UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

WELLINGTON BELARMINO GONÇALVES

Desenvolvimento de novos materiais sensitivos a base de compósitos de Fe_3O_4 para aplicação em sensores de gases e nariz eletrônico

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890
O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

05/06/2020

WELLINGTON BELARMINO GONÇALVES

Desenvolvimento de novos materiais sensitivos a base de compósitos de Fe_3O_4 para aplicação em sensores de gases e nariz eletrônico

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Química

Orientador: Prof. Dr. Jonas Gruber

São Paulo

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletronico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

G635d

Gonçalves, Wellington Belarmino
Desenvolvimento de novos materiais sensitivos a base de compósitos de Fe3O4 para aplicação em sensores de gases e nariz eletrônico / Wellington Belarmino Gonçalves. - São Paulo, 2020.
167 p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Gruber, Jonas

1. Materiais compósitos. 2. Sensores químicos. 3. Nariz eletrônico. I. T. II. Gruber, Jonas, orientador.

Universidade de São Paulo
Instituto de Química

"Desenvolvimento de novos materiais sensitivos a base de compósitos de Fe3O4 para aplicação em sensores de gases e nariz eletrônico"

WELLINGTON BELARMINO GONÇALVES

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências - no Programa de Química.

Jonas Gruber

Prof. Dr. Jonas Gruber
(Orientador e Presidente)

APROVADO(A) POR:

p/ Jonas Gruber

Profa. Dra. Liliana Marzorati
IQ - USP

p/ Jonas Gruber

Profa. Dra. Daniele Fernanda Maffei
ESALQ - USP

p/ Jonas Gruber

Prof. Dr. Juliano Gonçalves Pereira
FMV - UNESP - BOTUCATU

SÃO PAULO
07 de agosto de 2020

Aos meus pais, João e Inacia, pela dedicação, amor e confiança que foram essenciais para que eu chegasse até aqui.

À minha irmã Rosely, pelo companheirismo, carinho e conversas que sinto tanta falta por estar longe.

Ao meu sobrinho João Miguel, a quem eu amo do fundo de meu coração.

Ao meu cunhado Eliatan.

À minha amada noiva Evelyn, que me acompanhou durante essa jornada me dando suporte, atenção, amor, compreensão e fidelidade, não me deixando perder o foco.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar comigo, me guardando e sustentando em todos os momentos de minha vida.

Ao Prof. Dr. Jonas Gruber pela orientação, paciência, amizade e dedicação que teve para comigo desde o começo deste trabalho.

Aos Prof. Dr. Hans Viertler e Profa. Dra. Vera Pardini pelas conversas e conselhos.

A Profa Dra Ana Cecília Roque pela orientação durante o período sanduíche em que os materiais utilizados neste trabalho foram desenvolvidos.

Ao meu amigo e colega de laboratório Wanderson Teixeira (Violino) pela colaboração que me proporcionou, às amostras utilizadas nas diversas aplicações deste trabalho, por realizar experimentos, tratar dados e escrever o artigo comigo. Além de abrir as portas de sua casa em Botucatu. Uma parceria que começou no laboratório e se estendeu para a vida.

Ao Prof. Dr. Juliano Pereira pela colaboração, disponibilizando seu laboratório e amostras de bactérias para os estudos feitos.

A Aryele Sampaio e Otávio Martins pela preparação das amostras de mel e crescimento das bactérias em diferentes meios de cultura e inoculação nas amostras de carne.

Aos técnicos da Central Analítica por fazerem as análises com competência e dedicação.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação.

A meu amigo Antonio Soares Paulino que me acompanhou nessa jornada de Recife para São Paulo, pelas conversas, incentivo e amizade.

À minha noiva Evelyn Perez Cervantes pelo amor, conversas e incentivos que me ajudaram a não perder o ânimo, além da colaboração com o tratamento dos dados que enriqueceram este trabalho.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Gonçalves, W. B. **Desenvolvimento de novos materiais sensitivos a base de compósitos de Fe_3O_4 para aplicação em sensores de gases e** nariz eletrônico. 2020. 167p. Tese - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Compósitos a base de ionogel foram preparados a partir dos componentes EMIMDCA, Fe_3O_4 e gelatina, aplicados como camada sensível em sensores de gases e testados em narizes eletrônicos. A análise dos componentes principais (PCA) mostrou que os narizes exibiram excelente discriminação entre uma variedade de compostos orgânicos voláteis. Diferentes classificadores, como *random forest, multilayer perceptron e K-nearest neighbor,* foram empregados para avaliar a acurácia na previsão dos sensores, obtendo valores acima de 98%.

Os narizes eletrônicos formados por esses sensores foram empregados em diferentes aplicações, começando pela diferenciação de mel puro e adulterado, sendo capazes de distingui-los com elevada precisão. O diagnóstico de parvovirose canina também foi estudado, doença com elevada taxa de mortalidade em cães. O diagnóstico da doença foi feito com 100% de acurácia. Estudos com bactérias patogênicas de origem alimentar foram conduzidos. Os sensores foram capazes de diferenciar *Salmonela* de outras bactérias em diferentes meios de cultura, além de distinguir diferentes espécies de bactérias (*Salmonella* Typhimurium*, Escherichia coli* e *Pseudomonas fluorescens*) inoculadas em diversos tipos de carne.

Duas inovações são apresentadas neste trabalho: i) aplicação de diferentes ionogéis produzidos com os mesmos componentes em um nariz eletrônico e ii) aplicação de um nariz eletrônico a base de ionogel em situações reais.

Palavras-chave: ionogel, sensores de gás, nariz eletrônico, mel, parvovirose, bactérias.

ABSTRACT

Gonçalves, W. B. **Development of new sensitive materials based on Fe_3O_4 composites for application in gas sensors and in electronic nose.** 2020. 167p. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Composites based on ionogel were prepared from the components EMIMDCA, Fe_3O_4 and gelatin, applied as a sensitive layer in gas sensors, and tested in an electronic nose. Despite the use of only 3 components, two sets with 4 sensors each were developed. Principal component analysis (PCA) showed that the electronic nose exhibited excellent discrimination between a variety of volatile organic compounds. Different classifiers, such as random forest, multilayer perceptron and K-nearest neighbor, were used to evaluate the accuracy in the prediction of the sensors, obtaining values above 98%.

The electronic noses were used for different applications starting with the differentiation of pure and adulterated honey, being able to capable distinguish it with high precision. The diagnosis of canine parvovirus was also studied, a disease with a high mortality rate in dogs. The diagnosis of the disease was done with 100% accuracy. Studies with foodborne pathogenic bacteria were conducted, the electronic nose was able to differentiate *Salmonella* from other bacteria in different culture media, and also to distinguish different bacteria species (*Salmonella* Typhimurium*, Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*) inoculated in different types of meat.

Two innovations are presented in this work: i) application of different ionogels produced with the same components in an electronic nose and ii) application of an electronic nose based on ionogel in real situations.

Keywords: ionogel, gas sensors, electronic nose, honey, parvovirus, bacteria.

ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AF	Ácido fórmico
AO	Ácido oléico
AL	Ácido láurico
AA	Ácido antraceno carboxílico
[BPy][BF_4]	Tetrafluoroborato de N-butilpiridínio
[BMPyr][PF_6]	Hexafluorofosfato de N-butil-N-metilpirrolidínio
[BMIM][DCA]	Dicianamida de 1-btil-3-metilimidazólio
[BMPyr][DCA]	Dicianamida de N-butil-N-metilpirrolidínio
[BMPy][DCA]	Dicianamida de N-butil-N-metilpiridínio
[BMIM][BTA]	Bis((trifluorometil)sulfonil)imida de 1-butil-3-metilimidazólio
BHI	Infusão Cérebro Coração
BSA	Ágar Sulfito de Bismuto
BGA	Ágar Verde Brilhante
CP	Polímeros condutores
CPV	Parvovirose canina
DME	1,2-Dimetoxietano
DMSO	Dimetilsulfóxido
EAN	Nitrato de etilamônio
[EMIM][BF_4]	Tetrafluoroborato de 1-etil-3metilimidazólio
[Et_4N][BF_4]	Tetrafluoroborato de tetraetilamônio
[Et4N][BF4]	Tetrafluoroborato de tetraetilamônio
EC	Carbonato de etileno
[EMIM][$(CF_3SO_2)_2N$]	Bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-etil-3-metilimidazólio
[EMIM][DCA]	Dicianamida de 1-etil-3-metilimidazólio
[EMIM][BF_4]	Tetrafluoroborato de 1-etil-3-metilimidazólio
[EMPyr][$(CF_3SO_2)_2N$]	Bis(trifluorometilsulfonil)imida de N-etil-N-metilpirrolidínio
[EMIM][Tf]	Trifluorometanossulfonato de 1-etil-3-metilimidazólio
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
E. coli	*Escherichia coli*
FP	Falsos positivos
FN	Falsos negativos

IJ	*Ion jelly*
ICA	Análise dos componentes independentes
IHA	Insuficiência hepática aguda
IBK	*Instances based*
KNN	K-*nearest neighbors*
LI	Líquido iônico
$LiN(CF_3SO_2)_2$	Bis(trifluorometilsulfonil)imida de lítio
$LiCF_3SO_3$	Triflato de lítio
$LiPF_6$	Hexafluorofosfato de lítio
LDA	*Linear Discriminant Analysis*
LMT	*Logistic Model Trees*
MNPs	Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro
MOS	Óxidos metálicos semicondutores
MLP	*Multilayer Perceptron*
NTCPS	Nanotubos de carbono de parede simples
PC	Carbonato de propileno
$[P_{6,6,6,14}]$ [DCA]	Dicianamida de trihexil(tetradecil)fosfônio
$[P_{6,6,6,14}]$ $[C_9H_{19}CO_2]$	Decanoato de trihexil(tetradecil)fosfônio
P(VdF-HFP)	Poli(fluoreto de vinilideno-hexafluoropropileno
PCA	Análise dos componentes principais
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PSO	*Particle swarm optmization*
P. fluorescens	*Pseudomonas fluorescens*
P. aeruginosa	*Pseudomonas aeruginosa*
PC	Componente principal
PN	Partículas nuas
Ra	Resposta relativa
RF	*Random forest*
RFC	*Randomizable Filtered Classifier*
SVM	*Support vector machine*
S. Typhimurium	*Salmonella* Typhimurium
S. aureus	*Staphylococcus aureus*
SMOTE	*Synthetic Minority Oversampling Technique*
TEM	mMicroscopia eletrônica de transmissão

TEOS	Tetraetoxissilano
TGA	Análise termogravimétrica
TSA	Ágar Triptona de Soja
ULDA	*Uncorrelated Linear Discriminant Analysis*
VOC's	Compostos orgânicos voláteis
VP	Verdadeiros positivos
VN	Verdadeiros negativos
XLD	Ágar Xilose Lisina Desoxicolato

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas cristalinas dos três óxidos de ferro mais utilizados (esferas vermelhas são íons de oxigênio, pretas são íons de ferro II e verdes íons de ferro III).[4] 20
Figura 2: Cátions e ânios mais utilizados em estudos com LIs. 24
Figura 3: Primeira reação de Diels Alder do ciclopropendieno com o acrilato de metila aplicando LI como solvente. 24
Figura 4: LI como solvente numa reação de Heck. 25
Figura 5: Cicloadição eletrocatalítica na presença de diversos LIs. 28
Figura 6: Esquema mostrando os diferentes tipos de ionogéis.[41] 29
Figura 7: Gelificantes de baixo peso molecular aplicados na produção de géis.[43] 30
Figura 8: Ionogel formado pelo método doping através da técnica de fundição. 31
Figura 9: Imagem de TEM dos NTCPS A) no ionogel produzido a partir de [BMIM][BF_4] e B) após sonicação em etanol.[49] 33
Figura 10: Dispersão das nanopartículas de sílica em [EMIM][NTf2] em diferentes concentrações: a) LI puro; b) 1% [m/m]; c) 3% [m/m]; d) 5% [m/m] e e) 15% [m/m].[57] 34
Figura 11: Ionogel híbrido a base de sílica e do copolímero PVdF-HFP com o LI EMIMTf e o sal de lítio LiTf.[59] 36
Figura 12: Esquema geral de um nariz eletrônico composto por quatro sensores de gás, uma unidade de processamento de sinal e uma análise multivariada dos voláteis. 38
Figura 13: LDA do estágio de amadurecimento das bananas com os dias de estoque em A) e senescências em B).[91] 41
Figura 14: Distinção de três tipos de tabaco em A) e de oito marcas de cigarros (Marlboro Silver - M1; Marlboro Gold - M2; Marlboro - M3; Marlboro Blue Ice – M4; Marlboro Fresh Mint – M5; Dunhill – S1; Lucky Strike – S2 e Derby – S3) em B).[97] 43
Figura 15: PCA mostrando a separação dos solventes analisados com os quatro ionogéis.[66] 45
Figura 16: Resposta relativa do sensor em função do tempo a diferentes concentrações de etanol.[65] 46
Figura 17: PCA do leite não contaminado, controle e contaminado com as bactérias e leveduras com os 7 clusters separados.[156] 61
Figura 18: Comparação entre os resultados do PCA em A) e do ULDA em B) para diferenciação das bactérias E. coli (E), Listeria (L) e a solução tampão fostato-salino (P).[162] 64
Figura 19: PCA das amostras de carne de frango estocadas a 30°C e 4°C em diferentes dias.[165] 65
Figura 20: A) Eletrodo interdigitado usado na preparação dos sensores de gás e B) representação do nariz eletrônico utilizado. 75
Figura 21: Espectro na região do infravermelho das partículas de Fe_3O_4 a) nuas e revestidas com b) AA; c) AL; d) AO 79

Figura 22: Análise termogravimétrica do EMIMDCA e ionogéis a) conjunto de sensores A e b) conjunto de sensores B. 80
Figura 23: Resposta do conjunto de sensores dopados com diferentes concentrações de Fe_3O_4 em ciclos de exposição (5s)/recuperação (100s) a etanol. (preto) Ionogeis puro; (vermelho) dopado com 25 mg/mL; (azul) dopado com 50 mg/mL e (verde) dopado com 75 mg/mL. 81
Figura 24: Resposta relativa para filmes com diferentes concentrações de partículas de Fe3O4. 82
Figura 25: Resposta relativa dos filmes dopados com partículas de Fe_3O_4 com funcionalizações diferentes. 83
Figura 26: Gráfico do PCA para os sensores A) com diferentes concentrações de partículas de Fe_3O_4 nuas e B) com três funcionalizações das partículas de Fe_3O_4. 85
Figura 27: Comparação da acurácia nos diferentes classificadores para os sensores do conjunto A e B. 86
Figura 28: Matriz de confusão do classificador IBK aplicado em a) predição dos VOCs no conjunto A e b) predição dos VOCs no conjunto B. 87
Figura 29: Amostras de méis verdadeiros (1 - 6) e adulterados (7 - 17) utilizados no estudo do nariz eletrônico. 90
Figura 30: Resposta dos sensores do conjunto A quando expostos a uma amostra de mel (A) e PCA para as 17 amostras de mel. 91
Figura 31: Peso de cada sensor na formação das componentes principais para o conjunto A. 92
Figura 32: Resposta dos sensores do conjunto B quando expostos a uma amostra de mel (A) e PCA para as 17 amostras de mel. 93
Figura 33: Peso de cada sensor na formação das componentes principais para o conjunto B. 94
Figura 34: Comparação da acurácia nos diferentes classificadores na diferenciação de méis verdadeiros de adulterados para os sensores do conjunto A e B. 95
Figura 35: Classificação de VP, VN, FP e FN aplicados no cálculo da sensibilidade e especificidade de um método de análise. 96
Figura 36: Resposta dos sensores quando expostos aos voláteis de uma amostra controle negativo (A) e PCA das 15 amostras que foram medidas no nariz eletrônico a base de MOS (B). 100
Figura 37: Medidas do nariz eletrônico durante os 8 ciclos de exposição e recuperação a uma amostra controle negativo (A) e PCA das 15 amostras para os sensores a base de ionogel (B). 101
Figura 38: Contribuição dos sensores na formação das componentes principais do PCA. 102
Figura 39: Acurácia de diferentes classificadores na separação das amostras positivas das negativas para os dois conjuntos de sensores estudados. 103
Figura 40: Resposta dos sensores quando expostos aos voláteis da *S.* Typhimurium no meio de cultura TSA. 110
Figura 41: PCA para *S.* Typhimurium de *E. coli, P. fluorescens, P. aeruginosa*, e *S. aureus* no meio não seletivo TSA. 111

