA. Desta forma, através da aplicação deste método, torna-se difícil distinguir os diferentes analitos.

Por último, observa-se, simultaneamente, o PCA da *tiramina* (1%), a partir de dados obtidos de sensores, com diferentes métodos da formação da camada ativa (*doctor blade* e *slot-die*), representado na Figura 34 (d). Verifica-se que os padrões característicos desta amina são semelhantes entre os métodos, porém em zonas distintas, sem sobreposições. Mantem-se a elevada percentagem dos componentes 1 e 2, de 99,7% nas duas técnicas. Este resultado indica que o padrão obtido para as aminas pode variar consoante a técnica de deposição de filmes efetuada no conjunto de sensores.

6.4.2 Dados obtidos através do sistema *E-Tongue*

6.4.2.1 Biomarcadores do trato ginecológico

No que concerne, aos dados obtidos a partir do sistema *E-Tongue*, foram determinados os padrões característicos da resposta com a *tiramina* (1%) e *trimetilamina* (1%), através dos métodos *doctor blade* e *spin coating*. Não foi possível determinar o padrão para a *putrescina*.

A partir do padrão, associado à *tiramina* (1%), Figura 35 (a), constata-se uma elevada percentagem das componentes principais 1 e 2, mais precisamente de 99,4%, semelhante ao verificado no sistema *E-Nose*. Relativamente, ao padrão obtido da *trimetilamina* (1%), verifica-se uma resposta semelhante com a *trimetilamina* Figura 35 (b), com um somatório das componentes 1 e 2, de 95,9%. No que se refere, à representação simultânea do PCA destas duas aminas, Figura 39 (c), observa-se que a *tiramina* (1%) está

totalmente incluída na região característica da *trimetilamina* (1%). Estes dois analitos apresentam uma maior dispersão nos seus padrões.

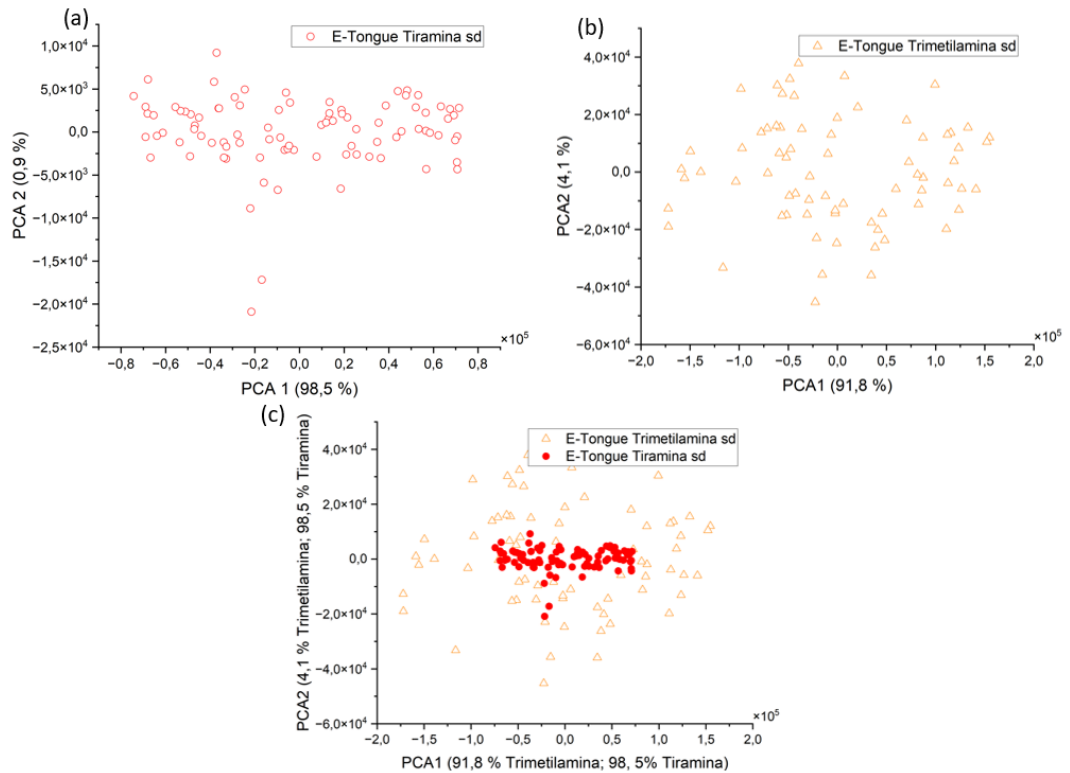


Figura 35- Gráfico das componentes principais da resposta *E-Tongue* (a) da *tiramina* (1%), (b) *trimetilamina* (1%) e (c) representação simultânea dos biomarcadores, através do método *slot-die*.

De seguida, a Figura 36, evidencia o PCA obtido com as mesmas aminas de sensores de camadas ativas efetuadas através da técnica *doctor blade*. Através destas figuras, afere-se que, mesmo mudando o método, o sumário das componentes principais 1 e 2 apresentam valores elevados, mais precisamente de 99,1%, relativamente à *tiramina* (1%), Figura 36 (a), e 98,0% ,Figura 36 (b), para a *trimetilamina* (1%). O padrão característico destas aminas apresenta uma menor dispersão relativamente aos representados na Figura 35.

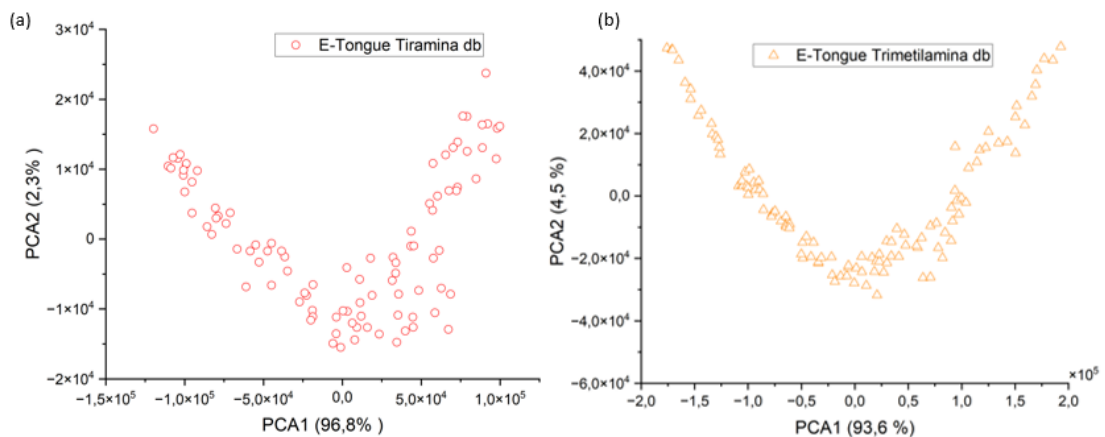


Figura 36- Gráfico das componentes principais da resposta *E-Tongue* em resistência dos sensores dos resultados obtidos através do método *doctor blade*. (a) PCA da *tiramina*, (b) *trimetilamina*.

