



# INTEGRAÇÃO DE MACHINE LEARNING EM BIOSSENSORES: UM ESTUDO SOBRE A PREVISÃO DE GLUCOSE E CURVAS DE CALIBRAÇÃO

ANTÓNIO GABRIEL VALENTE DA SILVA ABREU

outubro de 2024

# **INTEGRAÇÃO DE MACHINE LEARNING EM BIOSSENSORES: UM ESTUDO SOBRE A PREVISÃO DE GLUCOSE E RETAS DE CALIBRAÇÃO**

**António Gabriel Valente da Silva Abreu**

**Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Biomédica**

**Orientadora: Felismina Teixeira Coelho Moreira**

**Co-orientadores: José Luís Sousa de Magalhães Lima; Joaquim Fernando Almeida  
Alves**

**Júri:**

Presidente:

Joaquim Fernando Almeida Alves, Professor Adjunto, ISEP

Vogais:

Felismina Teixeira Coelho Moreira, Investigadora Junior, ISEP

Ana Isabel Pereira, Professora Coordenadora, IPB

**Orientadora: Felismina Teixeira Coelho Moreira**

**Co-orientadores: José Luís Sousa de Magalhães Lima; Joaquim Fernando Almeida Alves**

**Júri:**

Presidente:

Joaquim Fernando Almeida Alves, Professor Adjunto, ISEP

Vogais:

Felismina Teixeira Coelho Moreira, Investigadora Junior, ISEP

Ana Isabel Pereira, Professora Coordenadora, IPB

Porto, outubro 2024

# Dedicatória

Aos meus pais, pelo apoio incondicional e pela confiança depositada em mim ao longo de todo este percurso. Agradeço-vos por sempre me proporcionarem as melhores condições para que eu pudesse focar-me e crescer, tanto academicamente quanto pessoalmente. Este trabalho é, em grande parte, fruto do vosso empenho e dedicação. Obrigado por acreditarem em mim e por estarem sempre ao meu lado.



# Resumo

A diabetes é uma das principais causas de mortalidade e redução da expectativa de vida [1]. Os biossensores são uma tecnologia promissora para o diagnóstico de diabetes, oferecendo uma detecção rápida e precisa dos níveis de glucose no sangue.

Nesta dissertação, foram desenvolvidos biossensores de glucose (Glu) de primeira geração utilizando elétrodos descartáveis de platina impressos por serigrafia (Pt-SPEs, do inglês, *Platinum Screen-Printed Electrodes*). Inicialmente, os Pt-SPEs foram modificados com biografeno (BGr), um nanomaterial biocompatível, aplicado na superfície do eletrodo de trabalho. Em seguida, a enzima glucose oxidase (GOx) foi imobilizada na superfície do eletrodo modificado. Duas metodologias distintas foram estudadas: a adsorção química e o encapsulamento da enzima por eletropolimerização da dopamina na superfície do eletrodo. A influência do número de camadas de BGr e de GOx no desempenho analítico do biossensor foi avaliada. Para cada um dos métodos, foi realizada a caracterização eletroquímica por voltametria cíclica (CV, do inglês, *Cyclic voltammetry*) e a caracterização morfológica dos elétrodos por microscopia eletrônica de varrimento (SEM, do inglês, *Scanning electronic microscopy*) e microscopia eletrônica de transmissão (TEM, do inglês, *Transmission electron microscopy*). O desempenho dos biossensores foi avaliado através da construção das respectivas retas de calibração em tampão fosfato salino (PBS, do inglês: *Phosphate buffered saline*) e soro Cormay (SC), além de testes de seletividade competitiva. Os dados foram obtidos pela técnica de cronoamperometria (CA) em dois tempos distintos, 60 e 120 segundos, respectivamente.

Com os dados obtidos durante a construção e calibração dos biossensores em SC, foram testados vários algoritmos de *Machine Learning* (ML) para regressão não linear, visando obter um modelo capaz de prever com precisão a concentração de glucose e os parâmetros da reta de calibração de um biossensor de glucose. Para cada variável de saída estudada, foram treinados diversos algoritmos com todas as combinações possíveis de dados de entrada, selecionando-se o modelo que melhor descreveu os dados fora do conjunto de treino.

O biossensor com melhor desempenho analítico, em termos de gama de linearidade, limite de detecção (LD) e seletividade, foi aquele que utilizou uma camada de BGr e imobilização de uma camada de enzima pela metodologia de encapsulamento, considerando os resultados para 60 segundos. A gama de linearidade da calibração realizada em SC diluído variou entre 0,75 mM e 40 mM, apresentando uma correlação de 0,988 e um LD de 0,078 mM.

Entre os vários algoritmos testados, determinou-se que o algoritmo de *Decision Tree* é capaz de prever a ordenada da origem de uma reta de calibração com um coeficiente de determinação de 0,956. Para além disso, foram construídos modelos *Random Forest* capazes de prever o valor do declive e limite superior de uma reta de calibração com coeficientes de determinação de 0,812 e 0,900 e ainda provou ser promissor na previsão de concentração de glucose com um coeficiente de determinação de 0,738.

**Palavras-chave:** Diabetes, Biossensor, Glucose Oxidase, *Machine Learning*, Inteligência Artificial, Modelos de Regressão não linear



# Abstract

Diabetes is one of the main causes of mortality and reduced life expectancy [1]. Biosensors are a promising technology for diagnosing diabetes, offering rapid and accurate detection of blood glucose levels.

In this dissertation, first-generation glucose (Glu) biosensors were developed using disposable screen-printed platinum electrodes (Pt-SPEs). Initially, Pt-SPEs were modified with biographene (BGr), a biocompatible nanomaterial, applied to the surface of the working electrode. Then, the enzyme glucose oxidase (GOx) was immobilized on the surface of the modified electrode. Two distinct methodologies were studied: chemical adsorption and enzyme encapsulation by electropolymerization of dopamine on the electrode surface. The influence of the number of BGr and GOx layers on the analytical performance of the biosensor was evaluated. For each of the methods, electrochemical characterization by cyclic voltammetry (CV) and morphological characterization of the electrodes by scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) were performed. The performance of the biosensors was evaluated by constructing the respective calibration curves in phosphate buffered saline (PBS) and Cormay serum (CS), in addition to competitive selectivity tests. The data were obtained using the chronoamperometry (CA) technique at two different times, 60 and 120 seconds, respectively.

With the data obtained during the construction and calibration of the biosensors in SC, several Machine Learning (ML) algorithms for non-linear regression were tested, aiming to obtain a model capable of accurately predicting the glucose concentration and the parameters of the calibration curve for a glucose biosensor. For each output variable studied, several algorithms were trained with all possible combinations of input data, selecting the model that best described the data outside the training set.

The biosensor with the best analytical performance, in terms of linearity range, detection limit (LD) and selectivity, was the one that used a layer of BGr and immobilization of a layer of enzyme using the encapsulation methodology, considering the results for 60 seconds. The linearity range of the calibration performed in diluted SC varied between 0.75 mM and 40 mM, presenting a correlation of 0.988 and a LD of 0.078 mM.

Among the various algorithms tested, it was determined that the Decision Tree algorithm is capable of predicting the ordinate of the origin of a calibration curve with a coefficient of determination of 0.956. Furthermore, Random Forest models capable of predicting the slope value and upper limit of a calibration curve with coefficients of determination of 0.812 and 0.900 were constructed and further proved to be promising in predicting glucose concentration with a coefficient of determination of 0.738.

**Keywords:** Diabetes, Biosensor, Glucose Oxidase, Machine Learning, Artificial Intelligence, Nonlinear Regression Models



# Agradecimentos

Gostaria de expressar a minha sincera gratidão aos meus orientadores, Professora Felismina Moreira e Professor José Lima, por terem aceitado colaborar neste trabalho e por todo o apoio e orientação prestados ao longo deste percurso.

Agradeço igualmente a toda a equipa do LabRise, cuja ajuda constante e ambiente acolhedor tornaram a experiência no laboratório verdadeiramente enriquecedora e prazerosa. Um agradecimento especial à Daniela Oliveira, que se revelou uma verdadeira guia e amiga, sempre disposta a ajudar com espírito solidário e uma presença constante de apoio e ainda à Inês Vinagre pelo apoio, pelas valiosas dicas e, claro, pelo incansável fornecimento de PBS “comunitário”, cuja disponibilidade parecia milagrosamente inesgotável.

Por fim, estendo a minha gratidão ao Professor Dionisis Cavouras, que, mesmo à distância, demonstrou um enorme interesse e disponibilidade para contribuir com este trabalho.

A todos, o meu profundo agradecimento por me terem acompanhado ao longo deste semestre, durante o qual cresci e aprendi imensamente.



# Índice

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>1</b>
1.1	Motivação/Enquadramento	1
1.2	Objetivos	1
1.3	Estrutura da tese	2
<b>2</b>	<b>Revisão Teórica</b>	<b>5</b>
2.1	Diabetes Mellitus	5
2.1.1	DM Tipo 1	6
2.1.2	DM Tipo 2	7
2.1.3	Fatores de Risco da DM	7
2.1.4	Prevalência de DM	8
2.1.5	Métodos de diagnóstico	13
2.2	Métodos convencionais de detecção de glucose	14
2.3	Biossensores	14
2.4	Biossensores Eletroquímicos	15
2.4.1	Classificação de Biossensores Eletroquímicos	16
2.4.2	Elementos de biorreconhecimento	19
2.4.3	Imobilização enzimática	21
2.4.4	Transdutores eletroquímicos	24
2.4.5	Técnicas eletroquímicas	25
2.5	Biossensor Eletroquímico/Enzimático de Glucose	26
2.5.1	1ª Geração	27
2.5.2	2ª Geração	27
2.5.3	3ª Geração	27
2.6	<i>Machine Learning</i>	30
2.6.1	Considerações sobre ML	31
2.6.2	Processo geral de análise de dados de ML	32
2.6.3	Tipos de Algoritmos de ML	34
2.6.4	Aplicações de ML nos Biossensores	36
<b>3</b>	<b>Metodologia</b>	<b>41</b>
3.1	Material e Equipamento	41
3.2	Reagentes	42
3.3	Soluções	43
3.3.1	Síntese do Biografeno	43
3.3.2	Soluções de enzima GOx	43
3.3.3	Reta de calibração	44
3.3.4	Estudo da seletividade	44
3.4	Preparação dos biossensores	44
3.4.1	Adsorção	45

3.4.2	Encapsulamento .....	45
3.4.3	Caracterização Eletroquímica dos Biossensores .....	46
3.4.4	Estudo de seletividade .....	48
3.4.5	Caracterização morfológica dos elétrodos .....	49
3.5	Componente de estudos de ML.....	49
3.5.1	<i>Datasets</i> .....	50
3.5.2	<i>Algoritmos</i> .....	52
3.5.3	<i>Previsão</i> de retas de calibração e concentrações de glucose.....	52
3.5.4	Avaliação do desempenho dos algoritmos .....	53
<b>4</b>	<b>Resultados e Discussão .....</b>	<b>55</b>
4.1	Caracterização eletroquímica dos biossensores .....	55
4.1.1	Modificação dos elétrodos com biogrfeno.....	55
4.1.2	<i>Imobilização</i> da GOx por adsorção.....	56
4.1.3	<i>Polidopamina</i> como matriz de imobilização da GOx .....	57
4.2	Caracterização morfológica dos elétrodos .....	58
4.2.1	Análises SEM .....	58
4.2.2	Análises TEM .....	59
4.3	Desempenho eletroquímico do biossensor.....	60
4.3.1	<i>Calibração</i> em tampão PBS .....	60
4.3.2	Calibração em soro Cormay.....	63
4.3.3	Limites de detecção.....	67
4.3.4	Estudos da seletividade .....	68
4.4	Componente de estudos de ML.....	69
<b>5</b>	<b>Conclusões e trabalho futuro .....</b>	<b>77</b>
	<b>Referências.....</b>	<b>81</b>

# Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> – Mapa global do impacto na saúde de DM em 2017. <b>(A)</b> Número de prevalência; <b>(B)</b> Número de mortes, adaptado de [1]. .....	9
<b>Figura 2</b> – Prevalência da DM por idade e sexo em 2019, adaptado de [4]. .....	10
<b>Figura 3</b> – Os 10 países com maior número de adultos com DM em 1980 e 2014, retirado de [6]. .....	12
<b>Figura 4</b> – Exemplos de compostos monitorizados por biossensores, adaptado de [21]. .....	15
<b>Figura 5</b> – Representação esquemática de um biossensor: <b>(A)</b> Os analitos presentes na amostra ligam-se ao elemento de biorreconhecimento do biossensor, gerando uma alteração que o transdutor converte num sinal quantificável, posteriormente processado e apresentado pelo sistema de visualização. <b>(B)</b> Exemplo de amostras que contêm analitos detetáveis por biossensores, destacando os elementos de biorreconhecimento e os sistemas de transdução, com ênfase nos sinais eletroquímicos. ....	16
<b>Figura 6</b> – Estrutura quaternária da GOx, com o cofator FAD e hidratos de carbono em evidência, retirada de [21]. .....	21
<b>Figura 7</b> – Oxidação de glucose pela enzima GOx. ....	21
<b>Figura 8</b> – Esquema de métodos físicos de imobilização enzimática: <b>(A)</b> retenção; <b>(B)</b> oclusão; <b>(C)</b> encapsulamento. ....	24
<b>Figura 9</b> – Voltamograma cíclico característico de um sistema reversível.....	25
<b>Figura 10</b> – Evolução da corrente com o tempo ao aplicar um impulso de potencial a um elétrodo.....	26
<b>Figura 11</b> – Relação entre AI, ML e DL, e vários algoritmos de ML, retirado de [24]. CNN: <i>Convolutional Neural Network</i> . DT: <i>Decision tree</i> . Feedforward ANN: <i>Feedforward Artificial Neural Network</i> . GBT: <i>Gradient-boosted Trees</i> . HCA: <i>Hierarchical Clustering Analysis</i> . kNN: <i>k-Nearest Neighbor</i> . LDA: <i>Linear Discriminant Analysis</i> . MLR: <i>Multiple Linear Regression</i> . NB: <i>Naive Bayes</i> . PCA ou PCR: <i>Principal Component Analysis ou Regression</i> . PLSDA ou PLSR: <i>Partial Least-Squares Discriminant Analysis ou Regression</i> . RF: <i>Random Forest</i> . RNN: <i>Recurrent Neural Network</i> . SVW: <i>Support Vector Machine</i> . ....	31
<b>Figura 12</b> – Processo geral de análise de dados baseada em ML, adaptado de [24]. .....	33
<b>Figura 13</b> – Benefícios de ML para biossensores, retirado de [24].....	37
<b>Figura 14</b> – Potencióstato/Galvanostato <i>Autolab</i> PGSTAT302N. ....	41
<b>Figura 15</b> – Elétrodo descartável de platina, constituído por um elétrodo de trabalho, um contra elétrodo e um elétrodo de referência. ....	42
<b>Figura 16</b> – Caixa de comutação. ....	42
<b>Figura 17</b> – Ilustração esquemática da construção de um biossensor para a deteção de glucose. <b>1</b> – Fixação do biografeno; <b>2</b> – Imobilização da enzima GOx por adsorção química; <b>3</b> – Deteção de glucose; <b>4</b> – Medição do sinal.....	45
<b>Figura 18</b> – Ilustração esquemática da construção de um biossensor para a deteção de glucose. <b>1</b> – Fixação do biografeno; <b>2</b> – Adsorção da mistura da enzima GOx com a dopamina;	

<b>3 – Eletropolimerização da dopamina; 4 – Detecção de glucose; 5 – Desempenho analítico do biossensor.</b> .....	46
<b>Figura 19 – Retas de calibração incluídas no <i>dataset</i>.</b> .....	50
<b>Figura 20 – Representação gráfica das leituras de CVs em tampão PBS, comparando as medições antes e após a fixação do biografeno.</b> .....	56
<b>Figura 21 – Voltamogramas obtidos em tampão PBS e em solução de glucose a 5 mM, após imobilização da GOx por adsorção.</b> .....	57
<b>Figura 22 – Voltamogramas obtidos em tampão PBS e em solução de glucose a 5 mM, após aplicação da polidopamina como matriz de imobilização da GOx.</b> .....	58
<b>Figura 23 – Análise SEM com diferentes ampliações: 1-10,000x=10 µm; 2-25,000x=4 µm; 3-50,000x=2 µm. Eléctrodo de platina sem modificações (A1 -A3); Fixação do biografeno (B1-B3); Imobilização da GOx por adsorção (C1-C3); Polidopamina como matriz de imobilização da GOx (D1-D3).</b> .....	59
<b>Figura 24 – Resultado da análise por TEM do BGr, com imagem obtida a uma ampliação de 200,000x.</b> .....	60
<b>Figura 25 – Cronoamperogramas e as respectivas retas de calibração obtidas em tampão PBS, após a imobilização da GOx por adsorção. A) e B) Representam o cronoamperograma sem e com a presença da GOx, em resposta à variação das concentrações de glucose (0,05 – 50 mM). C) Reta de calibração da resposta de corrente em função da concentração logarítmica de glucose com e sem enzima para o tempo 60 e 120 s.</b> .....	62
<b>Figura 26 – Cronoamperograma e as respectivas retas de calibração obtidas em tampão PBS, após a imobilização da GOx pelo método de encapsulamento. A) Representa o cronoamperograma com a presença da GOx, em resposta à variação das concentrações de glucose (0,05 – 50 mM). B) Reta de calibração da resposta de corrente em função da concentração logarítmica de glucose para o tempo 60 e 120 s.</b> .....	63
<b>Figura 27 – Cronoamperograma e as respectivas retas de calibração obtidas em SC, após a imobilização de uma camada da GOx por adsorção. A) Representa o cronoamperograma com a presença da GOx, em resposta à variação das concentrações de glucose (0,05 – 50 mM). B) Reta de calibração da resposta de corrente em função da concentração logarítmica de glucose para o tempo 60 e 120 s.</b> .....	64
<b>Figura 28 – Cronoamperograma e as respectivas retas de calibração obtidas em SC, após a imobilização de duas camadas da GOx por adsorção. A) Representa o cronoamperograma com a presença da GOx, em resposta à variação das concentrações de glucose (0,05 – 50 mM). B) Reta de calibração da resposta de corrente em função da concentração logarítmica de glucose para o tempo 60 e 120 s.</b> .....	65
<b>Figura 29 – Cronoamperograma e as respectivas retas de calibração obtidas em soro Cormay, após a imobilização de uma camada da GOx pelo método de encapsulamento. A) Representa o cronoamperograma com a presença da GOx, em resposta à variação das concentrações de glucose (0,05 – 50 mM). B) Reta de calibração da resposta de corrente em função da concentração logarítmica de glucose para o tempo 60 e 120 s.</b> .....	66
<b>Figura 30 – Cronoamperograma e as respectivas retas de calibração obtidas em soro Cormay, após a imobilização de duas camadas da GOx pelo método de encapsulamento. A) Representa o cronoamperograma com a presença da GOx, em resposta à variação das concentrações de</b>	

glucose (0,05 – 50 mM). <b>B)</b> Reta de calibração da resposta de corrente em função da concentração logarítmica de glucose para o tempo 60 e 120 s. ....	67
<b>Figura 31</b> – Estudos de seletividade utilizando um método competitivo entre a glucose e as espécies interferentes, após a imobilização da GOx por adsorção. As espécies interferentes estudadas foram a creatinina, o ácido úrico, a ureia e o ácido ascórbico.....	68
<b>Figura 32</b> – Estudos de seletividade utilizando um método competitivo entre a glucose e as espécies interferentes, após encapsulamento da GOx com polidopamina. As espécies interferentes estudadas foram a creatinina, o ácido úrico, a ureia e o ácido ascórbico.....	69
<b>Figura 33</b> – Gráfico de dispersão para melhor modelo obtido na previsão de: <b>(A)</b> ordenada na origem: DecisionTreeRegressor <sup>2</sup> com base em N <sup>o</sup> Camadas de BGr, Tempo, [Enzima], [Dopamina], Corrente LI, Corrente LS; <b>(B)</b> declive: DecisionTreeRegressor <sup>1</sup> com base em N <sup>o</sup> Camadas de BGr, Corrente LS; <b>(C)</b> Limite Superior: DecisionTreeRegressor <sup>2</sup> com base em N <sup>o</sup> Camadas de BGr, Tempo, [Enzima], [Dopamina], [Glucose], Corrente LI; <b>(D)</b> Limite Inferior: DecisionTreeRegressor <sup>1</sup> com base em Tempo, [Enzima], [Dopamina], Corrente LI; <b>(E)</b> [Glucose]: MLPRegressor com base em N <sup>o</sup> camadas BGr, [Enzima], [Dopamina] e Corrente. .	71
<b>Figura 34</b> – Gráfico de dispersão para o modelo: <b>(A)</b> DecisionTreeRegressor <sup>1</sup> com melhor desempenho na precisão de ordenada na origem com base na combinação de variáveis de entrada mais frequentes: N <sup>o</sup> camadas de BGr, Tempo, [Enzima], [Dopamina], Corrente LI e Corrente LS; <b>(B)</b> Gráfico de dispersão para RandomForestRegressor <sup>2</sup> com melhor desempenho na previsão de declive com base na combinação de variáveis de entrada mais frequentes: N <sup>o</sup> camadas de BGr, [Enzima] e corrente LS; <b>(C)</b> RandomForestRegressor <sup>2</sup> com melhor desempenho na previsão de limite superior com base na combinação de variáveis de entrada mais frequente: [Enzima] e [Dopamina]; <b>(D)</b> DecisionTreeRegressor <sup>2</sup> com melhor desempenho na previsão de limite inferior com base na combinação de variáveis de entrada mais frequentes: [Dopamina] e [Glucose]; <b>(E)</b> RandomForestRegressor <sup>2</sup> com melhor desempenho na previsão de [Glucose] com base na combinação de variáveis de entrada mais frequentes: N <sup>o</sup> camadas BGr, [Enzima], [Dopamina] e Corrente. ....	74



# Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b> – Top 10 de países ou territórios para o número de pessoas com DM, entre os 20 e 79 anos, em 2019, 2030 e 2045, adaptado de [4]. .....	11
<b>Tabela 2</b> – Comparação entre indivíduos normais, com diabetes e pré-diabetes com base em três métodos de diagnóstico, adaptado de [15]. .....	13
<b>Tabela 3</b> – Biossensores eletroquímicos enzimáticos para a detecção de glucose (2021-2024).29	
<b>Tabela 4</b> – Lista de reagentes utilizados e as suas respectivas origens.....	43
<b>Tabela 5</b> – Concentrações dos interferentes próximas dos valores fisiológicos em soro humano. ....	44
<b>Tabela 6</b> – Parâmetros utilizados no procedimento de eletropolimerização. ....	46
<b>Tabela 7</b> – Parâmetros utilizados no procedimento de leitura dos elétrodos, após as modificações dos mesmos. ....	47
<b>Tabela 8</b> – Diluições dos padrões preparados a partir da solução-mãe e tampão PBS, com as respectivas concentrações finais. ....	47
<b>Tabela 9</b> – Descrição do <i>dataset</i> utilizado para previsão de parâmetros da reta de calibração de um biossensor. ....	51
<b>Tabela 10</b> – Descrição do <i>dataset</i> utilizado para previsão de concentrações de glucose em amostra. ....	51
<b>Tabela 11</b> – Algoritmos estudados e respetivos hiperparâmetros definidos.....	52
<b>Tabela 12</b> – Limites de detecção. ....	67
<b>Tabela 13</b> – Melhor modelo obtido para cada uma das variáveis de saída. ....	70
<b>Tabela 14</b> – Combinação de variáveis de entrada mais frequente. ....	73



# Acrónimos

## Lista de Acrónimos

<b>A1C</b>	Hemoglobina glicada
<b>AA</b>	Ácido Ascórbico
<b>ADA</b>	<i>American Diabetes Association</i>
<b>ANN</b>	<i>Artificial Neural Network</i>
<b>ANN</b>	<i>Feedforward artificial neural network</i>
<b>ATP</b>	<i>Adenosine triphosphate</i>
<b>AU</b>	Ácido Úrico
<b>BGr</b>	Biografeno
<b>BSA</b>	<i>Bovine serum albumin</i>
<b>CA</b>	Cronoamperometria
<b>CNN</b>	<i>Convolutional neural network</i>
<b>CNN</b>	<i>Convolutional Neural Network</i>
<b>Creat</b>	Creatinina
<b>CV</b>	<i>Cyclic voltammetry</i>
<b>DL</b>	<i>Deep Learning</i>
<b>DM</b>	<i>Diabetes Mellitus</i>
<b>DM1</b>	<i>Diabetes Mellitus Tipo 1</i>
<b>DM2</b>	<i>Diabetes Mellitus Tipo 2</i>
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
<b>Dop</b>	Dopamina
<b>DRP-DSC</b>	Caixa de comutação da DropSens
<b>DT</b>	<i>Decision tree</i>

<b>EIS</b>	<i>Electrochemical impedance spectroscopy</i>
<b>ES</b>	Enzima-Substrato
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FAD</b>	<i>Flavin adenine dinucleotide</i>
<b>FID</b>	Federação Internacional da Diabetes
<b>FN</b>	Falso Negativo
<b>FP</b>	Falso Positivo
<b>GAD65</b>	Anticorpos Anti Descarboxilase do Ácido Glutâmico
<b>GBT</b>	<i>Gradient-boosted trees</i>
<b>Glu</b>	Glucose
<b>GOx</b>	Glucose Oxidase
<b>HCA</b>	Análise hierárquica de clusters
<b>HCA</b>	<i>Hierarchical clustering analysis</i>
<b>HLA</b>	<i>Human leukocyte antigen</i>
<b>IA</b>	Inteligência Artificial
<b>IMC</b>	Índice de massa corporal
<b>IUBMB</b>	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
<b>IUPAC</b>	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
<b>K<sub>d</sub></b>	Constante de Michaelis-Menten
<b>kNN</b>	<i>k-nearest neighbor</i>
<b>KR</b>	<i>Kernel Ridge</i>
<b>LD</b>	Limite de detecção
<b>LDA</b>	<i>Linear discriminant analysis</i>
<b>LI</b>	Limite Inferior
<b>LS</b>	Limite Superior
<b>MAE</b>	Erro Médio Absoluto

<b>mDNA</b>	Mitochondrial DNA
<b>MAE</b>	<i>Mean absolute error</i>
<b>ML</b>	<i>Machine Learning</i>
<b>MLP</b>	<i>Multilayer Perception</i>
<b>MLR</b>	<i>Multiple linear regression</i>
<b>mRNA</b>	<i>Messenger RNA</i>
<b>MSE</b>	<i>Mean squared error</i>
<b>NB</b>	<i>Naive Bayes</i>
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<b>PCA</b>	Análise de Componentes Principais
<b>PCR</b>	Regressão por Componentes Principais
<b>PLS</b>	<i>Partial least squares</i>
<b>PLSDA /PLS</b>	<i>Partial least-squares analysis/regression</i>
<b>Pt-SPE</b>	<i>Platinum Screen-Printed Electrode</i>
<b>R<sup>2</sup></b>	Coeficiente de Determinação ou Correlação
<b>RF</b>	<i>Random Forest</i>
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic acid</i>
<b>RNN</b>	<i>Recurrent neural network</i>
<b>SC</b>	Soro Cormay
<b>SEM</b>	<i>Scanning electronic microscopy</i>
<b>SVM</b>	<i>Support vector machine</i>
<b>TEM</b>	<i>Transmission electron microscopy</i>
<b>VN</b>	Verdadeiro Negativo
<b>VP</b>	Verdadeiro Positivo



# 1 Introdução

Este capítulo visa realizar uma breve introdução sobre o problema abordado. Assim, estão descritos o enquadramento para o estudo realizado bem como os seus objetivos e estrutura.

## 1.1 Motivação/Enquadramento

A Diabetes Mellitus (DM) é uma doença crónica que já afeta milhões de indivíduos por todo o mundo, números que aparentam crescer cada vez mais com o passar do tempo. Ela representa um aglomerado de distúrbios autoimunes, metabólicos e genéticos e está associada a elevados níveis de glucose e à insuficiência parcial ou total da ação ou produção de insulina. Uma vez que elevados níveis de glucose no sangue durante um período longo geralmente resultam num aumento do risco de desenvolver complicações crónicas, o diagnóstico precoce de diabetes torna-se algo fundamental e para tal são necessárias ferramentas de deteção de glucose de alta sensibilidade, seletividade e reprodutibilidade.

Assim, os biossensores eletroquímicos enzimáticos são dispositivos que cumprem esses requisitos e ao integrar abordagens de *Machine Learning* (ML), é possível tornar estas ferramentas ainda mais precisas, rápidas e duradouras.

## 1.2 Objetivos

Este estudo está dividido em duas partes, com diferentes objetivos. Em primeiro lugar, pretende-se estudar diferentes mecanismos de imobilização enzimática, sendo eles a adsorção e encapsulamento, da enzima glucose oxidase (GOx) na superfície de um elétrodo descartável de platina (Pt-SPE, do inglês, *Platinum Screen-Printed Electrodes*) modificado com o nanomaterial biografeno (BGr).

O controlo da modificação da superfície do elétrodo e do desempenho do biossensor é efetuado através de diferentes técnicas eletroquímicas de forma a obter um biossensor de glucose de primeira geração com elevada sensibilidade e seletividade. A caracterização morfológica da superfície do nanomaterial BGr é efetuada por microscopia eletrónica de varrimento (SEM, do inglês, *Scanning electronic microscopy*) e microscopia de transmissão eletrónica (TEM, do inglês, *Transmission electron microscopy*).

Na segunda parte, com os dados obtidos durante o processo de construção e calibração do biossensor, são testados também diferentes algoritmos de regressão não linear, de modo a perceber se estas ferramentas de ML são capazes de prever com precisão parâmetros da reta de calibração de um biossensor de glucose ou até mesmo a concentração de glucose em amostras de soro diluído, sem ser necessário proceder aos métodos de calibração comuns.

### **1.3 Estrutura da tese**

Este trabalho está dividido em vários capítulos, sendo eles introdução, revisão teórica, metodologia, resultados e discussão e conclusão.

O presente capítulo, como já mencionado anteriormente, explica o enquadramento e objetivos que envolvem este estudo.

Na revisão teórica começa-se por se aprofundar o conhecimento sobre a DM. São relatadas as diferenças entre o tipo 1 e tipo 2, fatores de risco e prevalência da doença, bem como métodos de diagnóstico de diabetes e deteção de glucose. De seguida, procede-se a uma revisão da literatura sobre biossensores, mais especificamente biossensores eletroquímicos, onde se pode encontrar informação sobre a classificação destes, dos seus componentes e ainda técnicas de imobilização enzimática para a construção destes dispositivos. Encontra-se também uma revisão mais específica sobre os biossensores de glucose e ainda das técnicas eletroquímicas usadas neste trabalho. Por fim, este capítulo termina com um aprofundamento sobre ML, onde se encontram considerações gerais sobre diferentes tipos algoritmos e dos processos de análise, bem como um sumário de possíveis aplicações destas ferramentas em biossensores. Seguidamente, é discutido o estado da arte, que inclui uma revisão de estudos já publicados na literatura, numa primeira fase referente a biossensores de glucose baseados na enzima GOx e noutra parte de diferentes contributos que o ML já teve na área de biossensores.

De seguida, a metodologia apresenta todo os passos executados ao longo deste estudo, desde o material, soluções e procedimentos de caracterização eletroquímica e morfológica utilizados durante o processo de construção e calibração de biossensores até ao processamento de dados retirados durante esta fase e conseqüente análise em algoritmos de regressão não linear. Posteriormente, são apresentados e discutidos os resultados obtidos para a construção de biossensores e aplicação de modelos de regressão não linear, que permitem avaliar os desempenhos de ambas as partes.

Por fim, a conclusão engloba as conclusões retiradas graças a este trabalho, bem como considerações para o futuro de possíveis estudos que possam complementar ou melhorar os resultados obtidos nesta dissertação de tese.