Figura 42: A) Comparação da acurácia dos classificadores empregados na separação das bactérias no meio TSA, B) Matriz de confusão feita a partir da análise dos dados com Kstar. 113
Figura 43: PCAs for *S*. Typhimurium, *E. coli*, e *P. fluorescens* em A) BSA, B) XLD and C) BGA media. 115
Figura 44: A) Comparação da acurácia dos classificadores para os meios BSA, XLD e BGA, B) Matriz de confusão do BSA com MPL, C) Matriz de confusão do XLD com LDA e D) Matriz de confusão do BGA com LMT. 118
Figura 45: PCA das medidas feitas com amostras de carne bovina contaminada com *S*. Typhimurium, *E. coli* e *P. fluorescens* A) dia 0; B) dia 1; C) dia 2 e D) dia 3. 123
Figura 46: Classificadores aplicados para averiguar a acurácia da distinção da carne bovina contaminada com diferentes bactérias. 124
Figura 47: Matriz de confusão para carne bovina A) dia 0; B) dia 1; C) dia 2 e D) dia 3 a partir do classificador Kstar. 125
Figura 48: PCA das medidas feitas com amostras de carne suína contaminada com *S*. Typhimurium, *E. coli* e *P. fluorescens* A) dia 0; B) dia 1; C) dia 2 e D) dia 3. 126
Figura 49: Classificadores aplicados para averiguar a acurácia da distinção da carne suína contaminada com diferentes bactérias. 127
Figura 50: Matriz de confusão das amostras de carne suína contaminadas com bactérias para o classificador Kstar do A) dia 0; B) dia 1; C) dia 2 e D) dia 3. 128
Figura 51: PCA das medidas feitas com amostras de carne de frango contaminada com *S*. Typhimurium, *E. coli* e *P. fluorescens* A) dia 0; B) dia 1; C) dia 2 e D) dia 3. 129
Figura 52: Classificadores aplicados para averiguar a acurácia da distinção da carne de frango contaminada com diferentes bactérias. 130
Figura 53: Matriz de confusão das amostras de carne de frango contaminadas com bactérias para o classificador Kstar A) dia 0; B) dia 1; C) dia 2 e D) dia 3. 131
Figura 54: Resposta relativa média dos sensores nos três dias de medida, quando expostos a voláteis da carne de frango contaminada com *P. fluorescens*. 132
Figura 55*:* PCA das carnes (A) bovina, (B) de frango e (C) suína durante três dias de contaminação com *S*. Typhimurium. 134
Figura 56: Acurácia dos classificadores utilizados na distinção dos dias de contaminação das carnes *S*. Typhimurium (A) e matriz de confusão da evolução da contaminação das carnes (B) bovino com LDA; (C) frango com MLP e (D) suíno com RF. 135
Figura 57: PCA das carnes (A) bovina, (B) de frango e (C) suína durante três dias de contaminação com *E. coli*. 136
Figura 58: Acurácia dos classificadores utilizados na distinção dos dias de contaminação das carnes com *E. coli* (A) e matriz de confusão da evolução da contaminação com *E. coli* nas carnes (B) bovino com LDA; (C) frango com MLP e (D) suíno com LDA. 137
Figura 59: PCA das carnes (A) bovina, (B) de frango e (C) suína durante três dias de contaminação com *P. fluorescens*. 138

Figura 60: Acurácia dos classificadores utilizados na distinção dos dias de contaminação das carnes com *P. fluorescens* (A) e matriz de confusão da evolução da contaminação das carnes com MLP (B) bovino; (C) suíno e (D) frango. 140

Sumário

Capítulo 1: Introdução xxiii
1.1 Óxido de Ferro 19
1.1.1 Nanopartículas de óxido de ferro 20
1.1.2 Métodos de síntese 21
1.2 Líquidos iônicos 23
1.3 Ionogel 28
1.3.1 Ionogéis orgânicos 29
1.3.2 Ionogéis inorgânicos 32
1.3.3 Ionogéis híbridos 35
1.3.4 *Ion jelly* 36
1.4 Sensores de gás e nariz eletrônico 37
1.4.1 Materiais usados como camada sensível 40
1.5 Análise multivariada 46
1.5.1 Extração de dados (pré-processamento) 47
1.5.2 Seleção de classificadores 48
1.5.3 Métodos de validação cruzada 50
1.6 Aplicação de nariz eletrônico em Mel 52
1.7 Detecção de parvovirose canina 55
1.8 Aplicação de nariz eletrônico para detecção de bactérias 57
Capítulo 2: Objetivos 68
2.1 Gerais 69
2.2 Específicos 69
Capítulo 3: Parte experimental 70
3.1 Materiais 71
3.2 Síntese das particulas de Fe_3O_4 71
3.3 Funcionalização das partículas 72
3.4 Produção do ionogel 72
3.5 Compósitos 73
3.5.1 Dopagem do ionogel com partículas de Fe_3O_4 nuas 73
3.5.2 Dopagem do ionogel com partículas de Fe_3O_4 funcionalizadas 73
3.6 Caracterização 73
3.7 Preparação dos sensores e aplicação no nariz eletrônico 74
3.8 Preparação das culturas de bactérias e contaminação das carnes 75

Capítulo 4: Prova de conceito 77
4.1 Resultados e discussão 78
4.2 Caracterização de Fe_3O_4. 78
4.3 Caracterização térmica dos ionogéis 79
4.4 Ionogel – conjunto A 80
4.5 Ionogel - Conjunto B 83
4.6 Nariz eletrônico 84
4.7 Conclusão 88
Capítulo 5: Identificação de méis adulterados 89
5.1 Resultados e discussão 90
5.2 Conjunto A 90
5.3 Conjunto B 92
5.4 Análise multivariada 94
5.5 Conclusão 96
Capítulo 6: Detecção de parvovirose canina 98
6.1 Resultados e discussão 99
6.2 Detecção de parvovirose canina 99
6.3 Análise multivariada 102
6.4 Comparação com outros métodos 104
6.5 Sensibilidade e especificidade 106
6.6 Conclusão 107
Capítulo 7: Detecção de *Salmonella* em diferentes meios de cultura 108
7.1 Resultados e discussão 109
7.2 Bactérias em meio não seletivo 110
7.2.1 Análise multivariada das bactérias em meio não seletivo 111
7.3 Crescimento em meio seletivo 113
7.3.1 Análise multivariada – bactérias em meio seletivo 116
7.4 Conclusão 118
Capítulo 8: Diferenciação de bactérias em carnes 120
8.1 Resultados e discussão 121
8.2 Carne bovina 122
8.3 Carne suína 125
8.4 Carne de frango 128
8.5 Determinação do tempo de contaminação 133
8.5.1 Carnes contaminadas com *S. Typhimurium* 133
8.5.2 Carnes contaminadas com *E. coli* 135

8.5.3 Carnes contaminadas com *P. fluorescens* 138
8.6 Conclusão 140
Capítulo 9: Conclusões gerais 142
10. Referências 147
Súmula curricular 164

Capítulo 1: Introdução

1.1 Óxidos de Ferro

Os óxidos de ferro são compostos que estão presentes no cotidiano da sociedade e são encontrados nos solos, rochas e água. Este minério está sendo utilizado pela humanidade há séculos, podendo ser notado nas pinturas rupestres, mostrando sua estabilidade e durabilidade. Os principais minérios de ferro encontrados de forma natural são hematita (α-Fe_2O_3), geotita (FeOOH) e magnetita (Fe_3O_4). Estes óxidos são de grande importância devido às suas propriedades elétricas, magnéticas, físico-químicas e morfológicas. As aplicações são diversas, podendo citar catálise heterogênea, pigmentos, processo Harber-Bosch para produção de amônia, processo Fischer-Tropsch para produção de hidrocarbonetos líquidos, etc.[1]

Dentre os diferentes tipos de óxidos de ferro conhecidos, hematita, magnetita e maghemita (γ-Fe_2O_3) são os mais utilizados. A hematita é o óxido de ferro conhecido há mais tempo, sua estrutura consiste em pares de $Fe(O)_6$ octaédricos ligados em uma célula unitária hexagonal. É fracamente magnética. A magnetita é o óxido de ferro mais magnético, possui estrutura cúbica do tipo espinélio invertido com íons Fe^{2+} e Fe^{3+} distribuídos em um arranjo tetraédrico e octaédrico. A maghemita é um óxido de ferro que não pode ser encontrado de modo natural, é oriunda da transformação da magnetita em hematita. Apesar de sua fórmula molecular ser idêntica à da hematita, sua estrutura cristalina é similar à da magnetita, porém possui apenas íons Fe^{3+}.[2,3] A Figura 1 mostra as estruturas cristalinas da hematita, magnetita e maghemita.

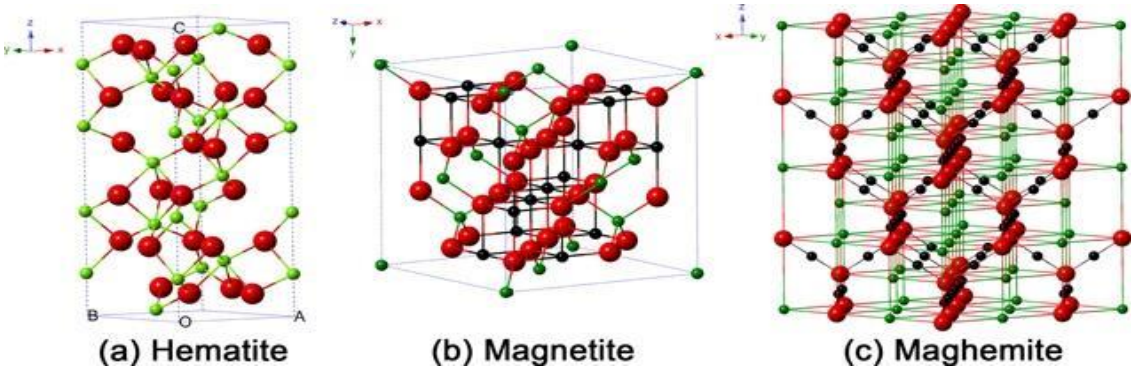


Figura 1: Estruturas cristalinas dos três óxidos de ferro mais utilizados (esferas vermelhas são íons de oxigênio, pretas são íons de ferro II e verdes íons de ferro III).[4]

1.1.1 Nanopartículas de óxido de ferro

O estudo dos nanomateriais é motivado pelas propriedades elétricas, ópticas, magnéticas e físico-químicas adquiridas na escala nanométrica. Essas propriedades são drasticamente alteradas quando comparadas às do mesmo material na forma “bulk”.[5,6]

As nanopartículas magnéticas (MNPs) de óxido de ferro estão dentro desse universo de nanomateriais. Com numerosos estudos feitos, tendo esse material como base, as MNPs de óxido de ferro representam um dos materiais mais estudados na atualidade. Por apresentar propriedades como superparamagnetismo, biocompatibilidade, além de atoxicidade, permite uma vasta aplicação em ferrofluidos, sistemas de refrigeração magnética, transporte de fármacos, catálise, entre outras.[7]

Apesar das vantagens apresentadas no uso de MNPs, há uma limitação relacionada à estabilidade química. O núcleo magnético é facilmente oxidado causando diminuição das propriedades magnéticas, além da formação de aglomerados que diminuem a energia resultante da grande área superficial. Para evitar tais problemas, é necessário o recobrimento das partículas com

espécies orgânicas, como polímeros, surfactantes, ou com espécies inorgânicas, como sílica.[2]

1.1.2 Métodos de síntese

A síntese de MNPs pode ser feita por diversas rotas, das quais podemos citar os métodos de coprecipitação, solvotérmico, hidrotérmico, microemulsão e decomposição térmica. Cada método pode levar a partículas com maior ou menor grau de cristalinidade, polidispersão e tamanho[2]

O método de coprecipitação é o mais utilizado para a síntese das MNPs por ser simples, barato e pode ser feito em grande escala, além de ter a possibilidade de síntese a temperatura ambiente. A síntese consiste no tratamento de uma mistura de sais de ferro, Fe^{2+} e Fe^{3+}, na proporção molar 1:2, com uma base, sendo o hidróxido de amônio a mais comum. A reação é feita em atmosfera inerte para evitar a oxidação da magnetita. Apesar das vantagens, as MNPs sintetizadas por esse método possuem baixa cristalinidade e alta distribuição de tamanho, o que pode ser contornado, utilizando elevados valores de pH durante a síntese (pH 11), controle da velocidade de agitação e aquecimento.[4,8,9]

Na decomposição térmica, é utilizado um precursor de ferro organometálico ou complexo metálico que dissolvido em um solvente orgânico com alto ponto de ebulição na presença de um surfactante, são decompostos gerando MNPs com alta cristalinidade e baixa distribuição de tamanho. Existem dois métodos de preparação, no primeiro o precursor metálico é adicionado à reação previamente aquecida, e no segundo, a solução é preparada a temperatura ambiente e, posteriormente aquecida. Uma importante característica da decomposição térmica é a possibilidade da síntese de MNPs

com o controle do número de etapas da reação, de acordo com o precursor metálico utilizado. Um precursor metálico com ferro de valência zero, como $Fe(CO)_5$, leva à formação do metal, que na presença de um oxidante brando forma o óxido. Já precursores metálicos catiônicos, como $[Fe(acac)_3]$, conduzem diretamente às MNPs. Uma desvantagem desse método é que as partículas sintetizadas são solúveis apenas em solventes apolares.[4,8,9]

Os métodos de síntese hidrotérmico e solvotérmico diferem basicamente no solvente utilizado. O método hidrotérmico utiliza solução aquosa, enquanto o solvotérmico, solução não aquosa. Ambos utilizam altas temperaturas (na faixa de 130 – 250°C) e pressão de vapor (0,3 – 4MPa) para produção de MNPs com alta cristalinidade e controle de tamanho e forma, podendo-se obter nanoestruturas de óxido de ferro como nanotubos e nanoesferas ocas.[4,8,9]

A microemulsão é uma mistura isotrópica termodinamicamente estável entre dois líquidos imiscíveis na presença de um surfactante que forma uma película na interface entre os dois líquidos. Em uma microemulsão de água e óleo, a fase aquosa contendo o sal de ferro é dispersa como microgotas, enquanto o óleo é a fase contínua formada por hidrocarbonetos e olefinas. A microemulsão pode ser de dois tipos: direta (óleo disperso na água) ou inversa (água dispersa no óleo), sendo ambas usadas para síntese das MNPs. Apesar do uso de surfactantes, as MNPs produzidas por esse método precisam passar por diversos processos de lavagem e estabilização por causa da formação de agregados, levando a um baixo rendimento e uso de solvente em excesso.[4,8,9]

1.2 Líquidos iônicos

Líquidos iônicos à temperatura ambiente, líquido iônico não aquoso, sal fundido, sal de líquido orgânico e sal derretido são termos utilizados para descrever sais na fase líquida.[10] Líquidos iônicos (LIs) são sais compostos de íons carregados positivamente e negativamente, que possuem ponto de fusão até 100 °C. Sais líquidos acima desta temperatura são chamados de sais derretidos.[10]

O primeiro registro na literatura dos LIs foi o nitrato de etanol amônio feito por Gabriel em 1888 que possuía ponto de fusão de 55 °C. Posteriormente, em 1914, Walden publicou um novo LI com ponto de fusão de 12 °C, o nitrato de etilamônio (EAN).[11,12] Apesar do primeiro registro de LI na literatura datar de 1888, apenas nos anos 1990 a pesquisa por diferentes LIs e suas aplicações ganharam maior atenção pelos pesquisadores com a publicação da síntese do tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio ([BMIM][BF_4]) e hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio ([BMIM][PF_6]).[13,14]

Os LIs são compostos não inflamáveis, não voláteis, apresentam condutividade iônica, estabilidade térmica, química e eletroquímica, além de serem considerados solventes verdes.[15] Alguns dos principais cátions utilizados são Alquilamônio, Alquilfosfônio, N,N – Dialquilimidazólio e N – Alquilpiridínio. Enquanto os ânions mais comuns são o hexafluorofosfato, acetato de trifluorometil, tetrafluoroborato, dicianamida, Bis(trifluorometilsulfonil)imida, cloreto, brometo e trifluorometilsulfonato.[12,16] A Figura 2 mostra as estruturas dos cátions e ânions mais comuns.