Além disso, representa-se, simultaneamente, o PCA da *tiramina* (1%) e *trimetilamina* (1%) (Figura 37 (a) e (b), respetivamente), a partir dos dados obtidos de sensores, com diferentes métodos da formação da camada ativa (*doctor blade* e *slot-die*). Nessa figura, verifica-se que a *tiramina* (1%) apresenta um comportamento muito semelhante, independentemente do método de preparação de filmes, enquanto a *trimetilamina* (1%) difere, dependente do método, obtendo-se resposta menos dispersa com a técnica *doctor blade*, mantendo a região característica do PCA desta amina.

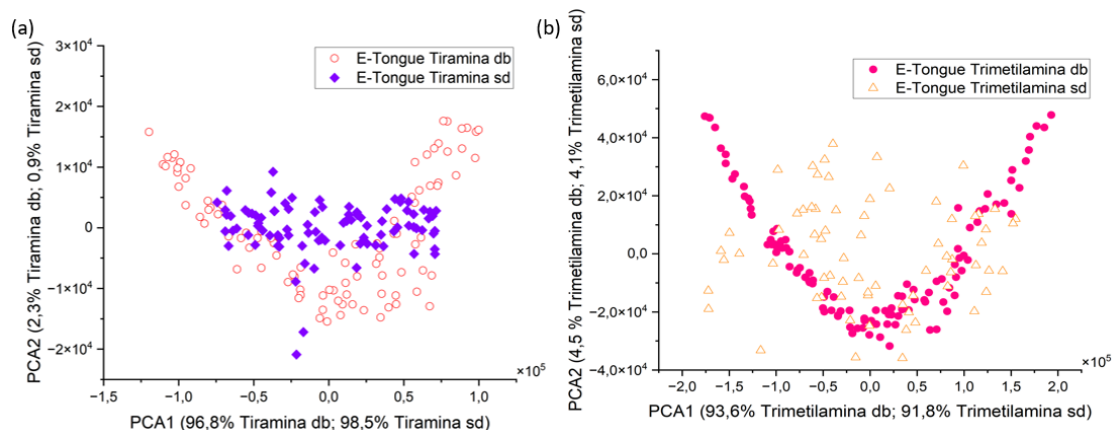


Figura 37- Gráfico das componentes principais da resposta *E-Tongue* com (a) *tiramina* (1%) e (b) *trimetilamina* (1%) com os métodos *doctor blade* e *slot-die*.

De seguida, é importante referir os padrões da *trimetilamina* (1%) e *tiramina* (1%), obtidos com P3HT, relativamente ao PEDOT:PSS através do método *slot-die*. A partir da representação simultânea das componentes principais 1 e 2, verifica-se que o padrão da *tiramina* é semelhante entre os dois polímeros, Figura 38 (a). Por outro lado, obtém-se um padrão menos disperso com o P3HT para a *trimetilamina* e numa região mais restrita, Figura 38 (b).

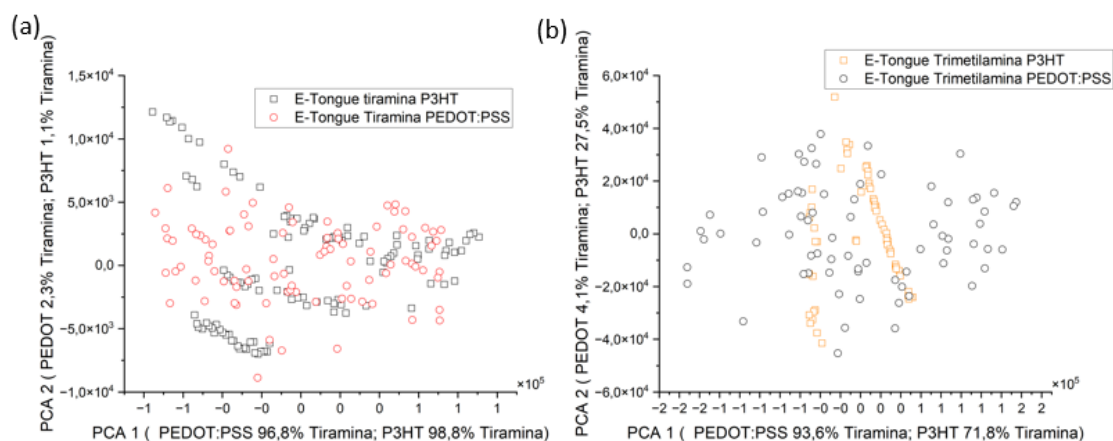


Figura 38- Gráfico das componentes principais da resposta *E-Tongue* com (a) *tiramina* (1%) e (b) *trimetilamina* (1%) com o método *slot-die*.

6.4.2.2 Biomarcadores do trato urinário

Por fim, representa-se, simultaneamente, o PCA do AA e do AU, apresentando uma elevada percentagem das componentes principais 1 e 2, mais precisamente de 98,0% (AA) e 99,6% (AU). A grande diferença entre os padrões destes dois biomarcadores, consiste na menor dispersão do padrão do AA. Através da representação simultânea do PCA destes dois analitos (Figura 39) infere-se que estão sobrepostos em várias zonas. Desta forma, é difícil distinguir o AA e o AU aplicando este algoritmo de reconhecimento de padrões.