## 2 Revisão Teórica

### 2.1 Diabetes Mellitus

A DM está entre as principais causas de mortalidade e redução da expectativa de vida [1]. A DM significa um conjunto de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia, devido a defeitos na secreção de insulina, na sua ação ou em ambos. O estado de hiperglicemia crônica pode promover danos de longo prazo, degradação e/ou disfunção de diversos órgãos [2].

O desenvolvimento de DM envolve diversos processos patogênicos, desde a destruição autoimune das células  $\beta$  do pâncreas, o que leva à deficiência de insulina, até alterações que resultam em resistência à ação da insulina, causando disfunções no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas. Essa disfunção na ação da insulina é resultado da secreção inadequada da hormona e/ou da resposta reduzida dos tecidos à mesma num ou mais pontos das complexas vias de sinalização hormonal. Com frequência, a secreção deficiente de insulina e os defeitos na sua ação coexistem no mesmo paciente, o que complica determinar qual dessas anomalias, se alguma isoladamente, é a causa principal da hiperglicemia [2].

Os sintomas da hiperglicemia incluem poliúria, polidipsia, perda de peso, poligrafia e visão turva. Podem também ocorrer falhas no crescimento e maior suscetibilidade a determinadas infecções. As consequências agudas e potencialmente fatais da diabetes descontrolada são a hiperglicemia acompanhada de cetoacidose ou síndrome hiperosmolar não cetótica [2].

As complicações a longo prazo de DM incluem retinopatia, que pode levar à perda de visão; nefropatia, que pode resultar em insuficiência renal; neuropatia periférica, que aumenta o risco de úlceras nos pés, amputações e articulações de Charcot. Pacientes com DM têm uma incidência maior de doenças cardiovasculares ateroscleróticas, doenças arteriais periféricas e cerebrovasculares. Muitos casos também apresentam hipertensão e anormalidades no metabolismo das lipoproteínas [2]. A DM está associada ao aumento da incidência e morte por doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, cancro, doenças infecciosas, o que resulta no aumento da mortalidade indireta associada ao diabetes [3].

A DM está entre as 10 principais causas de morte em todo o mundo, condições responsáveis por mais de 80 % de todas as mortes prematuras e por doenças não-transmissíveis, pelo que tem grande impacto na vida e no bem-estar de vários indivíduos em todo o mundo [4], [5], [6].

A presença de diabetes está associada a um aumento de risco de morte, da mortalidade por infeção, doença cardiovascular, acidente vascular cerebral, doença renal crónica, doença hepática crónica e cancro [1]. Mesmo com progressos na promoção da saúde da população e no aumento da esperança de vida, a DM é o segundo maior efeito negativo na esperança de vida global ajustada à saúde em todo o mundo [7]. Em 2017, as despesas globais com a saúde relacionadas com a diabetes foram estimadas em 727 mil milhões de dólares [4]. A maior parte dos casos desta doença enquadra-se em duas grandes categorias: o tipo 1 e o tipo 2 [2], [4].

### 2.1.1 DM Tipo 1

DM tipo 1 (DM1) resulta de uma deficiência absoluta na secreção de insulina. É possível identificar indivíduos com risco elevado de desenvolver esta forma da doença por meio de evidências sorológicas de um processo autoimune que afeta as ilhotas pancreáticas, bem como por meio de marcadores genéticos [2].

O DM1 afeta 5-10 % das pessoas com diabetes e resulta da destruição autoimune das células  $\beta$  do pâncreas. Os marcadores desta destruição imunológica incluem autoanticorpos contra as células das ilhotas, insulina, GAD65 e tirosina fosfatases. Pelo menos um destes marcadores está presente em 85-90 % dos indivíduos quando a hiperglicemia em jejum é inicialmente detetada. Além disso, a doença tem fortes associações com o sistema antígeno leucocitário humano (HLA, do inglês, *Human leukocyte antigen*), estando ligada aos genes DQA e DQB, e é influenciada pelos genes DRB [2].

A taxa de destruição celular neste tipo tanto pode ser rápida em determinados indivíduos (bebés e crianças, principalmente) como lenta em outros (adultos, principalmente). Alguns indivíduos com DM1, principalmente adolescentes e crianças, podem apresentar cetoacidose como a primeira manifestação da doença. Outros podem exibir hiperglicemia em jejum moderada, que pode evoluir para um estado grave e/ou cetoacidose devido a infeções ou outros tipos de stress. Os adultos, em particular, podem reter função celular residual suficiente para prevenir a cetoacidose durante vários anos, até eventualmente tornarem-se dependentes de insulina para sobrevivência, enquanto o risco de cetoacidose aumenta. Nos últimos estágios da doença, a secreção de insulina é pouca ou até mesmo nula. A DM1 costuma surgir na infância ou adolescência, no entanto pode-se manifestar em qualquer idade [2].

A destruição autoimune das células  $\beta$  está relacionada a diversas predisposições genéticas e fatores ambientais. A obesidade, embora rara nesta categoria, não é incompatível com o diagnóstico. Pessoas com DM1 são propensas a outras doenças autoimunes, como a doença de Graves, tireoidite de Hashimoto, doença de Addison, vitiligo, doença celíaca, hepatite autoimune e anemia perniciosa [2].

### 2.1.2 DM Tipo 2

No DM tipo 2 (DM2), cuja prevalência é mais alta, a causa é uma combinação de resistência à ação da insulina e uma resposta inadequada na secreção dessa hormona. Nesta condição, pode haver um grau de hiperglicemia que provoca alterações patológicas e funcionais em diversos tecidos-alvo, mas sem sintomas clínicos por longos períodos antes da detecção da doença. Durante este período assintomático, é possível identificar alterações no metabolismo dos carboidratos por meio da medição dos níveis de glucose no plasma em jejum [2].

Entre 90-95 % das pessoas com diabetes são diagnosticadas DM2, caracterizado pela presença de resistência à insulina e, frequentemente, por uma deficiência relativa de insulina. Geralmente, nas fases iniciais e, às vezes, ao longo da vida, esses indivíduos não necessitam de tratamento com insulina para sobreviver. No DM2, ao contrário do DM1, não ocorre a destruição autoimune das células  $\beta$  do pâncreas [2].

Grande parte dos pacientes que sofre de DM2 também sofrem de obesidade, sendo esta um dos motivos para o aumento dos níveis de resistência à ação da insulina. O aparecimento de cetoacidose é muito mais raro no tipo 2, estando normalmente associado a stress de outra doença, como uma infecção. Uma vez que a hiperglicemia se desenvolve de forma mais gradual e nos primeiros estágios, em maior parte dos casos, não é grave o suficiente para que se notem alguns dos sintomas típicos da diabetes, esta categoria da doença costuma permanecer sem diagnóstico durante muitos anos. Todavia, estes indivíduos correm risco aumentado de desenvolver complicações vasculares [2].

Nos pacientes com DM2, embora os níveis de insulina possam parecer normais ou ligeiramente elevados, seria de esperar que valores de glicemia mais elevados resultassem em níveis de insulina ainda mais altos, se a função celular estivesse normal. No entanto, a secreção de insulina é defeituosa e insuficiente nesses indivíduos para compensar a resistência à insulina. Embora a resistência à insulina possa ser controlada com perda de peso e/ou tratamento farmacológico da hiperglicemia, raramente retorna ao estado normal [2].

Com a idade, a obesidade e a falta de atividade física estão relacionadas com o risco de desenvolver DM2. No caso de mulheres com DM gestacional prévia e indivíduos com hipertensão há risco ainda maior de desenvolver a doença. Embora a frequência da doença varie em diversos subgrupos raciais/étnicos, também se associa a predisposição genética, embora este assunto ainda seja complexo e pouco esclarecido [2].

### 2.1.3 Fatores de Risco da DM

Globalmente, DM está altamente associada a riscos metabólicos, como índice de massa corporal (IMC) elevado, e fatores comportamentais, como dieta inadequada, tabagismo e baixa atividade física [1].

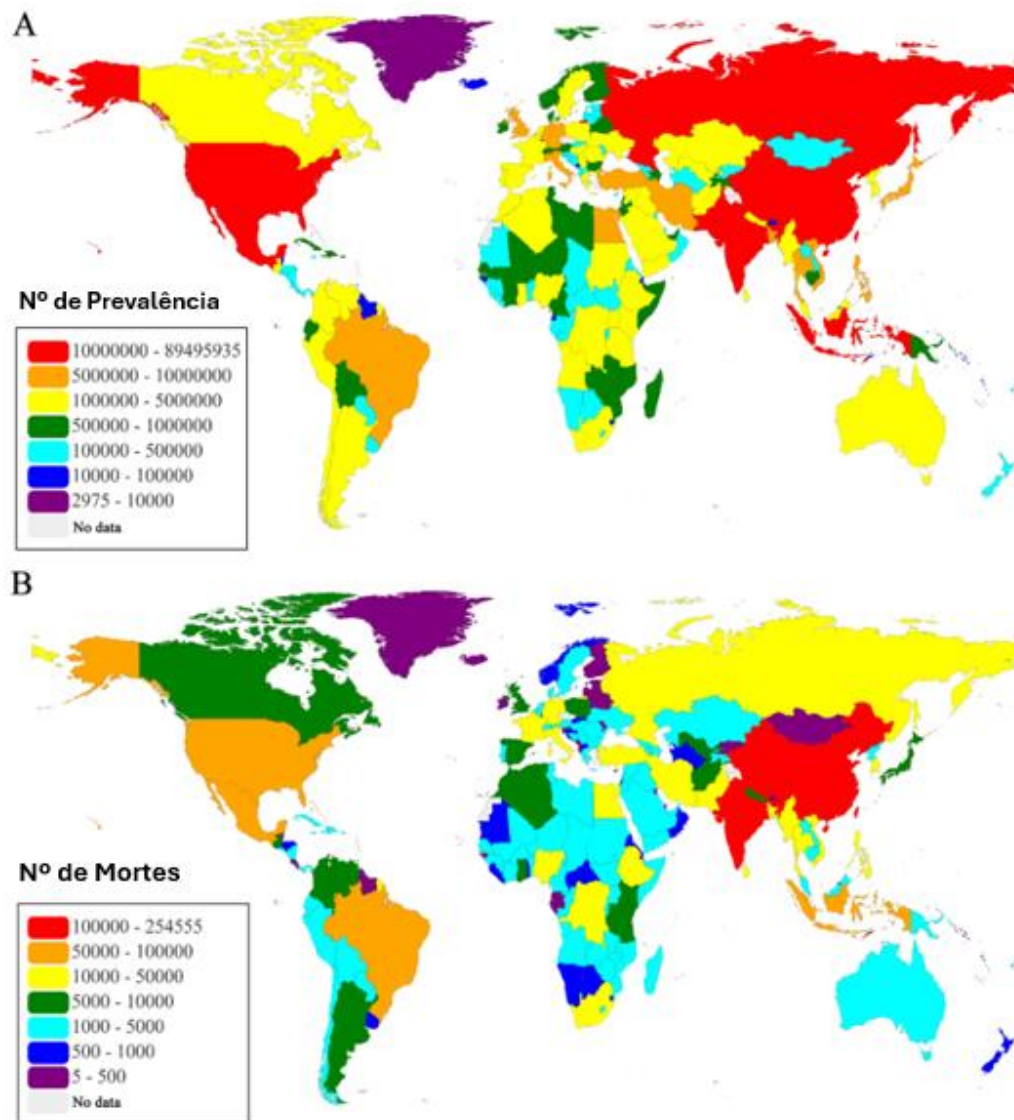
Em 2017, identificou-se o IMC elevado, riscos alimentares e poluição ambiental por partículas como os três principais fatores de risco da DM. Nas regiões de índice sociodemográfico baixo e médio, a dieta pobre em frutas também é um fator de risco determinante para além de apresentarem um maior risco de morte devido a poluição causada por combustíveis sólidos. Curiosamente, o uso de álcool mostra ter um efeito protetor em regiões de índice sociodemográfico mais alto [1].

#### 2.1.4 Prevalência de DM

A DM tornou-se uma das maiores preocupações globais de saúde pública, impondo um fardo global à saúde pública, bem como ao desenvolvimento socioeconómico. Embora a incidência tenha começado a diminuir em alguns países, a prevalência da diabetes aumentou nas últimas décadas na maioria dos outros países desenvolvidos e em desenvolvimento [1]. Até à data, a Federação Internacional da Diabetes (FID) estimou que 451 milhões de adultos vivem com diabetes em todo o mundo em 2017, com um aumento previsto para 693 milhões até 2045 se não forem adotados métodos de prevenção eficazes [8]. A prevalência de DM1 e DM2 entre crianças e adolescentes também aumentou, e as estimativas de crianças e adolescentes com menos de 20 anos com DM1 ultrapassam agora um milhão [9].

X. Lin *et al.* [1] estimaram a carga de diabetes por tipo, ano, região e estatuto socioeconómico em 195 países e territórios durante 28 anos, de forma a fornecer informações que possam ajudar a cumprir metas do Plano de Ação da Organização Mundial de Saúde (OMS) para Prevenção e Controlo de Doenças Não Transmissíveis em 2025. Daqui perceberam que a carga global de DM aumentou significativamente desde 1990 e que em 2017, a incidência global, a prevalência, a morte e a esperança de vida corrigida pela incapacidade foram, respetivamente, 22,2 milhões; 476 milhões; 1,37 milhões e 67,9 milhões, com uma projeção para 26,6 milhões; 570,9 milhões; 1,59 milhões e 70,3 milhões em 2025. Os riscos metabólicos, como IMC elevado, e os fatores comportamentais, como dieta inadequada, tabagismo e baixa atividade física, contribuíram para a maior parte de mortes atribuíveis à diabetes.

A distribuição geográfica da carga diabética em 2017 variou entre os países (**Figura 1**). As cinco prevalências mais elevadas foram observadas na China (89,5 milhões), Índia (67,8 milhões), Estados Unidos (30,7 milhões), Indonésia (21,0 milhões) e México (13,1 milhões). Os cinco principais países com mortes foram a Índia (254 555), a China (153 185), a Indonésia (97 005), os Estados Unidos (68 558) e o México (64 067) [1].

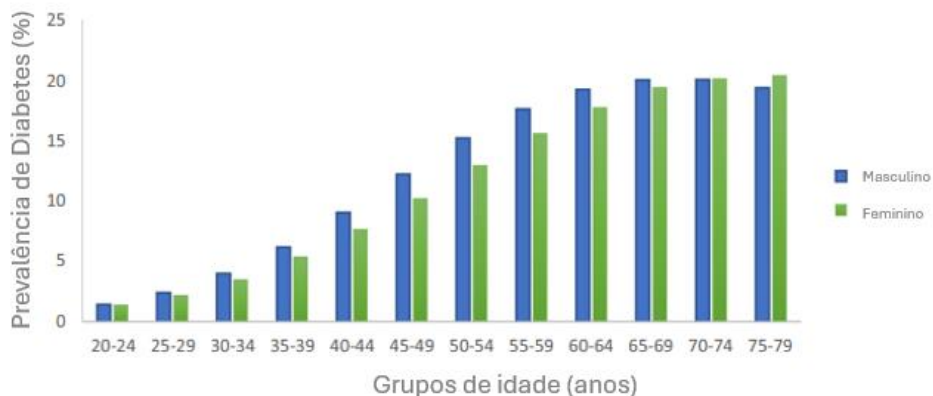


**Figura 1** – Mapa global do impacto na saúde de DM em 2017. **(A)** Número de prevalência; **(B)** Número de mortes, adaptado de [1].

Este estudo demonstrou que o número estimado de mortes devido ao diabetes aumentou nas últimas décadas e atingiu 1,37 milhão em 2017, número muito semelhante aos dados relatados pela OMS (1,6 milhões em 2016), mas significativamente menor que o valor relatado pela FID (5 milhões em 2017) [8]. No entanto, a taxa de mortalidade de DM2 em áreas com melhores condições socioeconômicas e a taxa de mortalidade global de DM1 mostraram uma tendência decrescente [1].

Noutro estudo [4], em 2019, a FID estimou que um total de 463 milhões de pessoas vivem com diabetes, representando 9,3 % da população adulta mundial (20-79 anos). Espera-se que este número aumente para 578 milhões (10,2 %) em 2030 e 700 milhões (10,9 %) em 2045. A prevalência de diabetes em mulheres em 2019 é estimada em 9,0 % e 9,6 % em homens (dada por faixa etária na **Figura 2**). O aumento da prevalência da diabetes com a idade leva a uma

prevalência de 19,9 % (111,2 milhões) em pessoas com idades compreendidas entre os 65 e os 79 anos.



**Figura 2** – Prevalência da DM por idade e sexo em 2019, adaptado de [4].

Relatou-se uma prevalência superior nas áreas urbanas relativamente às zonas rurais e também nos países de rendimento elevado em comparação com os de baixo rendimento. Outro dado interessante recolhido nesta investigação foi o facto de uma em cada duas pessoas coexistem com a doença sem o saber. Em suma, quase meio bilhão de pessoas vivem com diabetes em todo o mundo e estimam que o número aumente 25 % em 2030 e 51 % em 2045 [4].

Para o DM2, que representa aproximadamente 90 % do total, esta tendência crescente foi atribuída ao envelhecimento, ao rápido aumento da urbanização e aos ambientes obesogénicos. Notou-se que as taxas de incidência de DM1 também estão a aumentar, contribuindo para o aumento da prevalência do diabetes, embora a causa seja desconhecida. Da mesma forma, o número crescente de jovens adultos com DM2 nos últimos anos também contribui para o aumento da prevalência global de DM, através da sua maior sobrevivência [4].

O mesmo estudo também concluiu que os países com maior número de casos de DM em 2019 eram a China, Índia e Estados Unidos da América, algo que só se deverá alterar em 2045, com o Paquistão a substituir os Estados Unidos da América (EUA) (**Tabela 1**) [4].

**Tabela 1** – Top 10 de países ou territórios para o número de pessoas com DM, entre os 20 e 79 anos, em 2019, 2030 e 2045, adaptado de [4].

2019			2030			2045		
Posição	País	Número de pessoas com diabetes (Milhões)	Posição	País	Número de pessoas com diabetes (Milhões)	Posição	País	Número de pessoas com diabetes (Milhões)
1	China	116,4	1	China	140,5	1	China	147,2
2	Índia	77,0	2	Índia	101,0	2	Índia	134,2
3	EUA	31,0	3	EUA	34,4	3	Paquistão	37,1
4	Paquistão	19,4	4	Paquistão	26,2	4	EUA	36,0
5	Brasil	16,8	5	Brasil	21,5	5	Brasil	26,0
6	México	12,8	6	México	17,2	6	México	22,3
7	Indonésia	10,7	7	Indonésia	13,7	7	Egito	19,9
8	Alemanha	9,5	8	Egito	11,9	8	Indonésia	16,6
9	Egito	8,9	9	Bangladesh	11,4	9	Bangladesh	15,0
10	Bangladesh	8,4	10	Alemanha	10,1	10	Turquia	10,4

A produção periódica de estimativas de prevalência e projeções futuras para a diabetes é essencial para promover a prevenção da DM e incentivar melhorias nos cuidados para todos os que vivem com diabetes [4].

Um outro trabalho [6] sobre as tendências globais de diabetes chegou à conclusão que desde 1980 até 2014, o número de adultos com diabetes aumentou de 108 milhões para 422 milhões. Este aumento está relacionado com o aumento da prevalência, crescimento populacional e envelhecimento. Também perceberam que o sexo masculino é mais afetado que o feminino pela doença e ainda que os países de rendimento baixo e médio mostram um aumento dos números de casos mais acentuados que os países de elevados rendimentos.

Metade dos adultos com diabetes em 2014 vivia em 5 países: China, Índia, EUA, Brasil e Indonésia. Estes países também representavam metade da população adulta nessa altura. De acordo com artigos mencionados anteriormente, prevê-se que a China e a Índia mantenham-se no topo da lista e que os EUA mostrem uma diminuição neste aspeto. Por outro lado, os países de rendimento baixo, como a Indonésia, Paquistão, México e Egito apresentam um aumento do número de casos da doença e substituem países europeus como a Alemanha, Ucrânia, Itália e Reino Unido na lista dos principais países com a maioria de adultos com DM (Figura 3) [6].

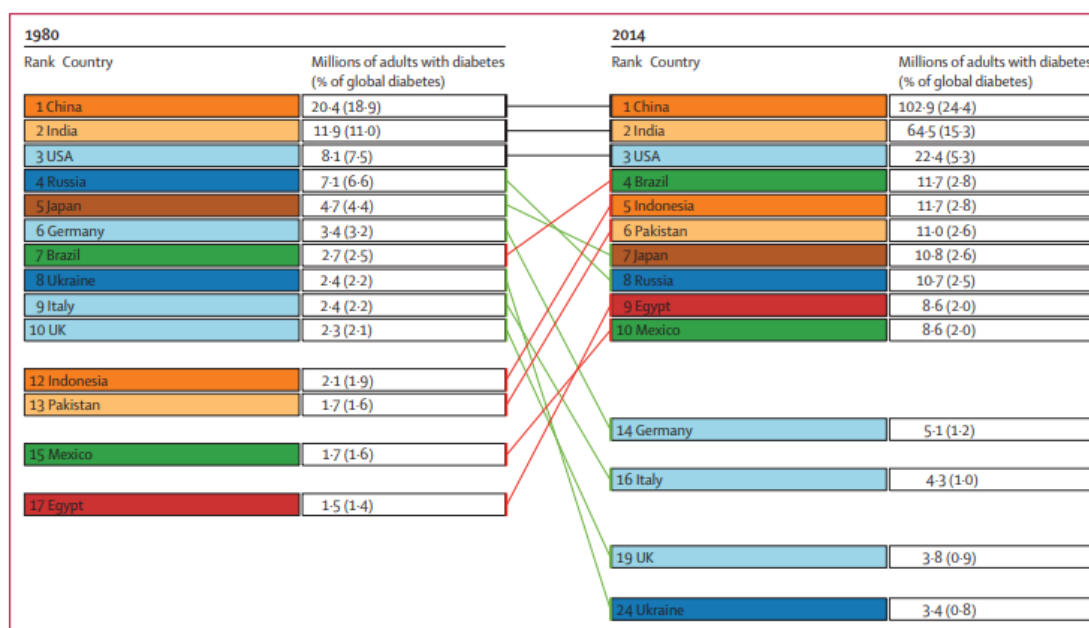


Figura 3 – Os 10 países com maior número de adultos com DM em 1980 e 2014, retirado de [6].

Isto pode ser explicado pelo aumento da adiposidade nos países de rendimentos não elevados, diferenças na suscetibilidade genética ou em variações fenotípicas devido a nutrição e crescimento inadequados ou até mesmo por haver menos recursos nos países de baixo e médio rendimento, logo têm mais dificuldade em detetar a DM em fases precoces, o que aumenta muito o risco de desenvolvimento [6].

A DM as suas conseqüentes complicações vasculares são responsáveis por mais de 2 milhões de mortes todos os anos [10], ocupando a sétima posição de causas principais de incapacidade em todo o mundo. A diabetes é também um fator de risco para tuberculose, outra doença com grande prevalência em populações de países de baixo e médio rendimento [6].

É possível reduzir os níveis de glucose com modificação do estilo de vida ou medicamentos em pessoas com DM, especialmente se for implementado precocemente, podendo até atrasar a progressão de complicações vasculares. O controlo glicémico a longo prazo e a redução da pressão arterial e colesterol também reduzem o risco de resultados cardiovasculares adversos [11]. Mesmo com estas alternativas, a eficácia destas intervenções a nível populacional tem sido pequena, até porque muitos casos permanecem sem diagnóstico [12], [13], uma vez que a população em geral não tem muita adesão ao tratamento [14]. Daqui advém uma necessidade urgente de implementar novas técnicas a nível mundial que combatam a DM, melhorem a sua deteção precoce e utilizem intervenções farmacológicas e de estilo de vida que previnam ou retardem a progressão da doença [6].

### 2.1.5 Métodos de diagnóstico

Para alguém ser diagnosticado como diabético, os níveis de glucose no sangue têm de ser iguais ou superiores a um determinado valor (**Tabela 2**). Segundo a *American Diabetes Association* (ADA), existem quatro métodos para o diagnóstico de DM: (1) teste de glicemia em jejum: em que o jejum se refere à ausência de ingestão de alimentos e bebidas, para além de água, durante pelo menos 8 horas antes do teste; ou (2) teste oral de tolerância à glucose: em que um doente consome uma solução de xarope com 75 g de glucose antes da qual é realizado um exame ao sangue para determinar a glucose plasmática de 2 horas; ou (3) níveis de A1C (hemoglobina glicada) através de um teste laboratorial; ou (4) glucose plasmática superior ou igual a 200 mg dL<sup>-1</sup> ou 11,1 mM em doentes que apresentaram sintomas de hiperglicemia ou crise hiperglicémica [15].

**Tabela 2** – Comparação entre indivíduos normais, com diabetes e pré-diabetes com base em três métodos de diagnóstico, adaptado de [15].

	Teste de glicemia em jejum (mM)	Glucose plasmática no teste oral de tolerância à glucose (mM)	Níveis de A1C (mmol mol <sup>-1</sup> )
Normal	<5,5	<7,8	< 39
Pré-Diabetes	≥5,5	≥7,8	≥39
Diabetes	≥7,0	≥11,1	≥48

## 2.2 Métodos convencionais de detecção de glucose

Os métodos convencionais de detecção de glucose incluem uma variedade de técnicas laboratoriais e eletroquímicas amplamente utilizadas em diagnósticos clínicos e monitorização de diabetes. Os principais métodos são:

1. **Método enzimático colorimétrico:** Utiliza a GOx para oxidar a glucose, formando peróxido de hidrogénio. A peroxidase reage com o peróxido, que gera uma mudança de cor que pode ser medida espectralmente [16].
2. **Método enzimático de hexocinase:** A enzima hexocinase converte a glucose em glucose-6-fosfato que seguidamente é convertida em 6-fosfogluconato pela glucose-6-fosfato desidrogenase, gerando NADPH. O aumento de NADPH é medido por absorvância, refletindo a concentração de glucose [17].
3. **Glicosímetros (tiras reagentes):** Baseiam-se na reação da glucose GOx ou glucose desidrogenase presente nas tiras de teste, gerando uma corrente elétrica proporcional à concentração de glucose no sangue [18].
4. **Espetroscopia de infravermelho:** Método não invasivo que mede a concentração de glucose através da absorção de luz infravermelha pelos tecidos, com base nas diferenças nas frequências vibracionais das moléculas de glucose [19].

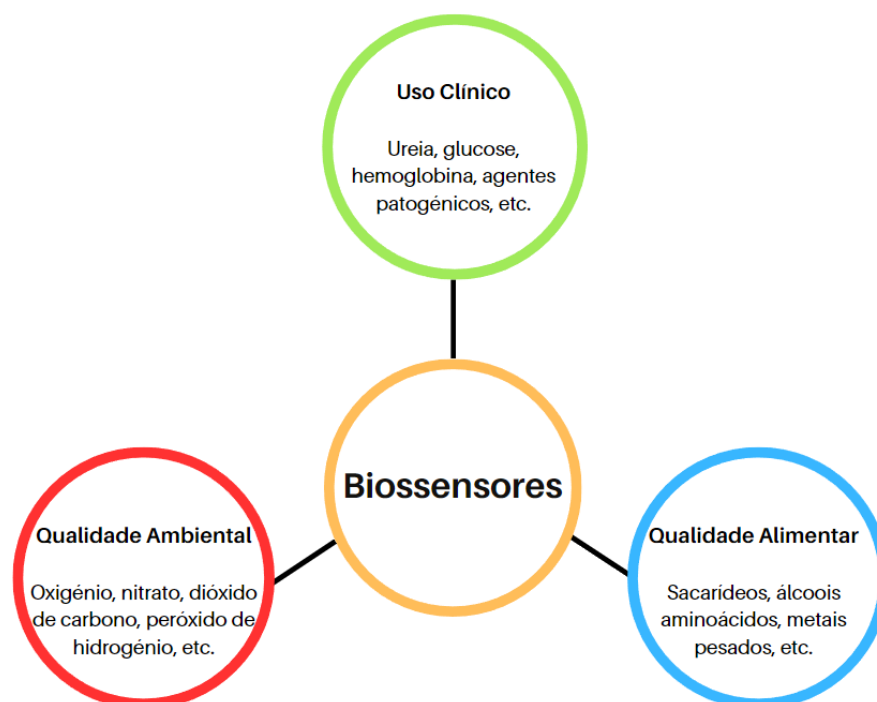
## 2.3 Biossensores

Os biossensores têm-se tornado uma ferramenta essencial para a monitorização da saúde, com sua capacidade e diversidade a crescer continuamente. Novas abordagens estão constantemente a surgir para melhorar e aprimorar esses dispositivos. Um biossensor é um dispositivo que deteta compostos químicos ou biológicos através de sinais elétricos, térmicos ou óticos, resultantes de reações bioquímicas específicas mediadas por biorreceptores, como enzimas, sistemas imunológicos, tecidos, organelos ou células. Cada biossensor é composto por biorreceptores e transdutores, que geram um sinal mensurável quando os biorreceptores interagem com os seus alvos [20].

O avanço dos biossensores tem sido impulsionado pela crescente necessidade de tecnologias que permitam a monitorização em tempo real de compostos biologicamente ativos em diversos setores, incluindo análise clínica, controlo de qualidade ambiental e alimentar, investigações biológicas fundamentais, diagnóstico de doenças e triagem de medicamentos. Estes dispositivos têm evoluído constantemente e atualmente a indústria de biossensores representa um mercado avaliado em bilhões de euros por ano. Isto tem possibilitado uma melhoria contínua na qualidade de vida e na segurança da sociedade em geral [21].

Uma vez que vários setores de atividade humana, como a agricultura, medicina e a pecuária, têm vindo a crescer ainda mais, tornou-se importante a otimização de recursos. A revolução industrial resultou num aumento significativo na produção de resíduos, o que levou à implementação de limites máximos de emissões de gases e regulamentos para o tratamento de resíduos. Estas medidas visam assegurar a sustentabilidade da nossa qualidade de vida [21].

Os requisitos cada vez mais rigorosos impostos à indústria, juntamente com a crescente exigência pública por cuidados de saúde e qualidade alimentar, têm impulsionado o mercado de sensores e biossensores em diversas áreas. A **Figura 4** apresenta alguns exemplos de biossensores utilizados em três áreas de grande relevância, que requerem garantias de qualidade e capacidade de diagnóstico analiticamente viáveis [21].