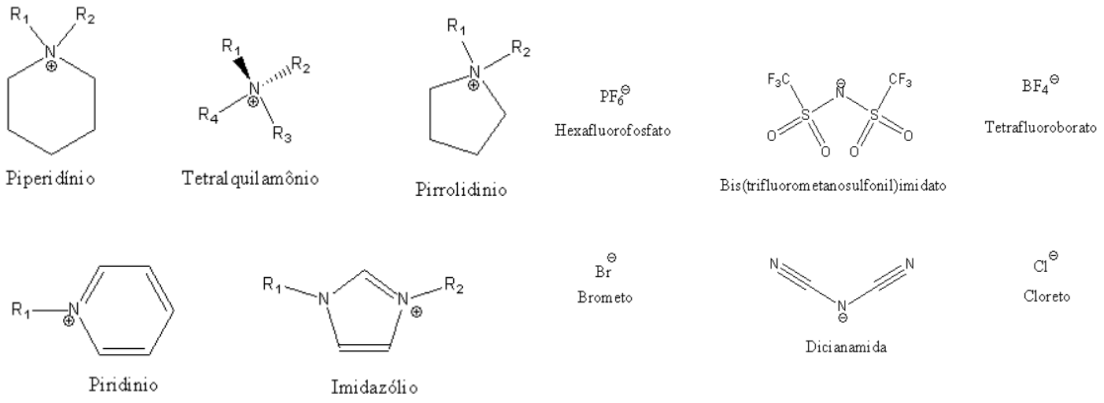


Figura 2: Cátions e ânions mais utilizados em estudos com LIs.

Os LIs foram inicialmente aplicados como solventes em diversas reações de síntese orgânica, substituindo os solventes orgânicos tradicionais. Jaerger e Tucker [17,18] foram os primeiros a aplicar o EAN como solvente para a reação de Diels Alder do ciclopentadieno com acrilato de metila e metilvinilcetona. Esta reação gera uma mistura dos produtos *endo* e *exo*, e o solvente tem influência na seletividade. Utilizando o EAN, o produto *endo* é formado preferencialmente. Apesar de não conseguir melhores rendimentos que a mesma reação feita em água, o EAN pode ser utilizado com reagentes sensíveis à umidade Figura 3.

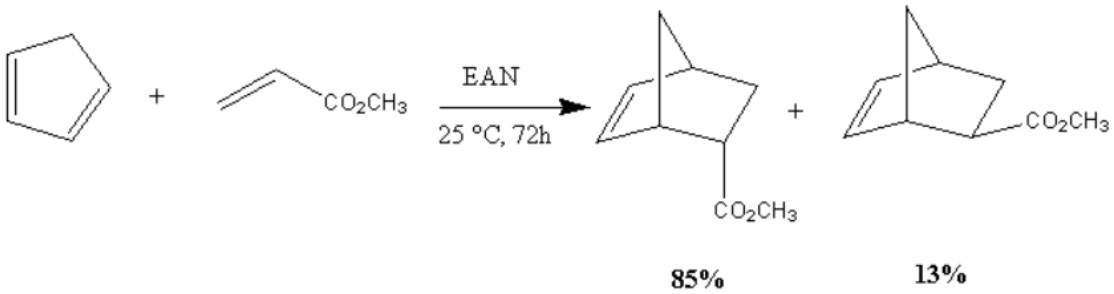


Figura 3: Primeira reação de Diels Alder do ciclopentadieno com o acrilato de metila aplicando LI como solvente.

A reação de Heck também foi estudada utilizando LIs como solventes. Kaufmann *et al.*[14,19] foram os primeiros a aplicar sais fundidos de tetralquilamônio e tetralquilfosfônio na reação do bromobenzeno com o acetato de butila catalisada por paládio. No término da reação não foi observado a formação de precipitado, indicando que mesmo o paládio elementar permaneceu dissolvido (Figura 4).

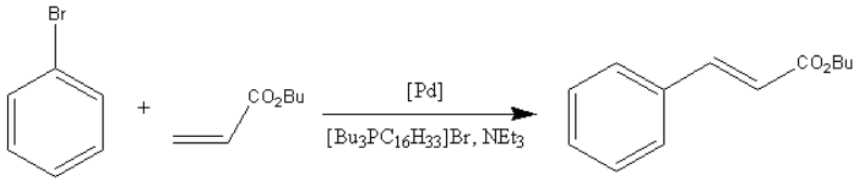


Figura 4: LI como solvente numa reação de Heck.

Além da substituição dos solventes orgânicos convencionais, os LIs também são empregados como catalisadores, podendo exercer a função de solvente e catalisador na mesma reação. Zolfigol *et al.*[20] mostraram o uso do LI cloreto de 3-metil-1-sulfo-1H-imidazólio como catalisador e solvente na preparação de N-sulfonil iminas a partir de sulfonamidas e compostos carbonílicos a temperatura ambiente. O LI sintetizado, quando comparado com outros LIs citados na literatura para a mesma reação, foi mais robusto com menor tempo reacional e maior rendimento. Os autores ainda mostraram que o catalisador era reciclável e reutilizável, apresentando uma série de quatro reações com o mesmo LI com uma leve diminuição nos rendimentos, entre 92-88%.

As propriedades de baixa pressão de vapor, estabilidade térmica e química e não inflamabilidade, levaram à utilização dos LIs como solventes e catalisadores de diversas reações orgânicas. Entretanto, uma propriedade

importante que é explorada em diversos trabalhos na literatura é a alta condutividade iônica.[21–23] A condutividade dos LIs a temperatura ambiente (0,1 – 18 mS/cm) é menor que a de eletrólitos aquosos utilizados em baterias alcalinas, como o KOH (29,4 wt.%) que possui condutividade de 540 mS/cm. Apesar da diferença de condutividade com as soluções aquosas, os LIs quando na presença de solventes podem obter um aumento na condutividade, como em tetrafluoroborato de 1-etil-3metilimidazólio ([EMIM][BF_4]), que quando puro é de 14 mS/cm, porém, quando em uma solução de acetonitrila (2 mol/mL) aumenta para 47 mS/cm. A Tabela 1 mostra alguns eletrólitos utilizados em eletroquímica.[23]

Tabela 1: Condutividade de alguns eletrólitos clássicos aplicados em eletroquímica.[23]

Eletrólito	**Solvente**	**σ [mS/cm]**
H_2SO_4 (30% [m/m])	H_2O	730
KOH (29,4% [m/m])	H_2O	540
NH_4Cl (25% [m/m])	H_2O	400
[Et_4N][BF_4] (1 mol/dm^3)	ACN	60
$LiN(CF_3SO_2)_2$ (1 mol/dm^3)	EC + DME (1:1)	13,3
$LiCF_3SO_3$ (1 mol/dm^3)	EC + DME (1:1)	8,3
$LiPF_6$ (1 mol/dm^3)	EC + DME (1:1)	16,6
[Et_4N][BF_4] (0,65 mol/dm^3)	PC	10,6
[EMIM][BF_4] (2 mol/dm^3)	ACN	47
[EMIM][BF_4] (2 mol/dm^3)	PC	16

Os Lis também podem ser utilizados como eletrólitos na ausência de solventes, substituindo as soluções convencionais.[24] A Tabela 2 apresenta a condutividade de alguns LIs comparativamente com os apresentados anteriormente na Tabela 1.

Tabela 2: Condutividade de alguns LIs.[25]

Eletrólito	σ [mS/cm]	T/K
[BPy][BF_4]	1,94	298
[BMPyr][PF_6]	7,65	368
[EMIM] [$N(CF_3SO_2)_2$]	7,73	298
[EMIM][DCA]	9,53	298
[BMIM][DCA]	9,54	298
[BMPyr][DCA]	9,83	298
[EMIM][BF_4]	13,05	298
[EMPyr][$N(CF_3SO_2)_2$]	17,2	365
[BMPy][DCA]	17,4	298
[$P_{6,6,6,14}$][DCA]	156	368
[$P_{6,6,6,14}$][$C_9H_{19}CO_2$]	740	378

A utilização dos LIs em estudos eletroquímicos pode ser encontrada amplamente na literatura. Swain *et al.*[26] em 1967 estudaram o comportamento cinético e eletroquímico do benzoato de tetrahexilamônio. Outros trabalhos foram desenvolvidos aplicando os LIs em estudos eletroquímicos.[27–29] Trabalhos mais atuais aplicaram LIs na eletrodeposição de metais,[30–32] eletrossíntese,[33] eletrólitos,[23,34,35] células combustível e baterias.[36]

Mukhopadhyay e Freyland[32] reportaram a eletrodeposição de nanofios de titânio (Ti) em grafite pirolítico altamente orientado, utilizando o LI bis((trifluorometil)sulfonil)imida de 1-butil-3-metilimidazólio como solvente e eletrólito. Por meio da técnica de voltametria cíclica, os autores observaram um potencial de redução em -0,5 V atribuído a redução do Ti (IV) para Ti (II).

Yang *et al.*[37] publicaram a primeira cicloadição eletrocatalítica de dióxido de carbono em epóxido a temperatura ambiente aplicando diferentes Lis (Figura 5). O dióxido de carbono foi eletroquimicamente reduzido, produzindo o radical ($CO_2^{-\cdot}$) que reagiu com vários epóxidos. Os produtos gerados apresentaram uma dependência do LI e do substrato utilizado.[33]

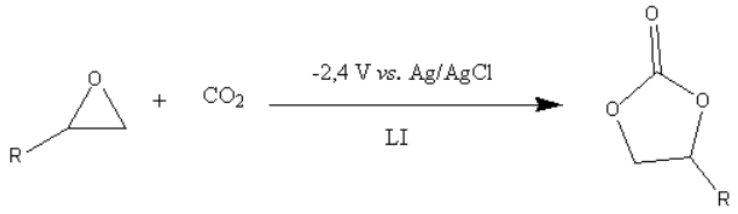


Figura 5: Cicloadição eletrocatalítica na presença de diversos LIs.

Considerando as propriedades e aplicações mencionadas acima, os LIs aparecem como candidatos promissores para extrapolar o âmbito das pesquisas acadêmicas e encontrar espaço para aplicação em dispositivos eletroquímicos e eletrônicos, como célula combustível, capacitores, células solares, entre outros. No entanto, o fato de serem líquidos é uma barreira para expansão das aplicações dos LIs em dispositivos eletrônicos. Pesquisas visando a preparação de compósitos sólidos baseados em LIs estão sendo desenvolvidas. Tais materiais compósitos são chamados de ionogéis.

1.3 Ionogel

O confinamento de LIs em uma matriz sólida tridimensional, podendo ser orgânica, inorgânica ou híbrida (orgânica-inorgânica), que conserve as propriedades do LI e confira um comportamento de *quasi*-sólido, gera os ionogéis.[38,39] Estes materiais podem ser classificados pelo tipo de interação entre o LI e a matriz, podendo ser gel físico ou químico. No gel químico, são formadas ligações covalentes entre a matriz e o LI, resultando na limitação do grau de liberdade do LI, diminuição da condutividade, limitação da quantidade de LI no gel (por formar apenas uma monocamada) e necessidade de LIs mais complexos, com grupos funcionais capazes de se ligar à matriz. No gel físico, a

matriz e o LI estão ligados por interações fracas e reversíveis, como ligações de hidrogênio ou interações hidrofóbicas, isto garante uma quantidade maior de LI confinado devido a baixa pressão de vapor, além de formar multicamadas de LI dentro da matriz e em alguns casos o LI pode ser removido da matriz, reciclado e reutilizado.[40]

Além disso, dependendo da natureza da matriz empregada é possível produzir ionogéis orgânicos, que são formados por um gelificador orgânico com baixo peso molecular ou um polímero, ionogéis inorgânicos, que utilizam nanopartículas de óxidos, nanotubos de carbono e óxidos proveniente de processo sol-gel, e ionogéis híbridos, em que as matrizes são baseadas em polímeros reforçados com fibras inorgânicas (Figura 6).[41]

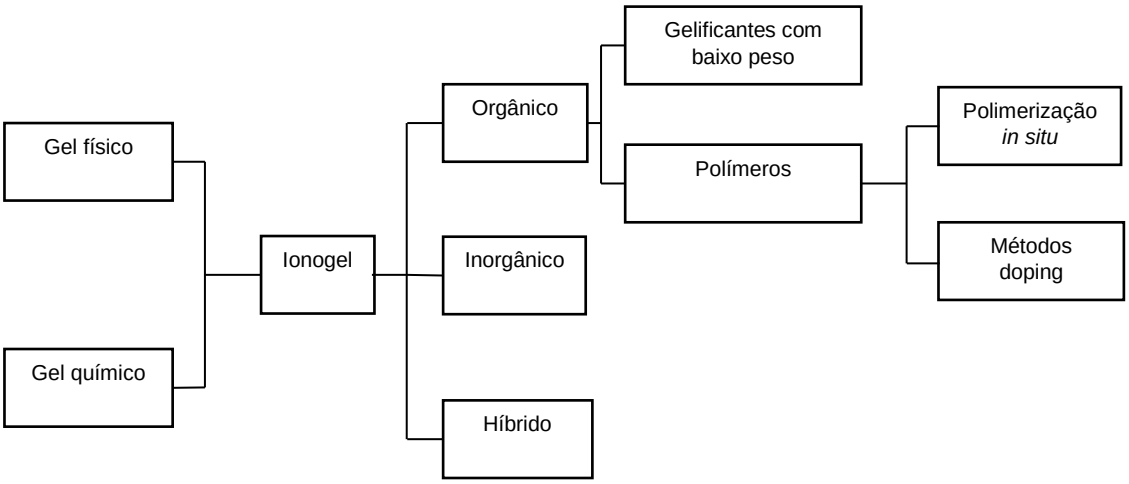


Figura 6: Esquema mostrando os diferentes tipos de ionogéis.[41]

1.3.1 Ionogéis orgânicos

Como ilustrado na Figura 6, os ionogéis orgânicos podem ser divididos entre os que são preparados com gelificantes de baixo peso molecular ou por polímeros.