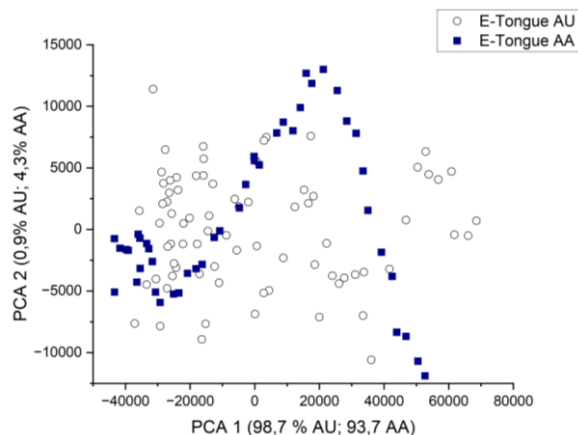


Figura 39- Gráfico das componentes principais da resposta com *E-Tongue* AA (100 μ M) e AU (100 μ M) com o método *slot-die*.

6.4.3 Síntese de resultados

As alterações resistivas dos sistemas *E-Nose/E-Tongue* na presença de diferentes tipos de biomarcadores de aminas (*tiramina*, *trimetilamina* e *putrescina*) e de biomarcadores do trato urinário (AA e AU), podem ser utilizadas para melhorar a detecção dos mesmos. Na Figura 40, é apresentado um exemplo para a *trimetilamina* (1%), único biomarcador com respostas válidas nos dois sistemas, mostrando um padrão similar entre eles.

Neste caso, uma especificação mais precisa de cada tipo de amina é predominante num fluido, pode ser obtida. Os componentes PCA estão dispersos numa pequena gama com um padrão característico, para ambos os sistemas de *E-Tongue* e *E-Nose* quando expostos ao biomarcador *tiramina*, independente do método de criação dos filmes.

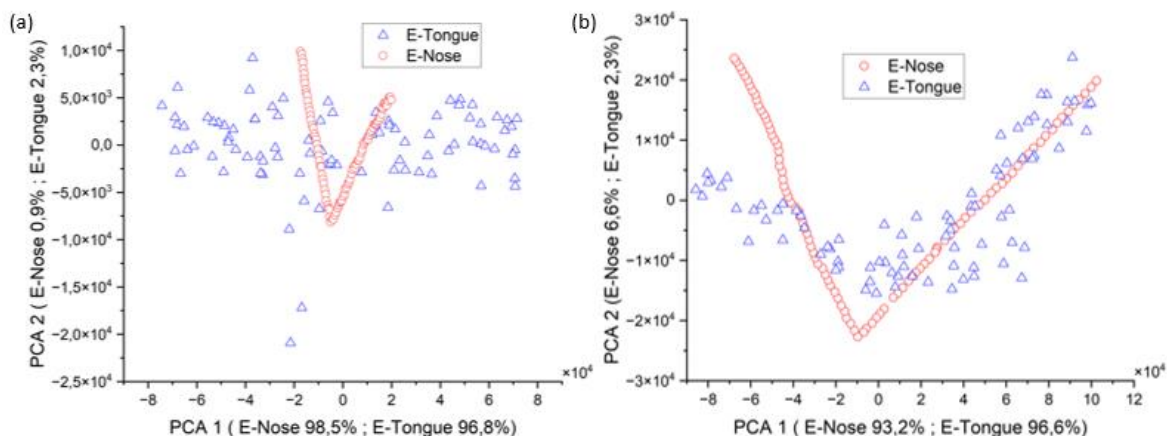


Figura 40- Gráfico das componentes principais da resposta com *tiramina* (1%) (a) através de *doctor blade* e (b) *slot-die*.

Quando se sobrepõe as diferentes regiões de PCA dos diferentes biomarcadores, representado na Figura 41 (a), verifica-se que existem zonas em comum o que pode dificultar a detecção eficaz das diferentes aminas, o que era exetável, uma vez que as composições químicas das mesmas são muito semelhantes. Em conformidade, o PCA dos biomarcadores do trato urinário está sujeito ao mesmo problema. Desta forma, surge a necessidade da utilização de um processo mais eficiente para a distinção das mesmas, como por exemplo, a criação de redes neuronais artificiais.

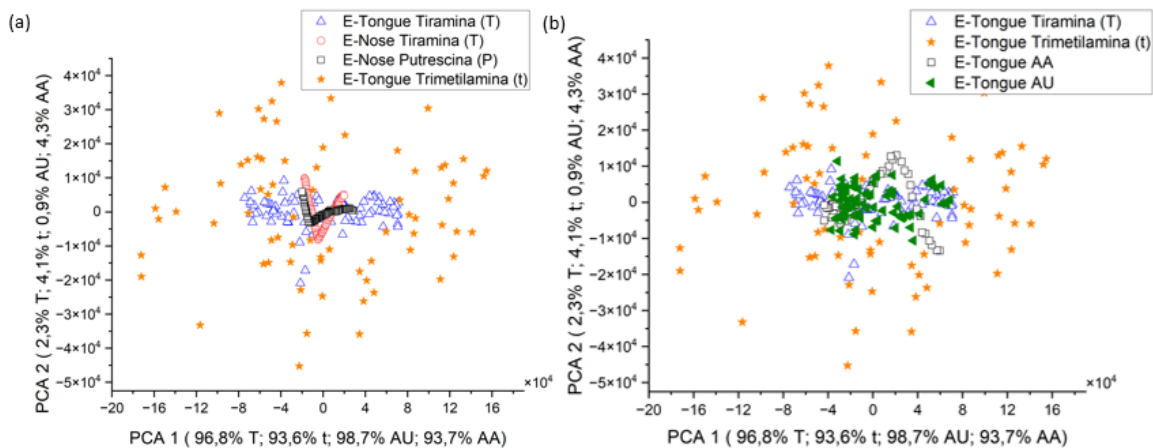


Figura 41- Sobreposição dos dados PCA (a) da *tiramina* (1%), *trimetilamina* (1%) e *putrescina* (1%) obtidos pelo sistema *E-Nose/E-Tongue* e (b) da *tiramina* (1%), *trimetilamina* (1%), *AA* e *AU* do sistema *E-Tongue*.

Convém referir, do evidenciado na figura anterior, que no caso específico da mistura de biomarcadores de patologias do trato ginecológico (aminas) com as do trato urinário (*AA* e *AU*), fica claro que, em algumas situações no *E-Tongue* é possível haver alguma probabilidade de deteção qualitativa de alguns biomarcadores (p.ex. *trimetilamina* versus *AA* e *AU* ou *tiramina*) dada a dispersão das duas primeiras componentes principais. Contudo, uma análise mais assertiva parece ser algo difícil. Uma hipótese futura será a introdução de (pelo menos) mais uma *feature* no sistema *E-Tongue*, nomeadamente, adicionando a diferenciação do polímero da camada ativa com a geometria do sensor.