**Figura 4** – Exemplos de compostos monitorizados por biossensores, adaptado de [21].

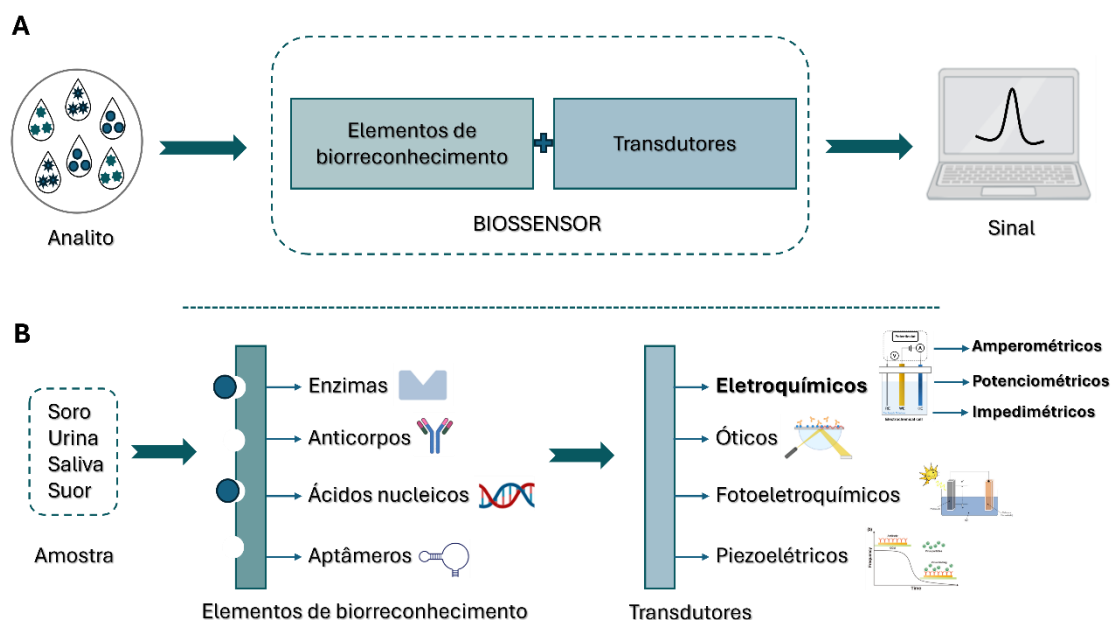
Nas últimas décadas, com a extensa progressão da nanotecnologia, das estratégias de amplificação de sinal e dos transdutores, os biossensores avançaram significativamente. No entanto, todos os biossensores apresentam inevitavelmente algum ruído de sinal irregular. Alguns biossensores dependem fortemente de anticorpos ou aptâmeros como biorreceptores o que restringe os biossensores a uma vida útil curta e baixa estabilidade [22].

## 2.4 Biossensores Eletroquímicos

Os biossensores eletroquímicos (**Figura 5**) são pequenos dispositivos de deteção ou diagnóstico que incorporam um elemento de biorreconhecimento em contato com um transdutor eletroquímico que transforma evento químico/biológico num sinal elétrico mensurável através de eventos eletroquímicos e bioquímicos para determinar concentração de substâncias e

outros parâmetros de interesse biológico. A investigação e o desenvolvimento neste campo são amplos e multidisciplinares, incluindo bioquímica, físico-química, eletroquímica, ciência de biorreatores, eletrônica e engenharia de software [23], [24], [25].

A resposta destes biossensores é impactada por diversas variáveis, como as características do eletrodo utilizado (geometria, área, material), variáveis elétricas (tensão, corrente, impedância, carga), eletrolíticas (concentração, pH, solvente), de reação (parâmetros termodinâmicos e cinéticos) e ainda variáveis externas (pressão, temperatura e tempo) [23]. Em comparação com instrumentos analíticos convencionais, os biossensores têm vantagens como serem mais rápidos, de baixo custo, apresentar propriedade não destrutiva e detecção no local [24]. A qualidade de um biossensor define-se por uma detecção rápida, de elevada sensibilidade e capacidade de medição contínua [23].



**Figura 5** – Representação esquemática de um biossensor: **(A)** Os analitos presentes na amostra ligam-se ao elemento de biorreconhecimento do biossensor, gerando uma alteração que o transdutor converte num sinal quantificável, posteriormente processado e apresentado pelo sistema de visualização. **(B)** Exemplo de amostras que contêm analitos detetáveis por biossensores, destacando os elementos de biorreconhecimento e os sistemas de transdução, com ênfase nos sinais eletroquímicos.

### 2.4.1 Classificação de Biossensores Eletroquímicos

A definição de biossensor eletroquímico foi estabelecida pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), que ofereceu diversas recomendações sobre a definição, classificação e nomenclatura de biossensores eletroquímicos. A característica mais significativa é que o elemento de biorreconhecimento seja de natureza biológica, como enzimas, anticorpos ou bactérias, e que o transdutor oxide ou reduza um produto da reação no elemento sensorial [21].

Um biossensor deve ser autônomo, ou seja, o seu desempenho não deve depender de outros reagentes, métodos de amostragem ou operações adicionais para o tratamento da amostra. Além disso, os componentes elétricos utilizados para a amplificação do sinal não são considerados parte do biossensor [26].

A classificação de um biossensor está geralmente relacionada com a natureza do elemento de biorreconhecimento, do transdutor ou da combinação destes dois elementos. Há dois tipos de mecanismos moleculares comumente utilizados como elementos sensoriais em biossensores: (bio)catalíticos e de (bio)afinidade [21].

#### 2.4.1.1 Biossensores (Bio)catalíticos

Os biossensores (bio)catalíticos utilizam um elemento biológico como sensor, o qual catalisa uma reação bioquímica. Este elemento biológico pode ser uma macromolécula, uma enzima, uma célula inteira ou um fragmento de tecido. O funcionamento destes elementos sensoriais é semelhante, pois catalisam uma reação na qual ocorre uma variação na concentração do substrato, ou seja, a reação encontra-se fora do equilíbrio. Uma reação enzimática segue um esquema reacional segundo a **Equação 1** [21]:



No esquema reacional mencionado,  $S$  é o substrato,  $S'$  é o co-substrato, e  $P$  e  $P'$  são os produtos da reação. É possível aproveitar a atividade de mais de uma enzima para determinar a concentração de um analito ou de um produto que não apresenta atividade eletroquímica. Há três classes de elementos de biorreconhecimento de biossensores enzimáticos [21]: **(1)** os biossensores mono-enzimáticos pertencem a uma classe que utiliza apenas uma enzima como elemento de biorreconhecimento. A determinação do analito ocorre pelo seu consumo ou no do co-substrato. Além disso, a determinação também pode ser realizada pelo efeito inibitório de um dos componentes da reação; **(2)** nos biossensores bi-enzimáticos, duas enzimas são imobilizadas. Uma dessas enzimas converte o substrato inicial em um substrato para a segunda enzima. A segunda enzima, então, converte o substrato em uma espécie eletroativa, que é medida pelo transdutor. As reações são estequiometricamente equivalentes, portanto, a relação de concentrações é direta e a corrente é proporcional à concentração do substrato inicial; **(3)** os biossensores multi-enzimáticos operam com os mesmos princípios que os biossensores bi-enzimáticos, porém eles empregam um maior número de enzimas que reagem em cascata para a determinação de um ou mais analitos.

Os biossensores (bio)catalíticos eletroquímicos são classificados em métodos amperimétricos e impedimétricos, amplamente relatados em aplicações sensíveis de biossensores eletroquímicos, e ainda potenciométricos, consoante o a via de transdução [21], [25], [27].

Na **técnica amperimétrica**, a medição é baseada na corrente produzida pelas reações *redox* que ocorrem na superfície do eletrodo, quando é aplicado um potencial constante. Esta técnica combina a especificidade e seletividade de moléculas biológicas com o poder analítico das

técnicas eletroquímicas. São necessários três elétrodos: um eletrodo de trabalho, um eletrodo auxiliar e um eletrodo de referência. O processo (bio)catalítico ocorre na superfície do eletrodo de trabalho, e a corrente medida é proporcional à concentração do analito, resultando em uma resposta linear em função dessa concentração. Em resumo, a corrente medida reflete a transferência de elétrons na reação, dependente da concentração do analito presente.

Na **técnica potenciométrica**, a determinação é feita através da medição do potencial entre dois elétrodos: um de trabalho e um de referência, ou entre dois elétrodos de referência separados por uma membrana com permeabilidade seletiva, quando não há fluxo de corrente elétrica entre eles. A diferença entre os potenciais dos elétrodos de referência e de trabalho é proporcional à atividade dos íons ou à concentração de gases dissolvidos.

Na **técnica impedimétrica**, a detecção é realizada medindo a resposta a uma pequena perturbação sinusoidal do potencial ou corrente aplicada. Esta resposta manifesta-se através de diferenças de fase e amplitude em relação à perturbação aplicada. A razão entre o potencial e a corrente é conhecida como impedância, que reflete essas diferenças de fase e amplitude. A análise da impedância permite tirar conclusões sobre os processos interfaciais do eletrodo, como separação, transferência de carga e difusão de espécies eletroativas, bem como a detecção quantitativa. Neste sentido, as alterações na impedância e/ou capacitância são registradas como resultado da ligação biomolecular. A investigação sobre biossensores impedimétricos, utilizando EIS (do inglês: *Electrochemical impedance spectroscopy*) avançou ao ponto em que sistemas automáticos e económicos são agora possíveis. O EIS oferece várias vantagens, incluindo rapidez, sensibilidade e capacidade de substituir técnicas estabelecidas, como ensaios imunoenzimáticos e reação em cadeia da polimerase [27].

A detecção do analito pode ser efetuada de duas formas [21]:

- Na **detecção direta**, o biossensor mede continuamente o consumo do analito ou a produção do produto durante a reação catalisada pelo biocatalisador.
- Na **detecção indireta**, a medição é realizada através da inibição da atividade biológica do biocatalisador. Geralmente, esse processo é irreversível, especialmente em imunossensores; no entanto, em alguns casos, a atividade pode ser regenerada por meio de um tratamento químico simples [26]. Esta forma de detecção é amplamente empregada na monitorização de pesticidas e íons de metais pesados.

#### 2.4.1.2 Biossensores de (Bio)afinidade

Os biossensores de (bio)afinidade funcionam de maneira diferente dos (bio)catalíticos, pois não medem o consumo ou a formação de substrato/produto, mas sim o equilíbrio de interação do analito com macromoléculas. A interação entre o analito e as macromoléculas é medida diretamente pelo detetor; em alguns casos, um elemento (bio)catalítico pode ser utilizado para monitorizar a (bio)afinidade entre o analito e o seu recetor. Os complexos macromoleculares mais comuns neste tipo de biossensores incluem ácido ribonucleico (RNA, do inglês, *Ribonucleic*

*acid*), RNA mensageiro (mRNA, do inglês, *Messenger RNA*), ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês, *Deoxyribonucleic acid*), DNA mitocondrial (mDNA, do inglês: *Mitochondrial DNA*), e anticorpos [21].

Apesar dos recentes avanços na produção de biossensores de (bio)afinidade, ainda existem algumas limitações. A necessidade de a camada do elemento de biorreconhecimento estar em contato direto com a solução de analito cria problemas em termos de estabilidade do biossensor, o que reduz a sua vida útil e limita o número de utilizações possíveis. Além disso, devido ao seu modo de funcionamento baseado em um estado de equilíbrio, esses biossensores geralmente apresentam uma gama linear reduzida e não permitem a monitorização contínua [21].

## 2.4.2 Elementos de biorreconhecimento

Os elementos de biorreconhecimento/biorreceptores de um biossensor são fundamentais para sua capacidade de detetar e medir substâncias específicas. O funcionamento de um biossensor começa com os biorreceptores, que são responsáveis pela deteção do analito. Esses biorreceptores podem assumir várias formas, incluindo enzimas, anticorpos, nucleotídeos e recetores de células. As enzimas catalisam reações bioquímicas que transformam o analito em um produto mensurável. Um exemplo é a enzima GOx, que é utilizada em biossensores de glucose para converter a glucose em um produto que pode ser detetado e quantificado. Os anticorpos são utilizados para identificar e ligar-se a antígenos específicos, tornando-os ideais para biossensores imunológicos. Sequências de DNA ou RNA podem ser utilizadas para detetar mutações ou patógenos, enquanto células ou fragmentos de células podem responder a neurotransmissores ou hormonas para medir atividades celulares [28]. Nesta dissertação o elemento de biorreconhecimento estudado foi a enzima GOx.

### 2.4.2.1 Enzimas

Milhares de reações químicas ocorrem no sistema complexo que é o organismo, e algumas destas reações não encontram as condições necessárias no próprio organismo para serem realizadas. O controlo e regulação destes processos bioquímicos são executados pelas enzimas, que são proteínas que atuam como catalisadores dessas reações. Isto deve-se à especificidade da interação e da complementaridade electroestática entre a enzima e o seu substrato.

Devido ao vasto número de enzimas e substratos, é necessária uma classificação. Tipicamente, o nome de uma enzima possui o sufixo “-ase” ligado ao nome do substrato ou a um conjunto de palavras que descreve a reação catalisada. De acordo com a IUPAC e a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), as enzimas são classificadas em seis classes, subdivididas em subclasses e sub-subclasses [21]: **(1)** oxirredutases: catalisam reações de oxidação/redução; **(2)** transferases: catalisam reações de transferência de grupos funcionais; **(3)** hidrólases: catalisam reações de hidrólise; **(4)** liases: catalisam reações de eliminação de ligações duplas; **(5)** isomerases: catalisam reações de isomerização; **(6)** ligases: catalisam a

formação de novas ligações acopladas com a hidrólise da adenosina trifosfato (ATP, do inglês, *Adenosine triphosphate*). Como catalisadores, as enzimas possuem diversas características distintivas: aumento significativo das constantes de equilíbrio em ordens de grandeza entre  $10^{12}$  e  $10^{16}$ , alta especificidade, funcionamento em condições de reação suaves em termos de temperatura e pH, e capacidade de regulação das reações. Estas características são principalmente atribuídas às estruturas das enzimas, que podem ser distinguidas em quatro níveis [21].

A **estrutura primária** consiste na sequência de aminoácidos na(s) cadeia(s) polipeptídica(s). A **estrutura secundária** refere-se ao arranjo espacial da estrutura primária, onde ocorre uma distorção dos ângulos C-O-N-C para minimizar o contato entre as cadeias laterais dos aminoácidos da cadeia peptídica. A **estrutura terciária** descreve o arranjo espacial dos elementos estruturais secundários, onde se inserem especificamente todos os átomos das cadeias peptídicas e das cadeias laterais. A **estrutura quaternária** é uma associação de subunidades terciárias por meio de interações de *van der Waals*; normalmente são proteínas de grandes dimensões e massas moleculares elevadas (<100 kDa). A enzima é estabilizada por forças intermoleculares como pontes de hidrogénio, forças de *van der Waals* e interação com iões metálicos, conferindo um arranjo espacial mais favorável termodinamicamente.

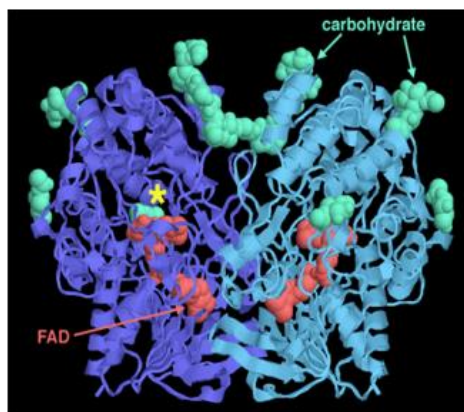
A estrutura das enzimas está dividida em dois setores, o centro ativo e o suporte proteico. É no centro ativo onde as reações ocorrem, embora o suporte proteico também ajude na ligação ao substrato, que adequa a sua estrutura (*induced fit*) devido à interação do substrato com os aminoácidos do invólucro proteico. Muitas enzimas precisam ainda de co-substratos, de forma a alterar a estrutura enzimática e ativá-la para que a sua conformação seja mais favorável para a ligação do substrato, e cofatores, que tornam o centro ativo mais reativo, para que seja possível a catálise da reação. Este modelo faz parte da teoria de ligação enzimática chave-fechadura, onde se associa a ligação não-covalente do substrato com a enzima formando o complexo enzima-substrato (ES) [29].

#### 2.4.2.2 Enzimas Oxidase

As enzimas oxidase catalisam reações de oxidação/redução, que dificilmente ocorrem sem a presença de condições extremas. Muitas destas reações são mediadas por cofatores com elevada capacidade de transferir eletrões para um aceitador e promover assim a reação [29]. O dinucleótido de flavina adenina (FAD, do inglês, *Flavin adenine dinucleotide*) destaca-se entre os cofatores mais comuns das oxidases. Grande parte das oxidases possui uma ou mais moléculas de FAD no seu centro ativo, reduzindo assim o oxigénio a peróxido de oxigénio ( $H_2O_2$ ) [29]. As oxidases são amplamente utilizadas em biossensores enzimáticos, especialmente devido a métodos de deteção que se baseiam na regeneração de FAD a  $FADH_2$ . Conforme a enzima em questão, esta regeneração pode ocorrer em potenciais muito diferentes. Isto acontece porque o FAD está situado no bolso profundo e quanto maior for a profundidade deste, maior será o potencial necessário para promover a regeneração do cofator [29].

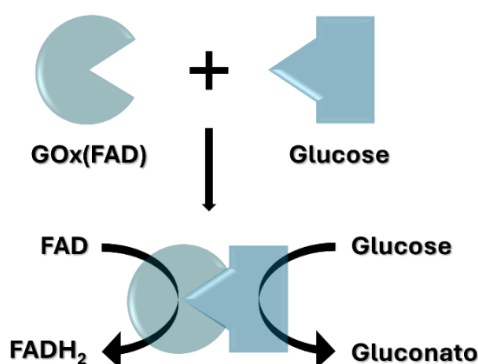
### 2.4.2.3 Glucose Oxidase

A enzima GOx pertence à classe de enzimas oxirredutase e atua sobre a  $\beta$ -D-Glucose, uma das formas isómeras da glucose. Possui uma estrutura quaternária dimérica (**Figura 6**), constituída por duas subunidades, com uma molécula de FAD no centro ativo de cada uma [21].



**Figura 6** – Estrutura quaternária da GOx, com o cofator FAD e hidratos de carbono em evidência, retirada de [21].

A enzima GOx facilita a oxidação de  $\beta$ -D-Glucose a D-glucono-1,5 – lactona, que posteriormente sofre hidrólise espontânea para formar D-ácido glucónico (**Figura 7**). Esta reação ocorre na presença de oxigénio, que atua como co-substrato, sendo reduzido a peróxido de hidrogénio. O bolso profundo é composto por segmentos secundários não contínuos, incluindo 6 folhas  $\beta$  antiparalelas. Os aminoácidos responsáveis pela interação com o substrato incluem triptofano, asparagina e fenilalanina, enquanto aqueles que compõem a região do centro ativo e catalisam a reação são histidina, ácido aspártico e tirosina [35,36].



**Figura 7** – Oxidação de glucose pela enzima GOx.

### 2.4.3 Imobilização enzimática

A imobilização de enzimas na superfície do transdutor é uma das fases mais importantes no desenvolvimento de biossensores, pois o elemento de biorreconhecimento e o transdutor devem estar em contato direto. Dito isto, diversos métodos de imobilização enzimática foram

desenvolvidos para reter a enzima em contato direto com o transdutor, a fim de manter sua estrutura o mais próxima possível do estado nativo e conservar o máximo da sua atividade. No entanto, é importante notar que sempre que uma enzima é imobilizada, a sua atividade tende a diminuir [30], [31].

#### 2.4.3.1 Ligação química

Nestes casos, atinge-se a imobilização enzimática através de ligações covalentes com os grupos reativos da superfície proteica das enzimas, o que resulta na inativação da enzima devido a um excesso de ligações. Entre os métodos mais comuns temos: reticulação, ligação covalente, adsorção física e (bio)afinidade [30], [31].

Na **técnica de reticulação**, as ligações covalentes são estabelecidas entre os grupos amina presentes nos aminoácidos expostos na superfície externa das enzimas. Para tal, é utilizado um agente reticulante, que precisa ser um composto bifuncional. Isto significa que o agente possui capacidade de estabelecer ligações covalentes em ambas as suas extremidades. Desta forma, o agente reticulante cria uma rede tridimensional na qual a enzima fica imobilizada sobre o transdutor, mantendo-a fixa e permitindo a realização das reações bioquímicas necessárias para a detecção dos analitos. Este método é amplamente utilizado na imobilização de enzimas em biossensores devido à sua eficácia na fixação da enzima ao suporte. Uma limitação associada a este método reside na ausência de precisão na orientação da enzima e na determinação do local exato onde ocorre a ligação covalente. Esta imprecisão pode afetar a eficácia da enzima, potencialmente dificultando ou até mesmo impossibilitando a difusão do substrato até o centro ativo, ou resultar na ligação da enzima num local que pode levar à sua desativação [30], [31].

A **imobilização covalente** de enzimas, fixa as enzimas a um suporte, como um eletrodo, através de ligações químicas fortes. O processo começa com a preparação e ativação da superfície do suporte, seguida pela ligação da enzima aos grupos ativadores. Após a imobilização, o suporte pode ser tratado para bloquear grupos reativos indesejados. Este método oferece alta estabilidade e a possibilidade de reutilização da enzima, mantendo sua atividade enzimática, mas pode ser complexo e alterar a conformação da enzima [30], [31].

O método de imobilização de **enzimas por (bio)afinidade** utiliza interações específicas para fixar enzimas em um suporte, como um eletrodo ou matriz polimérica. O suporte é tratado para introduzir grupos funcionais que permitem a ligação da enzima, que é então fixada por essas interações naturais e específicas. Após a imobilização, o suporte é tratado para bloquear ligações não desejadas. Este método oferece alta especificidade e preserva a atividade enzimática, permitindo a detecção precisa de analitos em baixas concentrações. No entanto, pode ser caro e complexo, e a estabilidade da enzima pode ser afetada pelas condições ambientais [30], [31].

Por outro lado, a **adsorção física/química** envolve interações intermoleculares entre a enzima e o suporte, como pontes de hidrogênio, forças iônicas, eletrostáticas ou *van der Waals*. Uma

das vantagens deste método é o seu baixo custo e simplicidade. A ligação à superfície ocorre pela evaporação do solvente de uma solução enzimática, deixando apenas a enzima em contato com o transdutor devido às forças intermoleculares. No entanto, a eficácia da imobilização depende do pH e da força iónica, tornando crucial a otimização das condições de imobilização para preservar a estabilidade e especificidade da enzima. Entre as desvantagens, estão a imobilização fraca, o risco de perda significativa de enzima, distribuição não uniforme das enzimas e a falta de controle sobre sua orientação, o que pode resultar na perda de atividade enzimática e redução do sinal de resposta do biossensor [30], [31].

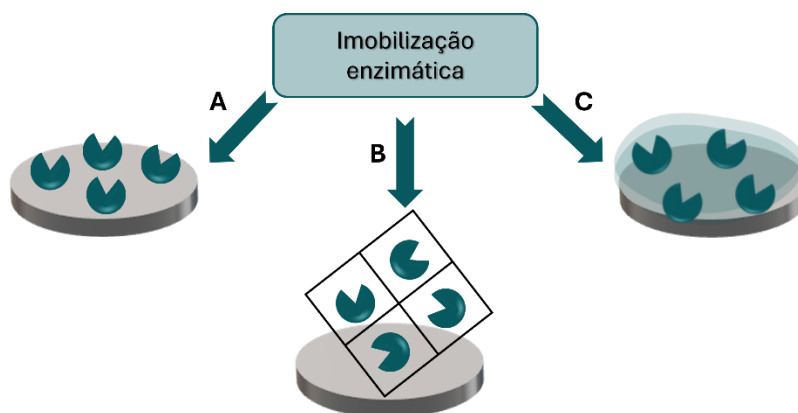
#### 2.4.3.2 Métodos de retenção física (encapsulamento)

Os métodos de **retenção física (Figura 8)** foram os primeiros a serem aplicados na construção dos biossensores. Uma vantagem destes métodos é que eles não alteram a estrutura da enzima, já que não envolvem a formação de novas ligações. No entanto, eles têm a desvantagem de ter um tempo de vida mais curto e geralmente requerem uma maior quantidade de enzima em comparação com outros métodos [30], [31].

O primeiro método desenvolvido para imobilizar camadas enzimáticas sobre a superfície de eletrodos foi a retenção com membranas. Neste método, uma membrana de diálise é fixada por um anel de borracha sobre a camada enzimática, possibilitando a passagem dos substratos e produtos da reação enzimática. A sensibilidade do biossensor está diretamente relacionada à qualidade da camada enzimática e à espessura da membrana. A oclusão, por sua vez, consiste em reter enzimas nas cavidades de uma matriz polimérica porosa durante a polimerização dos monómeros que estão em suspensão junto com a enzima e um iniciador. Esta matriz pode ser um gel ou fibras e mantém a estrutura das enzimas, uma vez que não há formação de ligações entre os grupos amina da superfície enzimática. No entanto, este método exige um controlo rigoroso das condições de polimerização, o que o torna pouco reproduzível. Uma desvantagem é a perda de enzima devido à degradação da estrutura porosa da matriz e dos poros que servem de suporte para a enzima, resultando em uma diminuição da sensibilidade. O encapsulamento é um método em que uma membrana semipermeável é utilizada para envolver mais do que uma molécula de enzima. Esta membrana permite a circulação de reagentes e produtos através dos poros, o que pode melhorar o desempenho e a estabilidade do biossensor. A vantagem deste método é que a membrana não permite o contato direto entre a enzima e o meio, o que ajuda a evitar efeitos de inativação. Isto proporciona uma proteção adicional à enzima, contribuindo para uma vida útil prolongada e uma resposta mais estável do biossensor [27].

Um outro método para encapsular enzimas consiste no recurso a polímeros condutores ou isolantes [26]. As técnicas de imobilização de enzimas em filmes poliméricos permitem a localização de moléculas biologicamente ativas de qualquer tamanho ou geometria. O uso destes polímeros também permite a deposição direta do mesmo na superfície do eletrodo, enquanto se imobiliza as moléculas enzimáticas [25]. Devido à vasta diversidade estrutural, algumas enzimas podem não ser tão reativas em certas matrizes ou a sua imobilização pode não ser fácil, o que pode levar à perda de enzima [30], [31].

Algumas das desvantagens deste método são a necessidade de maiores quantidades de enzima para que ocorra encapsulamento eficaz e a dificuldade de adsorção à superfície do eletrodo.



**Figura 8** – Esquema de métodos físicos de imobilização enzimática: (A) retenção; (B) oclusão; (C) encapsulamento.

Após a interação entre o analito e o biorreceptor, o transdutor assume um papel crucial ao converter a reação bioquímica em um sinal mensurável. Os transdutores podem ser classificados em diferentes tipos, cada um com suas próprias técnicas e princípios de funcionamento. Os **transdutores eletroquímicos** transformam a reação em um sinal elétrico detetável, utilizando métodos como potenciometria ou amperometria para quantificar a resposta. Por outro lado, os **transdutores óticos** detetam mudanças em absorção, fluorescência ou luminescência, proporcionando uma forma sensível e precisa de medir a interação entre o analito e o biorreceptor. Os **transdutores térmicos** capturam variações na temperatura associadas à reação, enquanto os **transdutores mecânicos** monitorizam alterações físicas, como variações na massa ou pressão, empregando técnicas como a microbalança de cristal de quartzo. Cada tipo de transdutor contribui de maneira específica para a detecção e análise dos analitos, ampliando as possibilidades e a precisão dos biossensores. Nesta dissertação, a transdução estudada foi a **eletroquímica**, e será descrita com mais detalhes na seção a seguir [30], [31].

#### 2.4.4 Transdutores eletroquímicos

Como já mencionado anteriormente, um biossensor é composto por um elemento de biorreconhecimento e um transdutor de sinal, responsável por converter o sinal gerado pela reação bioquímica em uma grandeza química. No caso dos transdutores eletroquímicos, o sinal é convertido em corrente elétrica [21].

Estes transdutores são compostos por materiais condutores ou semicondutores, já que a transdução de sinal é realizada por via elétrica, exigindo alta mobilidade dos elétrons. Nos últimos anos, novos materiais têm sido desenvolvidos para aplicações eletroquímicas e eletrônicas, não apenas em biossensores, mas também em diversos outros dispositivos que precisam incorporar materiais capazes de conduzir corrente elétrica de baixa intensidade [21].

Uma das limitações na aplicação destes materiais é a sua abundância e, conseqüentemente, o custo. Portanto, é vantajoso utilizar materiais de alta abundância, como o carbono, em vez de metais nobres como ouro, prata e platina. Assim, surgiram elétrodos compostos por carbono, grafite e polímeros. Mais recentemente, foram sintetizadas novas formas estruturais de carbono, como nanotubos de carbono e grafeno. Estes últimos são classificados como nanomateriais, uma vez que seu arranjo estrutural apresenta dimensões na ordem dos nanômetros [21].

#### 2.4.5 Técnicas eletroquímicas

Existem diversas técnicas eletroquímicas que podem ser aplicadas para avaliar o desempenho analítico do biossensor, como voltametria cíclica (CV, do inglês, *Cyclic voltammetry*) e cronoamperometria (CA) através de retas de calibração, estudo de seletividade e análise de amostras de soro comercial [34].

##### 2.4.5.1 Voltametria Cíclica

CV é uma técnica que envolve a variação controlada de potencial aplicado ao longo do tempo, dentro de uma gama específica (**Figura 9**). Durante este processo, reações de oxidação ou redução ocorrem na superfície do elétrodo de trabalho, juntamente com a adsorção de espécies e uma corrente capacitiva resultante da carga acumulada na camada. O potencial varia de forma linear em função do tempo dentro do intervalo definido, partindo do valor mínimo até o máximo e de seguida no caminho inverso, obtendo-se graficamente uma representação da corrente em função do potencial. Essa técnica é comumente utilizada para estudar as constantes cinéticas de reações de transferência de carga, bem como para determinar áreas eletroativas.

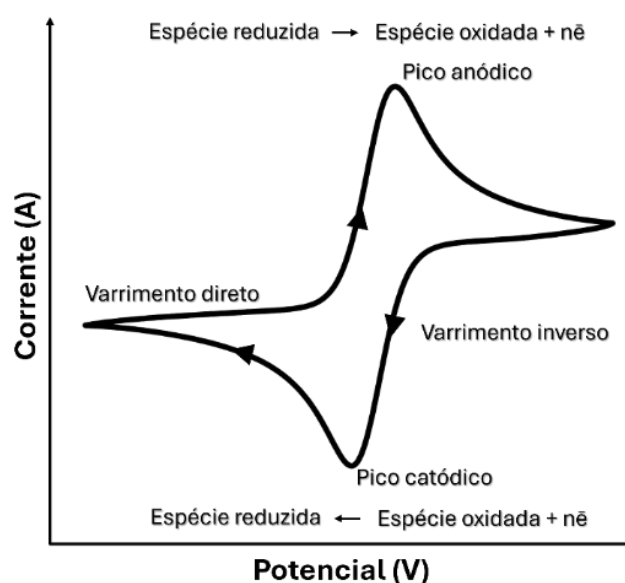
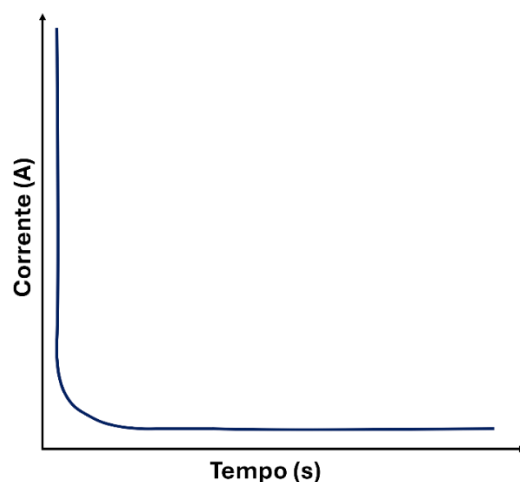


Figura 9 – Voltamograma cíclico característico de um sistema reversível.

### 2.4.5.2 Cronoamperometria

CA é uma técnica onde aplica-se no eletrodo de trabalho um potencial de onda quadrada. A corrente do eletrodo, medida em função do tempo, varia conforme a difusão de um analito da solução aplicada na superfície do biossensor (**Figura 10**). Pode ser usada para medir a dependência corrente-tempo para um processo que ocorra no eletrodo, que varia conforme a concentração do analito. Ao contrário do CV, nesta técnica aplica-se um potencial constante e observa-se o comportamento da corrente gerada em função de um intervalo de tempo definido.