Gelificantes de baixo peso molecular são moléculas orgânicas pequenas que misturadas a líquidos aquecidos, são induzidas à gelificação física com a diminuição da temperatura por meio de interações π-π e ligações de hidrogênio.[41] Kimizuka e Nakashima[42] desenvolveram o primeiro ionogel auto montado com gelificantes de baixo peso molecular. Os autores sintetizaram dois LIs a partir de núcleos imidazólicos, que através da adição do ácido L-glutâmico ou carboidratos, como beta-D-glucose e alfa-ciclodextrina, ocorria a gelificação. Minakuchi *et al.*[43] sintetizaram sete gelificantes, combinando diferentes aminoácidos ligados ao ácido glucônico e a uma longa cadeia lateral formada de hidrocarbonetos. Esta combinação resultou em uma estrutura anfifílica que foi aplicada na produção de hidrogéis, organogéis e ionogéis, pela imobilização de uma variedade de LIs. A Figura 7 mostra a estrutura geral da molécula contendo o aminoácido ligado ao ácido glucônico e a cadeia com 16 átomos de carbono, representados pela letra R. Os aminoácidos L-valina, L-leucina e L-isoleucina apresentaram maior poder de gelificação.

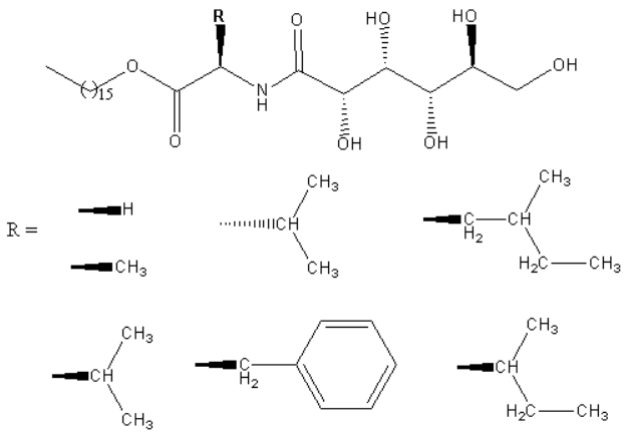


Figura 7: Gelificantes de baixo peso molecular aplicados na produção de géis.[43]

A utilização de polímeros para o confinamento dos LIs pode ser realizada de duas maneiras: i) *doping* ou ii) polimerização *in situ.*[41] No método de *doping*, o LI é adicionado ou impregnado ao polímero no fim da polimerização. Este processo pode ocorrer de duas maneiras, a primeira é por fundição. Na fundição, o polímero é dissolvido em um solvente ou mistura de solventes até formar um gel, em seguida o LI é adicionado e a mistura é mantida sob agitação para homogeneizar, por fim o solvente é removido resultando no ionogel. Yang *et al.*[44] prepararam um ionogel utilizando o método de fundição para aplicação como eletrólito em baterias de lítio (Figura 8). Dissolvendo o polímero poli(fluoreto de vinilideno-hexafluoropropileno) (P(VdF-HFP)) em N-metil pirrolidona com posterior adição do LI bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-etil-3-metililidazólio e de um sal de lítio (bis(trifluorometilsulfonil)imida de lítio), seguido pela evaporação do solvente, o ionogel foi preparado. Os autores perceberam uma melhora na condutividade iônica e na janela eletroquímica, quando comparado com o gel sem LI. Similarmente, Liu *et al.*[45] prepararam um ionogel como eletrólito para aplicação em baterias de lítio com o mesmo procedimento de Yang *et al.*, porém modificaram o LI empregado.

Figura 8: Ionogel formado pelo método *doping* através da técnica de fundição.

A segunda maneira em que o método *doping* pode ser utilizado é por inchamento. Neste caso, uma membrana polimérica com microporos é preparada, sendo posteriormente saturada com o LI para preenchimento dos poros. Izák *et al.*[46] montaram um aparato experimental baseado em uma câmera digital de alta resolução, com o qual estudaram o inchamento de polímeros planos. Para isso, investigaram o inchamento de quatro diferentes membranas com três LIs, concluindo que a técnica é eficiente para o acompanhamento da cinética do inchamento das membranas, assim como o estudo do equilíbrio soluto/solvente no processo de absorção.

No método de polimerização *in situ*, um monômero dissolvido em um LI é polimerizado, aprisionando o LI em sua estrutura.[47] Noda e Watanabe[48] realizaram a polimerização do metacrilato de 2-hidroxietila em dois LIs diferentes, tetrafluoroborato de 1-butilpiridinio e tetrafluoroborato de 1-etil-3-metilimidazólio. Utilizando um iniciador radicalar, obtiveram um gel transparente com alta condutividade.

1.3.2 Ionogéis inorgânicos

As matrizes para preparação de ionogéis inorgânicos são compostas por partículas inorgânicas que podem ser dispersas no LI ou aplicando a técnica de sol-gel.[41]

Fukushima *et al.*[49] dispersaram nanotubos de carbono de parede simples (NTCPS) em [BMIM][BF_4]. Após a centrifugação para retirada do excesso de [BMIM][BF_4], um gel escuro foi formado pela reticulação física dos componentes. Outros LIs foram empregados, levando a diferentes ionogéis. Os NTCPS formam pacotes entrelaçados com vários fios, entretanto, os autores

observaram por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) que não ocorre o entrelaçamento no gel formado (Figura 9). Similarmente, Chen el al.[50] confinaram o LI hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio ([BMIM][PF_6]) em nanotubos de carbono com paredes multiplas (NTCPM), mantendo o LI e o NTCPM em banho de ultrassom a 90 °C para estudar o comportamento da cristalização do [BMIMPF_6] confinado no interior dos nanotubos.

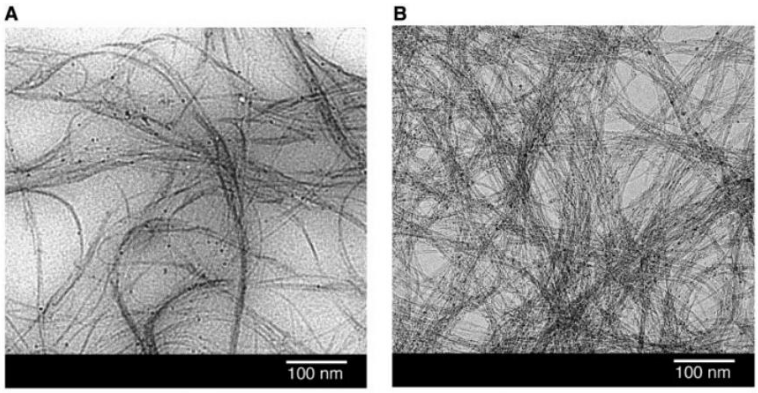


Figura 9: Imagem de TEM dos NTCPS A) no ionogel produzido a partir de [BMIM][BF_4] e B) após sonicação em etanol.[49]

O método sol-gel é amplamente aplicado na preparação de ionogéis, entretanto, devido à negligenciável pressão de vapor do LI, não ocorre a evaporação durante a policondensação e polimerização da matriz, garantindo o sinergismo do LI com a matriz. Este método pode ser dividido em dois processos: (i) o hidrolítico,[51,52] em que um ácido ou uma base podem ser aplicados como catalisadores, porém formam géis frágeis que são inadequados para aplicações que necessitam de boas propriedades mecânicas e (ii) o não hidrolítico,[53,54] que aplica ácidos, como o fórmico, glicólico, entre outros, como catalisador para formação dos ionogéis, produzindo géis transparentes com boa condutividade iônica. O trabalho de Dai *et al.*[55] foi o pioneiro no

desenvolvimento da técnica sol-gel não hidrolítico. Aplicando o LI como solvente, tetrametilortosilicato como precursor do sol-gel e ácido fórmico como catalisador, foi possível ampliar a produção de ionogéis com diferentes LI.

Dentre os materiais utilizados como matrizes, a sílica é o mais popular por sua área superficial, estabilidade mecânica e térmica.[56] Ueno *et al.*[57] prepararam um ionogel em que o LI 1-etil-3-metilimidazólio bis(trifluoronetilsulfonil)imida foi aprisionado em nanopartículas de sílica (Figura 10). Os autores estudaram as propriedades de transporte iônico, observando uma elevada condutividade proveniente da matriz interconectada formada pelas nanopartículas de sílica. Cheng *et al.*[58] também sintetizaram um ionogel a base de sílica e aplicaram como eletrólito para baterias de lítio.

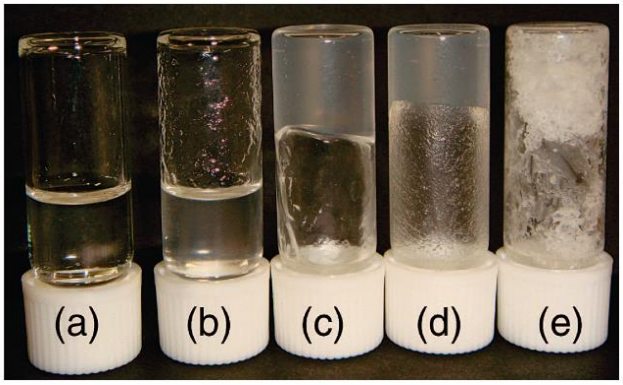


Figura 10: Dispersão das nanopartículas de sílica em [EMIM][NTf2] em diferentes concentrações: a) LI puro; b) 1% [m/m]; c) 3% [m/m]; d) 5% [m/m] e e) 15% [m/m].[57]

Apesar da sílica ser o material mais popular na preparação de ionogéis inorgânicos, outros óxidos também podem ser aplicados como o dióxido de titânio, dióxio de zircônio, óxido de alumínio, etc.[56]

1.3.3 Ionogéis híbridos

Este tipo de ionogel pode ser preparado de duas maneiras: i) gerando as cargas inorgânicas *in situ* via preparação pelo método sol-gel não aquoso. Neste método uma mistura do gelificador orgânico, LI e um precursor das cargas inorgânicas são misturados para posterior adição do ácido, como na preparação de ionogéis não hidrolíticos. ii) Incorporando as partículas inorgânicas na solução do gelificador orgânico com o LI.[38] O uso de uma matriz híbrida permite a produção de um material que comporta uma maior quantidade de LI, além de agregar estabilidade mecânica, flexibilidade e fácil moldagem.[59] As propriedades inerentes do LI são conferidas ao material, assim como o mesmo passa a atuar como compatibilizador entre as cadeias poliméricas apolares e as cargas inorgânicas polares.[41]

Li *et al.*[60] desenvolveram um eletrólito a base de ionogel híbrido para aplicação em baterias de lítio. O material foi preparado seguindo uma rota sol-gel não aquosa em que o polímero bis(trifluorometanosulfonil)imida de poli(dialildimetilamônio) foi dissolvido em acetona, seguido pela adição de uma mistura (Li-LI) do LI bis(trifluorometanosulfonil)imida de N-metoxietil-N-metilpirrolidínio com um sal de lítio (bis(trifluorometanosulfonil)imida de lítio). A carga inorgânica foi formada *in situ* pela adição de ácido fórmico (AF) e tetraetoxissilano (TEOS). Os autores perceberam que o aumento da quantidade da mistura de Li-LI resultava no aumento da condutividade iônica do ionogel, associando este fato à melhora do transporte dos íons. O aumento da quantidade de sílica também melhorou a condutividade iônica do material, isto ocorre porque o método de síntese sol-gel *in situ* forma uma matriz de sílica continua beneficiando a movimentação dos íons. Semelhantemente,

Khurana e Chandra[59] prepararam um ionogel híbrido em que o polímero P(VdF-HFP) foi dissolvido em acetona, acrescido da solução de eletrólito (Li-LI) que consiste do LI trifluorometanossulfonato de 1-etil-3-metilimidazólio ([EMIM][Tf]) com o sal de lítio (trifluorometanossulfato de lítio), finalizando com o TEOS e AF (Figura 11). O ionogel formado foi caracterizado utilizando várias técnicas como difração de raios-X e calorimetria exploratória diferencial, que revelaram tratar-se de um material mais amorfo que o polímero puro. A voltametria de varredura linear mostrou uma ampla janela de potencial eletroquímico e a análise termogravimétrica revelou que o material possuía estabilidade térmica.

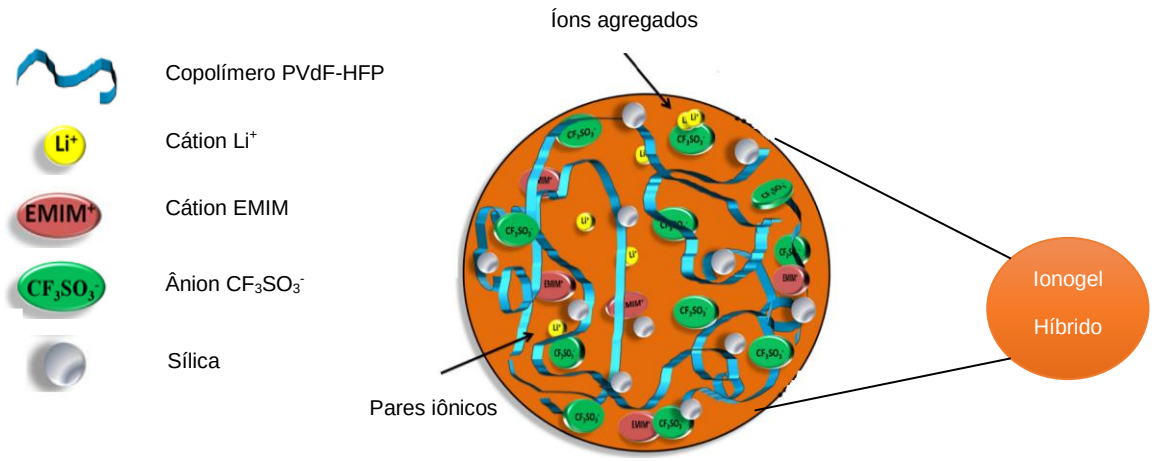


Figura 11: Ionogel híbrido a base de sílica e do copolímero PVdF-HFP com o LI EMIMTf e o sal de lítio LiTf.[59]

1.3.4 *Ion jelly*

Uma variação dos tipos de ionogéis discutidos até o momento foi desenvolvido por Vidinha *et al.*[61] e intitulado *Ion Jelly* (IJ). Este novo material foi

preparado, utilizando um biopolímero (gelatina) como matriz para confinar o LI. Segundo Carvalho *et al.*,[25] o IJ apresenta diversas características que se adequam aos princípios da química verde, como o uso de solvente inócuo (água), redução de subprodutos, economia de energia, pelo fato de ser produzido em temperatura relativamente baixa (35 °C) e pressão atmosférica, inerentemente seguro na prevenção de acidentes e não utiliza substâncias perigosas. Ainda podemos acrescentar a fácil preparação e baixo custo da gelatina.

Os trabalhos publicados com este tipo de material focaram no uso em dispositivos eletroquímicos e até mesmo como membrana de separação.[61–64] Porém, em 2014, tanto IJ como ionogéis inorgânicos começaram a ser aplicados como camada sensível em sensores de gás e nariz eletrônico.[65,66]

1.4 Sensores de gás e nariz eletrônico

O olfato foi por muito tempo o mais enigmático sentido do ser humano. Como consegue distinguir cerca de 10 mil odores e guardá-los na memória, de modo a recordar quando sente o mesmo odor anos depois? Linda Buck e Richard Axel ganharam o Prêmio Nobel em Fisiologia/Medicina em 2004 por ajudar a entender o funcionamento do sistema olfativo humano e associá-lo a memórias por meio do trabalho "*Odorant receptors and the organization of the olfactory system*".[67]

Na busca por mimetizar o sistema olfativo humano surgiu o nariz eletrônico, um sistema composto por um arranjo de sensores de gás que ao interagir com voláteis resulta na mudança de uma ou mais propriedades físico-químicas do material que é traduzida em um sinal elétrico. Quando acoplados a

um sistema de reconhecimento de padrões, os sensores são capazes de identificar, classificar e até quantificar voláteis de uma determinada amostra (Figura 12).[68,69] Os compostos orgânicos voláteis (VOC's) interagem com a superfície dos sensores por diversos mecanismos, podendo ser por adsorção, absorção, quimissorção ou coordenação. O mecanismo de interação dos sensores com os VOC's deve ser levado em consideração, pois é desejável que o sensor de gás seja confiável, sensível, robusto, seletivo e reversível. Caso a interação entre o volátil e o sensor seja muito forte, afetará a reversibilidade do sensor, ou se a interação for muito fraca, o sensor não será seletivo.[70] Assim, o sensor de gás aplicado ao nariz eletrônico deve ter uma parcial seletividade a voláteis, para que o conjunto dos sensores produza uma resposta cruzada que será a impressão digital de cada VOC analisado.