6.5 Criação de redes neuronais e teste das mesmas

Após a verificação de algumas dificuldades na utilização do método PCA, por este, não apresentar capacidades em distinguir, de forma clara, os biomarcadores, procedeu-se à aplicação de um método mais avançado, nomeadamente as RNA. Estas redes foram criadas, com o auxílio do Matlab e são constituídas por oito neurónios iniciais que são treinados, o correspondente a cada um dos oito sensores, aplicando o algoritmo *Back-propagation*, descrito na seção 3.1.3.2. Estes oito neurónios, interagem com dez camadas intermédias na fase de treino. Para este treino, basicamente procedeu-se à criação de um *data set* de input (os $|\Delta R|$ específicos para um analito em treino de reconhecimento) e um *output* conhecido, identificador desse mesmo analito.

Ao longo do processo de aprendizagem, o sistema extrai informações sobre os padrões inseridos no mesmo, consistindo num ajusto iterativo dos *weights* associados às conexões, até se obter o *target* (*output* desejado) e criando-se assim, a função matemática que representa a rede neuronal. Desta forma, é possível testar a capacidade da rede em reconhecer os diferentes biomarcadores, confrontando a mesma com novos dados desconhecidos, ou seja, sujeitar a rede a um teste cego (*blind test*), para verificar a sua resposta.

Primeiramente, para criar RNA é necessário efetuar o pré-processamento das respostas dos sensores, em contacto com os diferentes biomarcadores, seguindo-se o mesmo método explicado no PCA. Através dos dados obtidos, é criado a matriz *target* da rede neuronal, contendo os valores da variação absoluta das resistências dos sensores no *estado on* e *off* ao interagir com os diferentes biomarcadores.

Uma matriz *M*, corresponde a um conjunto de vetores de entrada, denominados preditores. Para além disso, é necessário definir uma nova matriz, ou seja, um conjunto de vetores resposta que indique à rede neuronal artificial as diferentes classes associadas às diferentes observações. Por conseguinte, definiu-se uma matriz *T* composta apenas por um e zero. Cada resposta tem estes dois elementos, o que indica a correlação entre a classe e a observação. Quando os preditores devem ser classificados em *N* classes diferentes, as respostas têm *N* elementos.

Para classificar padrões, utilizou-se a aplicação de Reconhecimento de Padrões da Rede Neuronal no Matlab usando o algoritmo *nprtool*. Este algoritmo tende a resolver um problema de classificação de

reconhecimento de padrões usando uma rede *patternnet* (redes de reconhecimento de padrões que podem ser treinadas para classificar entradas de acordo com as classes de destino) *feed-forward* de duas camadas com neurónios de saída *sigmoid*. De seguida, o programa realiza uma fase de treino com 70% dos dados de forma aleatória, quinze % dos dados para a validação e os restantes quinze % para a fase de teste (que verifica se a rede é convenientemente treinada) (Figura 42). Este programa, ainda permite, depois da rede ser criada, gerar o código da rede neuronal resultante, o que possibilita a realização de testes cegos e ver a sua resposta.

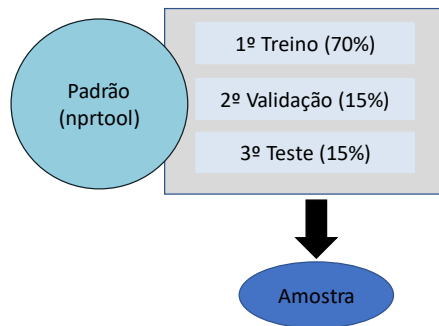


Figura 42- Criação da rede neuronal através da utilização do algoritmo *nprtool* do Matlab. Adaptado de [53].

A partir de dados obtidos, com sensores de camadas ativas efetuadas com o método *slot-die* com PEDOT:PSS, em contacto com *tiramina* (1%) e *trimetilamina* (1%), testadas com o sistema *E-Tongue*, criou-se a matriz M e a correspondente matriz T , com dados de dois testes de cada um dos analitos. A escolha destes dados, para a criação das matrizes, é explicada por diversos motivos. Primeiramente, os dados correspondem a sensores efetuados com a técnica de deposição mais reproduzível. Em segundo lugar, os testes entre si utilizam o mesmo polímero e biossensor, mantendo-se o máximo de variáveis constante e, por último, estas aminas apresentaram o maior número de resultados adquiridos com o método de formação da camada ativa. Basicamente, temos um número de classes – as duas aminas – com um conjunto completo e similar de sensores – *features*, no total oito – e um significativo número de observáveis que é exigido (em nenhuma outra situação neste trabalho se conseguiu assertivamente este conjunto).

Através da matriz M e T , explicadas anteriormente, foi possível criar uma RNA com as seguintes características de *confusion plot*, nas diferentes fases treino, validação e teste e ainda as curvas *receiver of characteristics* (ROC), representadas na Figura 43. Relativamente, aos gráficos ROC é relevante explicitar que as duas células diagonais mostram o número e a percentagem de classificações corretas por parte da RNA.