**Figura 10** – Evolução da corrente com o tempo ao aplicar um impulso de potencial a um eletrodo.

## 2.5 Biossensor Eletroquímico/Enzimático de Glucose

A detecção e monitorização da glucose são fundamentais no combate à DM e às suas complicações, o que tem impulsionado, ao longo dos anos, o desenvolvimento de biossensores de glucose cada vez mais seletivos e precisos [34]. A reação catalisada pela enzima provoca uma alteração no pH ou na corrente de oxidação do microambiente na matriz polimérica, o que resulta em mudanças na condutividade eletrônica [35]. A GOx catalisa a reação entre a  $\beta$ -D-glucose e o oxigênio, produzindo ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. Quando um eletrodo modificado com GOx é utilizado como sensor de glucose, a enzima imobilizada numa matriz reage com a glucose que se difunde da solução para o polímero [36].

Para o eletrodo enzimático, é criada uma reta de calibração que relaciona a concentração de glucose com a resposta do sensor. A parte útil da reta é aquela em que a variação da corrente em função da concentração de glucose é linear. No entanto, esta zona linear representa apenas uma pequena porção da reta de calibração, o que significa que apenas as concentrações de glucose dentro dessa gama limitada podem ser determinadas com precisão [25].

Os biossensores enzimáticos de glucose têm-se destacado como uma das abordagens mais promissoras para a monitorização da DM, devido à sua elevada sensibilidade e seletividade. A GOx é frequentemente escolhida como biocatalisador, graças à sua excelente estabilidade,

sensibilidade e seletividade [37], [38]. Embora, na natureza, a reação catalisada pela GOx ocorra apenas na presença de oxigênio, que atua como mediador, foram já desenvolvidas abordagens alternativas para superar esta limitação, o que resultou na criação de diferentes gerações de biossensores enzimáticos de glucose [39], [40].

### 2.5.1 1ª Geração

Os biossensores de glucose de 1ª geração utilizam o oxigênio como mediador, conforme explicado anteriormente, e detetam o peróxido de hidrogênio produzido durante a reação [41].

Todavia esta geração enfrentava desafios relacionados com interferências eletroativas, uma vez que a detecção eficaz do  $H_2O_2$  requer um potencial de operação elevado para garantir forte seletividade. Esse problema podia ser mitigado com o uso de membranas seletivas ou azul da Prússia, que ajudam a reduzir as interferências. Além disso, se a concentração de oxigênio ( $O_2$ ) não for suficientemente alta, a reação catalisada pela GOx não ocorre de forma eficiente [39], [41], [42]. Assim, a 1ª geração é propensa a erros e por isso, nanomateriais, como nanocubos ou nanopartículas, começaram a ser usados para o desenvolvimento de biossensores, devido ao seu elevado efeito catalítico [42].

### 2.5.2 2ª Geração

Para superar as limitações da 1ª geração, a 2ª geração de biossensores passou a utilizar aceitadores de elétrons sintéticos, ou mediadores redox, em alternativa dão oxigênio. Neste caso, o mediador transporta elétrons da enzima para a superfície do eletrodo de trabalho e há formação de um mediador reduzido em vez de  $H_2O_2$  [39], [41]. Neste tipo, o processo catalítico ocorre em 3 fases distintas. Primeiro, ocorre a transferência de elétrons para os centros FAD da GOx, originando  $FADH_2$ . Depois o mediador artificial é reduzido devido a transferência de elétrons do  $FADH_2$  e irá transportar elétrons até ao eletrodo, produzindo corrente elétrica [43].

Os biossensores amperimétricos de GOx de 2ª geração são adequados para determinação da glucose sanguínea, uma vez que é evitada a dependência de oxigênio e a interferência de outros componentes dos fluídos biológicos [23]. O maior desafio desta geração, é a dificuldade em manter contato adequado entre a enzima, o mediador e o eletrodo [44].

### 2.5.3 3ª Geração

Na 3ª geração, os biossensores não recorrem a mediadores, baseando-se apenas da transmissão direta de elétrons. Este fenómeno está fortemente relacionado com a distância entre o centro redox da enzima e a superfície do eletrodo [45] e permite operar em baixos potenciais, o que tem um efeito de redução na interferência [46].

Uma vez que a GOx é influenciada por vários fatores ambientais externos, como pH, humidade e temperatura, a 3ª geração ainda apresenta inúmeras restrições. Desta forma, os biossensores de glucose ainda estão longe de alcançar o seu potencial máximo, o que torna necessário o investimento em técnicas e materiais que possibilitem um sensor mais estável, sensível, seletivo e económico [39].

Nesta dissertação foram desenvolvidos sensores amperimétricos de 1ª geração. Na **Tabela 3** encontram-se descritos alguns biossensores enzimáticos relatados recentemente na literatura para a deteção amperimétrica da glucose entre 2021 e 2024.

**Tabela 3** – Biossensores eletroquímicos enzimáticos para a detecção de glicose (2021-2024).

<b>Eléctrodo</b>	<b>Geração</b>	<b>Imobilização</b>	<b>Transdução</b>	<b>Gama de linearidade</b>	<b>LD</b>	<b>Referência</b>
Grafite/Nanopartículas de Ouro/Azul de Prússia/GOx	1ª	Adsorção	Eletroquímico (Amperimétrico)	0,025 – 1 mM	0,0088 mM	[47]
Óxido de Grafeno/Polianilina/Nafion/GOx	1ª	Encapsulamento	Eletroquímico (Amperimétrico)	0,05 – 50 mM	0,0890 mM	[48]
Ouro/Nafion/Peroxidase/Albumina/GOx	1ª	Adsorção	Eletroquímico (Amperimétrico)	0,02 – 15 mM	0,0029 mM	[49]
Ouro/Óxido de Grafite/Cobalto/Quitossano/GOx	2ª	Adsorção	Eletroquímico (Amperimétrico)	1 – 15 mM	2,7 mM	[50]
Nanocubos de carbono/Glucose Desidrogenase	3ª	Adsorção	Eletroquímico (Amperimétrico)	0,05 – 5 mM	0,0156 mM	[51]

Numa investigação, L. Sakalauskiene *et al.* [47] desenvolveram um biossensor amperimétrico de 1ª geração ao modificar a superfície de um eletrodo de grafite com nanoestruturas de ouro e azul da Prússia com glucose oxidase. Primeiro aplicou-se as nanoestruturas de ouro no eletrodo, seguindo-se pelo azul de Prússia e, seguidamente, a glucose oxidase. O biossensor desenvolvido exibiu uma gama linear de 0,025 mM a 1 mM de glucose, de fácil reprodutibilidade e elevada seletividade sobre substâncias interferentes eletroativas.

Noutro estudo, A. Popov *et al.* [48] testaram um protocolo onde se combinava óxido de grafeno reduzido, polianilina, nafion e glucose oxidase para desenvolver um biossensor de glucose amperimétrico, cuja gama linear abrange desde os 0,5 mM até 50 mM. O biossensor também provou ser seletivo, estável e de fácil reprodutibilidade para a determinação de glucose em soro humano.

Um biossensor de glucose foi fabricado por A. Izadyar *et al.* [49] ao usar uma enzima recombinante derivada do milho. O eletrodo manipulado com a peroxidase da planta, glucose oxidase, albumina bovina e ouro mostrou-se capaz de responder a uma gama linear de glucose desde 20  $\mu$ M até 15 mM. O seu fabrico mostrou-se rápido, económico e de fácil reprodutibilidade.

D. Kim *et al.* [50] verificaram que um composto de óxido de grafite, cobalto e quitosano tinha forte estabilidade e capacidade de transferência de eletrões e aplicaram-no num biossensor eletroquímico com elevada sensibilidade e estabilidade para uma gama linear de glucose de 1,0 a 15 mM.

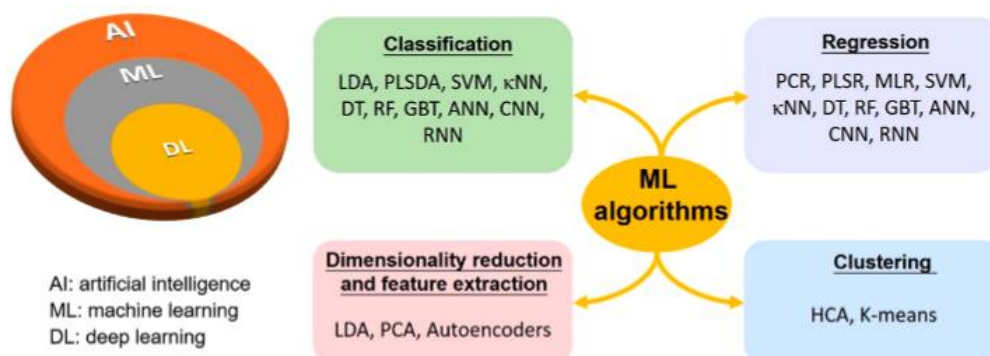
W. Jeon *et al.* [51] vincularam glucose desidrogenase e nanotubos de carbono para construir um biossensor de 3ª geração. Com isto, conseguiram obter um sensor seletivo e estável para uma gama linear de 0,5 a 5 mM.

## 2.6 Machine Learning

A quimiometria é a disciplina química que emprega métodos estatísticos ou matemáticos para interrogar o máximo de informações químicas por meio de análise de dados químicos e para selecionar ou projetar testes e procedimentos de medição ideais [52]. Assim, os métodos de quimiometria tem um papel crucial na deteção, análise e diagnóstico baseados em química analítica, como biossensores [53].

Aplica-se quimiometria no processamento quantitativo e qualitativo de sinais complexos a partir de sensores eletroquímicos, óticos e colorimétricos [24]. Existem vários métodos quimiométricos como *Principal Component Analysis/Regression* (PCA/PCR), *Linear Discriminant Analysis* (LDA), *Multiple Linear Regression* (MLR), *Partial Least Squares* (PLS), *Hierarchical Clustering Analysis* (HCA) e combinações entre estes [54], [55], [56].

Atualmente, como um ramo da inteligência artificial (IA), o *Machine Learning* (ML) alcançou avanços impressionantes. Ao integrar técnicas de quimiometria com algoritmos avançados de ML para processamento de dados, como *K-Nearest Neighbor* (kNN), *Support Vector Machine* (SVM), *Naive Bayes* (NB), *Decision Tree* (DT), *Gradient-Boosted Tree* (GBT), *Random Forest* (RF), *Artificial Neural Network* (ANN), *Recurrent Neural Network* (RNN) e *Convolutional Neural Network* (CNN), surgiram diversas novas estratégias de análise, classificação, diagnóstico, das quais algumas já estão bem envolvidas em biossensores (**Figura 11**) [24], [27].



**Figura 11** – Relação entre AI, ML e DL, e vários algoritmos de ML, retirado de [24]. CNN: *Convolutional Neural Network*. DT: *Decision tree*. Feedforward ANN: *Feedforward Artificial Neural Network*. GBT: *Gradient-boosted Trees*. HCA: *Hierarchical Clustering Analysis*. kNN: *k-Nearest Neighbor*. LDA: *Linear Discriminant Analysis*. MLR: *Multiple Linear Regression*. NB: *Naive Bayes*. PCA ou PCR: *Principal Component Analysis ou Regression*. PLSDA ou PLSR: *Partial Least-Squares Discriminant Analysis ou Regression*. RF: *Random Forest*. RNN: *Recurrent Neural Network*. SVM: *Support Vector Machine*.

No campo de biossensores e detecção, ML surge como uma ferramenta ou método de processamento e análise de dados, como extração de características ou previsão de espécies, de concentrações de analitos e até mesmo informações desconhecidas em ensaios qualitativos ou quantitativos [24], [27], [57], [58].

Os méritos dos métodos avançados de ML em relação às abordagens convencionais são a capacidade de interrogar dependências não lineares apropriadas para amostras biológicas complexas, ao oferecer a possibilidade inimitável de resolver desafios urgentes na área de biossensores. A relação entre IA, ML e *deep learning* (DL) e vários algoritmos de ML é apresentada na **Figura 11** [24].

### 2.6.1 Considerações sobre ML

O ML é um subcampo da IA que abrange qualquer ferramenta computacional capaz de imitar a inteligência humana [57].

O ML pode ser categorizado como supervisionado ou não supervisionado [27], [59], [60]. O supervisionado engloba algoritmos de ML que podem ser treinados com um conjunto de dados de entrada com os seus resultados alvo. Na fase de treino, os algoritmos analisam o conjunto de dados de entrada, identificando padrões de forma a prever o valor verdadeiro fornecido.

Eles são usados para realizar classificação e regressão e já mostraram progresso promissor no que toca a biossensores, especialmente espectrométricos, ao fornecer com precisão saídas discretas para classificação e contínuas para regressão [27], [57], [61], [62].

O ML tem capacidade de processar de forma efetiva grandes dimensões de dados de detecção para matrizes ou amostras complexas e ainda beneficia da possibilidade de obter resultados analíticos razoáveis, mesmo na presença de ruído ou baixa resolução. Pode também ser uma forma de descobrir relações ocultas entre parâmetros de amostra e sinais de detecção, por meio de visualização de dados e explorar inter-relações entre sinais e (bio)eventos.

Espera-se que a capacidade de previsão dos métodos supervisionados de ML aumente progressivamente com a dimensão de amostra de treino e a diversificação química dos dados de detecção (entrada). Daqui vem a importância de treinar o modelo com grandes dimensões de amostras reais, o que contribui para reprodutibilidade, escala, estabilidade, sensibilidade, reatividade cruzada e incrustação [63]. Ainda assim, é de notar-se que a diversificação química e dimensão de amostras de treino não são suficientes para garantir modelos que possam prever com precisão a saída de amostras desconhecidas fora do conjunto de treino (conjunto de teste). A qualidade dos dados experimentais que constituem a entrada é também um fator relevante, pois devem ser precisas e reprodutíveis para minimizar erros sistemáticos. Para além disto, os dados experimentais devem ser representativos da propriedade a ser determinada, pois só assim o ML será capaz de resolver esses problemas de correlação [57], [64].

Por sua vez, no ML não supervisionado o conjunto de dados de treino (entrada) não está previamente associado a um resultado (saída). Aqui, determina-se a distribuição do conjunto de dados de entrada (estimativa de densidade) ou encontra-se um conjunto de exemplos semelhantes no conjunto de dados de entrada (*clustering*) [24], [57].

### **2.6.2 Processo geral de análise de dados de ML**

Tanto o conjunto de dados sequenciais (obtidos por biossensores elétricos e espectrais) como o conjunto de dados de imagem (adquiridos por biossensores colorimétricos e fluorométricos) existem no campo de biossensores. A primeira preocupação, é projetar um modelo de ML apropriado com base no conjunto de dados a ser analisado e na finalidade da análise (quantitativa ou qualitativa). Após a arquitetura ML ser projetada para um biossensor específico, é necessário implementar um fluxo de trabalho como mostrado na **Figura 12** [24].

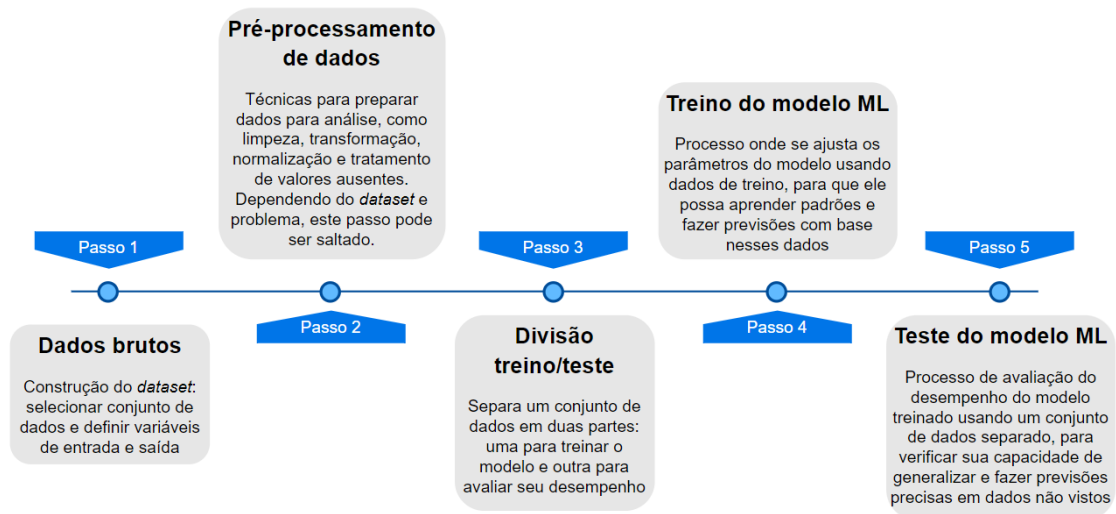


Figura 12 – Processo geral de análise de dados baseada em ML, adaptado de [24].

O pré-processamento dos dados brutos de detecção é outro passo de extrema importância. Métodos como derivadas, eliminação de ruído, transformada de *Fourier*, compactação de dados, eliminação de desvios de linha de base e normalização estão entre os mais comuns, e tendem a ter grande impacto no desempenho final dos modelos de ML. A normalização, por exemplo, torna possível não apenas comparar os erros dos modelos, mas também diminuir os efeitos de amostras discrepantes durante a fase de treino. Porém, deve-se notar que o pré-processamento de dados brutos não tem garantia de produzir melhores resultados, pois também pode remover acidentalmente alguns recursos informativos dos dados brutos e, conseqüentemente, piorar o desempenho do algoritmo [24].

O conjunto de dados pré-processados ou brutos deve ser dividido em 2 subconjuntos: conjunto de treino (cerca de 80 %) e conjunto de teste (cerca de 20 %). O conjunto de treino é usado para extrair informação significativa e encontrar hiperparâmetros ideais para os algoritmos. Por sua vez, o conjunto de teste é empregado para relatar o desempenho de algoritmos. Estes conjuntos devem todos ser retirados do mesmo conjunto de dados inicial [24].

Uma parte importante na fase de treino é a inicialização dos pesos. Geralmente, aplica-se a inicialização aleatória, mas está sujeita a explosão, desaparecimento ou convergência lenta do gradiente. Outros métodos, como a inicialização de He ou Xavier [65], [66], surgiram como soluções mais confiáveis. Quando a precisão do conjunto de teste é muito menor que a do conjunto de treino, pode ocorrer *overfitting* [24].

Uma tarefa crítica de análise de dados é o ajuste de hiperparâmetros. O método de validação cruzada *k-fold* pode ser usado no ajuste de hiperparâmetros e avaliar o desempenho de previsão do algoritmo após este passo [24].

Em algoritmos de regressão, métricas como o coeficiente de determinação ( $R^2$ ), erro médio absoluto (MAE, do inglês, *Mean Absolute Error*) e erro médio quadrático (MSE, do inglês, *Mean Squared Error*) costumam ser utilizadas para avaliação do desempenho do modelo.

Numerosos algoritmos avançados de ML estão a ser desenvolvidos para processamento de dados e previsão em biossensor, como ANN, MLP, SVM, kNN, DT, RF, KR, GBT [67], [68], [69].

### 2.6.3 Tipos de Algoritmos de ML

Nesta secção encontram-se breves descrições dos algoritmos estudados nesta dissertação, bem como algumas das suas aplicações mais comuns.

#### 2.6.3.1 Support Vector Machine

Tem como objetivo procurar um hiperplano, que pode maximizar a margem entre os padrões de treino e o limite de decisão. É amplamente utilizado no diagnóstico de cancro e na deteção de patógenos transmitidos pela água [70], [71]. O SVM baseado em *kernel* aplica funções de *kernel* para converter os dados num espaço de recursos de maiores dimensões, caso um conjunto de dados não possa ser separado linearmente. O desempenho deste algoritmo é afetado por dois hiperparâmetros, os parâmetros de *kernel* e os tipos de *kernel*, que são selecionados conforme os dados de entrada [72].

#### 2.6.3.2 Kernel Ridge

O algoritmo *Kernel Ridge* (KR) pode ser usado como uma variação da regressão linear que combina a regularização de *Ridge Regression* com o uso de *kernels* para modelar relações não lineares entre as variáveis. Ele transforma os dados originais para um espaço de alta dimensão, onde as relações lineares podem ser encontradas mais facilmente, utilizando funções *kernel*. A regularização *Ridge* adiciona um termo de penalização à função de custo, ajudando a evitar o *overfitting* e melhorando a generalização do modelo. O KR é eficiente para resolver problemas complexos onde as relações entre as variáveis são não lineares e difíceis de capturar com modelos lineares simples [73].

#### 2.6.3.3 K-Nearest Neighbor

Aplicado principalmente para classificação. O número de vizinhos ( $k$ ) é baseado no conjunto de dados e normalmente, valores menores de  $k$  tornam os limites mais distintos entre as classes, embora aumentem a influencia do ruído na classificação. Este tipo de algoritmo tem vindo a ser otimizado e já tem aplicações no diagnóstico de cancro da mama e em deteção de anomalias [74], [75].

#### 2.6.3.4 Decision Tree

Na estrutura de DT, cada nó representa um recurso em um instante a ser “testado”, cada ramificação representa um valor que um nó pode assumir e cada folha representa a densidade de probabilidade para a distribuição de classe ou valor DT fornece uma previsão rápida, mas em contrapartida o desenvolvimento deste modelo requer uma quantidade de tempo considerável e tem mais dificuldade em operar com dados de elevadas dimensões. Uma DT singular enfrenta problemas de *overfitting* à medida que a árvore cresce mais profundamente. Neste cenário, irá obter-se um resultado de treino ideal, mas com grande risco de induzir erros inaceitáveis em teste [76].

#### 2.6.3.5 Random Forest

RF é um método de conjunto que opera ao desenvolver uma série de DTs para classificação e regressão. Pode ultrapassar o problema de *overfitting* e lida bem com ruído. Quanto maior o número de árvores, mais lento será a RF no processo de classificação ou previsão. Assim, DTs fracas e não correlacionadas são agregadas como RF [77], [78], [79].

#### 2.6.3.6 Gradient Boosting Tree

GBT é outro algoritmo de ML baseado em conjunto, que inclui *boosting*, uma poderosa estratégia de aprendizagem que visa melhorar a precisão das previsões, ao combinar a saída de muitos aprendizes fracos com ponderação numa série repetitiva [75]. As suas vantagens incluem alta precisão, pequenas dimensões de modelo e um processo rápido de treino e previsão. Aqui, as árvores são treinadas sequencialmente para compensar o resíduo da árvore anterior. A profundidade de cada árvore, o número mínimo de folhas em cada árvore e o número mínimo de pontos de dados por folha podem ser manipulados para evitar ajuste excessivo, maximizando a precisão [80].

#### 2.6.3.7 Artificial Neural Network

As ANNs são programas de computador baseados num modelo simplificado do cérebro, que tenta reproduzir a operação lógica do mesmo ao usar um conjunto de entidades semelhantes a neurónios para realizar o processamento dos dados.

A estrutura deste algoritmo é geralmente constituída por três camadas (entrada, ocultas e saída) e conexões *feed-forward*, às quais são aplicados pesos. Consiste em neurónios conectados (nós) que são projetados de forma a imitar o cérebro humano. Estes nós processam os sinais de entrada e transmitem-nos para os próximos nós conectados. A saída dos nós, está sujeita à soma ponderada dada pelos nós da camada anterior. ANNs tiveram um grande impacto no desenvolvimento de DL, um ramo de ML. O tamanho da camada oculta e os pesos das conexões entre nós são alguns dos parâmetros-chave que afetam significativamente o desempenho de uma ANN e devem ser otimizados de forma a realizar previsões com o menor erro possível [24], [81].

### 2.6.3.8 Multilayer Perceptron

O algoritmo MLP (*Multilayer Perceptron*) é um tipo de ANN composta por múltiplas camadas de neurónios: uma camada de entrada, uma ou mais camadas ocultas, e uma camada de saída. Cada neurónio em uma camada está conectado a todos os neurónios da próxima camada, e cada conexão tem um peso ajustável. O MLP utiliza funções de ativação não lineares, como ReLU ou sigmoide, para capturar relações complexas nos dados. O treino é realizado por meio do algoritmo de retropropagação, que ajusta os pesos das conexões para minimizar o erro entre as previsões do modelo e os valores reais. O MLP é amplamente utilizado para tarefas de classificação e regressão em ML [82].

### 2.6.4 Aplicações de ML nos Biossensores

A comercialização de biossensores é limitada pela precisão e confiabilidade dos mesmos. Tendo isto em conta, tem havido mais testes focados na análise de dados de deteção baseada ML, que tem o potencial de desenvolver novas estratégias que superem os desafios atuais dos biossensores. Com tempo, biossensores inteligentes que podem prever automaticamente espécies ou concentrações de analito podem se tornar o comum do dia-a-dia [79].

Entre vários desafios que os biossensores enfrentam, resultados falsos e atrasos estão entre os mais antigos. Embora os modelos de classificação e de *Deep Learning* (DL) sejam novas oportunidades com o potencial de elevar o desempenho destes dispositivos, como a confiança de medição e velocidade, a IA ainda tem dificuldades a garantir que as previsões sejam explicáveis e consistentes com o conhecimento do domínio aplicado [83].

Especialmente, o ML pode analisar dados brutos de um biossensor de diversas maneiras (**Figura 13**): **(1)** Categorização: os sinais de deteção podem ser classificados em várias categorias pelos algoritmos baseados no analito alvo. **(2)** Deteção de anomalias: quando os biossensores são usados no local, a matriz da amostra e condições operacionais podem interferir significativamente na contaminação. O ML tem a capacidade de decidir se o sinal está “correto” ou até mesmo corrigi-lo. **(3)** Redução de ruído: interferência de sinal, como ruído elétrico, pode ter grande impacto na análise de sinais, no entanto é possível treinar o ML para desprezá-lo. **(4)** Identificação de objetos e conhecimento de padrões. Ao descobrir objetos e padrões latentes com ML, os dados de deteção podem ser interpretados de forma mais fácil e eficaz [24].

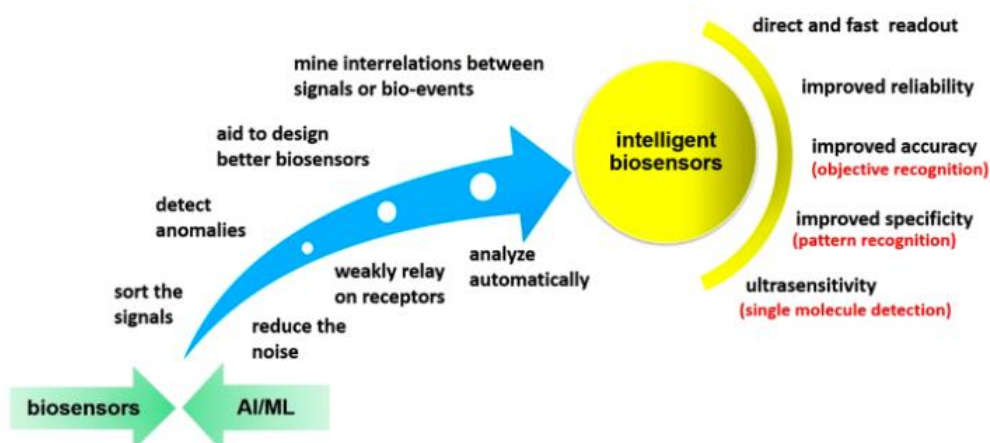


Figura 13 – Benefícios de ML para biosensores, retirado de [24].

Os métodos de ML trazem, eventualmente, ganhos analíticos relevantes ao remover características experimentais anômalas, ao mesmo tempo em que coletam de forma inteligente apenas determinados dados para obter descritores robustos, que podem fornecer informações analiticamente úteis (saídas) qualitativas (identificação de analitos e classificação de padrões) e/ou quantitativas (regressão), analisa com maior sensibilidade, reprodutibilidade e precisão, mesmo na presença de problemas (incrustação do eletrodo, baixa relação sinal-ruído e efeitos de matriz) [84], [85], [86]. Outro benefício auxiliado por ML é a capacidade de monitorizar múltiplos parâmetros ou alvos a partir de uma única medição (multideterminação), evitando assim a necessidade de métodos de separação ou vários sensores/biosensores seletivos [87].

Ao convergir biosensores com métodos de ML, originou-se uma estratégia promissora que visa a tradução de tecnologias de teste capazes de fornecer testes extensivos e pontuais em uso prático. Além de permitir a multideterminação e melhorar o desempenho analítico dos dispositivos através da discriminação de sinais sobrepostos, os modelos de ML supervisionados podem fornecer testes precisos sem a necessidade de métodos experimentais para evitar problemas analíticos como incrustações de eletrodos, efeitos de matriz, interferências químicas e relação sinal-ruído fraco [88]. O ML pode auxiliar a leitura do biossensor de maneira direta, automática, precisa e rápida, o que é muito importante para detecção ou diagnóstico no local.

#### 2.6.4.1 Interferências Químicas

Usando ML, quantificações precisas podem ser alcançadas sem a adoção de métodos experimentais para evitar interferências químicas em biosensores, como o uso de técnicas de separação e membranas seletivas [89].

Torrecilla *et al.* [81] desenvolveram um biossensor amperométrico de GOx e nanopartículas de ouro para determinação simultânea de glucose e interferentes comuns, como ácido ascórbico e ácido úrico, em misturas. Os dados obtidos a partir de CV gerados com o biossensor foram processados com recurso a ANN. O princípio de determinação baseia-se na medição de uma corrente de oxidação proveniente do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido por enzimas.

A ANN implementada era composta por 11 nós de entrada, 13 ocultos e 3 de saída. A diferença média entre o valor real e previsto de cada composto foi inferior a 1,7 % para uma faixa de concentração entre 0,1 mM e 1 mM, provando que a ANN pode ser útil para resolver o efeito de interferência na análise de glucose, ácido ascórbico e úrico, sem qualquer conhecimento fenomenológico prévio e qualquer pré-tratamento [81].

#### **2.6.4.2 Aumento de tempo útil**

Aumentar a longevidade dos biossensores é outro desafio que pode ser ultrapassado com recursos a modelos de ML.

Massah *et. al* [90] usaram um modelo de regressão SVM para melhorar o desempenho de um biossensor para determinação de nitrato com o objetivo de aumentar a vida útil do biossensor, tendo em conta que a atividade da enzima imobilizada decresce com o passar do tempo e utilizações. O modelo SVM treinado com função de *kernel* polinomial resultou numa precisão promissora na previsão de nitrato, com um coeficiente de correlação de 0,93 a partir de resultados de CV. O elétrodo preparado foi utilizável até pelo menos 10 dias após a imobilização enzimática para análise em mais de 400 amostras sem necessidade de realizar qualquer intervenção no elétrodo.

Noutro estudo, Vakilian e Massah [91] processaram dados de CV e de absorção com recurso a SVM, o que permitia prolongar a longevidade de um biossensor baseado em nitrato redutase até 10 dias, analisando mais de 200 amostras.

Embora DL proporcione novas hipóteses no sensoriamento químico [92], como a melhoria do limite de deteção, vários estudos aplicaram esta ferramenta em biossensores [23], [93], [94], [95], [96].

#### **2.6.4.3 Capacidade de classificação**

Quando biossensores levam à geração de resultados quimicamente diversificados, ou seja, impressões digitais, o uso de ML torna-se uma estratégia eficaz para garantir tarefas precisas de deteção e/ou classificação [97], [98].

Ali *et al.* [97] relataram um sensor de impedância descartável totalmente impresso para deteção e classificação rápida de três espécies de bactérias. Embora os dados de impedância para quarenta amostras de cada espécie fossem semelhantes, impressões digitais exclusivas relacionadas à amostra, consistindo em características de entrada distintas, como potência, curva de potencial de corrente e a primeira e segunda derivadas dessas curvas, foram extraídas dos dados e utilizadas como recursos em métodos de reconhecimento de padrões, como análise de discriminação linear, estimativa de máxima verossimilhança linear e rede neuronal de retropropagação não linear. Estas abordagens não supervisionadas proporcionaram a classificação das amostras por meio de testes aleatórios de validação cruzada com 100 % de precisão.

Zhang *et al.* [83] mostraram que a consistência das previsões de um modelo de classificação de aprendizagem profunda com o conhecimento do domínio de biossensores foi alcançada pela supervisão da função de custo e permitiu um sensor rápido e preciso através da resposta dinâmica do biossensor. Ao considerar a concentração do analito alvo como uma variável categórica com base na estrutura de dados de calibração, foi possível obter a classificação precisa da resposta dinâmica do biossensor e, conseqüentemente, a quantificação da concentração do analito alvo e resultados FN e FP, com recurso a ANN.