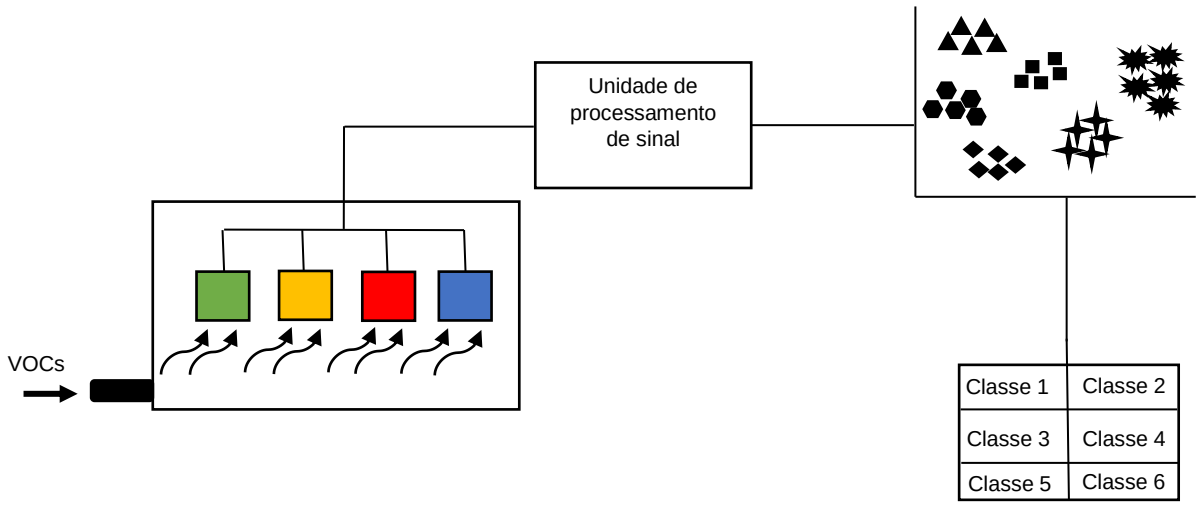


Figura 12: Esquema geral de um nariz eletrônico composto por quatro sensores de gás, uma unidade de processamento de sinal e uma análise multivariada dos voláteis.

O primeiro trabalho relacionado à identificação de voláteis foi publicado por Moncrieff em 1961.[71] Wilkens e Hatman[72] em 1964 desenvolveram o primeiro nariz eletrônico empregando oito células eletroquímicas que responderam diferentemente à exposição de diferentes amostras. Em 1982, Persaud e Dodd[73] publicaram um trabalho em que mimetizaram o sistema olfativo dos mamíferos com um arranjo de multisensores de gás semicondutores, mostrando que não é necessária a utilização de receptores altamente específicos para discriminação de vários odores. Além disso, este foi o primeiro trabalho que utilizou o conceito de reconhecimento de padrões para análise das respostas, cunhando pela primeira vez a expressão "*electronic nose*". Com o desenvolvimento da eletrônica, da computação e da química sensorial o nariz eletrônico passou a ser discutido em workshops e conferências,[74] ocorrendo o primeiro encontro especificamente para tratar deste tópico em 1991.[75] A definição do conceito foi feita por Gardner e Bartlett[76] em um artigo de revisão, sendo aceita até hoje. Neste artigo os autores afirmam que:

"Nariz eletrônico *é um instrumento que compreende uma matriz de sensores químicos com parcial especificidade e apropriado sistema de identificação, capaz de reconhecer odores simples e complexos*."

Nos últimos anos um grande número de trabalhos relacionados a nariz eletrônico foram publicados.[70,77,78] Esta tecnologia está sendo amplamente aplicada em diagnóstico de doenças,[79] monitoramento de alimentos,[80,81] controle do meio ambiente,[82] detecção de bactérias,[83] cuidados médicos,[84]

segurança aduaneira,[85] dentre outras.[86] Pesquisadores têm aprimorado esta tecnologia, buscando novas aplicações, pois comparado aos métodos tradicionais como espectrometria de massas, o nariz eletrônico apresenta baixo custo, análise em tempo real, resposta rápida e operação fácil.[87–89]

1.4.1 Materiais usados como camada sensível

1.4.1.1 MOS

O material mais utilizado como camada sensível em sensores de gás são os óxidos metálicos semicondutores (MOS) por possuírem elevada sensibilidade, rápido tempo de resposta e recuperação, além de poder ser dopado com diversos metais nobres (como Ni, Pd e Pt) para aprimorar a seletividade.[70] Estes materiais quando expostos a gases apresentam uma mudança na resistência elétrica.[90] Sanaeifar *et al.*[91] estudaram o amadurecimento de bananas utilizando um nariz eletrônico a base de seis MOS. Nesse trabalho foram avaliados os índices de qualidade de amadurecimento e senescência de bananas, relacionando as respostas dos sensores aos sólidos totais solúveis, acidez, pH e firmeza. Os sensores trabalhavam em temperaturas entre 300 – 500 °C, com período de exposição de 180 s e período de recuperação de 80 s com um fluxo de 1,31 L/min. Aplicando um método de análise multivariada (*Linear Discriminant Analysis* – LDA, este método e outros serão discutidos no próximo tópico) e um nariz eletrônico de baixo custo, os autores estabeleceram uma relação entre os índices de qualidade da banana em cinco estágios de amadurecimento e quatro de senescência com as respostas dos sensores utilizando uma técnica não destrutiva (Figura 13).

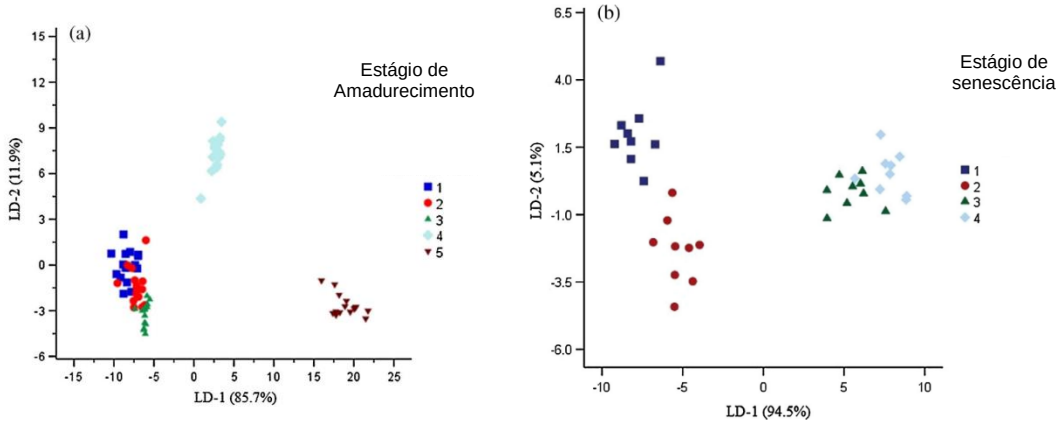


Figura 13: LDA do estágio de amadurecimento das bananas com os dias de estoque em A) e senescências em B).[91]

Gancarz *et al.*[92] estudaram a qualidade de colza durante um período de estocagem de 31 dias, analisando os VOCs produzidos pelo crescimento de culturas de fungos durante a estocagem. Aplicando um nariz eletrônico a base de oito MOS e análise multivariada, foi possível separar quatro grupos das amostras de colza estudadas: amostra controle, microflora de campo (1 – 11 dias de estoque), microflora de campo e início de microflora de armazenamento (12 – 19 dias de estoque) e microflora de armazenamento (20 – 31 dias de estoque). Apesar de aplicarem oito sensores, apenas seis apresentaram resposta quando expostos aos VOCs das amostras. Uma aplicação envolvendo a indústria de bebidas foi feita por Siadat *et al.*[93] Neste trabalho, cinco MOS foram utilizados para construir um nariz eletrônico com o qual bebidas alcoólicas e não alcoólicas foram diferenciadas.

Nos últimos anos, estudos têm aprimorado este tipo de material para sensores de gás, trabalhando em escala nanométrica, melhorando a eficiência energética e uniformidade térmica.[94] Porém, a alta temperatura de operação e correspondente consumo de energia ainda são limitantes.

1.4.1.2 Polímeros condutores

Alternativamente aos MOS, os polímeros condutores (CP) são amplamente aplicados em sensores de gás e nariz eletrônico. Esses materiais levaram os pesquisadores Shirakawa, McDiarmid e Heeger[95] a ser agraciados com o prêmio Nobel de química em 2000 por sua descoberta. Os CP apresentam algumas vantagens em relação aos MOS como operar a temperatura ambiente, maior variedade de funcionalizações para ajuste de propriedades físicas e químicas, além de sensibilidade a um número maior de voláteis.[96]

Henrique *et al.*[97] sintetizaram um novo CP poli(9,9-n-dioctil-2,7-fluorenilenovinileno-alt-4,7-dibenzotiadiazol-2,5-tiofeno), que dopado com diferentes porfirinas geraram três sensores de gás que foram aplicados como camada sensível em um nariz eletrônico. As porfirinas empregadas na dopagem do CP possuíam o mesmo núcleo, sendo efetuadas pequenas mudanças estruturais, que foram suficientes para causar diferentes respostas elétricas quando os sensores foram expostos aos voláteis. Os autores aplicaram o nariz eletrônico na diferenciação de três tipos de tabaco (Burley, Flue Cured e Oriental), obtendo a completa separação dos tipos de tabaco estudados. O estudo foi ampliado para distinção de oito marcas de cigarros que foram identificadas com sucesso pelo nariz eletrônico (Figura 14).

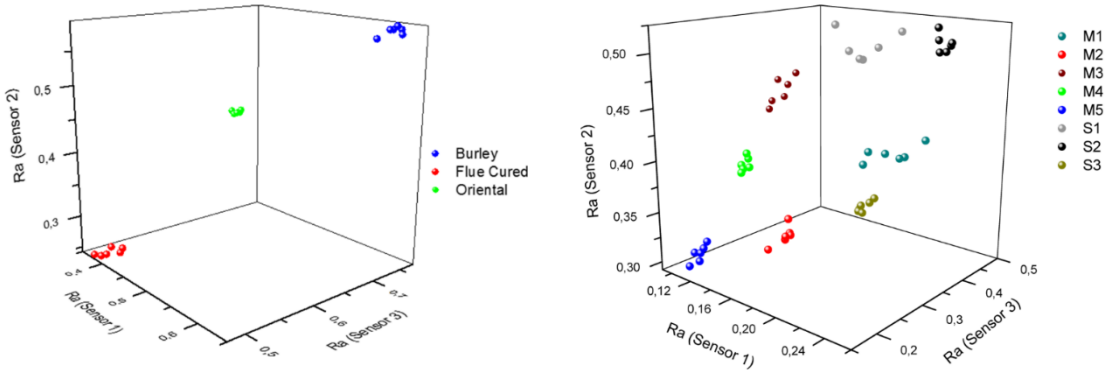


Figura 14: Distinção de três tipos de tabaco em A) e de oito marcas de cigarros (Marlboro Silver - M1; Marlboro Gold - M2; Marlboro - M3; Marlboro Blue Ice – M4; Marlboro Fresh Mint – M5; Dunhill – S1; Lucky Strike – S2 e Derby – S3) em B).[97]

Considerando a problemática da exploração de árvores ameaçadas de extinção, que podem ser confundidas com árvores que a exploração é legalizada, Cordeiro et al[98] sintetizaram quatro CPs e aplicaram em um nariz eletrônico para diferenciação de dois pares de madeiras: i) Mogno (*Swietenia macrophylla*) e cedro espanhol (*Cedrela fissilis*); ii) Imbuia (*Ocotea porosa*) e Canela (*Ocotea catharinensis*). Esses dois pares podem ser confundidos pela fiscalização, deixando passar madeira extraída de forma ilegal. Os autores foram capazes de separar os dois pares, além de ser perceptível a maior separação entre Mogno e Cedro espanhol do que entre Canela e Imbuia. Como essas últimas pertencem ao mesmo gênero, os compostos voláteis de ambas madeiras são similares. Vale ressaltar que os sensores demonstraram boa reversibilidade e possibilidade de reutilização.

Embora a utilização de CP em sensores de gás e nariz eletrônico tenha muitas vantagens, este tipo de material apresenta algumas limitações como: i) sensibilidade à umidade, podendo mascarar as respostas dos voláteis das amostras; ii) síntese e polimerização mais trabalhosa; iii) variação na resposta

de polímeros feitos em dias diferentes e iv) tempo de vida menor quando comparados aos MOS.[70,78]

1.4.1.3 Ionogel

Apesar de os materiais mais utilizados em sensores de gás e em nariz eletrônico serem MOS e CP, que formam sensores quimiorresistívos, outros tipos de sensores também podem ser encontrados na literatura como sensores ópticos[99] e piezoelétricos.[100]

Os LIs, como mencionado anteriormente, possuem a condutividade iônica como uma de suas propriedades, sendo esta explorada em diversos estudos eletroquímicos. Esta propriedade também chamou a atenção para a aplicação dessa classe de compostos em sensores de gás. Evenberg *et al.*[101] construíram um sensor eletroquímico baseado em camadas finas de LI como eletrólito. Este sensor foi capaz de detectar etileno, substância liberada durante o processo de amadurecimento de frutas. O controle dessa substância é importante no monitoramento da qualidade das frutas. Os autores conseguiram um limite de detecção de 760 ppb e resposta linear de até 10 ppm, mostrando que os LIs podem ser aplicados para detecção de gases.[102] Contudo, uma limitação na aplicação de LI em dispositivos eletrônicos, incluindo sensores de gás, é seu estado físico, que dificuldade a deposição dessa classe de compostos em eletrodos ou outros componentes. Como descrito anteriormente, os ionogéis são uma alternativa para a imobilização dos LIs em uma matriz sólida que mantém as propriedades do LI e permitem a aplicação para diversas finalidades.

Os primeiros trabalhos aplicando ionogéis em nariz eletrônico foram publicados em 2014. Carvalho *et al.*[66] utilizaram os IJs como camada sensível

em um nariz eletrônico inédito que foi construído com quatro sensores preparados a partir de diferentes LIs confinados em gelatina e depositados sobre eletrodos interdigitados. Os sensores foram capazes de detectar e classificar oito solventes distintos (orgânicos, inorgânico, polares e apolares), até mesmo os que possuíam estruturas químicas semelhantes, como etanol e metanol (Figura 15). Os autores destacaram que os IJs apresentaram baixo tempo de resposta (5s), rápida recuperação (65s), alta sensibilidade, repetibilidade, baixo custo, fácil preparação, operação a temperatura ambiente, além de ser durável, sendo utilizados em um período de três meses e continuarem respondendo perfeitamente.