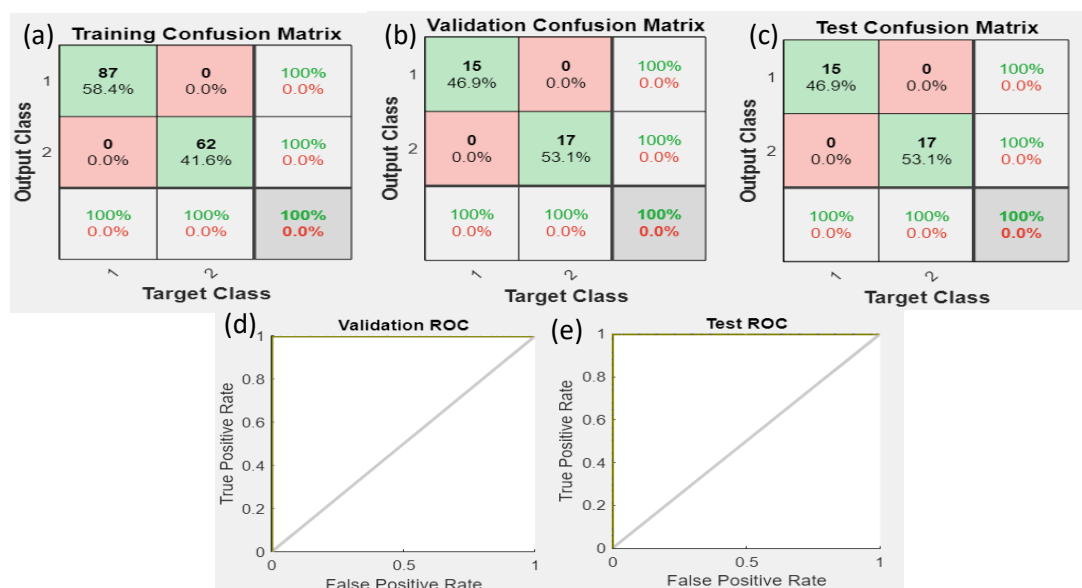


Figura 43- *Confusion plot* na (a) fase de treino, (b) validação, (c) teste e curvas ROC da fase de (d) validação e (e) teste, relativas à rede neuronal criada. De referir que nos gráficos ROC as linhas referentes às classes estão alinhadas segundo os *true positive rate* (1 ou 100%) e *false positive rate* (1 ou 100%) não se

distinguindo nas marcações (só é visível uma das classes). A linha na diagonal representa (se alguma das linhas das classes se aproximarem dela) a situação de não validação da rede.

Com este resultado, verifica-se que na fase de treino, apenas se constata observações classificadas corretamente, com 87 acertos (verdadeiro positivo) e 62 valores rejeitados corretamente (verdadeiro negativo). O comportamento manteve-se nas restantes fases da criação da RNA. A fase de validação e teste, apresentam os mesmos valores representados no *confusion plot*, com dezasseis acertos e dezassete valores rejeitados corretamente. O facto da RNA não apresentar valores classificados, incorretamente, pode ser justificado pela quantidade escassa de dados com que a mesma é treinada.

As curvas ROC é uma métrica usada para verificar a qualidade dos classificadores na RNA criada. Neste gráfico, são calculados dois valores relativos à relação positiva verdadeira (TPR) e a relação positiva falsa (FPR). Assim sendo, os gráficos ROC obtidos corroboram as afirmações descritas dos resultados visualizados no *confusion plot*, nas diversas fases da criação da RNA.

A partir da RNA criada, foi realizado um "teste cego", testando-a com dados da ΔR_n , $n=1, \dots, 8$ com os mesmos sensores, mas efetuados com outra técnica (*doctor blade*), expostos ao analito *tiramina* (1%). Este teste indicou como resultado, uma probabilidade de 95,6%, do analito que estava a analisar, corresponder à *tiramina*. Assim sendo, este resultado é um bom indicador de que as RNA conseguem distinguir, de forma precisa, as diferentes aminas, independentemente da técnica usada, obtendo-se, assim, o conceito prova.

Como indicação global, este trabalho provou ser viável construir um sistema de *E-Tongue* e *E-Nose*, *low cost* e baseado em eletrónica impressa, para deteção, qualitativa, de biomarcadores de patologias do foro ginecológico (aminas) e urinário (ácido úrico e ácido ascórbico). Tanto quanto é do nosso conhecimento, foi a primeira vez que tal foi desenvolvido com este pormenor. Deste o trabalho fundamental de desenvolvimento dos sensores, otimização de técnicas de deposição dos filmes da camada ativa até aos inúmeros testes, foi finalmente possível chegar a sistemas que podem ser claramente aprimorados no futuro, dado que mostraram a sua viabilidade. Na avaliação qualitativa de dados, as técnicas de redução de dimensionalidade como o PCA, mostraram alguma dificuldade no reconhecimento de padrões específicos dos biomarcadores, embora os inúmeros resultados indicam que seja eventualmente possível aumentar a seletividade através da adição de pelo menos mais uma *feature* no sistema de sensores, trabalhando com dois diferentes polímeros (PEDOT:PSS e P3HT) juntamente com as diferentes geometrias dos elétrodos interdigitados. Paralelamente, com a utilização de RNAs foi finalmente possível um conceito de prova de grande interesse que é a identificação to tipo de amina, na medida em que diferentes colónias de bactérias têm "assinatura" de uma ou mais aminas estudadas neste trabalho.

Finalmente, realça-se que a importância destes resultados serão de grande interesse no desenvolvimento de sistemas *E-Nose* no âmbito de um projeto tecnológico em curso (*OliHealth*) na área da biomédica.

7 Conclusões, Limitações e Linhas Futuras de Investigação

No estado da arte deste trabalho, foi possível mostrar claramente o elevado potencial de biossensores baseados nos conceitos *E-Nose / E-Tongue* na prevenção, despistagem e mesmo deteção de patologias várias, embora ainda carecendo de uma confiabilidade que assegure a sua utilização comum em ambiente médico real. Neste sentido, tornou-se imperativo a necessidade de encontrar respostas claras, para os atuais impedimentos, e garantir uma otimização destes sistemas que seja compatível com o rigor necessário à sua utilização quotidiana, em particular no conceito *home care*. Através de uma visão bastante alargada, foram abordados os principais aspetos a ter em consideração no desenvolvimento de um sistema *E-Nose / E-Tongue* e fundamentadas as reais expectativas de sua futura evolução.

Neste sentido, foi realizado uma investigação, fruto do atual estado da arte e do conhecimento anterior próprio (bem como das colaborações a nível médico atuais), especificamente, vocacionado para a despistagem de patologias do foro ginecológico e urinário, baseado nos dois tipos de biossensores específicos (aminas e ácidos). Assim sendo e tendo em consideração, que os analitos biológicos de interesse em ambos os tipos de patologias, podem ser odoríferos ou não (apenas presente em fluidos sem emanção de odor), procura-se tentar encontrar uma resposta alargada, no âmbito das despistagens patológicas de referência.

Os polímeros utilizados (PEDOT: PSS, P3HT, PANi e MEH-PPV) e os métodos de deposição, foram testados usando os sistemas *E-Nose/E-Tongue* com diferentes conjuntos de sensores e diferentes camadas ativas, de maneira a obter o conjunto de sensores com maior variabilidade, polímeros com respostas mais significativas e o melhor método de deposição de filmes para a aplicação pretendida. Através desses mesmos testes, verificou-se que apenas dois dos quatro polímeros apresentavam resultados significativos, especificamente, o PEDOT:PSS e o P3HT. Para além disso, o método de deposição mais reprodutível e preciso corresponde ao método *slot-die*.