Noutro trabalho, Deshpande *et al.* [27] aplicaram 4 classificadores ML diferentes sobre respostas impedimétricas e amperométricas de biossensores eletroquímicos para diferentes concentrações de cloreto de potássio e glucose. Após comparem os resultados de exatidão, precisão, recall e tempo de treino, concluíram que as ANNs eram o classificador de melhor exatidão e precisão tanto para os conjuntos de dados impedimétricos como amperométricos, comparativamente a modelos SVM, kNN e DT.

#### 2.6.4.4 Quantificação Precisa e Capacidade de Previsão

Além do seu emprego para melhorar a capacidade de classificação, os métodos de ML são usados para aumentar a precisão de quantificação [99], [100].

Gonzalez-Navarro *et al.* [23] compararam quatro tipos de modelos de regressão ML para aumentar a estabilidade e precisão de um biossensor amperométrico de GOx na circunstância incerta. Foram utilizados SVM baseado em função de base radial, SVM linear baseado em *kernel*, ANN baseada no método de retropropagação Levenberg-Marquardt e o PLS. Foi analisada a resposta amperométrica de um biossensor de GOx com variáveis dependentes em diferentes condições de pH, temperatura, concentração de benzoquinona (mediador) e glucose, que estão fortemente relacionadas à sensibilidade da resposta do biossensor. Os modelos SVM baseado em função de base radial e ANN provaram-se excelentes modelos de ML para melhorar o desempenho do biossensor amperométrico, apresentando coeficientes de correlação de 0,999 e 0,980, respetivamente [23].

Gonzalez *et. al* [101], em um outro estudo, analisou a resposta amperométrica de um biossensor baseado em GOx de 2ª geração sobre diferentes conjuntos de condições como temperatura, pH, concentração de mediador e substrato através de métodos estatísticos a partir de uma perspectiva de regressão. Para tal, foram usadas ANN, regressão LASSO e RIDGE e classificação e regressão (CART). Daqui, concluíram que o modelo ANN e CART são formas simples de prever a resposta amperométrica de biossensores de GOx.

Zhu *et al.* [102] demonstraram um biossensor EIS baseado em ML para deteção de E. coli com maior precisão. Um modelo SVM foi treinado para estabelecer automaticamente uma relação quantitativa entre múltiplos parâmetros impedimétricos e concentrações bacterianas. Os resultados mostraram uma maior precisão na determinação da concentração bacteriana.

Seker e Becerik [25] aprisionaram GOx numa matriz de polipirrol com p-benzoquinona para determinar glucose e aplicaram ANNs para analisar a parte do gráfico de calibração não linear. A ANN era composta por uma camada de entrada, uma de saída e uma oculta formada por 3 nós e a sua habilidade de previsão está associada a um  $R^2$  de 0,99.

Aiassa *et al.* [103] desenvolveram um novo método para deteção eletroquímica de propofol com compensação do efeito de incrustação (*fouling*) através do modelo ML. Ao usar um classificador de vetores de suporte de função e base radial, foi possível melhorar a precisão do biossensor de 33 % para 100 % em amostras de soro humano.

Por exemplo, Rivera *et al.* [100] usaram algoritmos supervisionados de RF e ANN para investigar quantitativamente a relação entre a concentração de um determinado luminífero e sinais eletroquímicos resultante. Os modelos de regressão RF e ANN provaram ser capazes de inferir diretamente a concentração do analito a partir diversas respostas eletroquímicas. Alta correlação (0,99 e 0,96 para RF e ANN, respetivamente) entre valores reais e previstos foi alcançada na faixa de deteção entre 0,02  $\mu\text{M}$  e 2,5  $\mu\text{M}$ .

## 3 Metodologia

Neste capítulo estão apresentados e explicados todos os procedimentos, equipamentos e reagentes utilizados durante a construção e calibração de dois biossensores de glucose de primeira geração, um preparado pelo método de adsorção e outro pelo método de encapsulamento.

Os dados obtidos durante este processo foram processados e aplicados em diferentes algoritmos de regressão não linear de modo a prever concentrações de glucose em solução e ainda parâmetros de uma reta de calibração para um biossensor. Os métodos referentes a tratamento de dados, construção de modelos de ML e avaliação de desempenho também podem ser encontrados nesta secção.

### 3.1 Material e Equipamento

Os processos de CV e CA foram realizados com recurso a um potencióstato *Metrohm Autolab* (Figura 14).



Figura 14 – Potencióstato/Galvanostato *Autolab* PGSTAT302N.

Os elétrodos Pt-SPEs foram comprados à Metrohm/DROPSSENS e são constituídos por um eletrodo de trabalho e um contra eletrodo de platina, e um eletrodo de referência de prata (Figura 15).



**Figura 15** – Elétrodo descartável de platina, constituído por um elétrodo de trabalho, um contra elétrodo e um elétrodo de referência.

Para estabelecer uma interface entre os elétrodos e o potencióstato, foi usada uma caixa de comutação *DropSens* (DRP-DSC, Figura 16).



**Figura 16** – Caixa de comutação.

Na preparação das diversas soluções necessárias ao longo do estudo, recorreu-se a micropipetas *Gilson* de volume ajustável (0,2-2,0  $\mu\text{L}$ ; 2-20  $\mu\text{L}$ , 20-200  $\mu\text{L}$ , 100-1000  $\mu\text{L}$  e de 1000-5000  $\mu\text{L}$ ) para medições de volumes até 5 mL. Para volumes superiores, preparou-se soluções em balões volumétricos entre 5 e 20 mL.

Para pesagem de reagentes, utilizou-se uma balança *Mettler Toledo* com incerteza de medição de  $\pm 0,01$  mg.

Em determinadas situações, onde a dissolução do reagente era mais baixa, foi utilizado um agitador de líquidos de baixa tensão superficial da marca *Fisherbrand*.

Para secar as camadas aplicadas nos elétrodos, usou-se uma estufa *P Selecta* a 37 °C.

## 3.2 Reagentes

Os reagentes utilizados ao longo do estudo estão descritos na **Tabela 4**.

**Tabela 4** – Lista de reagentes utilizados e as suas respectivas origens.

Reagente	Origem
Soro humano comercial	Cormay Diagnostics
D-(+)-Glucose (dextrose monohidratada)	Alfa Aesar
Glucose Oxidase HPS300 de <i>Aspergillus niger</i>	Sekisui Diagnostics
Tampão PBS (do inglês, <i>Phosphate buffered saline</i> )	VWR
Creatinina	Fluka
Ácido Úrico, >= 99 % cristalino	Sigma Aldrich
L-Ácido Ascórbico	Riedel-De-Haën
Cloridrato de Dopamina, 99%	Thermo Scientifics
Ureia	Fragon

### 3.3 Soluções

Ao longo deste trabalho, preparou-se várias soluções.

#### 3.3.1 Síntese do Biografeno

O BGr foi obtido por esfoliação de grafite na presença da proteína albumina sérica bovina (BSA, do inglês, *bovine serum albumin*) de acordo com a referência [104], que facilita a dispersão do material em água à temperatura ambiente, utilizando um liquidificador. O processo começou com uma suspensão de cristais de grafite ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) em 200 mL de água desionizada a pH 7,0, contendo BSA ( $3,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Para realizar o cisalhamento, a suspensão foi processada no liquidificador durante 30 minutos, com amostras sendo recolhidas a cada 5 minutos para análise da taxa de esfoliação. A extinção a 600 nm da suspensão foi medida por espectroscopia UV-visível, sendo utilizada para quantificar a concentração de grafeno após a remoção da grafite não esfoliada, separada por centrifugação a 1500 rpm durante 45 minutos. Todas as experiências de esfoliação foram conduzidas adicionando-se quantidades precisas de grafite, BSA e água desionizada, ajustando a velocidade da lâmina conforme necessário.

#### 3.3.2 Soluções de enzima GOx

A solução de tampão PBS a 10 mM foi preparada dissolvendo uma pastilha de PBS concentrado em 100 mL de água ultrapura proveniente do sistema Milli-Q. Para além da solução de BGr, foram preparadas soluções de enzima GOx (aproximadamente  $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) em tampão PBS e soluções mistas de enzima GOx ( $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e dopamina (5 mM), para aplicação subsequente nos elétrodos.

### 3.3.3 Reta de calibração

Para gerar as retas de calibração para cada biossensor, prepararam-se padrões de glucose tanto em tampão PBS quanto em SC, que foi filtrado e diluído 50 vezes em tampão PBS. O soro humano comercial foi previamente tratado com filtros Amicon (50 kDa). Após a filtração, o que ficou retido foi descartado, e o filtrado foi ajustado com tampão PBS para obter a diluição de 50 vezes.

Preparou-se uma solução-mãe de glucose a 50 mM, tanto em soro quanto em tampão PBS. A partir desta solução-mãe, foram preparadas, por diluição, soluções de glucose nas seguintes concentrações: 0,05 mM; 0,5 mM; 0,75 mM; 1 mM; 2,5 mM; 5 mM; 10 mM; 20 mM; 30 mM; e 40 mM.

### 3.3.4 Estudo da seletividade

Para o estudo da seletividade, prepararam-se soluções de potenciais interferentes presentes no soro humano, incluindo ácido úrico (AU), ácido ascórbico (AA), ureia e creatinina (Creat). A solução de referência utilizada era uma solução de glucose a 5 mM em tampão PBS, para simular condições fisiológicas. As concentrações dos interferentes foram ajustadas para refletir os valores fisiológicos típicos encontrados no soro humano (**Tabela 5**).

**Tabela 5** – Concentrações dos interferentes próximas dos valores fisiológicos em soro humano.

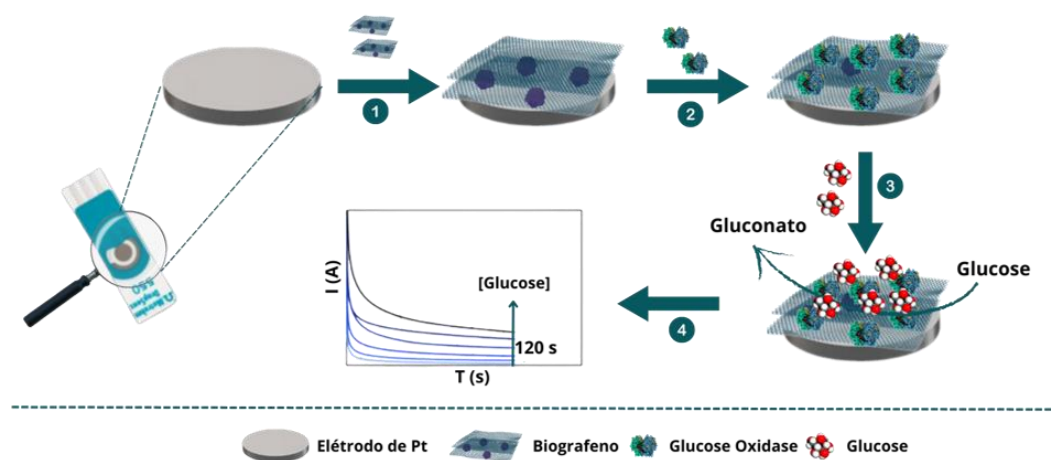
Interferente	Concentração Fisiológica (mg mL <sup>-1</sup> )	Massa Molar (g mol <sup>-1</sup> )
AU	0,070	168,11
Creat	0,013	113,12
AA	0,015	176,13
Ureia	0,400	60,10

## 3.4 Preparação dos biossensores

Foram testadas diferentes metodologias para a preparação de biossensores, variando o número de camadas de BGr aplicadas no eletrodo de trabalho e os métodos de imobilização enzimática — encapsulamento e adsorção. De forma geral, todos os métodos envolveram a imobilização de BGr e, em seguida, a enzima GOx no eletrodo de trabalho. No método de adsorção, a enzima GOx é diretamente imobilizada na superfície do eletrodo de trabalho do Pt-SPE previamente modificado com BGr. No método de encapsulamento, a enzima GOx é imobilizada em uma solução contendo dopamina (Dop), seguida pela eletropolimerização da Dop através da técnica de CV, resultando na formação de polidopamina.

### 3.4.1 Adsorção

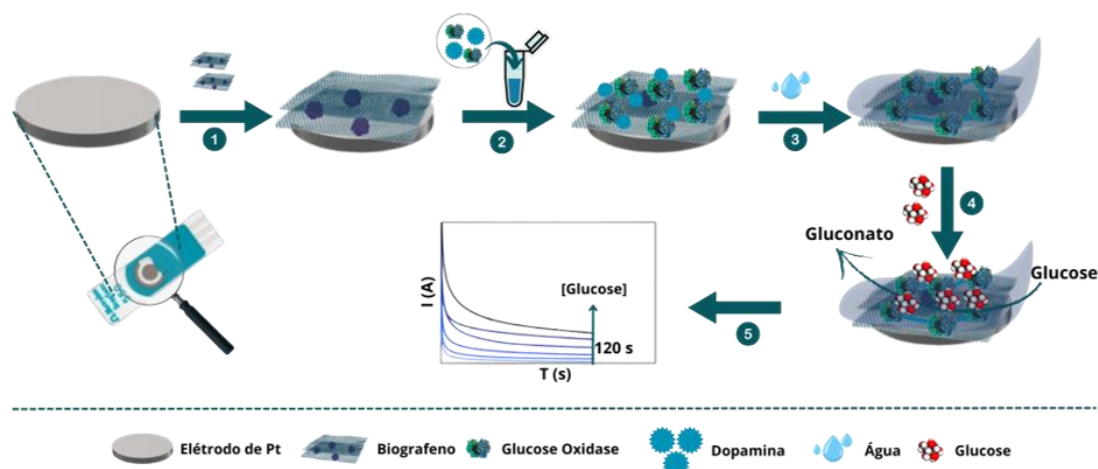
No método de adsorção (**Figura 17**), foram testadas duas combinações de camadas de nanomaterial e enzima aplicadas, com cada camada correspondendo a 5  $\mu\text{L}$ . Inicialmente, aplicaram-se duas camadas de BGr no elétrodo de trabalho, seguidas pela aplicação de duas camadas de uma solução pura de enzima GOx ( $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) em tampão PBS. Após a aplicação de cada camada, o biossensor foi colocado em estufa a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por 2 horas. Em seguida, os biossensores foram armazenados no frigorífico a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  durante a noite antes da calibração. Também foi testada a aplicação de uma única camada de enzima GOx sobre uma camada de BGr.



**Figura 17** – Ilustração esquemática da construção de um biossensor para a detecção de glucose. **1** – Fixação do biogrfeno; **2** – Imobilização da enzima GOx por adsorção química; **3** – Detecção de glucose; **4** – Medição do sinal.

### 3.4.2 Encapsulamento

Assim como no método anterior, foram testadas a aplicação de uma e duas camadas do nanomaterial e da enzima GOx. Neste caso (**Figura 18**), em alternativa à imobilização direta da enzima GOx, foi utilizada uma solução contendo enzima GOx ( $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e Dop ( $5 \text{ mM}$ ) em tampão PBS. Após a aplicação dessa solução, o biossensor foi mantido em ambiente húmido numa estufa a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 2 horas. Após a imobilização, os biossensores foram armazenados em condições de refrigeração durante a noite.



**Figura 18** – Ilustração esquemática da construção de um biossensor para a detecção de glucose. **1** – Fixação do biogrfeno; **2** – Adsorção da mistura da enzima GOx com a dopamina; **3** – Eletropolimerização da dopamina; **4** – Detecção de glucose; **5** – Desempenho analítico do biossensor.

Para concluir a encapsulação da GOx numa matriz polimérica de polidopamina, realizou-se a eletropolimerização da Dop utilizando a técnica de CV. Para esse processo, foram adicionados 100 µL de H<sub>2</sub>O, cobrindo completamente os 3 eléctrodos. Os parâmetros electroquímicos utilizados encontram-se descritos na **Tabela 6**.

**Tabela 6** – Parâmetros utilizados no procedimento de eletropolimerização.

Parâmetro	Valor
<i>Start Potential (V<sub>REF</sub>)</i>	-0,3
<i>Upper Vertex Potential</i>	1,5
<i>Lower Vertex Potential (V<sub>REF</sub>)</i>	-0,3
<i>Stop Potential (V<sub>REF</sub>)</i>	-0,29
<i>Number of Scans</i>	2
<i>Scan Rate (V s<sup>-1</sup>)</i>	0,05
<i>Step (V)</i>	0,001244

### 3.4.3 Caracterização Electroquímica dos Biossensores

Para a caracterização electroquímica dos biossensores, recorreu-se às técnicas de CV e CA.

#### 3.4.3.1 Pico de oxidação da glucose pela GOx

De forma a descobrirmos a que potencial ocorre o pico de oxidação da reacção catalisada pela GOx, ou seja, qual o melhor potencial que promove a reacção, aplicou-se a técnica de CV com os seguintes parâmetros (**Tabela 7**).

**Tabela 7** – Parâmetros utilizados no procedimento de leitura dos eletrodos, após as modificações dos mesmos.

Parâmetro	Valor
Start Potential ( $V_{REF}$ )	-0,1
Upper Vertex Potential	0,8
Lower Vertex Potential ( $V_{REF}$ )	-0,1
Stop Potential ( $V_{REF}$ )	-0,09
Number of Scans	3
Scan Rate ( $V s^{-1}$ )	0,01
Step (V)	0,001244

Estudou-se a resposta dos eletrodos sem sofrerem alterações, após imobilização de BGr e após imobilização de BGr e GOx ou GOx/Dop, quando aplicados 70  $\mu$ L de tampão PBS e de solução de Glu 5 mM em tampão PBS.

#### 3.4.3.2 Reta de Calibração

A reta de calibração do biossensor eletroquímico enzimático foi obtida por CA a 0,4 V, utilizando soluções padrão de glucose com concentrações variando de 0,05 mM a 50 mM. O processo envolveu a incubação do biossensor com aproximadamente 70  $\mu$ L da solução de menor concentração sobre os eletrodos, seguida da realização das leituras de corrente por CA. Após cada medição, a superfície dos eletrodos foi limpa antes de repetir o procedimento com soluções de concentrações progressivamente maiores. A corrente gerada foi registrada durante 120 segundos, com intervalos de 0,1 segundos entre cada medição. Além disso, o comportamento do biossensor foi avaliado em soluções de glucose diluídas em tampão PBS a pH fisiológico e em soro Cormay filtrado e diluído 50 vezes, conforme descrito na **Tabela 8**.

**Tabela 8** – Diluições dos padrões preparados a partir da solução-mãe e tampão PBS, com as respectivas concentrações finais.

Padrão (em tampão PBS ou SC 50 vezes diluído)	Concentração de Glucose (mM)
Branco	0,00
1	0,05
2	0,50
4	0,75
5	1,00
6	2,50
7	5,00
8	10,00
9	20,00
10	30,00
11	40,00
12 (Solução-Mãe)	50,00

### 3.4.3.3 Traçado da Reta de Calibração

Após executada a técnica de CA, retirou-se o valor de corrente correspondente aos 60 segundos e 120 segundos para cada padrão.

Ao aplicar o logaritmo sobre os valores de concentração, é possível obter um gráfico linear que representa a corrente em função do logaritmo das concentrações. É preciso ter em atenção que o comportamento de linearidade nem sempre se verifica para os intervalos de concentração estudados, então é necessário selecionar só o intervalo onde esta linearidade se verifica, definido pelo limite de deteção inferior (LI) e limite de deteção superior (LS). Assim, foi obtida uma reta de calibração para os valores de corrente referentes aos 60 segundos e outra para os dados que correspondem aos 120 segundos para cada biossensor preparado. O declive destas retas permite tirar conclusões também sobre a sensibilidade e qualidade de resposta de cada biossensor.

### 3.4.3.4 Cálculo do limite de deteção

A partir dos resultados da técnica CA, é ainda possível calcular o LD. A **Equação 2** [105] mostra como obter esse valor:

$$LD = \frac{\text{Desvio padrão (Sinal Branco)} \times 3}{\text{declive da curva de calibração}} \quad (2)$$

### 3.4.4 Estudo de seletividade

Para determinar a seletividade dos biossensores desenvolvidos, estudou-se a resposta amperométrica do mesmo para uma solução de glucose 5 mM na presença e ausência de interferentes, pelo método competitivo. Para tal, preparou-se soluções de glucose 5mM contendo ácido ascórbico (0,015 mg mL<sup>-1</sup>), ácido úrico (0,070 mg mL<sup>-1</sup>), creatinina (0,013 mg mL<sup>-1</sup>) ou ureia (0,400 mg mL<sup>-1</sup>).

Realizou-se a técnica CA da mesma forma como já relatado, para cada uma das soluções. Assumindo que o sinal eletroquímico referente à solução de glucose 5 mM corresponde a 100 % do sinal, calculou-se a interferência a partir da **Equação 3**:

$$\text{interferência (\%)} = \left| \frac{\text{sinal(Glu 5mM)} - \text{sinal(Glu 5mM+interferente)}}{\text{sinal(Glu 5mM)}} \right| \times 100 \quad (3)$$

Executou-se este estudo tanto para o biossensor preparado por adsorção como o preparado por encapsulamento, de uma camada de BGr e uma de GOx, usando os valores de corrente referentes a 60 e 120 segundos do sinal.

### 3.4.5 Caracterização morfológica dos elétrodos

Realizou-se ainda uma análise qualitativa da morfologia dos elétrodos. Para tal, recorreu-se à análise da superfície dos elétrodos ao longo da sua preparação por SEM e TEM.

#### 3.4.5.1 Análises SEM

O SEM fornece imagens ampliadas do tamanho, forma, composição, cristalografia e outras propriedades físicas e químicas de uma amostra. Analisa materiais ao emitir um feixe de eletrões gerado em ambiente de vácuo e diluído com lentes eletromagnéticas nas mesmas condições para criar uma imagem de alta resolução. As imagens que se encontram no microscópio são geradas a partir da contagem dos reflexos ou eletrões refletidos a partir da interação do feixe com o material. É composto por uma consola eletrónica e pela coluna de eletrões.

As análises por SEM foram realizadas com um microscópio eletrónico de varrimento de alta resolução, modelo JEOL JSM 6301 F, equipado com espectrómetro de energia dispersiva Oxford INCA Energy 350 e detector Gatan Alto 2500.

#### 3.4.5.2 Análises TEM

A TEM é uma tecnologia que possibilita a visualização de amostras em escala anatómica. Baseia-se na emissão de um conjunto de feixe de eletrões em direção a uma amostra ultrafina. As interações entre os eletrões transmitidos na amostra resultam numa imagem bidimensional numa chapa fotográfica ou numa imagem fluorescente. Quanto mais eletrões atravessarem um certo ponto da amostra, mais brilho terá esse ponto [102].

O BGr foi examinado utilizando um microscópio eletrónico de transmissão, modelo JEOL JEM 1400, com uma transmissão de 120 kV. Para isso, foram preparados 10  $\mu$ L de uma suspensão de BGr, que foram aplicados numa grelha de carbono. Em seguida, uma grade de cobre foi colocada em contacto com a superfície da gota de BGr. O excesso da amostra foi cuidadosamente removido com uma almofada absorvente, antes de proceder à análise no microscópio. A TEM permitiu realizar uma avaliação da morfologia do BGr, assim como da distribuição e do tamanho das suas nanopartículas.

## 3.5 Componente de estudos de ML

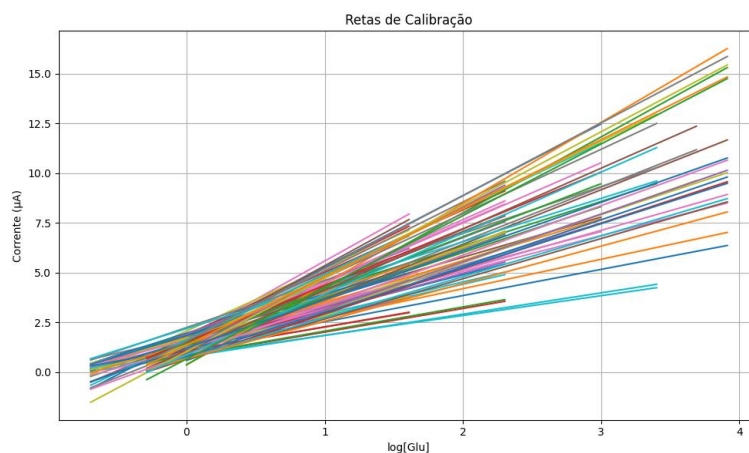
A reta de calibração de um biossensor é o que possibilita perceber a quantidade de analito presente numa amostra, neste caso, através do valor da corrente. No entanto, como se provou ao longo deste trabalho, é necessário muito esforço, cuidado e precisão para reproduzir biossensores com desempenhos semelhantes. Além disso, o próprio processo de calibração, para além de poder ser trabalhoso e demorado, pode influenciar o desempenho do biossensor, uma vez que cada leitura e limpeza pode alterar a superfície do biossensor.

Neste sentido, decidiu-se aplicar algoritmos de ML a dados retirados durante o processo de construção e calibração de biossensores de forma a entender se podem ser uma alternativa mais rápida e precisa ao processo de calibração utilizado, enquanto também se evita a degradação da superfície do eletrodo.

Vários algoritmos de regressão não linear foram aplicados em duas abordagens diferentes. Numa, pretende-se prever a equação da reta de calibração de um biossensor, declive ( $m$ ) e ordenada na origem ( $b$ ), bem como o limite inferior (LI) e limite superior (LS) correspondentes de um determinado biossensor. A outra abordagem tem como objetivo prever a concentração de glucose numa dada amostra.

### 3.5.1 Datasets

Utilizaram-se dois *datasets* diferentes, um de forma a prever os valores da reta de calibração de biossensores e outro para prever concentrações de glucose. Todos os dados retirados são relativos a biossensores usados para ler soluções de glucose em SC filtrado e diluído 50 vezes e só se considerou resultados quando as retas de calibração obtidas apresentassem um coeficiente de correlação superior a 0,98. Da mesma forma só se considerou retas de calibração cujo declive estava dentro de uma dada gama, onde se encontram os valores mais comuns e frequentes ao longo do trabalho de forma a não atrapalhar o processo de treino dos algoritmos, como se pode ver na **Figura 19**.



**Figura 19** – Retas de calibração incluídas no *dataset*.

A **Tabela 9** e **10** indicam a constituição dos *datasets* e a descrição de tanto as variáveis de entrada como de saída.

Tabela 9 – Descrição do *dataset* utilizado para previsão de parâmetros da reta de calibração de um biossensor.

	Variável	Descrição
Variáveis de entrada	Nº de camadas de BGr	Nº de camadas de biografeno aplicadas na superfície do eletrodo de trabalho
	Nº de camadas de GOx	Nº de camadas de GOx (adsorção) ou GOx/Dop (encapsulamento) aplicadas na superfície do eletrodo de trabalho
	Tempo (s)	Tempo aos quais se registaram os valores de corrente na técnica CA.
	[Enzima] (mM)	Concentração de GOx da solução enzimática aplicada na superfície de eletrodo de trabalho
	[Dopamina] (mM)	Concentração de Dop da solução enzimática aplicada na superfície do eletrodo de trabalho
	[Glucose] (mM)	Concentração de Glu da solução-mãe usada para preparação dos padrões no processo de calibração
	Corrente LI ( $\mu$ A)	Valor de corrente relativo ao limite inferior de detecção
	Corrente LS ( $\mu$ A)	Valor de corrente relativo ao limite superior de detecção
Variáveis de Saída	Limite Inferior	Concentração de glucose mais baixa medida pelo biossensor
	Limite Superior	Concentração de glucose mais alta medida pelo biossensor
	m	Declive da reta de calibração do biossensor
	b	Ordenada na origem da reta de calibração do biossensor

Tabela 10 – Descrição do *dataset* utilizado para previsão de concentrações de glucose em amostra.

	Variável	Descrição
Variáveis de entrada	Nº de camadas de BGr	Nº de camadas de biografeno aplicadas na superfície do eletrodo de trabalho
	Nº de camadas de GOx	Nº de camadas de GOx (adsorção) ou GOx/Dop (encapsulamento) aplicadas na superfície do eletrodo de trabalho
	Tempo (s)	Tempo aos quais se registaram os valores de corrente na técnica CA.
	[Enzima] (mM)	Concentração de GOx da solução enzimática aplicada na superfície de eletrodo de trabalho
	[Dopamina] (mM)	Concentração de Dop da solução enzimática aplicada na superfície do eletrodo de trabalho
	Corrente ( $\mu$ A)	Valor de corrente correspondente retirado
Variável de saída	[Glucose] (mM)	Concentração de glucose na amostra medida

Enquanto o primeiro *dataset* é constituído por 83 amostras relativas a diferentes retas de calibração, o segundo tem 522 amostras, cada uma correspondendo a um ponto das ditas retas de calibração utilizadas no *dataset* anterior.

### 3.5.2 Algoritmos

Foram aplicados diversos algoritmos de ML aos *datasets* descritos para regressão não linear. Todos foram importados da biblioteca *scikit-learn*, que dispõe de ferramentas simples e eficientes para análise preditiva de dados, e encontram-se indicados nesta secção, bem como os hiperparâmetros estudados e respetivos valores (**Tabela 11**), à exceção dos que não se definiram, isto é, mantêm os valores *default* descritos na biblioteca.

**Tabela 11** – Algoritmos estudados e respetivos hiperparâmetros definidos

Algoritmo	Hiperparâmetros
GradientBoostingRegressor	Loss='squared_error'
	n_estimators=30
	random_state=1
KernelRidge	kernel='polynomial'
	degree=2
	gamma=0.1
	alpha=0.1
SupportVectorRegressor	kernel='sigmoid'
	C=25
	epsilon=0.01
	Max_iter=-1
KNeighborsRegressor	n_neighbors=3
RandomForestRegressor <sup>2</sup>	n_estimators=10
RandomForestRegressor <sup>1</sup>	random_state=42
	n_estimators=100
DecisionTreeRegressor <sup>2</sup>	criterion='poisson'
	max_depth=9
DecisionTreeRegressor <sup>1</sup>	random_state=42
	criterion='squared_error'
MLPRegressor	hidden_layer_sizes=(50,30,20)
	activation='relu'
	learning_rate='adaptive'
	max_iter=500

### 3.5.3 Previsão de retas de calibração e concentrações de glucose

Antes da aplicação dos algoritmos aos *datasets*, calculou-se a matriz de correlação absoluta das variáveis de entrada e foram removidas as variáveis cujas correlações eram superiores a um limiar de 0,7, ou seja, com elevada correlação. Isto é uma prática comum em análise de dados

usada para mitigar a multicolinearidade de forma a evitar redundância e facilitar a interpretação em modelos de regressão. Isto resulta na eliminação da coluna “Camadas de Enzima” em ambos os *datasets*.

De seguida, aplicou-se cada algoritmo de forma a prever cada uma das variáveis dependentes desejadas. Para cada uma, realizou-se um ciclo de 20 iterações com cada um dos diferentes algoritmos. No início de cada iteração, os *datasets* eram divididos de forma aleatória, 80 % para fase de treino os restantes 20 % para fase de teste e em cada uma dessas iterações testava-se as diferentes combinações de variáveis de entrada possíveis e registava-se o modelo cuja combinação de variáveis de entrada apresentasse melhor desempenho no final dessa iteração. Após as 20 iterações, registou-se não só o conjunto de variáveis com melhor desempenho, como também a combinação de variáveis de entrada mais frequente ao longo das 20 iterações e o respetivo desempenho para cada algoritmo. Realizou-se esta abordagem porque uma vez que o conjunto de dados é dividido aleatoriamente no início de cada iteração, é esperado que para cada iteração haja uma “melhor” combinação de variáveis de entrada diferente que descreva melhor os dados. No caso de surgirem combinações diferentes com a mesma frequência ao longo das 20 iterações, selecionou-se aquela com melhores médias de desempenho.