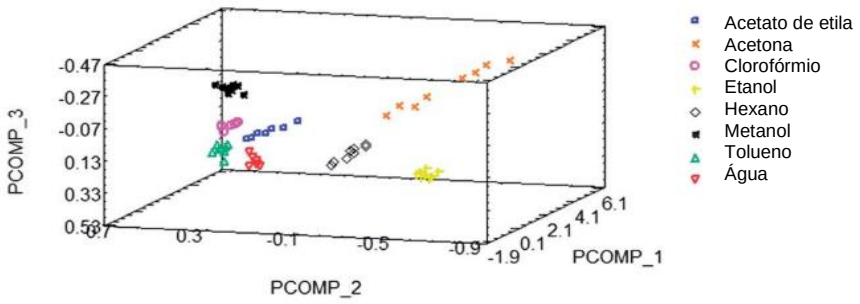


Figura 15: PCA mostrando a separação dos solventes analisados com os quatro ionogéis.[66]

Concomitantemente, Zhu *et al.*[65] construíram, a partir de nove ionogéis inorgânicos aplicando sílica como matriz, um nariz eletrônico para distinguir sete solventes orgânicos. Nesse trabalho os autores observaram por análise termogravimétrica (TGA) que a temperatura de decomposição dos LIs confinados era menor que os mesmos livres, indicando que a interação entre o cátion e o ânion do LI diminuiu com o confinamento, podendo sugerir que as propriedades físicas dos LIs estejam mais vulneráveis a mudanças com a

absorção de voláteis. Além disso, a condutividade dos sensores aumentou quando expostos aos VOC's devido a diminuição da viscosidade dos LIs que faz com que a mobilidade dos íons aumente, ocorrendo assim, o aumento da condutividade dos ionogéis. As respostas dos sensores ainda apresentaram linearmente com a pressão de vapor relativa dos VOC's em uma faixa de 10 – 50% de saturação, mostrando que além da detecção e distinção dos voláteis é possível fazer a quantificação (Figura 16). Selecionando um dos sensores, os autores mostraram a reprodutibilidade das medidas do ionogel, que manteve praticamente a mesma resposta relativa em cinco dias de medidas e a estabilidade dos sensores, que após cinquenta dias de estoque ainda responderam, apesar de ter uma redução na intensidade.

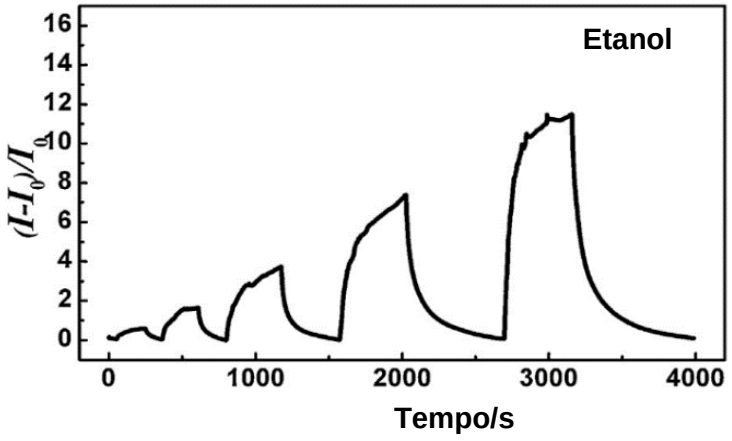


Figura 16: Resposta relativa do sensor em função do tempo a diferentes concentrações de etanol.[65]

1.5 Análise multivariada

Nos tópicos anteriores discutiu-se sobre a definição de nariz eletrônico e a seleção dos tipos de materiais que podem ser aplicados como camada sensível. Porém, após a leitura de um conjunto de amostras, o que se faz com esses dados? Como a variação da resistência e/ou condutância dos sensores

ao interagir com diferentes voláteis ajuda a diferenciar uma amostra da outra? Para responder estas questões, esta seção tratará da extração de dados e reconhecimento de padrões, etapa crucial que, dependendo do método escolhido, pode melhorar ou piorar a discriminação das amostras.

1.5.1 Extração de dados (pré-processamento)

Como mencionado anteriormente, a interação entre os voláteis de uma amostra e os sensores de um nariz eletrônico produz uma “impressão digital” da amostra. Esta impressão digital é composta por um conjunto de respostas provenientes de todos os sensores, e sua construção é feita mediante a escolha de um método que será responsável pela extração dessa informação. Existem vários métodos de extração de dados e de maneira geral pode-se dividi-los em três: o primeiro tipo utiliza as respostas originais dos sensores, como a resposta relativa (Ra), integrais das curvas, primeira derivada, segunda derivada, etc. O segundo tipo é baseado no ajuste da curva gerada pelos sensores, extraindo um conjunto de parâmetros de acordo com o modelo aplicado. O terceiro utiliza algumas transformações como a *fast Fourier transform* e *discrete wavelet transform*.[77] O primeiro tipo, que utilizam os dados de saída dos sensores, será discutido a seguir.

Os diferentes métodos fornecem informações distintas sobre a interação dos voláteis com os sensores. Com a Ra/fractional difference, por exemplo, é possível linearizar a resposta dos sensores com a concentração da amostra. Caso ocorra uma variação acentuada da concentração durante as medidas, o logaritmo da diferença é um método mais adequado, pois consegue relacionar estas variações de concentração com os dados de saída. Além disso, alguns

parâmetros possuem significado físico, como a primeira derivada que fornece a velocidade de interação dos odores com o sensor, a segunda derivada mostra a taxa de aceleração do processo.[103] A tabela 3 apresenta alguns parâmetros que podem ser extraídos das respostas dos sensores.

Tabela 3: Métodos de tratamento de dados.

Modelo	**Descrição**
Diferença	$X_{ij} = V_{ij}^{max} - V_{ij}^{min}$
Diferença relativa	$X_{ij} = V_{ij}^{max} / V_{ij}^{min}$
Resposta relativa	$X_{ij} = (V_{ij}^{max} - V_{ij}^{min}) / V_{ij}^{min}$
Logaritmo	$X_{ij} = \log(V_{ij}^{max} / V_{ij}^{min})$

1.5.2 Seleção de classificadores

Algoritmos de classificação são amplamente utilizados. Quando se assiste um vídeo no Youtube e aparecem sugestões de vídeos similares, são algoritmos que identificam o padrão dos vídeos que se está vendo. Quando se compra um livro e aparecem sugestões de títulos similares, é um algoritmo que faz a identificação dos padrões de leitura do cliente. Ao trabalhar com nariz eletrônico, queremos fazer a identificação e discriminação de diferentes amostras que podem apresentar, características semelhantes, como no trabalho de Esteves *et al.*[97] em que diferentes tipos de tabaco foram discriminados, ou como Cordeiro *et al.*[98] que distinguiram os tipos de madeiras. Para realizar esta diferenciação, podem-se utilizar diferentes tipos de algoritmos que conseguem separar os dados de uma variedade de amostras, que são inseridos como entrada do programa, em grupos, segundo suas similaridades. Esses algoritmos são chamados de métodos de aprendizagem e podem ser classificados como: aprendizagem supervisionada, não-supervisionadas, semi-supervisionadas e por reforço. Os métodos de

aprendizagem aplicados em nariz eletrônico estão focados na aprendizagem supervisionada e não-supervisionada.

A aprendizagem supervisionada consiste em determinar rótulos para os dados que estão sendo inseridos no programa, com a finalidade do algoritmo separar os dados conhecidos e definir o grupo que um rótulo desconhecido pertence. Aprendizagem não supervisionada, busca associar os dados de acordo com a similaridade em grupos, sem conhecimento prévio dos rótulos que estão sendo trabalhados.[104]

Os algoritmos aplicados na diferenciação e classificação de grupos são separados em diferentes categorias, dependendo do tipo de equação matemática e/ou teorema que são escritos. Alguns destes classificadores são árvores de decisão, como *Random Forest* (RF) e *Logistc Model Tree* (LMT), outros são baseados em probabilidade, como o *Bayes Network*, temos redes neurais, como *MultiLayer Perceptron* (MLP), por instâncias, como vizinhos mais próximo (*K-Nearest Neighbors*, KNN), classificadores de agrupamento como, análise dos componentes independentes (ICA), dente outros.[105]

Os classificadores que utilizam o método não supervisionado, são amplamente aplicados nas pesquisas em nariz eletrônico.[106] O PCA, particularmente, é o método aplicado na maioria dos trabalhos. Isto acontece porque, como exposto no tópico anterior, existem vários métodos para a extração de dados dos sensores e quando se trabalha com mais de três sensores ou com muitas características diferentes, não é possível uma representação gráfica desse volume de dados no espaço tridimensional. Com o PCA é possível reduzir a dimensionalidade com a mínima perda de informação.[79] Além disso, os dados gerados pelo PCA podem ser plotados e

agrupados por similaridade, e se os grupos forem corretamente separados, a aplicação de métodos mais sofisticados levará a uma melhor separação. Porém, caso os grupos não sejam separados, é uma indicação que as características de diferentes classes são semelhantes e a diferenciação é mais difícil.

Assim o PCA é um método que fornece um resultado preliminar da separação dos grupos estudados e, muitas vezes, é utilizado como única ferramenta na diferenciação do objeto de estudo. Porém, a aplicação de diferentes classificadores ajuda a confirmar o resultado gerado no PCA, além de mostrar que as características utilizadas na classificação são robustas e podem ser otimizadas e/ou replicadas em outros métodos.

Outro método bastante utilizado, além do PCA, é o LDA. Diferente do PCA que faz o reconhecimento dos padrões de acordo com as características dos dados, o LDA utiliza a informação de cada grupo previamente rotulado para realizar a discriminação das classes e promover previsões. Em muitos casos de reconhecimento de padrão de voláteis, o LDA apresenta melhor desempenho que o PCA.

1.5.3 Métodos de validação cruzada

Esta é a última etapa da análise estatística de um conjunto de dados medido por um nariz eletrônico. Como mencionado, a partir do PCA é possível gerar um gráfico onde é observado a separação ou sobreposição das classes, contudo, para saber o quanto esta separação representa a realidade, é necessário a aplicação de algum método de validação para dar suporte ao que

é observado graficamente. Isto não é feito apenas com o PCA, mas com qualquer classificador empregado na análise dos dados.

A técnica de validação cruzada consiste em dividir o conjunto de dados em dois ou mais subconjuntos, onde um será o subconjunto de treinamento e o outro o subconjunto de teste.[107] Alguns métodos de validação cruzada são K-*Fold*, *Leave-One-Out* e *Hold-Out*.

A validação cruzada K-*Fold* divide os dados em K subconjuntos e todos os subconjuntos são usados para treinamento e para teste.[108] Para ficar mais claro, vamos supor que um nariz eletrônico hipotético tenha sido exposto a odores de 10 tipos de chás, fazendo 10 medições para cada tipo, totalizando 100 registros. Utilizando um K=10, são formados 10 subconjuntos com o mesmo número de medidas em cada. O K-*Fold* utilizará 9 subconjuntos para fazer o treinamento dos dados e o subconjunto que ficou de fora é utilizado para o teste, verificando se a classificação das medidas que estavam no subconjunto de testes é realizada corretamente. Este mecanismo ocorre com todos os subconjuntos, fazendo com que todos sejam subconjunto de treinamento e de teste, gerando então um percentual de acerto do classificador escolhido.

O *Leave-One-Out* funciona de maneira semelhante ao K-*Fold*,[109] entretanto, o K nesse caso seria igual ao número de medidas feitas pelo nariz eletrônico. Voltando ao exemplo anterior, empregando esta técnica de validação cruzada, 99 registros seriam usados para treinamento e apenas 1 registro seria usado para o teste. Após o treinamento, a medida que ficou de fora é classificada verifica-se se foi corretamente atribuída ou não. Isto se repete 100 vezes, todas as medidas são usadas como subconjunto de teste e

cada subconjunto possui apenas uma medida. Este método consome um maior custo computacional, tendo em vista que para o K-*Fold* são feitas 10 repetições. Caso a quantidade de dados seja pequena, o tempo e custo de máquina não é muito expressivo, porém à medida que o conjunto de dados aumenta, pode se tornar inviável.

Na validação com *Hold-Out*,[110] os dados são divididos em dois subconjuntos, que são usados para treinamento e para teste. Neste caso, os subconjuntos de treinamento e de teste são fixos, ocorrendo o processo de validação apenas uma vez.

1.6 Aplicação de nariz eletrônico em Mel

O mel é um importante produto, utilizado em uma variedade de aplicações, seja como fitoterápico, adoçante ou para ser ingerido *in natura*. Este produto é composto majoritariamente de açúcares e água, que são 95% de sua composição. Os compostos que constituem os outros 5% da composição são nutrientes, como enzimas, aminoácidos, minerais, aromatizantes e numerosos compostos orgânicos voláteis, sendo os responsáveis pelas propriedades organolépticas e nutricionais.[111]

As propriedades de aroma do mel dependem da origem floral, localização geográfica, tipo de abelha e temperatura de estocagem. A partir da análise dos VOCs é possível identificar a origem geográfica do mel e diferenciar méis de diferentes floradas.[112] Uma preocupação relacionada a comercialização deste produto está no controle de qualidade. Fabricantes adicionam variações de açúcares ao mel puro, enganando consumidores e dificultando a diferenciação do mel puro de uma falsificação. Os métodos

tradicionais de identificação de fraude consistem em análises qualitativas que variam com o tipo de florada.[113]

O nariz eletrônico aparece como uma alternativa para identificação de adulterações de mel, apesar da pequena quantidade de trabalhos na literatura. Zakaria *et al.*[114] utilizaram um nariz eletrônico e uma língua eletrônica para diferenciação de méis de diferentes floradas, assim como a detecção de adulterações. Para este estudo foram utilizadas amostras de méis provenientes da Malásia (seis amostras de méis monoflorais e quatro méis poliflorais), Nova Zelândia (quatro amostras de méis monoflorais), duas adulterações induzidas e os dois açúcares utilizados como adulterantes. Inicialmente, o nariz eletrônico foi aplicado para diferenciar as diferentes categorias de méis (monoflorais-Malásia, monoflorais-Nova Zelândia e poliflorais-Malásia), das adulterações e dos adulterantes. Aplicando PCA e LDA como análise multivariada, os autores perceberam que o LDA apresentou melhor desempenho na classificação das amostras, separando tanto as amostras de méis monofloral-Malásia entre si e das adulterações, assim como as amostras de méis monoflorais-Nova Zelândia entre si e das adulterações. O PCA diferenciou apenas os méis das adulterações. Quando aplicaram o mesmo método para as amostras de méis poliflorais-Malásia, o resultado foi semelhante. As amostras de mel puro foram separadas das amostras adulteradas e das amostras dos adulterantes puros.

A aplicação da língua eletrônica mostrou resultados semelhantes em relação à utilização de PCA e LDA, porém as amostras foram melhor separadas quando utilizado o nariz eletrônico. Os pesquisadores fundiram os dados extraídos das duas técnicas e utilizaram LDA para fazer a classificação

de todas as amostras em um mapa global. Empregando *leave-one-out,* a acurácia da classificação alcançou 100% para separação das cinco classes.