Relativamente ao sistema *E-Nose*, constatou-se que entre todos os polímeros estudados, o PEDOT:PSS responde de forma mais significativa aos analitos. O mesmo não se aplica nos testes com o P3HT. A partir dos estudos efetuados com este sistema, não se obteve resultados com a *trimetilamina* por ser demasiado volátil e saturar os sensores. Comparativamente no sistema *E-Tongue*, observou-se respostas com dois polímeros, referidos anteriormente, apresentando uma resposta viável com a maioria dos biomarcadores das diferentes patologias do foro ginecológico e urinário. Importa salientar, que a vantagem de se usar o polímero P3HT, assenta no facto de este possuir uma resposta hidrofóbica com a água, comparativamente, ao PEDOT:PSS. De grosso modo, esta característica acaba por auxiliar os testes com o sistema *E-Tongue*, uma vez que, a camada ativa não tende a dissolver (se demasiado fina), no momento do teste.

Neste sentido e de forma a obter o padrão característicos dos diferentes biomarcadores, a partir dos dados obtidos, foram aplicados dois métodos, PCA e RNA. Em conformidade com as respostas dos sistemas *E-Nose* e *E-Tongue*, ficou perceptível a criação de um padrão específico para cada biomarcador envolvido, e portanto, melhorar a deteção. Esta constatação, somente, se aplica nos casos em que os biomarcadores apresentam uma resposta com os dois biossensores. No entanto, quando se sobrepõe os valores de PCA dos diferentes biomarcadores, estes estão sobrepostos em várias zonas, o que indica que este método não se visualiza, como sendo, o mais indicado para distinguir (na sua maioria, mas apenas limitado) os biomarcadores de interesse das diferentes patologias estudadas. Contudo, quando se aplicou RNA e sujeitou-se a mesma aos dados da *tiramina*, num *blind test*, obteve-se uma probabilidade de 95,6% de corresponder ao analito certo. Desta forma, este método apresentou bons indícios em distinguir os biomarcadores de patologias ginecológicas. É de extrema importância, referir que não foram efetuados testes, com dados relativos a biomarcadores de patologias do trato urinário, derivado à escassez de dados adquiridos.

A principal limitação da presente investigação, relacionou-se, essencialmente, com o tempo limitado para a obtenção de um número de resultados característicos dos diferentes biomarcadores (observáveis), para a criação e ensino das redes neuronais, a partir do método considerado mais viável para a criação da camada ativa do conjunto de sensores escolhidos (*slot-die*).

Em virtude destes factos, sugere-se como futuras linhas de investigação, efetuar um estudo mais exaustivo, de forma a obter um banco de dados considerável, definindo-se melhor as *features* das redes neuronais e testar a viabilidade das redes criadas. Tudo isto, com a finalidade de aprimorar e aumentar o alcance

de deteção, como também, averiguar se é possível distinguir os diferentes biomarcadores através de redes neuronais com um valor elevado de fiabilidade. É relevante, ainda, desenvolver testes com valores distintos de concentração dos biomarcadores, para verificar a sensibilidade quantitativa do sensor e incorporar mais subclasses de cada analito nas redes neuronais, tornando-a mais complexa. A inclusão de outros biomarcadores, nomeadamente, nas patologias do trato urinário, em especial a *dopamina*, é de extrema importância. A *dopamina* é um neurotransmissor de relevo, tendo funções em diferentes sistemas, principalmente no sistema nervoso central, renal, hormonal e sistema cardiovascular. O nível deste neurotransmissor, pode fornecer informações de diversas doenças, como Alzheimer [31]. Para além disto, sugere-se, realizar testes utilizando soluções mistas de diferentes biomarcadores, para testar a capacidade da rede neuronal, em diferenciar os diferentes analitos quando não se encontram isolados uns dos outros no mesmo ambiente, simulando melhor as condições do teste real.

Por último, e num ambiente *home care / home health*, recomenda-se, o desenvolvimento de sistemas integrados de deteção (neste caso especificamente uma deteção qualitativa) um protótipo está em estado de preparação e deverá ser integrado futuramente nos sistemas que se encontram em desenvolvimento no projeto *OliHealth*.

Este trabalho foi apresentado em comunicação na conferência ANM2022:

Amine biomarkers for Bacterial Vaginosis detection using an electronic-Nose and electronic-Tongue system with nanostructured flexible sensors, Armando Lemos, Joana Pimenta, J. Martinez de Oliveira and Luiz Pereira, ANM2022 – 19th International Conference on Advanced Nanomaterials, 27-29 July 2022, Aveiro, Portugal.