### 3.5.4 Avaliação do desempenho dos algoritmos

Para determinar o desempenho de um determinado modelo de regressão, é possível recorrer a diferentes métricas de avaliação, como o coeficiente de determinação, erro médio absoluto e erro médio quadrático (Equações 4, 5 e 6, respetivamente):

Coeficiente de determinação ( $R^2$ ) – mede a proporção de variação total dos dados que é explicada pelo modelo de regressão. Um valor próximo de 1 indica que o modelo explica bem os dados;

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (4)$$

Erro médio absoluto (MAE) – calcula a média das diferenças absolutas entre os valores reais ( $y_i$ ) e as previsões dos modelos ( $\hat{y}_i$ ), isto é, representa o erro médio em unidades da variável de saída;

$$MAE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |y_i - \hat{y}_i| \quad (5)$$

Erro médio quadrático (MSE) – calcula a média dos quadrados dos erros, penalizando grandes desvios entre os valores reais e previsões;

$$MSE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (6)$$

Realizou-se ainda *K-Fold Cross-Validation*, que divide o conjunto de dados, neste caso, em 3 partes aproximadamente iguais. Este processo de validação usa cada uma das partes como conjunto de teste e as restantes como conjunto de treino. No final de cada iteração retirou-se o coeficiente de determinação e calculou-se a média e o desvio-padrão para entender a variação do desempenho do modelo entre as diferentes partes. Esta técnica permite avaliar os modelos de forma mais confiável, reduzindo a variação que pode ocorrer devido à divisão aleatória dos dados em fase de treino e teste.

## 4 Resultados e Discussão

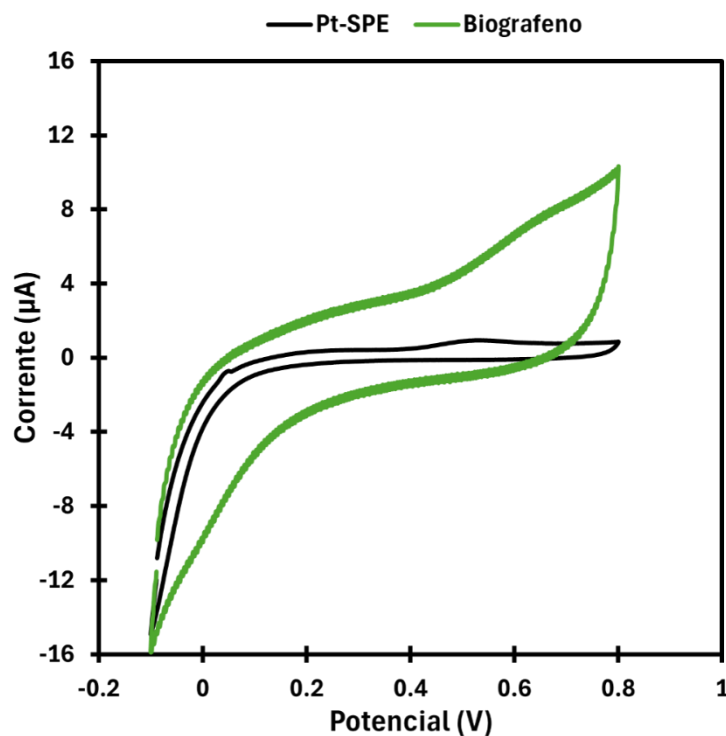
Nesta secção, são apresentados os resultados e a discussão relacionados com a caracterização eletroquímica e morfológica dos diferentes biossensores, bem como a avaliação do seu desempenho através do traçado das retas de calibração em tampão PBS e soro Cormay, acompanhados de estudos de seletividade. Para prever parâmetros da reta de calibração e concentração de glucose foram também desenvolvidos algoritmos DT, RF, kNN, GBT, KR, MLP e SVR.

### 4.1 Caracterização eletroquímica dos biossensores

As técnicas eletroquímicas permitem-nos avaliar o desempenho dos biossensores.

#### 4.1.1 Modificação dos elétrodos com biografeno

Na **Figura 20** encontram-se representados voltamogramas onde foram registados os valores de corrente numa gama de potencial entre -0,1 e 0,8 V a uma velocidade de varrimento de 10 mV s<sup>-1</sup>. As medições foram efetuadas em tampão PBS a pH 7,4. Após imobilização do BGr na superfície do elétrodo Pt-SPE observa-se um aumento da densidade e intensidade de corrente. O aumento da densidade de corrente após a deposição de BGr deve-se à sua alta área de superfície, excelente condutividade elétrica. Estas propriedades melhoram a transferência de eletrões e a eficiência das reações eletroquímicas, resultando em maior densidade de corrente CV.



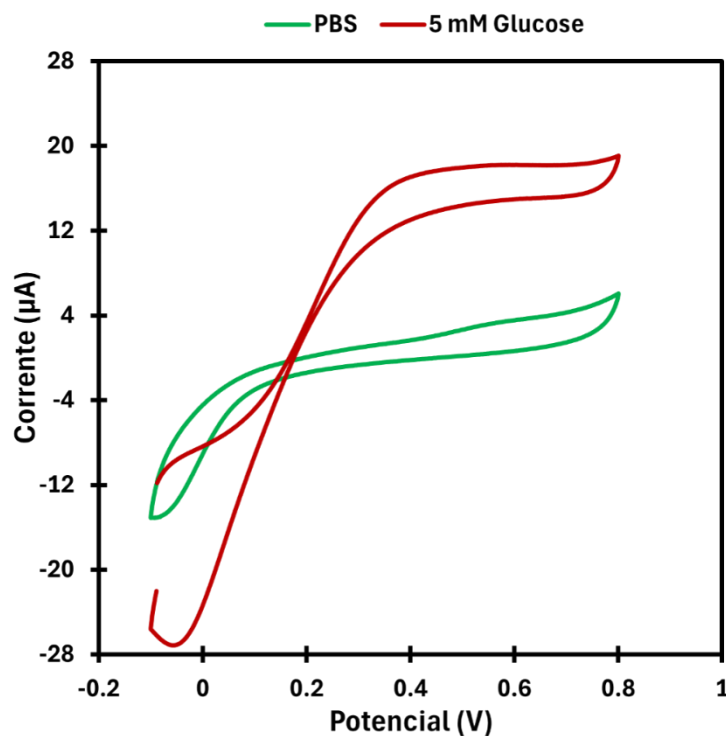
**Figura 20** – Representação gráfica das leituras de CVs em tampão PBS, comparando as medições antes e após a fixação do biografeno.

Estes resultados comprovam a eficiente imobilização do nanomaterial na superfície do eletrodo. O passo seguinte para a metodologia de adsorção da GOx consiste na aplicação de duas camadas de GOx na superfície do eletrodo previamente modificado com BGr.

#### 4.1.2 Imobilização da GOx por adsorção

Após a imobilização de duas camadas de enzima na superfície do eletrodo de trabalho modificado com BGr, foram efetuadas leituras em CV, nas mesmas condições anteriores com o objetivo de comparar os sinais eletroquímicos de uma solução de PBS (controlo) e de uma solução de glucose 5 mM. O objetivo foi entender o potencial onde a enzima oxida o substrato, a glucose. Foi utilizado um valor de concentração de glucose próximo do valor fisiológico.

Pode-se observar na **Figura 21** que, na presença de glucose, o sinal de corrente produzido atinge valores mais elevados. Nota-se também no mesmo sinal, que um pico é atingido a um potencial de aproximadamente 0,4 V. Este é o pico e potencial representativo da eletro-oxidação da glucose, que indica a que potencial a reação catalisada pela enzima GOx é promovida.

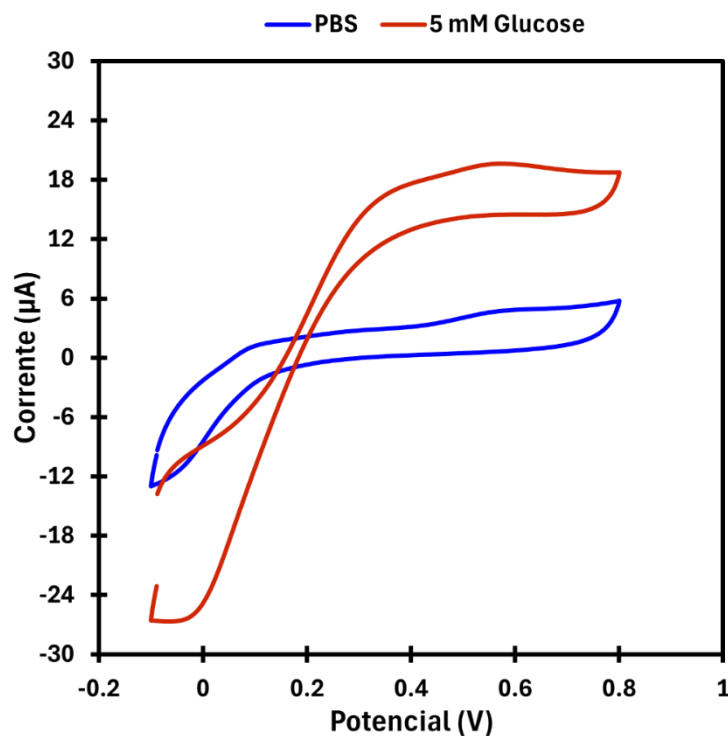


**Figura 21** – Voltamogramas obtidos em tampão PBS e em solução de glucose a 5 mM, após imobilização da GOx por adsorção.

#### 4.1.3 *Polidopamina* como matriz de imobilização da GOx

O mesmo procedimento foi repetido, mas desta vez para o biossensor desenvolvido pelo método de encapsulamento, também de duas camadas que, tal como se pode observar na **Figura 22**, mostrou resultados semelhantes.

Estes resultados provam não só que o biossensor responde à glucose, como permitiu estabelecer que o valor de potencial que melhor promove a reação enzimática é 0,4 V para ambos os métodos de preparação. Por este motivo, definiu-se este valor para ser utilizado na técnica de CA, de forma a obter respostas amperimétricas mais significativas.



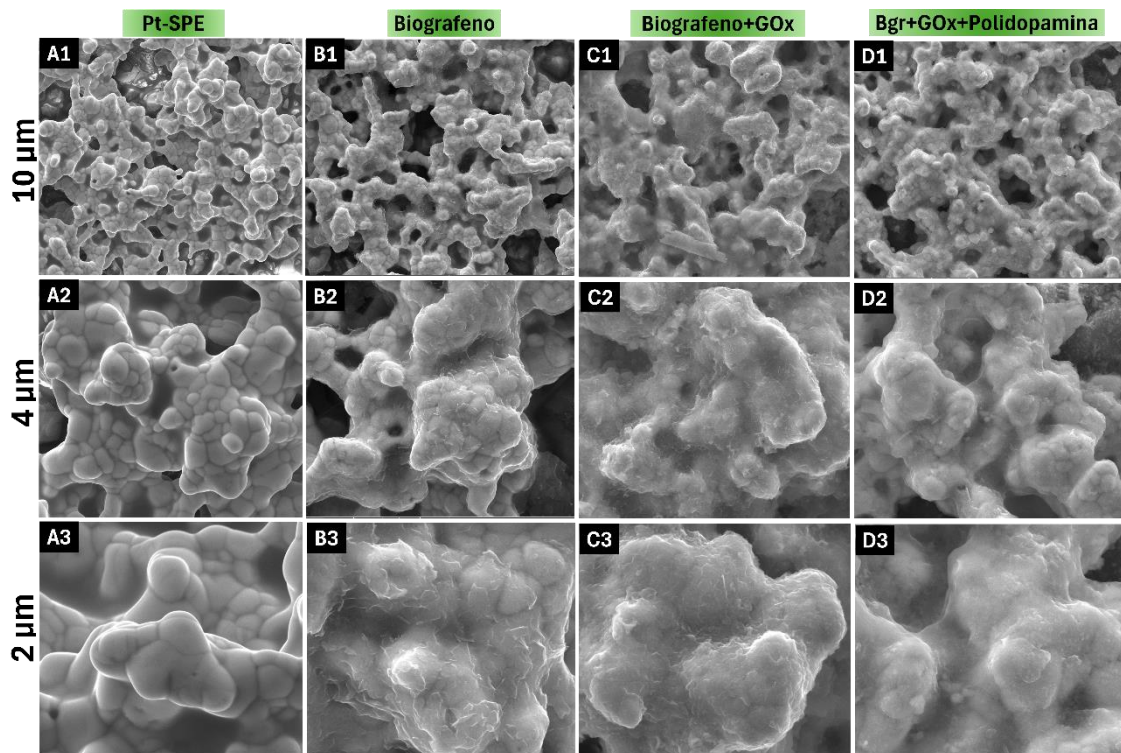
**Figura 22** – Voltamogramas obtidos em tampão PBS e em solução de glucose a 5 mM, após aplicação da polidopamina como matriz de imobilização da GOx.

## 4.2 Caracterização morfológica dos elétrodos

A superfície do elétrodo foi caracterizada por microscopia SEM para o elétrodo Pt-SPE, Pt-SPE modificado com BGr, com GOx e para a metodologia de encapsulamento da GOx com polidopamina. O BGr foi caracterizado adicionalmente pela técnica de TEM.

### 4.2.1 Análises SEM

A **Figura 23** mostra os resultados da análise SEM, que nos permitem verificar diferenças na morfologia da superfície dos elétrodos durante as várias fases de construção do biossensor.

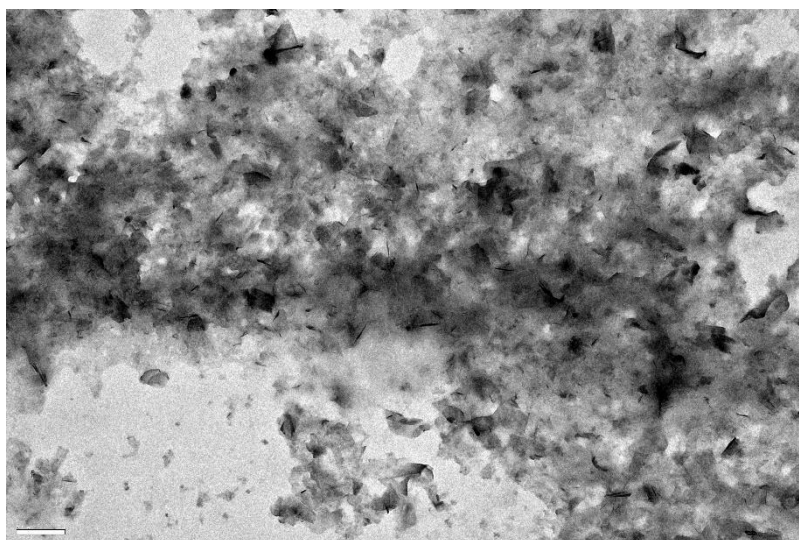


**Figura 23** – Análise SEM com diferentes ampliações: 1-10,000x=10 μm; 2-25,000x=4 μm; 3-50,000x=2 μm. Eléctrodo de platina sem modificações (**A1 -A3**); Fixação do biografeno (**B1-B3**); Imobilização da GOx por adsorção (**C1-C3**); Polidopamina como matriz de imobilização da GOx (**D1-D3**).

A **Figura 23B** confirma a presença da camada de BGr na superfície do Pt-SPE, onde é possível observar folhas de grafeno depositadas e aglomeradas. No entanto, a imobilização da enzima GOx não pode ser confirmada diretamente devido à sua pequena dimensão, que se encontra na escala de poucos nanómetros. A **Figura 23D** ilustra a metodologia de encapsulamento da enzima com polidopamina, onde pode-se visualizar a presença de um filme fino, especialmente quando comparado com a imagem do Pt-SPE não modificado (**Figura 23A**) e o eléctrodo modificado apenas com BGr (**Figura 23B**). Estes resultados corroboram a presença tanto do nanomaterial quanto do polímero na superfície do eléctrodo de trabalho.

#### 4.2.2 Análises TEM

A **Figura 24** apresenta a análise de microscopia TEM do nanomaterial BGr. A análise TEM permitiu observar em grande detalhe as folhas de grafeno que compõem o BGr. As diferentes orientações das folhas de grafeno, bem como a presença de áreas porosas (visíveis como zonas brancas), indicam que o material é policristalino.



**Figura 24** – Resultado da análise por TEM do BGr, com imagem obtida a uma ampliação de 200,000x.

### 4.3 Desempenho eletroquímico do biossensor

Avaliou-se o desempenho dos biossensores produzidos através de diferentes estudos. Inicialmente, realizou-se calibrações em tampão PBS para os métodos de adsorção e encapsulamento, tendo em conta os valores de corrente retirados aos 60 e 120 segundos. Os biossensores estudados em tampão PBS tinham todos duas camadas de BGr e duas camadas de enzima GOx. Também foram realizadas calibrações em soro Cormay filtrado e diluído 50 vezes, para ambos os métodos descritos, da mesma forma que no estudo em tampão PBS, mas neste caso também se analisou biossensores com só uma camada de BGr e uma camada de enzima. Por último, testou-se a seletividade dos biossensores produzidos (de uma camada de BGr uma camada de enzima) pelo método competitivo.

#### 4.3.1 *Calibração em tampão PBS*

Foram elaboradas retas de calibração em tampão PBS para um biossensor só com duas camadas de BGr (controlo) e para cada um dos métodos de imobilização, considerando os valores de corrente relativos a 60 e 120 segundos da técnica CA, que explicam a relação entre a corrente medida e o logaritmo da concentração de glucose. A concentração de glucose das soluções utilizadas para calibração são: 0 mM; 0,05 mM; 0,5 mM; 0,75 mM; 1 mM; 2,5 mM; 5 mM; 10 mM; 20 mM; 30 mM; 40 mM e 50 mM.

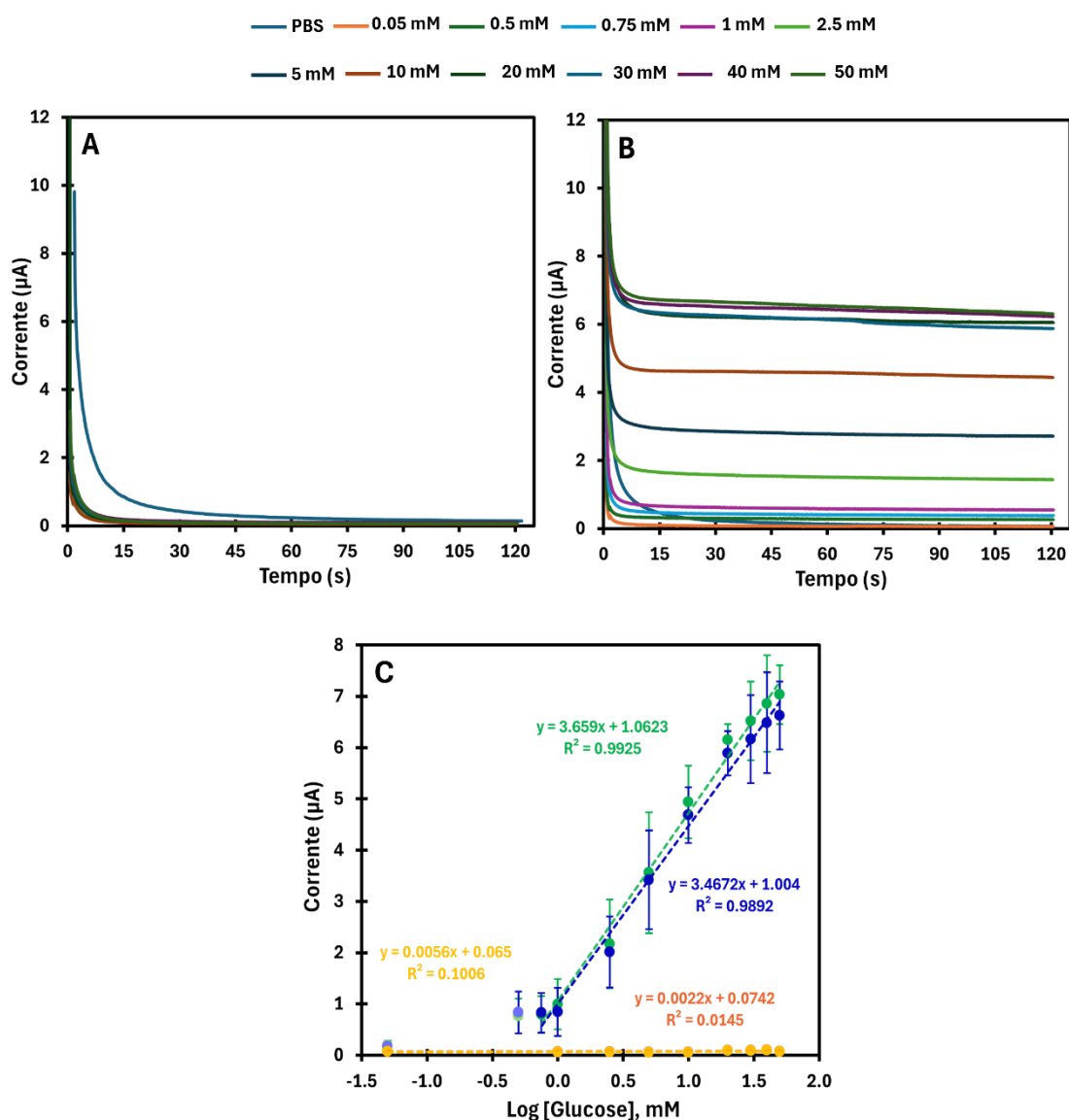
##### 4.3.1.1 *Imobilização da GOx por adsorção*

Ao observar a **Figura 25A**, percebe-se que no biossensor modificado com duas camadas de BGr (sem enzima), não se nota uma variação considerável nos valores de corrente produzidos por

soluções de diferentes concentrações de glucose. No entanto, quando se imobiliza duas camadas de enzima pelo método de adsorção (**Figura 25B**), não só se atinge valores de corrente mais elevados, como também há uma maior discrepância de valores relativos a diferentes concentrações, ou seja, o valor de corrente tende a aumentar com o valor de concentração de glucose proporcionalmente para uma gama de concentração entre 0,75 e 50 mM.

As retas de calibração obtidas para este método e respetivas barras de erro dos triplicados, para 60 e 120 segundos, estão apresentadas na **Figura 25C**. Da mesma forma, encontra-se a reta de calibração obtida para o controlo. Nota-se um aumento significativo do declive e da correlação nos resultados referentes à presença da enzima, quando comparados ao controlo. As retas de calibração obtidas permitem descrever os valores de correntes obtidos aos 60 e 120 segundos para uma gama linear de deteção de glucose entre 0,75 mM e 50 mM com uma correlação superior a 0,9800.

Comparativamente, os resultados relativos aos 60 segundos (declive= $3,6590 \mu\text{A}/\log([\text{Glu}])$ ;  $R^2=0,9925$ ), apresentam um declive e correlação superior aos de 120 segundos (declive= $3,4672 \mu\text{A}/\log([\text{Glu}])$ ;  $R^2=0,9892$ ), o que indica que os valores para 60 segundos permitem obter um biossensor mais sensível para este método, em tampão PBS.



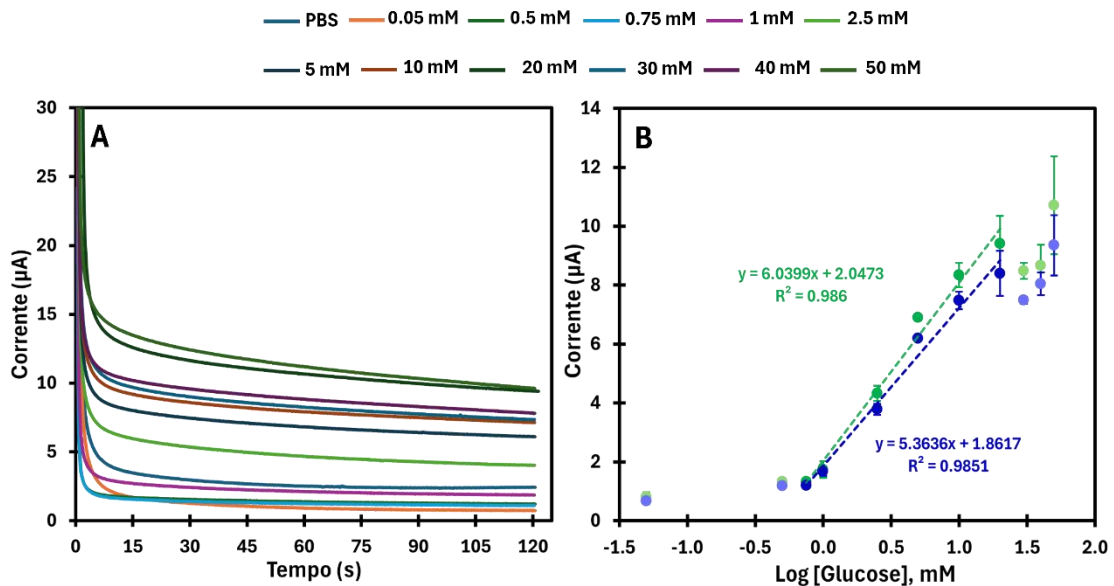
**Figura 25** – Cronoamperogramas e as respectivas retas de calibração obtidas em tampão PBS, após a imobilização da GOx por adsorção. **A)** e **B)** Representam o cronoamperograma sem e com a presença da GOx, em resposta à variação das concentrações de glucose (0,05 – 50 mM). **C)** Reta de calibração da resposta de corrente em função da concentração logarítmica de glucose com e sem enzima para o tempo 60 e 120 s.

#### 4.3.1.2 Polidopamina como matriz de encapsulamento da GOx

Realizou-se também calibrações para biossensores produzidos pelo método de encapsulamento (**Figura 26B**). Tal como no caso anterior, os resultados referentes aos 60 segundos (declive=6,0399 µA/log([Glu]);  $R^2=0,9860$ ) apresentam melhores valores para a mesma gama linear que os de 120 segundos (declive=5,3636 µA/log([Glu]);  $R^2=0,9851$ ).

Os declives obtidos foram sensivelmente 2 vezes superiores aos do método de adsorção. No entanto, embora os coeficientes de correlação obtidos para o método de encapsulamento

sejam superiores a 0,9800, eles são relativamente menores que os do método de adsorção e a gama linear de detecção de glucose foi encurtada para um intervalo entre 0,75 e 20 mM.



**Figura 26** – Cronoamperograma e as respectivas retas de calibração obtidas em tampão PBS, após a imobilização da GOx pelo método de encapsulamento. **A)** Representa o cronoamperograma com a presença da GOx, em resposta à variação das concentrações de glucose (0,05 – 50 mM). **B)** Retas de calibração da resposta de corrente em função da concentração logarítmica de glucose para o tempo 60 e 120 s.

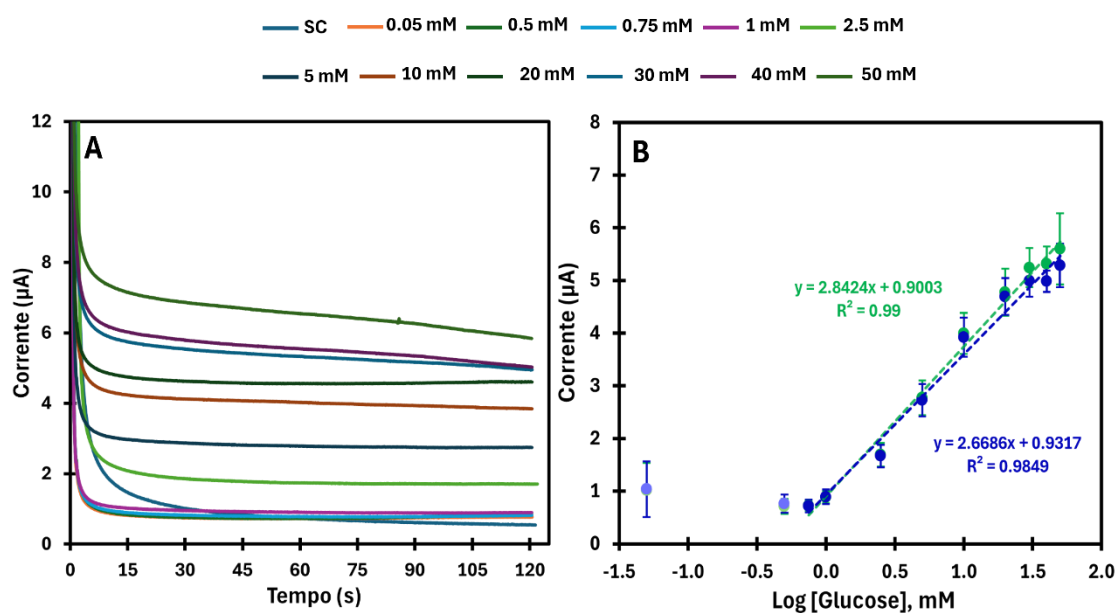
### 4.3.2 Calibração em soro Cormay

Adicionalmente, foram construídas retas de calibração com os dados obtidos no soro Cormay. Neste estudo, também foi investigado como o número de camadas influencia o desempenho do biossensor. Para isso, analisaram-se biossensores modificados com apenas uma camada de BGr e enzima GOx, além daqueles com duas camadas de cada, considerando ambos os métodos de preparação. A análise foi realizada para os valores de corrente correspondentes a 60 e 120 segundos.

#### 4.3.2.1 Imobilização da GOx por adsorção

Percebe-se que para o biossensor com uma camada de BGr e uma camada de enzima (**Figura 27**) preparado pelo método de adsorção apresenta menor declive e correlação que um biossensor produzido pelo mesmo método, mas com duas camadas de BGr e duas camadas de enzima (**Figura 28**), para ambos os tempos de 60 e 120 segundos.

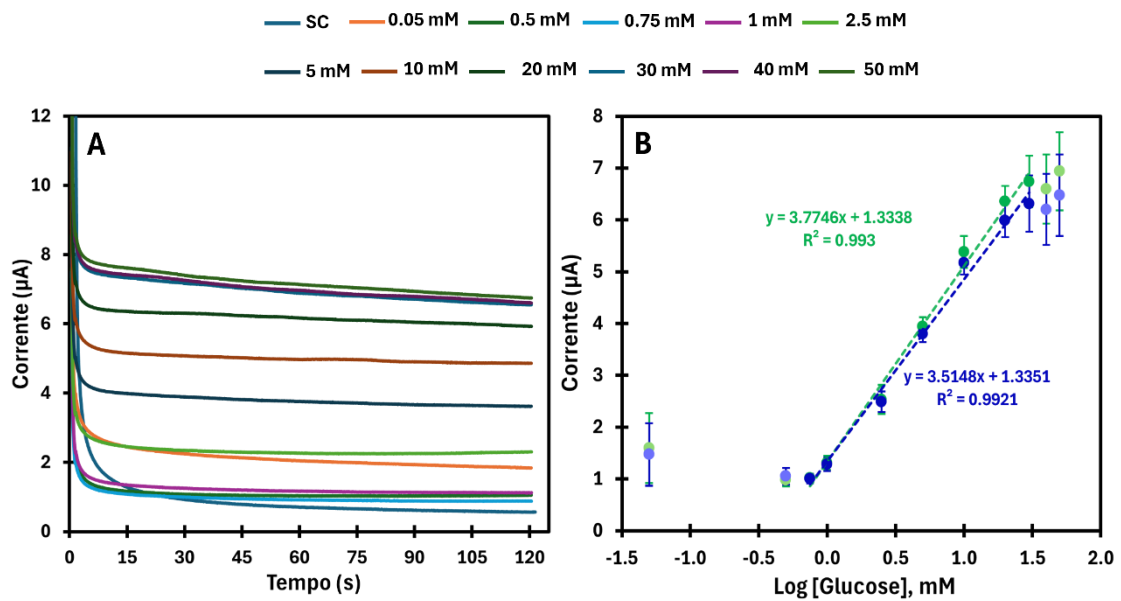
Relativamente à gama linear de detecção de glucose em SC, o biossensor com uma camada de BGr e uma camada de enzima preparado pelo método de adsorção (**Figura 27B**) apresenta uma gama entre 0,75 mM e 50 mM para 60 segundos e 120 segundos com correlações superiores a 0,9800 (0,9900 e 0,9849, respetivamente).