Subari *et al.*[115] estudaram um método para diferenciação de dez diferentes marcas de mel Tualang puro, provenientes da Malásia e Indonésia, de adulterações induzidas com soluções de açúcares (açúcar de beterraba e cana-de-açúcar), reduzindo a concentrações de mel puro gradualmente (80%, 60%, 40%, 20% e 0%). Duas técnicas foram aplicadas para diferenciação dos méis: i) nariz eletrônico e ii) infravermelho (FITR). Os dados gerados pelas duas técnicas foram pré-processados, utilizando as respostas relativas ou os dados normalizados. O PCA e LDA foram os classificadores escolhidos para realizar a classificação dos méis. Primeiramente, os dados extraídos do nariz eletrônico foram submetidos a redução de dimensionalidade e agrupamento pelo PCA, sendo observado o agrupamento dos dados do mel puro, porém houve sobreposição com as adulterações. O LDA apresentou melhor separação entre o mel puro e as adulterações com 76,5% de acurácia, mas as diferentes concentrações de adulteração formaram um grande aglomerado de pontos, não ocorrendo a diferenciação entre elas. Quando os dados extraídos do FITR foram utilizados, a análise com PCA foi semelhante ao resultado quando empregado o nariz eletrônico, porém o LDA alcançou maior acurácia, com 88%. Além disso, houve uma separação entre os grupos de acordo com o grau de adulteração, apesar da adulteração com 80% de mel feita com ambos os açúcares sobrepor com o mel puro. Observando que o LDA apresentava melhor desempenho do que o PCA, os pesquisadores fundiram os dados extraídos nas duas técnicas e utilizaram o LDA para avaliar a capacidade de separação dos grupos. Nesse caso, a acurácia alcançada chegou a 92,2%.

1.7 Detecção de parvovirose canina

O primeiro relato de parvovirose canina (CPV) ocorreu nos EUA nos anos de 1970, sendo disseminada para outros continentes.[116,117] O parvovírus canino original (CPV-2), causador da doença, sofreu mutações genéticas, dando origem a novas cepas (CPV-2a e CPV-2b) nos anos de 1980 e posteriormente, na Itália, uma terceira variação do vírus surgiu nos anos 2000 (CPV-2c).[118–120] A doença causa gastroenterite hemorrágica, e possui um alto índice de mortalidade, atingindo principalmente cães jovens, além de ser altamente contagiosa.[121,122]

Os sinais clínicos apresentados pelos cães não é suficiente para o diagnóstico da doença, pois outros patógenos podem causar diarréia e vômito, sendo necessário o uso de testes laboratoriais para confirmação da doença.[123,124] Os métodos convencionais para detecção do parvovírus são ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA),[125,126] imunocromatografia (IC)[127,128] e hemaglutinação (HA),[129,130] porém são métodos com sensibilidade relativamente baixa.[131] Métodos com maior acurácia e seletividade foram desenvolvidos como isolamento do virus,[116,127] reação em cadeia da polimerase (PCR)[132,133] e PCR em tempo real,[134,135] porém são técnicas que demandam tempo, são trabalhosas e/ou com alto custo na obtenção dos equipamentos e reagentes.[131] Na busca do aprimoramento no diagnóstico, pesquisadores têm buscado alternativas com maior acurácia, porém são técnicas complexas e/ou que necessitam de equipamentos de alto custo.[131,136–138]

Diversos trabalhos aplicando o nariz eletrônico no diagnóstico de doenças no âmbito animal já foram publicados na literatura, mostrando a robustez dessa tecnologia.[139–142] Fend *et al.*[139] aplicaram o nariz eletrônico no

diagnóstico de tuberculose em texugos e vacas. Fazendo uso de 14 sensores a base de CP e métodos de análise multivariada, os autores diagnosticaram a doença nas amostras dos animais infectados após a terceira semana, podendo acompanhar o tempo de infecção com o nariz eletrônico. Cramp *et al.*[140] detectaram miíase em ovelhas utilizando um nariz eletrônico composto por seis sensores a base de MOS. Os autores detectaram a doença dentro das primeiras horas, acompanhando a evolução nos três dias seguintes.

Peled *et al.*[143] desenvolveram um estudo em que 22 amostras de respiração de gado foram coletadas na tentativa de identificar os que estavam infectados com *Mycobacterium bovis,* bactéria responsável pela transmissão da tuberculose. De modo geral, dois grupos foram formados com oito animais infectados no primeiro conjunto e 14 animais saudáveis no segundo. Aplicando a técnica de espectrometria de massas, os VOCs exalados na respiração dos animais foram identificados e dois compostos foram associados aos animais infectados (2,3-dimetil-1,3-pentadieno e 1,3-dimetilbutil-cicloexano), e outros dois aos animais saudáveis (ácidos octadecanóico e hexadecanóico). Seis filmes quimiorresistivos de nanopartículas de ouro com diferentes funcionalizações foram empregados como camada sensível em um nariz eletrônico. Utilizando métodos multivariados, todos os animais infectados foram identificados, enquanto 21% dos animais saudáveis foram classificados erroneamente. Wlodzimirow *et al.*[142] aplicaram um nariz eletrônico comercial que utiliza oito sensores a base de MOS e um sensor de CO_2 adaptado, para detectar de maneira precoce insuficiência hepática aguda (IHA) em ratos a partir dos VOCs exalados na respiração dos roedores. Quatorze ratos foram utilizados, sendo que cada rato foi seu próprio controle. A IHA foi induzida nos

roedores e o nariz eletrônico foi utilizado para detectar os voláteis da respiração dos ratos. Utilizando PCA, os autores detectaram a IHA após 3h de seu início, considerando os dados do sensor de CO_2, esse tempo foi reduzido para 2 h. A acurácia alcançada com o método foi de 96%.

O nariz eletrônico é uma tecnologia eficiente e importante, porém sua aplicação em diagnóstico ou detecção de patógenos em cães é escassa. Neste trabalho apresentamos um primeiro nariz eletrônico aplicado à detecção de parvovirose em amostras de fezes de cães.

1.8 Aplicação de nariz eletrônico para detecção de bactérias

Microrganismos estão no cotidiano e muitas vezes são a causa de enfermidades devido à ingestão de alimentos e bebidas contaminados, contato com pessoas infectadas ou negligência com a higiene pessoal. Devido à preocupação com a saúde individual e pública, a rápida, confiável e eficiente determinação da presença/ausência de microrganismos e, se possível, sua quantificação é um dos principais objetivos para a medicina humana e animal, além de uma importante preocupação para as indústrias de alimentos, farmacêuticas e de produtos para cuidados pessoais.[144] Focando no estudo de bactérias, as infecções e intoxicações provenientes de bactérias que contaminam alimentos tem aumentado ao redor do mundo e a rápida detecção do patógeno é crucial para delimitar um tratamento adequado.[145] Apesar do desenvolvimento da microbiologia nas últimas décadas, as técnicas usuais ainda apresentam vários inconvenientes, como ensaios trabalhosos, longos tempos de análise e riscos de contaminação.[146] Atualmente, estas desvantagens podem ser superadas por algumas ferramentas modernas como

Matrix-Assisted Laser desorption/Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF),[147,148] *Polymerase Chain Reaction* (PCR),[149] *Scanning Electron Microscope* (SEM),[150] e *Hyperspectral Chemical Imaging* (HIS).[151] Contudo essas técnicas são caras e necessitam de profissionais especializados e infraestrutura, impossibilitando o uso em laboratórios de rotina.

Organismos microbianos geram VOCs específicos como subprodutos de seu metabolismo natural. Esta complexa mistura de gases pode ser analisada por um nariz eletrônico, estabelecendo um perfil padrão, relacionando a composição dos voláteis ao organismo microbiano, podendo ser usado para diferenciá-lo de outros organismos. Este conceito é aplicado para discriminação de fungos e bactérias em frutas, vegetais, bebidas, carnes e outros alimentos processados, como produtos *in natura* ou após enriquecimento microbiano, e consequentemente a utilização de nariz eletrônico.[88,152]

O primeiro relato do uso de nariz eletrônico na identificação de microrganismos foi feita por Claven *et al.*[153] em 1994. Um nariz eletrônico composto por quatro sensores comerciais feitos à base de MOS foi aplicado na identificação de seis bactérias patogênicas (*Clostridium perfringens, Proteus, Haemophilus influenzae, Bacteroides fragilis, Oxford staphylococcus* e *Pseudomonas aeruginosa*), cultivadas no meio de cultura ágar sangue. Os dados foram treinados em uma rede neural e o nariz eletrônico foi capaz de classificar corretamente apenas 62% das medidas. Em 1997, Gibson *et al.*[154] publicaram um estudo em que, considerando trabalhos prévios da literatura sobre os tipos de voláteis emitidos por microrganismos, desenvolveram 16 sensores de gás quemiorresistivos a base de CP para construção de um nariz eletrônico que respondesse aos grupos funcionais dos voláteis emitidos pelos

microrganismos, sendo aplicado na classificação de 12 bactérias e uma levedura patogênica cultivadas em placas com ágar (Tabela 4). De modo geral, a taxa de classificação das bactérias foi de 93,4%, com a classificação individual variando de 66,7 – 100%. Considerando a sensibilidade dos CP a umidade, vapor de água foi testado como espécie volátil, apresentando uma resposta menor que os voláteis das amostras estudadas, não afetando as medidas desde que levado em consideração esta influência.

Tabela 4: Bactérias e levedura diferenciadas pelo nariz eletrônico de Gibson com suas respectivas acurácias.[154]

Número	Organismos	Nº de amostras	Taxa de acerto (%)
1	*Escherichia coli*	28	85,7
2	*Pseudomonas aeruginosa*	36	91,5
3	*Citrobacter freundii*	48	100,0
4	*Enterobacter aerogenes*	10	70,0
5	*Bacillus cereus*	12	100,0
6	*Klebsiella aerogenes*	12	66,7
7	*Candida albicans*	18	100,0
8	*Staphylococcus aureus*	18	88,9
9	*Staphylococcus epidermis*	23	100,0
10	*Salmonella* Reading	12	100,0
11	*Salmonella* Poona	10	100,0
12	*Salmonella* Galinarium	6	100,0
13	*Bacillus subtillis*	11	63,6

Garden *et al.*[155] foram mais longe em 1998, não apenas identificando dois tipos de bactérias como fazendo a predição do estágio de crescimento das mesmas. Com seis sensores comerciais a base de MOS e utilizando 36 métodos de pré-processamento, as bactérias foram corretamente atribuídas com 96% de acerto. A matriz de confusão para as bactérias mostrou que *Escherichia coli* foi classificada com 100% de acurácia, enquanto *Staphylococus aureus* foi corretamente classificada com 92,2% de precisão. O estágio de crescimento das bactérias também foi estudado, sendo separado em três fases: i) inicial, durante a primeira hora de crescimento; ii) experimental, após duas horas e meia e iii) estacionária, após oito horas de crescimento. O nariz eletrônico foi capaz de predizer o estágio de crescimento das bactérias corretamente em 81% das amostras. Assim como Gibson, os autores selecionaram os sensores de acordo com os metabólitos secundários emitidos pelos microrganismos durante a etapa de crescimento que são hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, ácidos, amônia, etc.

Magan *et al.*[156] estudaram a precoce detecção de bactérias e leveduras que causam a deterioração do leite com um nariz eletrônico composto por 14 sensores a base de CP. Como consequência da deterioração do leite, diversos VOCs são liberados, dentre estes, alguns álcoois são caracterizados como importantes metabólitos microbianos nesse processo. Levando isso em consideração, primeiramente, os autores diferenciaram amostras de leite não contaminado de amostras controle, que foram preparadas adicionando butanol ao leite em uma concentração de 20 mL/L, e amostras contaminadas com *Candida pseudotropicalis* (incubadas por 60 min a 25 ºC). Adicionalmente, amostras contaminadas com *Staphylococcus aureus* e *Kluyveromyces lactis*

mostraram uma clara diferença na deterioração do leite para cada uma das espécies. Em seguida, foi feita a análise quantitativa da contaminação do leite com *Pseudomonas aureofaciens* em diferentes concentrações (baixa - 10^6 células/mL, média - $3,5 \cdot 10^8$ células/mL e alta - $8 \cdot 10^8$ células/mL), sendo possível diferenciar entre as três concentrações, o leite não contaminado e o controle com butanol. A análise hierárquica destas cinco amostras produziu três grupos a) leite com baixa concentração de bactéria e leite não contaminado; b) leite com concentração média e alta e c) leite controle. Finalmente, empregando o nariz eletrônico na diferenciação do leite contaminado com diferentes leveduras e bactérias, o PCA mostrou uma clara separação entre o leite não contaminado, o leite controle, o leite contaminado com as leveduras *Bacillus cereus, Candida pseudotropicalis* e *Kluyveromyces lactis* e o leite contaminado com as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas spp* (Figura 17).

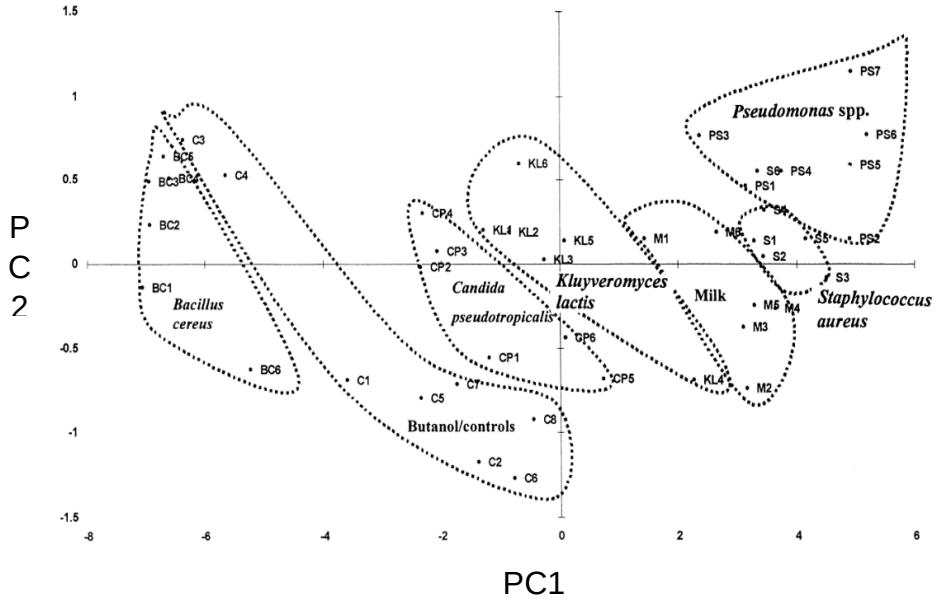


Figura 17: PCA do leite não contaminado, controle e contaminado com as bactérias e leveduras com os 7 *clusters* separados.[156]

Pavlou *et al.*[157] publicaram o primeiro trabalho de reconhecimento de padrões e diferenciação de bactérias anaeróbicas patogênicas retiradas de infecções intra-abdominais e feridas. Isolando e cultivando as bactérias *Clostridium* sp. (proveniente de 14 espécimes) e *Bacteroides fragilis* (proveniente de 12 espécimes) em ágar sangue, a análise do perfil dos voláteis foi executada. Com um nariz eletrônico a base de 14 CP, as duas bactérias foram diferenciadas alcançando 100% de acurácia. Dutta *et al.*[158] utilizaram um nariz eletrônico comercial e portátil (Cyranose 320) para diferenciar 6 bactérias patogênicas que causam infecção nos olhos (*Staphylococcus aureus, Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa* e *Moraxella catarrhalis*). Combinando três algoritmos de agrupamento de dados, uma abordagem inovadora para a época, e aplicando três classificadores, MLP, R*adial Basis Function network* e *Probabilistic Neural Network*, os autores diferenciaram as bactérias com 98% de acurácia.