8 Referências

- [1] A. D. Wilson, "Application of electronic-nose technologies and VOC-biomarkers for the noninvasive early diagnosis of gastrointestinal diseases," *Sensors*, vol. 18, no. 8, 2018, doi: 10.3390/s18082613.
- [2] J. H. H. M. Van De Wijkert *et al.*, "The vaginal microbiota: What have we learned after a decade of molecular characterization?," *PLoS One*, vol. 9, no. 8, Aug. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0105998.
- [3] B. B. Bergamo, R. E. Garcia, and J. A. Giacometti, "SLE ad : Electronic Tongue Data Analysis System," 2007.
- [4] C. Magro, E. P. Mateus, M. Raposo, and A. B. Ribeiro, "Overview of electronic tongue sensing in environmental aqueous matrices: Potential for monitoring emerging organic contaminants," *Environ. Rev.*, vol. 27, no. 2, pp. 202–214, 2019, doi: 10.1139/er-2018-0019.
- [5] W. Hu *et al.*, "Electronic Noses: From Advanced Materials to Sensors Aided with Data Processing," *Adv. Mater. Technol.*, vol. 4, no. 2, p. 1800488, Dec. 2018, doi: 10.1002/admt.201800488.
- [6] E. Stark, S. Hoover, A. Decesare, and E. Barenholtz, "Medicine Has Gone to the Dogs: Deep Learning and Robotic Olfaction to Mimic Working Dogs," *IEEE Technol. Soc. Mag.*, vol. 37, no. 4, pp. 55–60, 2018, doi: 10.1109/MTS.2018.2876216.
- [7] N. S. Ramgir, "Electronic Nose Based on Nanomaterials: Issues, Challenges, and Prospects," *ISRN Nanomater.*, 2013, doi: 10.1155/2013/941581.
- [8] M. T. Kalit, K. Marković, S. Kalit, N. Vahčić, and J. Havranek, "Application of electronic nose and electronic tongue in the dairy industry," *Mljekarstvo*, vol. 64, no. 4, pp. 228–244, 2014, doi: 10.15567/mljekarstvo.2014.0402.
- [9] P. Choden, T. Seesaard, T. Eamsa-Ard, C. Sriphrapadang, and T. Kerdcharoen, "Volatile urine biomarkers detection in type II diabetes towards use as smart healthcare application," *2017 9th Int. Conf. Knowl. Smart Technol. Crunching Inf. Everything, KST 2017*, pp. 178–181, 2017, doi: 10.1109/KST.2017.7886086.
- [10] L. F. Valdez and J. M. Gutierrez, "Portable olfactometric platform," *Glob. Med. Eng. Phys. Exch. Am. Heal. Care Exch.*, pp. 3–8, 2016, doi: 10.1109/GMEPE-PAHCE.2016.7504634.
- [11] K. T. Tang, S. W. Chiu, C. H. Pan, H. Y. Hsieh, Y. S. Liang, and S. C. Liu, "Development of a portable electronic nose system for the detection and classification of fruity odors," *Sensors*, vol. 10, no. 10, pp. 9179–9193, 2010, doi: 10.3390/s101009179.
- [12] Z. Wu *et al.*, "Development of a Low-Cost Portable Electronic Nose," *Sensors*, 2020.
- [13] X. Zhan *et al.*, "Online conformal prediction for classifying different types of herbal medicines with electronic nose," *IET Conf. Publ.*, vol. 2018, no. CP754, pp. 1–8, 2018, doi: 10.1049/cp.2018.1730.
- [14] C. Wongchoosuk, M. Lutz, and T. Kerdcharoen, "Detection and classification of human body odor using an electronic nose," *Sensors*, vol. 9, no. 9, pp. 7234–7249, 2009, doi: 10.3390/s90907234.
- [15] T. Dymerski, J. Gebicki, P. Wiśniewska, M. Śliwińska, W. Wardencki, and J. Namieśnik, "Application of the electronic nose technique to differentiation between model mixtures with COPD markers," *Sensors (Basel, Switzerland)*, vol. 13, no. 4, pp. 5008–5027, 2013, doi: 10.3390/s130405008.
- [16] A. Pádua *et al.*, "Scalable and easy-to-use system architecture for electronic noses," *BIODEVICES 2018 - 11th Int. Conf. Biomed. Electron. Devices*, vol. 1, no. Biostec, pp. 179–186, 2018, doi: 10.5220/0006597101790186.
- [17] H. C. da Cruz, "Development of electrodes in polymeric flexible substrates for organic biosensors," 2015.
- [18] I. Kiselev *et al.*, "On the temporal stability of analyte recognition with an e-nose based on a metal oxide sensor array in practical applications," *Sensors*, vol. 18, no. 2, Feb. 2018, doi: 10.3390/s18020550.
- [19] S. A. Etgeton, F. Chassot, C. G. Boer, L. Donatti, T. I. E. Svidzinski, and M. E. L. Consolaro, "Influência da co-agregação entre *Candida albicans* e *Lactobacillus acidophilus* na capacidade de adesão destes microrganismos às células epiteliais vaginais humanas (CEVH)," *Acta Sci. - Heal. Sci.*, vol. 33, no. 1, pp. 1–8, 2011, doi: 10.4025/actascihealthsci.v33i1.7218.
- [20] K. Matsumoto, Y. Murakami, Y. Shimizu, T. Hirayama, W. Ishikawa, and M. Iwamura, "Electronic nose to distinguish bladder cancer by urinary odour feature: A pilot study," *Cancer Biomarkers*, vol. 28, no. 1, pp. 33–39, 2020, doi: 10.3233/CBM-190466.
- [21] M. N. Anahtar, D. B. Gootenberg, C. M. Mitchell, and D. S. Kwon, "Cervicovaginal Microbiota and Reproductive Health: The Virtue of Simplicity," *Cell Host Microbe*, vol. 23, no. 2, pp. 159–168, 2018,