**Figura 27** – Cronoamperograma e as respetivas retas de calibração obtidas em SC, após a imobilização de uma camada da GOx por adsorção. **A)** Representa o cronoamperograma com a presença da GOx, em resposta à variação das concentrações de glucose (0,05 – 50 mM). **B)** Reta de calibração da resposta de corrente em função da concentração logarítmica de glucose para o tempo 60 e 120 s.

No caso dos biossensores onde foram aplicadas duas camadas de BGr e duas camadas de enzima (**Figura 28B**), a gama linear de deteção teve o seu limite superior encurtado para 30 mM, mas com correlações de 0,9930 e 0,9921 para 60 e 120 segundos, respetivamente. Os declives nos biossensores de combinações de duas camadas (3,7746  $\mu\text{A}/\log([\text{Glu}])$  para 60 segundos e 3,5148  $\mu\text{A}/\log([\text{Glu}])$  para 120 segundos) são superiores aos de combinações de uma camada, tanto para 60 como 120 segundos.

Percebe-se que para o biossensor com uma camada de BGr e uma camada de enzima preparado pelo método de adsorção apresenta menor declive e correlação que um biossensor produzido pelo mesmo método, mas com duas camadas de BGr e duas camadas de enzima, para ambos os tempos de 60 e 120 segundos. No entanto, os biossensores de combinações de duas camadas apresentam uma gama linear de deteção menor aos de uma camada. Nota-se também que os resultados para 60 segundos apresentam sempre melhor correlação e declive mais elevado que os de 120 segundos.



**Figura 28** – Cronoamperograma e as respectivas retas de calibração obtidas em SC, após a imobilização de duas camadas da GOx por adsorção. **A)** Representa o cronoamperograma com a presença da GOx, em resposta à variação das concentrações de glucose (0,05 – 50 mM). **B)** Reta de calibração da resposta de corrente em função da concentração logarítmica de glucose para o tempo 60 e 120 s.

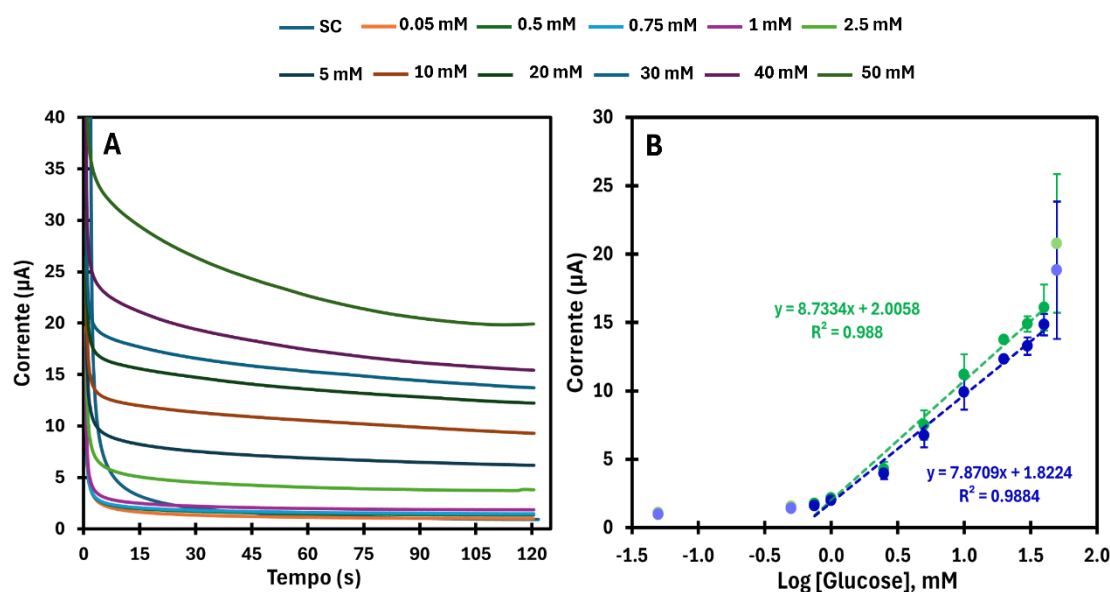
Ao comparar os resultados das calibrações dos biossensores de duas camadas preparados pelo método de adsorção em tampão PBS e SC, pode-se perceber que em SC estes biossensores apresentam maior sensibilidade (maior declive), maior correlação, mas um limite superior da gama linear de deteção menor (30 mM), tanto para 60 como 120 segundos.

#### 4.3.2.2 Polidopamina como matriz de imobilização da GOx

Repetiu-se o procedimento anterior, mas desta vez para biossensores preparados pelo método de encapsulamento, utilizando uma (**Figura 29**) e duas camadas (**Figura 30**) de enzima e BGr.

Para os resultados aos 60 segundos, os biossensores com duas camadas de BGr e enzima apresentaram declive superior ( $8,7943 \mu\text{A}/\log([\text{Glu}])$ ) aos de uma camada, que por sua vez apresentaram uma correlação superior (0,9880) para uma gama linear de deteção mais abrangente (0,75 mM e 40 mM) do que os de duas camadas (0,75 mM e 20 mM).

Por outro lado, para os 120 segundos, o biossensor com uma camada apresenta maior declive ( $7,8709 \mu\text{A}/\log([\text{Glu}])$ ), correlação (0,9884) e gama linear de deteção (0,75 mM e 40 mM) do que aquele com duas camadas, que tem uma gama linear entre 0,75 e 20 mM.



**Figura 29** – Cronoamperograma e as respetivas retas de calibração obtidas em soro Cormay, após a imobilização de uma camada da GOx pelo método de encapsulamento. **A)** Representa o cronoamperograma com a presença da GOx, em resposta à variação das concentrações de glucose (0,05 – 50 mM). **B)** Reta de calibração da resposta de corrente em função da concentração logarítmica de glucose para o tempo 60 e 120 s.

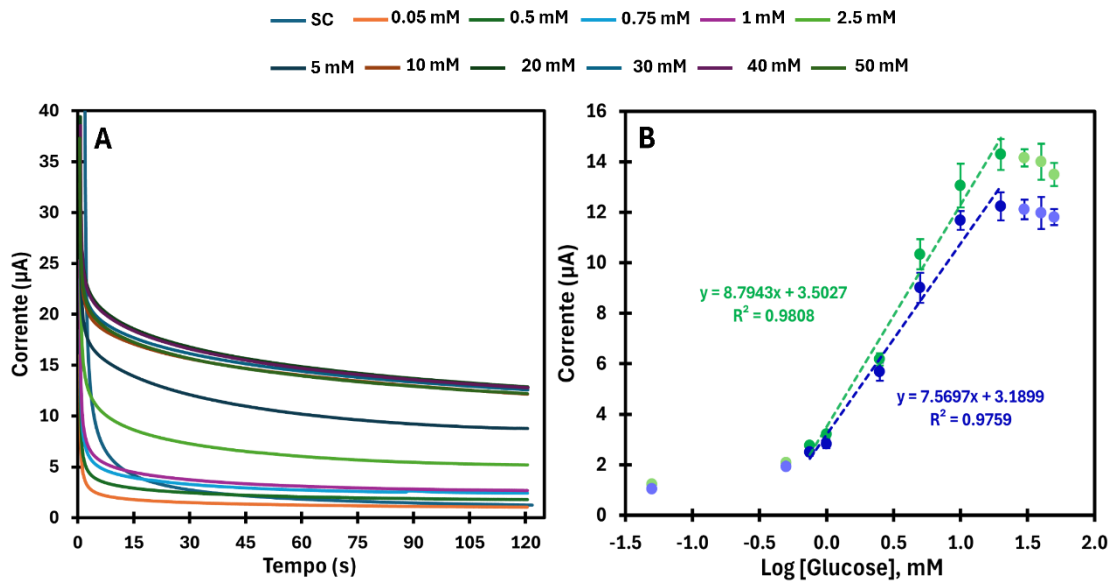
No caso do biossensor alterado com uma camada, o declive é superior para 60 segundos ( $8,7334 \mu\text{A}/\log([\text{Glu}]])$  mantendo uma correlação muito próxima e a mesma gama linear de deteção para 120 segundos.

Já para o biossensor modificado com duas camadas, os resultados para 60 segundos não só apresentam maior declive ( $8,7943 \mu\text{A}/\log([\text{Glu}]])$  como também maior correlação para a mesma gama linear de deteção que os de 120 segundos.

Comparando aos resultados obtidos na calibração tampão PBS (declive= $6,0399 \mu\text{A}/\log([\text{Glu}])$  e  $5,3636 \mu\text{A}/\log([\text{Glu}])$  para 60 e 120 segundos, respetivamente) para o biossensor de duas camadas preparado pelo método de encapsulamento, as calibrações indicam que a sensibilidade do biossensor aumenta em SC (declive= $8,7943 \mu\text{A}/\log([\text{Glu}])$  e  $7,5697 \mu\text{A}/\log([\text{Glu}])$  para 60 e 120 segundos, respetivamente), embora a correlação seja ligeiramente menor, tanto para 60 como 120 segundos, para a mesma gama linear de deteção.

Em termos de conclusão a condição que apresentou melhor características operacionais em termos de declive ( $8,7334 \mu\text{A}/\log([\text{Glu}]])$  e gama de linearidade (0,75 a 40 mM) foi o desenvolvimento do biossensor pela metodologia por encapsulamento em SC onde se aplicou uma camada de BGr e uma camada de enzima para 60 segundos, uma vez que apresenta elevada sensibilidade para uma gama linear mais abrangente. Medições em SC podem ser benéficas, considerando que a matriz já contém na sua composição inicial 3,5 mM de glucose, o que permite uma deteção mais fácil da glucose. O uso de uma camada de BGr e uma camada de GOx permite obter gamas lineares de deteção mais alargadas, o que pode indicar que usar maiores quantidades de enzima aumenta o risco de perda da mesma após lavagem, o que torna

mais vantajoso usar menores quantidades de GOx, pois assim a sua imobilização no BGr torna-se mais eficaz.



**Figura 30** – Cronoamperograma e as respectivas retas de calibração obtidas em soro Cormay, após a imobilização de duas camadas da GOx pelo método de encapsulamento. **A)** Representa o cronoamperograma com a presença da GOx, em resposta à variação das concentrações de glucose (0,05 – 50 mM). **B)** Reta de calibração da resposta de corrente em função da concentração logarítmica de glucose para o tempo 60 e 120 s.

### 4.3.3 Limites de detecção

Foram calculados os LD a partir da **Equação 2**, para leituras em PBS e em SC, para todos os biossensores produzidos, de combinações de uma e duas camadas, para 60 e 120 segundos. Estes resultados estão apresentados na **Tabela 12**.

**Tabela 12** – Limites de detecção.

Método	Combinação de Nº camadas	Tempo (s)	Meio	LD (mM)
Adsorção	2	60	PBS	0,098
		120		0,064
60		0,261		
120		0,260		
Encapsulamento	1	60	SC	0,012
		120		0,012
60		0,078		
120		0,060		
Adsorção	2	60	SC	0,089
		120		0,088
60		0,051		
120		0,034		

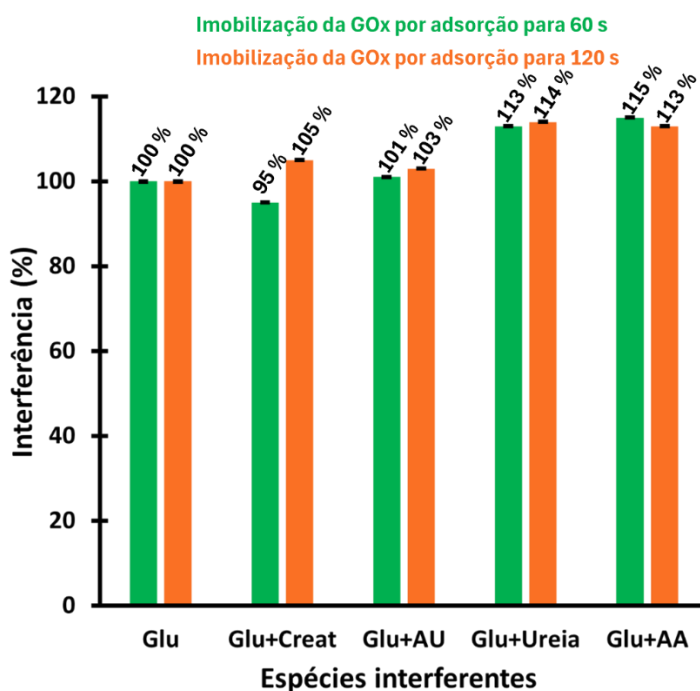
Com estes resultados percebe-se que os LD relativos a 120 segundos são sempre inferiores ou iguais aos de 60 segundos. Comparando as leituras em tampão PBS e SC, os LD são sempre superiores nas leituras em tampão PBS, tirando o caso do biossensor construído pelo método de adsorção para 120 segundos. Os LD para o método de adsorção de combinações de uma camada são inferiores para o mesmo método de combinações de duas camadas. No entanto, para o método de encapsulamento observa-se o oposto.

#### 4.3.4 Estudos da seletividade

Com os sinais eletroquímicos de uma solução de glucose 5mM na presença e ausência de possíveis interferentes, é possível calcular a percentagem de interferência pela **Equação 3**.

##### 4.3.4.1 Imobilização da GOx por adsorção

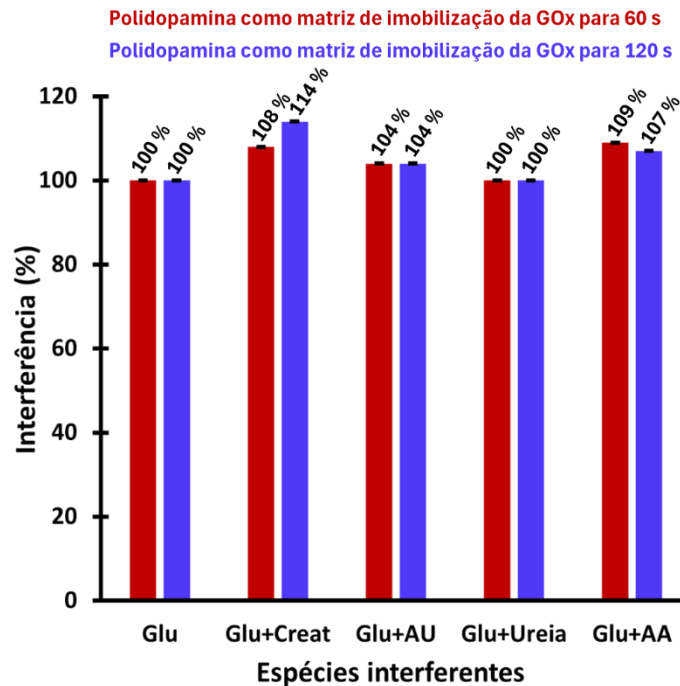
A **Figura 31** mostra que, tanto para 60 como 120 segundos, nenhum dos interferentes estudados causou uma percentagem de interferência no sinal superior a 15 %. Estes resultados indicam que o biossensor desenvolvido pelo método de adsorção é seletivo à glucose, uma vez que os sinais não diferem significativamente na presença de possíveis interferentes.



**Figura 31** – Estudos de seletividade utilizando um método competitivo entre a glucose e as espécies interferentes, após a imobilização da GOx por adsorção. As espécies interferentes estudadas foram a creatinina, o ácido úrico, a ureia e o ácido ascórbico.

#### 4.3.4.2 Polidopamina como matriz de imobilização da GOx

O biossensor desenvolvido pelo método de encapsulamento provou também ser seletivo à glucose, pois cumpre os mesmos parâmetros descritos no caso de adsorção, tal como se pode verificar na **Figura 32**.



**Figura 32** – Estudos de seletividade utilizando um método competitivo entre a glucose e as espécies interferentes, após encapsulamento da GOx com polidopamina. As espécies interferentes estudadas foram a creatinina, o ácido úrico, a ureia e o ácido ascórbico.

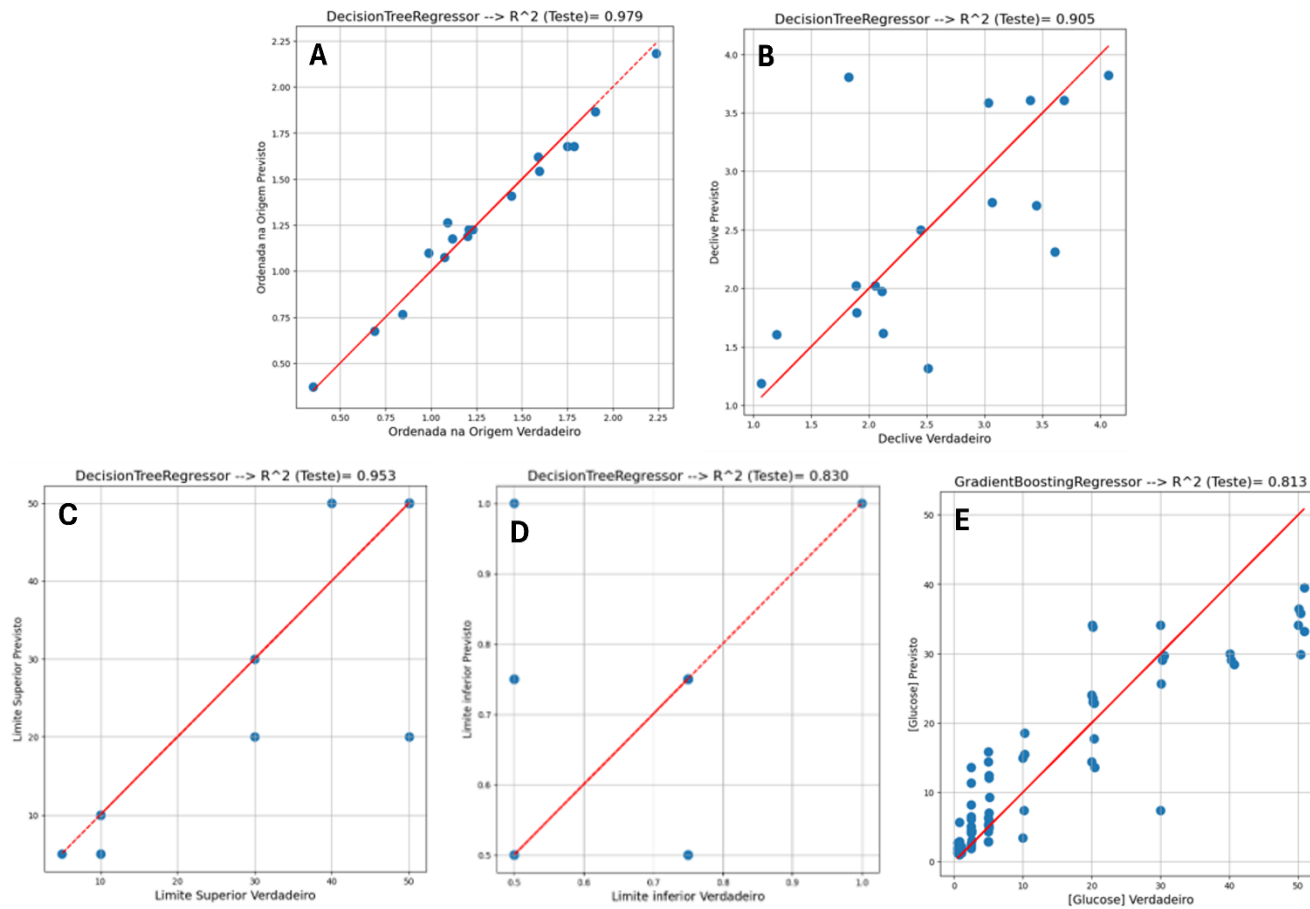
## 4.4 Componente de estudos de ML

Depois de testar diferentes algoritmos para prever as diversas variáveis de saída já mencionadas, registaram-se os modelos com melhor desempenho no final das 20 iterações e respetiva combinação de variáveis de entrada. Para além disso, registou-se também a melhor combinação de variáveis de entrada mais frequente para cada algoritmo, bem como a médias das métricas de desempenho (**Equações 4 a 6**) e selecionou-se o modelo com melhor média de métricas de avaliação.

Na **Tabela 13** e **Figura 33**, pode-se observar os modelos com melhor desempenho para cada uma das variáveis de saída, bem como a respetiva combinação de variáveis de entrada. Por outro lado, na **Tabela 13** pode-se observar a combinação de variáveis de entrada mais frequente para cada uma das variáveis de saída. Aqui consideraram-se os melhores resultados relativamente aos valores médios e a **Figura 34** mostra o melhor modelo obtido entre todas as iterações com as combinações de variáveis de entrada mais frequentes.

Tabela 13 – Melhor modelo obtido para cada uma das variáveis de saída.

Variável de saída	Melhor combinação	Algoritmo	R <sup>2</sup>	MAE	MSE	Média R <sup>2</sup> de CV	Desvio-Padrão de R <sup>2</sup> de CV
b	Nº Camadas de BGr, Tempo, [Enzima], [Dopamina], Corrente LI, Corrente LS	<i>DecisionTreeRegressor</i> <sup>2</sup>	0,979	0,051	0,005	0,439	0,270
m	Nº Camadas de BGr, Corrente LS	<i>DecisionTreeRegressor</i> <sup>1</sup>	0,905	0,478	0,506	0,120	0,348
LS	Nº Camadas de BGr, Tempo, [Enzima], [Dopamina], [Glucose], Corrente LI	<i>DecisionTreeRegressor</i> <sup>2</sup>	0,953	3,529	67,647	0,192	0,241
LI	Tempo, [Enzima], [Dopamina], Corrente LI	<i>DecisionTreeRegressor</i> <sup>1</sup>	0,830	0,118	0,037	0,399	0,325
[Glucose]	Nº camadas BGr, [Enzima], [Dopamina], Corrente	<i>MLPRegressor</i>	0,828	4,904	46,724	0,697	0,051



**Figura 33** – Gráfico de dispersão para melhor modelo obtido na previsão de: **(A)** ordenada na origem: DecisionTreeRegressor<sup>2</sup> com base em N<sup>o</sup> Camadas de BGr, Tempo, [Enzima], [Dopamina], Corrente LI, Corrente LS; **(B)** declive: DecisionTreeRegressor<sup>1</sup> com base em N<sup>o</sup> Camadas de BGr, Corrente LS; **(C)** Limite Superior: DecisionTreeRegressor<sup>2</sup> com base em N<sup>o</sup> Camadas de BGr, Tempo, [Enzima], [Dopamina], [Glucose], Corrente LI; **(D)** Limite Inferior: DecisionTreeRegressor<sup>1</sup> com base em Tempo, [Enzima], [Dopamina], Corrente LI; **(E)** [Glucose]: MLPRegressor com base em N<sup>o</sup> camadas BGr, [Enzima], [Dopamina] e Corrente.

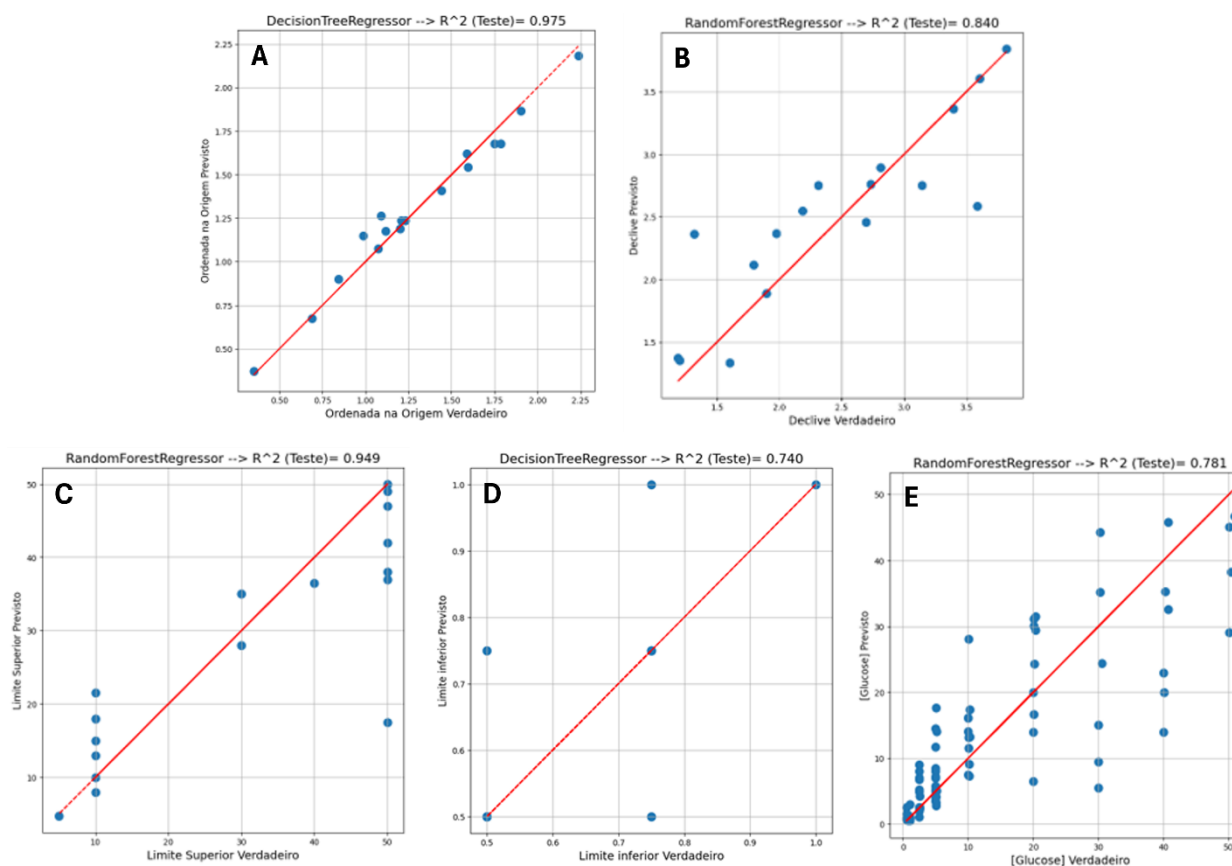
Os resultados apresentados na **Tabela 14** e **Figura 34** indicam o desempenho do melhor modelo obtido ao longo deste estudo para cada uma das variáveis de saída e respectivos gráficos de dispersão. Relativamente às retas de calibração, o desempenho para as variáveis “declive”, “ordenada na origem” e “limite superior” registados indicam uma elevada descrição destes dados, seguidos pelo “limite inferior”. Estes resultados são ótimos indicadores da capacidade de previsão da reta de calibração de um biossensor.

Quanto à previsão da concentração de glucose, os resultados também são bons indicativos de que se pode prever o valor da concentração de glucose numa amostra.

No entanto, estes resultados só descrevem os dados para uma determinada fase de teste e treino, ou seja, podem descrever uma porção do conjunto de dados, mas não o conjunto de dados na totalidade.

Tabela 14 – Combinação de variáveis de entrada mais frequente.

Variável de saída	Combinação mais frequente	Algoritmo	Média (n iterações)					
			n iterações	R <sup>2</sup>	MAE	MSE	Média R <sup>2</sup> de CV	Desvio-Padrão de R <sup>2</sup> de CV
b	Nº Camadas de BGr, Tempo, [Enzima], [Dopamina], Corrente LI, Corrente LS	<i>DecisionTreeRegressor</i> <sup>1</sup>	2	0,956	0,081	0,015	0,468	0,287
m	Nº Camadas de BGr, [Enzima], Corrente LS	<i>RandomForestRegressor</i> <sup>2</sup>	3	0,812	0,298	0,185	0,503	0,188
LS	[Enzima], [Dopamina]	<i>RandomForestRegressor</i> <sup>2</sup>	2	0,900	6,654	90,619	0,544	0,179
LI	[Dopamina], [Glucose]	<i>DecisionTreeRegressor</i> <sup>2</sup>	6	0,515	0,110	0,032	0,286	0,284
[Glucose]	Nº camadas BGr, [Enzima], [Dopamina], Corrente	<i>RandomForestRegressor</i> <sup>2</sup>	7	0,738	4,246	53,848	0,693	0,055



**Figura 34** – Gráfico de dispersão para o modelo: **(A)** DecisionTreeRegressor<sup>1</sup> com melhor desempenho na precisão de ordenada na origem com base na combinação de variáveis de entrada mais frequentes: N<sup>o</sup> camadas de BGr, Tempo, [Enzima], [Dopamina], Corrente LI e Corrente LS; **(B)** Gráfico de dispersão para RandomForestRegressor<sup>2</sup> com melhor desempenho na previsão de declive com base na combinação de variáveis de entrada mais frequentes: N<sup>o</sup> camadas de BGr, [Enzima] e corrente LS; **(C)** RandomForestRegressor<sup>2</sup> com melhor desempenho na previsão de limite superior com base na combinação de variáveis de entrada mais frequente: [Enzima] e [Dopamina]; **(D)** DecisionTreeRegressor<sup>2</sup> com melhor desempenho na previsão de limite inferior com base na combinação de variáveis de entrada mais frequentes: [Dopamina] e [Glucose]; **(E)** RandomForestRegressor<sup>2</sup> com melhor desempenho na previsão de [Glucose] com base na combinação de variáveis de entrada mais frequentes: N<sup>o</sup> camadas BGr, [Enzima], [Dopamina] e Corrente.

Assim, os resultados da **Tabela 14** e **Figura 34** são melhores indicadores da capacidade de descrição destes algoritmos para todo o conjunto de dados. Aqui considerou-se a melhor combinação de variáveis de entrada mais frequente ao longo das 20 iterações. Ao comparar as duas tabelas percebe-se que para todas as variáveis de saída o algoritmo que registou o melhor desempenho individualmente não é o mesmo que aquele com melhor média de métricas de avaliação quando se considera a combinação de variáveis de entrada mais frequente ao longo de todas as iterações.

No que respeita às combinações de variáveis de entrada, as variáveis de saída “ordenada na origem” e “concentração de glucose” foram os únicos casos onde a melhor combinação de variáveis de entrada mais frequente foi igual à usada nos algoritmos com melhor desempenho. Todas as outras variáveis de saída estudadas apresentaram diferentes combinações nos dois casos.

Para além disso, os resultados da **Tabela 14** também provam que é possível prever as variáveis “declive”, “ordenada na origem” e “limite superior” para dados fora do conjunto do treino considerado. O mesmo se pode dizer sobre a “concentração de glucose”, embora as métricas de avaliação apresentem valores relativamente mais baixos aos anteriores.



## 5 Conclusões e trabalho futuro

Desenvolveram-se biossensores de glucose de primeira geração, imobilizando a enzima GOx em cima de uma matriz de BGr na superfície de um elétrodo de platina, através do método de adsorção e encapsulamento. Para cada um destes métodos, realizou-se a calibração em tampão PBS (para duas camadas de BGr e enzima) e soro Cormay (para uma e duas camadas), bem como um estudo de seletividade em tampão PBS, para os valores de corrente obtidos a 60 e 120 segundos da técnica CA.

A aplicação de BGr na construção de um biossensor de glucose permitiu uma fácil redução eletroquímica e, assim, a determinação do  $H_2O_2$  produzido durante a oxidação da glucose catalisada por GOx na amostra a um potencial de operação de 0,4 V. Além disso, o método de encapsulamento com polidopamina melhorou a imobilização de GOx e garantiu um sinal analítico mais elevado.

Os resultados referentes aos 60 segundos foram quase sempre mais satisfatórios em termos de sensibilidade e correlação que os de 120 segundos, mantendo sempre a gama linear de detecção. No entanto, para o biossensor preparado pelo método de encapsulamento com uma camada, a correlação foi superior no caso dos 120 segundos, em SC.

Relativamente ao efeito do número de camadas, no método de adsorção, nota-se que um maior número de camadas de BGr e enzima causam um aumento da sensibilidade e correlação, embora uma diminuição do limite superior da gama linear de detecção de 50 mM para 30 mM, tanto para 60 como para 120 segundos. No caso do encapsulamento, um aumento do número de camadas causou também uma diminuição do limite superior (40 mM para 20 mM) e ainda uma diminuição de correlação, tanto para 60 como 120 segundos. Quanto à sensibilidade, para 60 segundos mais camadas geram maior sensibilidade, mas para 120 segundos verifica-se o oposto.

Ao observar as diferenças entre as calibrações em tampão PBS e soro Cormay, percebe-se que para o método de adsorção as calibrações em soro Cormay apresentam melhores valores de sensibilidade e correlação, mas um limite superior inferior menor (20 mM em vez de 50 mM),

tanto para 60 como 120 segundos. Para o método de encapsulamento, a calibração em soro Cormay permitiu obter uma sensibilidade maior para 60 segundos, mas uma correlação e limite superior de detecção inferior. Neste caso, para os 120 segundos, também se obteve maior sensibilidade em soro Cormay, mas correlação ligeiramente menor para a mesma gama linear de detecção (0,75 mM e 20 mM).

De todos os resultados obtidos, o biossensor onde se imobilizou duas camadas de enzima em cima de duas camadas de BGr pelo método de encapsulamento foi aquele que apresentou a maior sensibilidade ( $8,7943 \mu\text{A}/\log([\text{Glu}])$ ), com uma correlação muito próxima de 0,9800 para uma gama linear de detecção de glucose entre 0,75 mM e 20 mM. No entanto o biossensor com uma camada de BGr e uma camada de enzima preparado pelo método de encapsulamento, apresenta uma sensibilidade ligeiramente inferior ( $8,7334 \mu\text{A}/\log([\text{Glu}])$ ), todavia muito próxima, mas com uma correlação mais perto de 0,9900 para uma gama linear de detecção entre 0,75 mM e 40 mM, pelo que este seria o melhor desempenho entre todos os métodos estudados. O biossensor desenvolvido é conveniente para a determinação de glucose no meio fisiológico com um LD de 0,078 mM.

Testou-se vários algoritmos de regressão não linear de forma a prever variáveis relativamente à reta de calibração de um biossensor de glucose e ainda para prever as concentrações de glucose em amostra com esse mesmo biossensor, a partir dos dados obtidos durante o processo de preparação e calibração.

Daqui concluiu-se que o declive, ordenada na origem e limite superior de uma reta de calibração podem ser previstos com boa confiança recorrendo a algoritmos de RandomForestRegressor e DecisionTreeRegressor. O algoritmo RF apresentou também uma capacidade de descrição satisfatória dos dados, embora menor que as referidas, para a concentração de glucose numa amostra.

Embora as métricas de avaliação não tenham sido tão boas para o limite inferior, é de se notar que o conjunto de dados usado não é muito extenso. Uma maior quantidade de dados pode melhorar a capacidade de previsão. Da mesma forma, aumentar o número de iterações pode gerar resultados mais confiáveis.

Por outro lado, pode-se alterar e testar ainda mais combinações de hiperparâmetros dos modelos estudados, havendo a possibilidade de obter algoritmos que descrevem ainda melhor as variáveis estudadas.

Outra possibilidade de melhorar estes algoritmos seria inserir ainda mais variáveis de entrada que podem ter efeito no desempenho de um biossensor, como a temperatura no momento de leitura, pH das amostras ou até mesmo das soluções de enzima, humidade, entre outros.

É também de se notar que estes dados são relativamente a soluções de glucose em soro Cormay 50 vezes diluído e filtrado. Um estudo interessante seria a previsão de retas de calibração e concentrações de glucose para amostras em sangue humano, considerando também todas as

concentrações de interferentes no sangue humano que podem ter alguma influência nas medições.

Idealmente, cada biossensor deveria ser usado uma única vez, já que cada leitura pode influenciar os resultados posteriores, devido, principalmente, à perda de enzima. Os *datasets* deste trabalho incluem leituras sucessivas para diferentes biossensores, o que pode influenciar também o desempenho dos algoritmos e dificultar o trabalho de previsão. Um estudo interessante seria construir um *dataset* semelhante aos utilizados, mas desta vez realizar apenas uma única leitura para cada biossensor. Embora este estudo exija mais recursos e tempo, é possível garantir uma análise mais confiável dos dados e, possivelmente, melhorar ainda mais o desempenho dos algoritmos.

Em suma, este estudo permite concluir que o ML e modelos de regressão não linear podem ser incorporados na área de biossensores de forma a prever as retas de calibração dos mesmos sem ser necessário realizar o processo de calibração convencional ou até mesmo prever concentrações de glicose em amostras sem ser necessária calibração, o que pode poupar muito tempo, recursos e dinheiro, bem como garantir uma medição mais confiável, uma vez que o biossensor não foi submetido a tal processo e mantém a melhor qualidade possível.



## Referências

- [1] X. Lin *et al.*, “Global, regional, and national burden and trend of diabetes in 195 countries and territories: an analysis from 1990 to 2025,” *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-71908-9.
- [2] “Diagnosis and classification of diabetes mellitus,” Jan. 2011. doi: 10.2337/dc11-S062.
- [3] S. H. Read *et al.*, “Trends in incidence and case fatality of acute myocardial infarction, angina and coronary revascularisation in people with and without type 2 diabetes in Scotland between 2006 and 2015,” *Diabetologia*, vol. 62, no. 3, pp. 418–425, Mar. 2019, doi: 10.1007/s00125-018-4796-7.
- [4] P. Saeedi *et al.*, “Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition,” *Diabetes Res Clin Pract*, vol. 157, Nov. 2019, doi: 10.1016/j.diabres.2019.107843.
- [5] M. H. Forouzanfar *et al.*, “Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015,” *The Lancet*, vol. 388, no. 10053, pp. 1659–1724, Oct. 2016, doi: 10.1016/S0140-6736(16)31679-8.
- [6] B. Zhou *et al.*, “Worldwide trends in diabetes since 1980: A pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants,” *The Lancet*, vol. 387, no. 10027, pp. 1513–1530, Apr. 2016, doi: 10.1016/S0140-6736(16)00618-8.
- [7] H. Chen, G. Chen, X. Zheng, and Y. Guo, “Contribution of specific diseases and injuries to changes in health adjusted life expectancy in 187 countries from 1990 to 2013: retrospective observational study,” *BMJ (Online)*, vol. 364, 2019, doi: 10.1136/bmj.l969.

- [8] N. H. Cho *et al.*, “IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045,” *Diabetes Res Clin Pract*, vol. 138, pp. 271–281, Apr. 2018, doi: 10.1016/j.diabres.2018.02.023.
- [9] D. Dabelea *et al.*, “Prevalence of type 1 and type 2 diabetes among children and adolescents from 2001 to 2009,” *JAMA*, vol. 311, no. 17, pp. 1778–1786, May 2014, doi: 10.1001/jama.2014.3201.
- [10] G. Danaei *et al.*, “Cardiovascular disease, chronic kidney disease, and diabetes mortality burden of cardiometabolic risk factors from 1980 to 2010: A comparative risk assessment,” *Lancet Diabetes Endocrinol*, vol. 2, no. 8, pp. 634–647, 2014, doi: 10.1016/S2213-8587(14)70102-0.
- [11] R. R. Holman, S. K. Paul, M. A. Bethel, D. R. Matthews, and H. A. W. Neil, “10-Year Follow-up of Intensive Glucose Control in Type 2 Diabetes,” *New England Journal of Medicine*, vol. 359, no. 15, pp. 1577–1589, Oct. 2008, doi: 10.1056/nejmoa0806470.
- [12] J. Beagley, L. Guariguata, C. Weil, and A. A. Motala, “Global estimates of undiagnosed diabetes in adults,” *Diabetes Res Clin Pract*, vol. 103, no. 2, pp. 150–160, 2014, doi: 10.1016/j.diabres.2013.11.001.
- [13] X. Zhang, L. S. Geiss, Y. J. Cheng, G. L. Beckles, E. W. Gregg, and H. S. Kahn, “The Missed Patient With Diabetes: How access to health care affects the detection of diabetes,” *Diabetes Care*, vol. 31, no. 9, pp. 1748–1753, Jun. 2008, doi: 10.2337/dc08-0572.
- [14] E. W. Gregg *et al.*, “Changes in Diabetes-Related Complications in the United States, 1990–2010,” *New England Journal of Medicine*, vol. 370, no. 16, pp. 1514–1523, Apr. 2014, doi: 10.1056/nejmoa1310799.
- [15] R. M. M. Khan, Z. J. Y. Chua, J. C. Tan, Y. Yang, Z. Liao, and Y. Zhao, “From pre-diabetes to diabetes: Diagnosis, treatments and translational research,” Sep. 01, 2019, *MDPI AG*. doi: 10.3390/medicina55090546.
- [16] X. Li, C. Li, S. Zhang, C. Cui, J. Li, and Q. Gao, “Simple and fast colorimetric and electrochemical methods for the ultrasensitive detection of glucose”, doi: 10.1007/s00216-021-03547-6/Published.
- [17] J. F. Campo-Martínez, M. J. González-Castro, M. L. Enseñat-Berea, and J. Fernández-Paz, “Validation of an Automated Enzymatic Method for the Determination of Fermentable Sugars in Wines,” *Food Anal Methods*, vol. 15, no. 7, pp. 1851–1858, Jul. 2022, doi: 10.1007/s12161-022-02247-w.
- [18] M. T. Mustapha, D. Uzun Ozsahin, and I. Ozsahin, “Chapter 8 - Comparative evaluation of point-of-care glucometer devices in the management of diabetes mellitus,” in *Applications of Multi-Criteria Decision-Making Theories in Healthcare and Biomedical Engineering*, I. Ozsahin, D. U. Ozsahin, and B. Uzun, Eds., Academic Press, 2021, pp. 117–136. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824086-1.00008-6>.

- [19] A. Hina and W. Saadeh, "Noninvasive Blood Glucose Monitoring Systems Using Near-Infrared Technology—A Review," Jul. 01, 2022, *MDPI*. doi: 10.3390/s22134855.
- [20] V. Naresh and N. Lee, "A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors," Feb. 02, 2021, *MDPI AG*. doi: 10.3390/s21041109.
- [21] R. José Branco Leote and C. Christopher Michael Ashton Brett Co-coordenador Dra Mariana Emília Ghica, "Desenvolvimento e caracterização de biossensores eletroquímicos enzimáticos com enzimas oxidase Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química."
- [22] C. I. L. Justino, A. C. Freitas, R. Pereira, A. C. Duarte, and T. A. P. Rocha Santos, "Recent developments in recognition elements for chemical sensors and biosensors," May 01, 2015, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.trac.2015.03.006.
- [23] F. F. Gonzalez-Navarro, M. Stilianova-Stoytcheva, L. Renteria-Gutierrez, L. A. Belanche-Muñoz, B. L. Flores-Rios, and J. E. Ibarra-Esquer, "Glucose oxidase biosensor modeling and predictors optimization by machine learning methods," *Sensors (Switzerland)*, vol. 16, no. 11, Nov. 2016, doi: 10.3390/s16111483.
- [24] F. Cui, Y. Yue, Y. Zhang, Z. Zhang, and H. S. Zhou, "Advancing Biosensors with Machine Learning," Nov. 25, 2020, *American Chemical Society*. doi: 10.1021/acssensors.0c01424.
- [25] S. Seker and I. Becerik, "A neural network model in the calibration of glucose sensor based on the immobilization of glucose oxidase into polypyrrole matrix," *Electroanalysis*, vol. 16, no. 18, pp. 1542–1549, 2004, doi: 10.1002/elan.200302974.
- [26] D. R. Thévenot, K. Toth, R. A. Durst, G. S. Wilson, and D. R. Thévenot, "Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification," 2001. [Online]. Available: [www.elsevier.com/locate/bios](http://www.elsevier.com/locate/bios)
- [27] S. Deshpande, R. Datar, B. Pramanick, and G. Bacher, "Machine Learning-Assisted Analysis of Electrochemical Biosensors," *IEEE Sens Lett*, vol. 7, no. 9, Sep. 2023, doi: 10.1109/LSENS.2023.3307112.
- [28] A. A. Lahcen and A. Amine, "Chapter 3 - Biorecognition elements," in *Wearable Physical, Chemical and Biological Sensors*, E. Morales-Narvaez and C. Dincer, Eds., Elsevier, 2022, pp. 41–70. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821661-3.00011-2>.
- [29] W. P. Dijkman, G. De Gonzalo, A. Mattevi, and M. W. Fraaije, "Flavoprotein oxidases: Classification and applications," Jun. 2013. doi: 10.1007/s00253-013-4925-7.
- [30] S. Mross, S. Pierrat, T. Zimmermann, and M. Kraft, "Microfluidic enzymatic biosensing systems: A review," Aug. 05, 2015, *Elsevier Ltd*. doi: 10.1016/j.bios.2015.03.049.

- [31] D. Kim and A. E. Herr, "Protein immobilization techniques for microfluidic assays," *Biomicrofluidics*, vol. 7, no. 4, Jul. 2013, doi: 10.1063/1.4816934.
- [32] B. W. Park, D. Y. Yoon, and D. S. Kim, "Recent progress in bio-sensing techniques with encapsulated enzymes," Sep. 2010. doi: 10.1016/j.bios.2010.04.033.
- [33] C. M. Halliwell, E. Simon, C.-S. Toh, P. N. Bartlett, and A. E. G. Cass, "Immobilisation of lactate dehydrogenase on poly(aniline)-poly(acrylate) and poly(aniline)-poly-(vinyl sulphate) films for use in a lactate biosensor," 2002.
- [34] I. Maria De Sá Vinagre, "BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO DESCARTÁVEL PARA O DIAGNÓSTICO DA DIABETES."
- [35] M. Gerard, K. Ramanathan, A. Chaubey, and B. D. Malhotra, "Immobilization of Lactate Dehydrogenase on Electrochemically Prepared Polyaniline Films," *Electroanalysis*, vol. 11, no. 6, pp. 450–452, May 1999, doi: 10.1002/(sici)1521-4109(199905)11:6<450::aid-elan450>3.0.co;2-r.
- [36] C. Li *et al.*, "Cathode materials modified by surface coating for lithium ion batteries," May 20, 2006. doi: 10.1016/j.electacta.2005.11.015.
- [37] M. H. Lin, S. Gupta, C. Chang, C. Y. Lee, and N. H. Tai, "Carbon nanotubes/polyethylenimine/glucose oxidase as a non-invasive electrochemical biosensor performs high sensitivity for detecting glucose in saliva," *Microchemical Journal*, vol. 180, Sep. 2022, doi: 10.1016/j.microc.2022.107547.
- [38] O. Amor-Gutiérrez, E. Costa-Rama, and M. T. Fernández-Abedul, "Paper-Based Enzymatic Electrochemical Sensors for Glucose Determination," Aug. 01, 2022, *MDPI*. doi: 10.3390/s22166232.
- [39] E. H. Yoo and S. Y. Lee, "Glucose biosensors: An overview of use in clinical practice," May 2010. doi: 10.3390/s100504558.
- [40] A. Sassolas, L. J. Blum, and B. D. Leca-Bouvier, "Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors," May 2012. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.09.003.
- [41] V. B. Juska and M. E. Pemble, "A critical review of electrochemical glucose sensing: Evolution of biosensor platforms based on advanced nanosystems," Nov. 01, 2020, *MDPI AG*. doi: 10.3390/s20216013.
- [42] Q. Mei *et al.*, "Electrospinning of highly dispersed Ni/CoO carbon nanofiber and its application in glucose electrochemical sensor," *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 847, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.jelechem.2019.04.035.
- [43] M. H. Hassan, C. Vyas, B. Grieve, and P. Bartolo, "Recent advances in enzymatic and non-enzymatic electrochemical glucose sensing," Jul. 02, 2021, *MDPI AG*. doi: 10.3390/s21144672.

- [44] S. Tsujimura *et al.*, “Novel FAD-Dependent Glucose Dehydrogenase for a Dioxygen-Insensitive Glucose Biosensor.”
- [45] P. Rafighi, M. Tavahodi, and B. Haghghi, “Fabrication of a third-generation glucose biosensor using graphene-polyethyleneimine-gold nanoparticles hybrid,” *Sens Actuators B Chem*, vol. 232, pp. 454–461, Sep. 2016, doi: 10.1016/j.snb.2016.03.147.
- [46] V. B. Juska and M. E. Pemble, “A critical review of electrochemical glucose sensing: Evolution of biosensor platforms based on advanced nanosystems,” Nov. 01, 2020, *MDPI AG*. doi: 10.3390/s20216013.
- [47] L. Sakalauskiene, B. Brasiunas, A. Popov, A. Kausaite-Minkstimiene, and A. Ramanaviciene, “The Development of Reagentless Amperometric Glucose Biosensor Based on Gold Nanostructures, Prussian Blue and Glucose Oxidase,” *Biosensors (Basel)*, vol. 13, no. 10, Oct. 2023, doi: 10.3390/bios13100942.
- [48] A. Popov *et al.*, “Reduced graphene oxide and polyaniline nanofibers nanocomposite for the development of an amperometric glucose biosensor,” *Sensors (Switzerland)*, vol. 21, no. 3, pp. 1–15, Feb. 2021, doi: 10.3390/s21030948.
- [49] A. Izadyar, M. N. Van, K. A. Rodriguez, I. Seok, and E. E. Hood, “A bienzymatic amperometric glucose biosensor based on using a novel recombinant Mn peroxidase from corn and glucose oxidase with a Nafion membrane,” *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 895, p. 115387, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2021.115387>.
- [50] D. S. Kim *et al.*, “Development of GO/Co/Chitosan-Based Nano-Biosensor for Real-Time Detection of D-Glucose,” *Biosensors (Basel)*, vol. 12, no. 7, Jul. 2022, doi: 10.3390/bios12070464.
- [51] W.-Y. Jeon *et al.*, “A stable glucose sensor with direct electron transfer, based on glucose dehydrogenase and chitosan hydro bonded multi-walled carbon nanotubes,” *Biochem Eng J*, vol. 187, p. 108589, 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108589>.
- [52] M. Otto, “Front Matter,” in *Chemometrics*, Wiley, 2016. doi: 10.1002/9783527699377.fmatter.
- [53] I. Reinholds, V. Bartkevics, I. C. J. Silvis, S. M. van Ruth, and S. Esslinger, “Analytical techniques combined with chemometrics for authentication and determination of contaminants in condiments: A review,” Dec. 01, 2015, *Academic Press Inc*. doi: 10.1016/j.jfca.2015.05.004.
- [54] P. C. Jurs, G. A. Bakken, and H. E. McClelland, “Computational methods for the analysis of chemical sensor array data from volatile analytes,” *Chem Rev*, vol. 100, no. 7, pp. 2649–2678, Jul. 2000, doi: 10.1021/cr9800964.

- [55] S. Stewart, M. A. Ivy, and E. V. Anslyn, "The use of principal component analysis and discriminant analysis in differential sensing routines," Jan. 07, 2014, *Royal Society of Chemistry*. doi: 10.1039/c3cs60183h.
- [56] R. Goodacre, D. Graham, and K. Faulds, "Recent developments in quantitative SERS: Moving towards absolute quantification," May 01, 2018, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.trac.2018.03.005.
- [57] G. R. Schleder, A. C. M. Padilha, C. M. Acosta, M. Costa, and A. Fazzio, "From DFT to machine learning: Recent approaches to materials science - A review," *JPhys Materials*, vol. 2, no. 3, Jul. 2019, doi: 10.1088/2515-7639/ab084b.
- [58] B. Debus, H. Parastar, P. Harrington, and D. Kirsanov, "Deep learning in analytical chemistry," Dec. 01, 2021, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.trac.2021.116459.
- [59] A. Dasgupta and A. Nath, "Classification of Machine Learning Algorithms," *International Journal of Innovative Research in Advanced Engineering (IJIRAE)*, vol. 3, 2016, doi: 10.6084/M9.FIGSHARE.3504194.V1.
- [60] T. Oladipupo, "Types of Machine Learning Algorithms," in *New Advances in Machine Learning*, InTech, 2010. doi: 10.5772/9385.
- [61] F. Lussier, V. Thibault, B. Charron, G. Q. Wallace, and J. F. Masson, "Deep learning and artificial intelligence methods for Raman and surface-enhanced Raman scattering," Mar. 01, 2020, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.trac.2019.115796.
- [62] J. Yang, J. Xu, X. Zhang, C. Wu, T. Lin, and Y. Ying, "Deep learning for vibrational spectral analysis: Recent progress and a practical guide," *Anal Chim Acta*, vol. 1081, pp. 6–17, Nov. 2019, doi: 10.1016/j.aca.2019.06.012.
- [63] J. George and G. Hautier, "Chemist versus Machine: Traditional Knowledge versus Machine Learning Techniques," Feb. 01, 2021, *Cell Press*. doi: 10.1016/j.trechm.2020.10.007.
- [64] A. Mistry, A. A. Franco, S. J. Cooper, S. A. Roberts, and V. Viswanathan, "How Machine Learning Will Revolutionize Electrochemical Sciences," Apr. 09, 2021, *American Chemical Society*. doi: 10.1021/acseenergylett.1c00194.
- [65] K. He, X. Zhang, S. Ren, and J. Sun, "Delving Deep into Rectifiers: Surpassing Human-Level Performance on ImageNet Classification," Feb. 2015, [Online]. Available: <http://arxiv.org/abs/1502.01852>
- [66] X. Glorot and Y. Bengio, "Understanding the difficulty of training deep feedforward neural networks." [Online]. Available: <http://www.iro.umontreal>.

- [67] M. Islam, K. Wahid, and A. Dinh, "Assessment of ripening degree of avocado by electrical impedance spectroscopy and support vector machine," *J Food Qual*, vol. 2018, 2018, doi: 10.1155/2018/4706147.
- [68] N. Ha, K. Xu, G. Ren, A. Mitchell, and J. Z. Ou, "Machine Learning-Enabled Smart Sensor Systems," *Advanced Intelligent Systems*, vol. 2, no. 9, Sep. 2020, doi: 10.1002/aisy.202000063.
- [69] K. E. Schackart and J. Y. Yoon, "Machine learning enhances the performance of bioreceptor-free biosensors," Aug. 02, 2021, *MDPI AG*. doi: 10.3390/s21165519.
- [70] S. K. Majumder, N. Ghosh, and P. K. Gupta, "Support vector machine for optical diagnosis of cancer," *J Biomed Opt*, vol. 10, no. 2, p. 024034, 2005, doi: 10.1117/1.1897396.
- [71] C. Wang, F. Madiyar, C. Yu, and J. Li, "Detection of extremely low concentration waterborne pathogen using a multiplexing self-referencing SERS microfluidic biosensor," *J Biol Eng*, vol. 11, no. 1, Feb. 2017, doi: 10.1186/s13036-017-0051-x.
- [72] M. Awad and R. Khanna, *Efficient learning machines: Theories, concepts, and applications for engineers and system designers*. Apress Media LLC, 2015. doi: 10.1007/978-1-4302-5990-9.
- [73] T. Hofmann, B. Schölkopf, and A. J. Smola, "Kernel methods in machine learning," Jun. 2008. doi: 10.1214/009053607000000677.
- [74] W. Cherif, "Optimization of K-NN algorithm by clustering and reliability coefficients: Application to breast-cancer diagnosis," in *Procedia Computer Science*, Elsevier B.V., 2018, pp. 293–299. doi: 10.1016/j.procs.2018.01.125.
- [75] M. Y. Su, "Real-time anomaly detection systems for Denial-of-Service attacks by weighted k-nearest-neighbor classifiers," *Expert Syst Appl*, vol. 38, no. 4, pp. 3492–3498, Apr. 2011, doi: 10.1016/j.eswa.2010.08.137.
- [76] C. Crisci, B. Ghattas, and G. Perera, "A review of supervised machine learning algorithms and their applications to ecological data," Aug. 10, 2012. doi: 10.1016/j.ecolmodel.2012.03.001.
- [77] J. J. Rodríguez, L. I. Kuncheva, and C. J. Alonso, "Rotation Forest: A New Classifier Ensemble Method."
- [78] T. Shaikhina, D. Lowe, S. Daga, D. Briggs, R. Higgins, and N. Khovanova, "Decision tree and random forest models for outcome prediction in antibody incompatible kidney transplantation," *Biomed Signal Process Control*, vol. 52, pp. 456–462, Jul. 2019, doi: 10.1016/j.bspc.2017.01.012.

- [79] L. Blanchet *et al.*, “Constructing bi-plots for random forest: Tutorial,” Sep. 22, 2020, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.aca.2020.06.043.
- [80] S. Pandit, T. Banerjee, I. Srivastava, S. Nie, and D. Pan, “Machine Learning-Assisted Array-Based Biomolecular Sensing Using Surface-Functionalized Carbon Dots,” *ACS Sens*, vol. 4, no. 10, pp. 2730–2737, Oct. 2019, doi: 10.1021/acssensors.9b01227.
- [81] J. S. Torrecilla, M. L. Mena, P. Yáñez-Sedeño, and J. García, “A neural network approach based on gold-nanoparticle enzyme biosensor,” *J Chemom*, vol. 22, no. 1, pp. 46–53, 2008, doi: 10.1002/cem.1100.
- [82] F. Murtagh, “Multilayer perceptrons for classification and regression,” *Neurocomputing*, vol. 2, no. 5, pp. 183–197, 1991, doi: [https://doi.org/10.1016/0925-2312\(91\)90023-5](https://doi.org/10.1016/0925-2312(91)90023-5).
- [83] J. Zhang *et al.*, “Improving biosensor accuracy and speed using dynamic signal change and theory-guided deep learning,” *Biosens Bioelectron*, vol. 246, Feb. 2024, doi: 10.1016/j.bios.2023.115829.
- [84] F. Cui, Y. Yue, Y. Zhang, Z. Zhang, and H. S. Zhou, “Advancing Biosensors with Machine Learning,” Nov. 25, 2020, *American Chemical Society*. doi: 10.1021/acssensors.0c01424.
- [85] P. Puthongkham, S. Wirojsaengthong, and A. Suea-Ngam, “Machine learning and chemometrics for electrochemical sensors: Moving forward to the future of analytical chemistry,” *Analyst*, vol. 146, no. 21, pp. 6351–6364, Nov. 2021, doi: 10.1039/d1an01148k.
- [86] H. Haick and N. Tang, “Artificial Intelligence in Medical Sensors for Clinical Decisions,” Mar. 23, 2021, *American Chemical Society*. doi: 10.1021/acsnano.1c00085.
- [87] Z. Ballard, C. Brown, A. M. Madni, and A. Ozcan, “Machine learning and computation-enabled intelligent sensor design,” *Nat Mach Intell*, vol. 3, no. 7, pp. 556–565, Jul. 2021, doi: 10.1038/s42256-021-00360-9.
- [88] G. Rosati *et al.*, “Nanodiagnosics to Face SARS-CoV-2 and Future Pandemics: From an Idea to the Market and beyond,” Nov. 23, 2021, *American Chemical Society*. doi: 10.1021/acsnano.1c06839.
- [89] W. J. Sung, kun Na, and Y. H. Bae, “Biocompatibility and interference eliminating property of pullulan acetate/polyethylene glycol/heparin membrane for the outer layer of an amperometric glucose sensor,” *Sens Actuators B Chem*, vol. 99, no. 2–3, pp. 393–398, May 2004, doi: 10.1016/j.snb.2003.12.005.
- [90] J. Massah and K. Asefpour Vakilian, “An intelligent portable biosensor for fast and accurate nitrate determination using cyclic voltammetry,” *Biosyst Eng*, vol. 177, pp. 49–58, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.biosystemseng.2018.09.007.

- [91] K. A. Vakilian and J. Massah, "A Portable Nitrate Biosensing Device Using Electrochemistry and Spectroscopy," *IEEE Sens J*, vol. 18, no. 8, pp. 3080–3089, Apr. 2018, doi: 10.1109/JSEN.2018.2809493.
- [92] S. Y. Cho *et al.*, "Finding Hidden Signals in Chemical Sensors Using Deep Learning," *Anal Chem*, vol. 92, no. 9, pp. 6529–6537, May 2020, doi: 10.1021/acs.analchem.0c00137.
- [93] O. Guselnikova *et al.*, "Label-free surface-enhanced Raman spectroscopy with artificial neural network technique for recognition photoinduced DNA damage," *Biosens Bioelectron*, vol. 145, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.bios.2019.111718.
- [94] Y. Wu *et al.*, "Deep Learning Enables High-Throughput Analysis of Particle-Aggregation-Based Biosensors Imaged Using Holography," *ACS Photonics*, vol. 6, no. 2, pp. 294–301, Feb. 2019, doi: 10.1021/acsp Photonics.8b01479.
- [95] M. A. K. Sagar, K. P. Cheng, J. N. Ouellette, J. C. Williams, J. J. Watters, and K. W. Eliceiri, "Machine Learning Methods for Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM) Based Label-Free Detection of Microglia," *Front Neurosci*, vol. 14, Sep. 2020, doi: 10.3389/fnins.2020.00931.
- [96] K. E. Schackart and J. Y. Yoon, "Machine learning enhances the performance of bioreceptor-free biosensors," Aug. 02, 2021, *MDPI AG*. doi: 10.3390/s21165519.
- [97] S. Ali *et al.*, "Disposable all-printed electronic biosensor for instantaneous detection and classification of pathogens," *Sci Rep*, vol. 8, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-24208-2.
- [98] D. Beduk *et al.*, "'All In One' SARS-CoV-2 variant recognition platform: Machine learning-enabled point of care diagnostics," *Biosens Bioelectron X*, vol. 10, May 2022, doi: 10.1016/j.biosx.2022.100105.
- [99] X. Lu *et al.*, "An emerging machine learning strategy for electrochemical sensor and supercapacitor using carbonized metal–organic framework," *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 920, Sep. 2022, doi: 10.1016/j.jelechem.2022.116634.
- [100] E. C. Rivera *et al.*, "Data-driven modeling of smartphone-based electrochemiluminescence sensor data using artificial intelligence," *Sensors (Switzerland)*, vol. 20, no. 3, Feb. 2020, doi: 10.3390/s20030625.
- [101] F. F. González Navarro *et al.*, "Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae Analyzing the Amperometric Response of a Glucose Oxidase Sensor Applying Mathematical Models," 2016.
- [102] Y. Xu *et al.*, "Electrochemical Impedance Spectroscopic Detection of E.coli with Machine Learning," *J Electrochem Soc*, vol. 167, no. 4, p. 047508, 2020, doi: 10.1149/1945-7111/ab732f.

- [103] S. Aiassa *et al.*, “Continuous monitoring of propofol in human serum with fouling compensation by support vector classifier,” *Biosens Bioelectron*, vol. 171, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.bios.2020.112666.
- [104] C. V Kumar and A. Pattammattel, “Chapter Eleven - BioGraphene: Direct Exfoliation of Graphite in a Kitchen Blender for Enzymology Applications,” in *Methods in Enzymology*, vol. 571, C. V. Kumar, Ed., Academic Press, 2016, pp. 225–244. doi: <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.03.009>.
- [105] S. A. Gegenschatz, F. A. Chiappini, C. M. Teglia, A. Muñoz de la Peña, and H. C. Goicoechea, “Binding the gap between experiments, statistics, and method comparison: A tutorial for computing limits of detection and quantification in univariate calibration for complex samples,” May 29, 2022, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.aca.2021.339342.
- [106] M. Winey, J. B. Meehl, E. T. O’Toole, and T. H. Giddings, “Conventional transmission electron microscopy,” Feb. 01, 2014. doi: 10.1091/mbc.E12-12-0863.