- doi: 10.1016/j.chom.2018.01.013.
- [22] F. Águas and P. da S. Daniel., “Infecções Vulvovaginais,” *Soc. Port. Ginecol.*, pp. 1–52, 2012, [Online]. Disponível em: <http://www.spginecologia.pt/noticias-da-spg/revisao-dos-consensos-em-infecoes-vulgovaginais.html>
- [23] I. Zangl, I. J. Pap, C. Aspöck, and C. Schüller, “The role of lactobacillus species in the control of candida via biotrophic interactions,” *Microbial Cell*, vol. 7, no. 1. Shared Science Publishers OG, pp. 1–14, Jan. 01, 2020. doi: 10.15698/MIC2020.01.702.
- [24] T. M. Nelson, J. L. C. Borgogna, R. M. Brotman, J. Ravel, S. T. Walk, and C. J. Yeoman, “Vaginal biogenic amines: Biomarkers of bacterial vaginosis or precursors to vaginal dysbiosis?,” *Front. Physiol.*, vol. 6, no. SEP, pp. 1–15, 2015, doi: 10.3389/fphys.2015.00253.
- [25] T. A. Kuchmenko *et al.*, “Portable electronic nose system for fast gynecological-conditions diagnosis in consulting room: A case study,” *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 358, no. February, p. 131538, 2022, doi: 10.1016/j.snb.2022.131538.
- [26] H. Cruz *et al.*, “Development of e-nose biosensors based on organic semiconductors towards low-cost health care diagnosis in gynecological diseases,” *Mater. Today Proc.*, vol. 4, no. 11, pp. 11544–11553, 2017, doi: 10.1016/j.matpr.2017.09.065.
- [27] M. Gutiérrez-Capitán *et al.*, “Hybrid Electronic Tongues Applied to the Quality Control of Wines,” *J. Sensors*, vol. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/598317.
- [28] H. Xiao and J. Wang, “Discrimination of Xihulongjing tea grade using an electronic tongue,” *African J. Biotechnol.*, vol. 8, no. 24, pp. 6985–6992, 2009, doi: 10.4314/ajb.v8i24.68785.
- [29] J. M. Gutiérrez, A. Mimendia, R. Muñoz, L. Leija, P. R. Hernández, and M. Del Valle, “Monitoring of environmental systems using electronic tongues as sensor networks,” *Pan Am. Heal. Care Exch. PAHCE 2011 - Conf. Work. Exhib.*, pp. 72–76, 2011, doi: 10.1109/PAHCE.2011.5871851.
- [30] L. G. Dias, S. G. Meirinho, A. C. A. Veloso, L. R. Rodrigues, and A. M. Peres, *Electronic tongues and aptasensors*. Elsevier Ltd., 2017. doi: 10.1016/B978-0-08-100741-9.00013-9.
- [31] R. Cui, X. Wang, G. Zhang, and C. Wang, “Simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid, and uric acid using helical carbon nanotubes modified electrode,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 161, no. 1, pp. 1139–1143, 2012, doi: 10.1016/j.snb.2011.11.040.
- [32] J. Fernandes Filho, “Polímeros Semicondutores-Uma Breve Introdução Ao Assunto,” 2020, [Online]. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/13048>
- [33] H. Jiang, M. Zhang, B. Bhandari, and B. Adhikari, “Application of electronic tongue for fresh foods quality evaluation: A review,” *Food Rev. Int.*, vol. 34, no. 8, pp. 746–769, 2018, doi: 10.1080/87559129.2018.1424184.
- [34] T. Minami, T. Sato, T. Minamiki, and S. Tokito, “An extended-gate type organic FET based biosensor for detecting biogenic amines in aqueous solution,” *Anal. Sci.*, vol. 31, no. 7, pp. 721–724, 2015, doi: 10.2116/analsci.31.721.
- [35] T. Minami, T. Minamiki, and Y. Sasaki, “Development of enzymatic sensors based on extended-gate-type organic field-effect transistors,” *Electrochemistry*, vol. 86, no. 6, pp. 303–308, 2018, doi: 10.5796/electrochemistry.18-6-E2672.
- [36] M. J. Masnam *et al.*, “Principal Component Analysis – A Realization of Classification Success in Multi Sensor Data Fusion,” *Princ. Compon. Anal. - Eng. Appl.*, Mar. 2012, doi: 10.13140/2.1.2807.3926.
- [37] C. Degrave, J. Nicolas, and A. Romain, “PCA analysis , odour measurements and electronic nose advances”.
- [38] A. Hobdy, “Screen Printing For The Industrial User,” *Gwent Group Advanced Materials systems*, 1997. http://www.gwent.org/gem_screen_printing.html?fbclid=IwAR1seAmYxyxBawVEgk6TjLWAgUB_0bqtU2exkyGs57x16JpQZSPygjU9Vgk#principle (acessado em: Jun. 29, 2020).
- [39] B. S. Yilbas, A. Al-Sharafi, and H. Ali, “Surfaces for Self-Cleaning,” in *Self-Cleaning of Surfaces and Water Droplet Mobility*, Elsevier, 2019, pp. 45–98. doi: 10.1016/b978-0-12-814776-4.00003-3.
- [40] R. Cherrington and J. Liang, *Materials and Deposition Processes for Multifunctionality*. Elsevier Inc., 2016. doi: 10.1016/B978-0-323-34061-8.00002-8.
- [41] Y. Wen and J. Xu, “Scientific Importance of Water-Processable PEDOT–PSS and Preparation, Challenge and New Application in Sensors of Its Film Electrode: A Review,” *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 55, no. 7, pp. 1121–1150, 2017, doi: 10.1002/pola.28482.
- [42] Ossila, “Slot-Die Coating Theory, Design & Applications |,” *Ossila*. <https://www.ossila.com/en-eu/pages/slot-die-coating-theory> (acessado em: Ag. 29, 2022).

- [43] "Slot-Die Coater | Low Price Precision Coating | Ossila." <https://www.ossila.com/en-eu/products/slot-die-coater> (acessado em: Ag. 30, 2022).
- [44] Ossila, *Slot-Die Coater:User Manual*. 2019. [Online]. Disponível em: <https://downloads.ossila.com/manuals/slot-die-coater.pdf>
- [45] "Thin Film Coating Solution-Processing Techniques Compared | Ossila." <https://www.ossila.com/en-eu/pages/solution-processing-techniques-comparison> (acessado em: Ag. 30, 2022).
- [46] H. C. Da Cruz, "Development of electrodes in polymeric flexible substrates for organic biosensors," 2015.
- [47] R. A. Green and J. A. Goding, "11 - Biosynthetic conductive polymer composites for tissue-engineering biomedical devices," in *Biosynthetic Polymers for Medical Applications*, Elsevier Inc., 2016, pp. 277–298. doi: 10.1016/B978-1-78242-105-4.00011-0.
- [48] J. Liu *et al.*, "Polymeric ionic liquid — assisted polymerization for soluble polyaniline nano fi bers," no. II, 2020.
- [49] C. H. Rosmani, A. Z. Zainurul, M. Rusop, and S. Abdullah, "The Optical and Electrical Properties of Polymer Poly (3-Hexylthiophene) P3HT by Heat Treatment," *Adv. Mater. Res.*, vol. 1109, pp. 419–423, 2015, doi: 10.4028/www.scientific.net/amr.1109.419.
- [50] N. Yusoff, *Graphene-polymer modified electrochemical sensors*. Elsevier Inc., 2018. doi: 10.1016/B978-0-12-815394-9.00007-8.
- [51] P. Visciano and M. Schirone, "Update on Biogenic Amines in Fermented and Non-Fermented Beverages," *Foods*, vol. 11, no. 3, 2022, doi: 10.3390/foods11030353.
- [52] D. Ortiz-aguayo, M. Bonet-san-emeterio, and M. Valle, "Simultaneous Voltammetric Determination of Acetaminophen , Ascorbic Acid and Uric Acid by Use of Integrated Array of Screen-Printed Electrodes and Chemometric Tools," 2019.
- [53] M. del Valle, "Sensor Arrays and Electronic Tongue Systems," *Int. J. Electrochem.*, vol. 2012, pp. 1–11, 2012, doi: 10.1155/2012/986025.