Green *et al.*[159] investigaram a detecção e discriminação de *E. coli* e *Listeria,* utilizando três narizes eletrônicos em um trabalho publicado em 2004. Neste estudo, foram aplicados narizes comerciais a base de MOS (AlphaMOS), PC (Cyrabise 320) e um espectrômetro de massas. Utilizando apenas o PCA, os autores observaram a separação entre as classes. Com relação aos narizes eletrônicos utilizados, o que operava a base de MOS apresentou um maior tempo de análise e o espectrômetro de massas o maior custo. Ficou como perspectivas para trabalhos futuros a aplicação de métodos supervisionados, para melhorar a classificação e análise dos dados. Balasubramanian *et al.*[160] desenvolveram um método para predição da população de *Salmonella*

Typhimurium em carnes. Para esse trabalho, amostras de carne foram contaminadas com a bactéria e os VOCs foram expostos a um nariz eletrônico durante cinco dias. Analisando os dados gerados pelo nariz eletrônico por meio de dois métodos estatísticos (ICA e PCA), os autores desenvolveram um método para predizer a concentração de bactéria na carne com 69,64% de acurácia, quando utilizados os dados do PCA e 82,99% de acurácia, quando o ICA foi utilizado. Trincavelli *et al.*[161] identificaram dez bactérias utilizando um nariz eletrônico composto por 22 sensores. Empregando LDA para redução de dimensionalidade e *support vector machine* (SVM) como classificador, os autores obtiveram acurácia de 94% para discriminação das bactérias estudadas.

Continuando o trabalho publicado em 2006, Green *et al.*[162] realizaram a diferenciação das mesmas bactérias não patogênicas (*E. coli DH5α* e *Listeria innocua*), porém a partir da análise de uma única colônia de bactérias suspensa em uma solução tampão. Aplicando um nariz eletrônico com 12 sensores a base de MOS e incluindo métodos estatísticos, citados no trabalho anterior (PCA, *Uncorrelated Linear Discriminant Analysis* (ULDA) e LDA), a precisão do nariz eletrônico foi aferida. Aplicando o PCA, o gráfico com as duas bactérias e a solução controle permaneceram sobrepostas, após aplicar o método supervisionado ULDA houve uma clara separação entre as três categorias (Figura 18). Aplicando o *leave-one-out* como método de validação cruzada, a acurácia alcançada foi de 92,6%. Este estudo foi conduzido visando à aplicação do nariz eletrônico no controle da qualidade de alimentos para identificação de bactérias patogénicas.

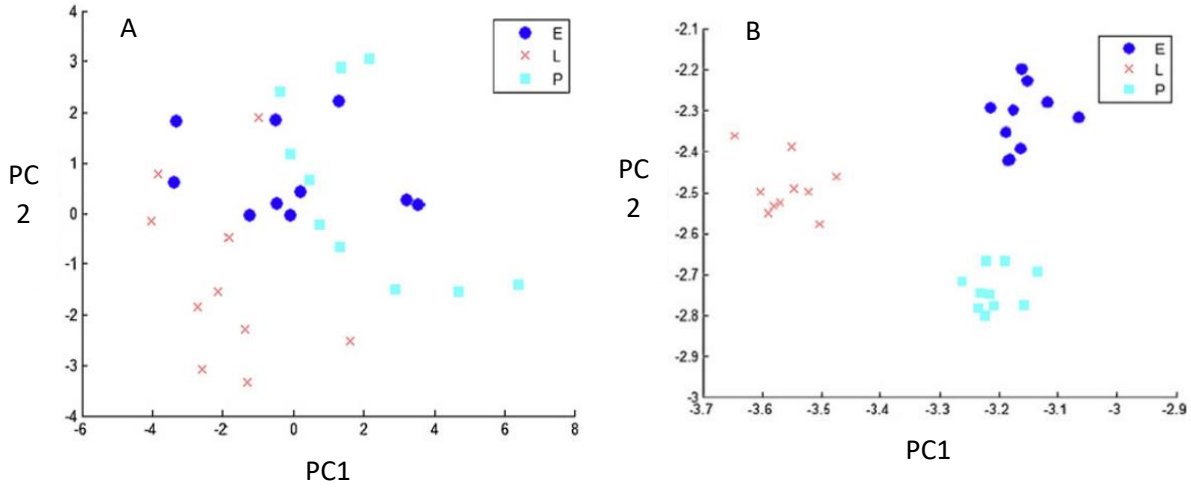


Figura 18: Comparação entre os resultados do PCA em A) e do ULDA em B) para diferenciação das bactérias *E. coli* (E), *Listeria* (L) e a solução tampão fostato-salino (P).[162]

Assim como Dutta, Abdallah *et al.*[163] utilizaram o Cyranose 320, porém com o objetivo de diferenciar bactérias patogênicas de origem alimentar em carnes. As bactérias estudadas foram *E. coli* O157:H7*, Salmonella* Typhimurium 857*, Staphylococcus aureus* 29213 e *Pseudomonas aeruginosa* 27853*.* As carnes foram avaliadas pelo nariz eletrônico antes e depois da contaminação, revelando que após a contaminação a concentração de voláteis liberados em ppb aumentou passado 4h da contaminação, mostrando que o Cyranose 320 pode ser aplicado para controle da qualidade de alimentos. Em 2014, Green *et al.*[164] publicaram a continuação de seus estudos com bactérias, utilizando o nariz eletrônico para discriminar bactérias patogênicas que podem ser transmitidas por alimentos (*E. coli* DH5α*, Listeria innocua, Enterococcus faecalis, E. coli* Biotype I). Assim como anteriormente, os autores aplicaram PCA e ULDA no estudo estatístico da resposta do nariz eletrônico, obtendo acurácia de 95% na classificação, diferenciando bactérias do mesmo espécime

(*E. coli*). Timsorn *et al.*[165] aplicaram um nariz eletrônico para avaliar o tempo de apodrecimento e aumento da população de bactérias em carne de frango estocada a 4°C e 30°C. A população de bactérias aumentou rapidamente na carne estocada a 30°C, de maneira que a contagem ocorreu apenas entre o dia 0 e dia 1, refletindo também na resposta dos sensores que foi maior nas primeiras 24h, diminuindo entre os dias 2 – 5. Já na carne estocada a 4°C, a população de bactérias aumentou gradualmente entre os dias 0 – 5, sendo observado o mesmo comportamento na resposta dos sensores. O PCA foi empregado para distinguir entre os dias de estocagem, sendo observados três *clusters* para a carne estocada a 30°C e cinco para o estoque a 4°C. Os três grupos apresentados no PCA para a temperatura de 30 ºC correspondem aos dias 1-3, com os dias 2 e 3 próximos e o dia 1 separado dos demais, visto que o apodrecimento da carne ocorre rapidamente no primeiro dia. Os cinco grupos observados para a temperatura de 4 ºC correspondem aos dias 1-5 que também foram separados do dia 0.

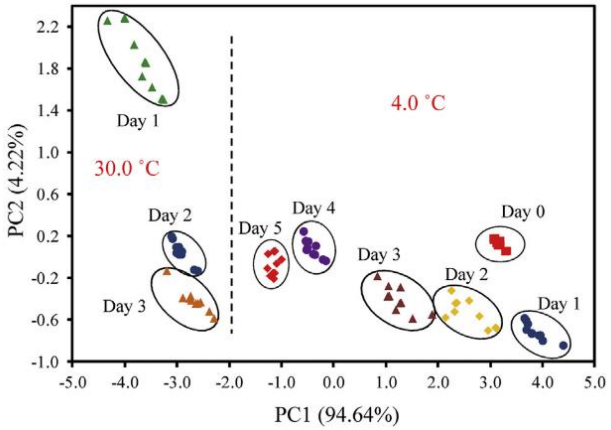


Figura 19: PCA das amostras de carne de frango estocadas a 30°C e 4°C em diferentes dias.[165]

Mais recentemente, Cuartin *et al.*[166] aplicaram um nariz eletrônico (Cyranose 320) na identificação de colonização bacteriana das vias aéreas de pessoas com bronquiectasia, principalmente as infecções com *Pseudomonas aeruginosa,* que é um dos patógenos mais frequentes isolados nesses casos. Os pacientes foram divididos em dois grupos: i) pacientes que possuíam colônias de microrganismos potencialmente patogênicos (41 pacientes) e ii) pacientes não colonizados (32 pacientes). Na maioria dos que estavam colonizados (27 pacientes), o microrganismo era *Pseudomonas aeruginosa* e o perfil da "impressão digital" da respiração desses pacientes foi diferente dos que estavam colonizados com outros microrganismos. Os autores conseguiram diferenciar pacientes colonizados de não colonizados com 72,1% de acurácia, além disso, pacientes colonizados com *Pseudomonas aeruginosa* foram diferenciados de pacientes colonizados com outros microrganismos com 89,2% de acurácia e pacientes colonizados com *Pseudomonas aeruginosa* foram diferenciados dos pacientes não colonizados com 72,7% de acurácia.

Bonah *et al.*[167] reproduziram o trabalho de Green da diferenciação de bactérias patogênicas transmitidas por alimentos em colônias individuais em suspensão. No entanto, aprimoraram a precisão da classificação e a quantidade de bactérias estudadas, além de reduzir o número de sensores utilizados. Aplicando uma variedade de métodos estatísticos como algoritmos de otimização de dados (*genetic algorithm*, *particle swarm optmization* (PSO) e grid searching (GS)) acoplados com o classificador SVM, os autores distinguiram cinco bactérias (*Escherichia coli, Escherichia coli* O157:H7*, Listeria monocytogenes, Salmonella* Enteritidis*,* e *Salmonella* Typhimurium) de diferentes cepas da mesma espécie (*E. coli* e *Salmonella*). O acoplamento dos

métodos gerou alta acurácia na classificação, com o PSO-SVM mostrando o melhor desempenho com 98,95% de acurácia.

Capítulo 2: Objetivos

2.1 Gerais

Este trabalho tem por objetivo o desenvolvimento de compósitos a base de ionogéis dopados com partículas de óxido de ferro nuas (em diferentes concentrações) e funcionalizadas, produzindo ionogéis hidrofílicos e hidrofóbicos para utilização como camada sensível em sensores de gás, compondo um nariz eletrônico, para diferenciação de compostos orgânicos voláteis e posterior aplicação em situações-problemas reais.

2.2 Específicos

- Síntese de nano e/ou micropartículas de óxido de ferro (magnetita) e sua caracterização;
- Preparação de ionogéis a base de biopolímero (gelatina) e líquido iônico;
- Preparação de compósitos condutores a partir dos ionogéis e das partículas;
- Preparação de sensores pela deposição de filmes dos compósitos com magnetita sobre eletrodos interdigitados;
- Caracterização elétrica e olfativa desses sensores;
- Construção de um nariz eletrônico formado por um arranjo dos sensores acima;
- Aplicação desse nariz em situações-problemas reais.

Capítulo 3: Parte experimental

3.1 Materiais

O líquido iônico 1-Etil-3-metilimidazólio dicianamida (EMIMDCA, pureza > 98%) e gelatina de pele bovina tipo B foram adquiridos da Sigma Aldrich. Cloreto de ferro (II) tetrahidratado ($FeCl_2$ **.**$4H_2O$, pureza >99%) foi obtdo da Vetec, cloreto de ferro (III) hexahidratado ($FeCl_3.6H_2O$, pureza ≥ 99%) foi obtido da Acros Organic. Ácido oléico (AO, pureza ≥ 99%) foi obtido da Carl Roth, o ácido láurico (AL, pureza ≥ 99%) e ácido antraceno carboxílico (AA, pureza ≥ 99%) foram obtidos da Sigma Aldrich. A solução aquosa de hidróxido de amônio a 25% bem como todos os solventes orgânicos foram adquiridos da Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda. Os eletrodos interdigitados foram fabricados pela empresa Micropress S. A. com 0,6 cm^2 de área interdigitada, 200 µm de espaçamento entre os dígitos de cobre e 100 µm de espaçamento entre os dígitos de níquel cobertos com 0,05 µm de ouro.

O caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) e os meios de cultura Ágar Triptona de Soja (TSA), Ágar Sulfito de Bismuto (BSA), Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e Ágar Verde Brilhante (BGA) foram adquiridos da Oxoid.

Todas as cepas bacterianas usadas neste estudo foram padrão ATCC, nomeadamente, *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028 – *S*. Typhimurium*), Escherichia coli* (ATCC 8739 – E. *coli*), *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525- *P*. *fluorescens*), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853 – *P*. *aeruginosa*) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 – *S*. *aureus*).

3.2 Síntese das particulas de Fe_3O_4

6,0 g de $FeCl_3.6H_2O$ foram dissolvidos em 100 mL de água destilada e 2,7 g $FeCl_2.4H_2O$ foram dissolvidos em 11 mL de água destilada. Ambas

soluções foram misturadas e agitadas mecanicamente sob atmosfera de nitrogênio até homogeneização. Em seguida, 19 mL de hidróxido de amônio (25%) foram adicionados rapidamente à mistura, que foi deixada reagindo por 5 min. A agitação foi interrompida, o agitador mecânico foi removido e se procedeu a separação das partículas Fe_3O_4 por decantação magnética. As partículas foram lavadas com água várias vezes e dispersas em água com concentração final de 78 mg/mL.

3.3 Funcionalização das partículas

Alíquotas de 1,4 mmol das partículas nuas (PN) dispersas em água foram misturadas a 4,1 mmol de AO, AL e AA em 8,0 mL de n-hexano (no caso de AO e AL) e DMSO (no caso de AA). A mistura ficou sob agitação por aproximadamente 15 h. A fase orgânica ficou com coloração preta com as partículas funcionalizadas, e a fase aquosa incolor (mistura água/hexano). Para as funcionalizações com AO e AL, após a separação da fase orgânica da fase aquosa a suspenção foi estocada. Já para a funcionalização com AA, as partículas foram decantadas magneticamente, lavadas com água destilada e dispersadas em acetonitrila.

3.4 Produção do ionogel

Em um banho de ultrassom, inseriu-se um pequeno frasco vedado contendo 75 µL do líquido iônico EMIMDCA. Foram adicionados 30 mg de gelatina de pele bovina em pequenas frações, aguardando 2 min entre as adições. Após 10 min, foram adicionados 40 µL de água destilada. A mistura foi mantida em banho ultrassônico por 15 min.

3.5 Compósitos

3.5.1 Dopagem do ionogel com partículas de Fe_3O_4 nuas

O procedimento descrito no item 3.4 foi adaptado para a preparação dos ionogéis dopados com as partículas nuas. Após a adição da gelatina no LI, adicionaram-se 40 µL de suspensões das partículas de Fe_3O_4 em água destilada com diferentes concentrações (25 mg/mL, 50 mg/mL and 75mg/mL), gerando três diferentes compósitos contendo os mesmos componentes.

3.5.2 Dopagem do ionogel com partículas de Fe_3O_4 funcionalizadas

Adaptou-se o procedimento do item 3.4 para a preparação dos ionogeis dopados com as partículas com diferentes funcionalizações. Foram adicionaram 40 µL da suspensão das partículas funcionalizadas com ácido oléico com concentração de 25 mg/mL à gelatina, evaporou-se o solvente e adicionou-se a gelatina dopada ao EMIMDCA que previamente estava em banho de ultrassom. Finalmente, adicionaram-se 40 µL de água destilada e aguardou-se até que a gelatina fosse solubilizada (15 min). Repetiu-se o procedimento para as demais funcionalizações.

3.6 Caracterização

Utilizou-se a espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), modelo Frontier FR-IR, para caracterização da superfície das partículas nuas e revestidas com os AA, AL e AO. As partículas foram moídas e misturadas com KBr para a obtenção do espectro. Determinou-se o diâmetro hidrodinâmico das PN usando um Zetasizer Nano Zs90 da

Malvern, operando a 25 °C. O TGA – Q500 foi empregado na análise termogravimétrica dos ionogéis. A perda de massa foi monitorada sob atmosfera de nitrogênio com taxa de aquecimento de 10 °C/min de 24 °C a 900 °C.

3.7 Preparação dos sensores e aplicação no nariz eletrônico

Os sensores foram divididos em dois conjuntos: o primeiro (A) formado pelo ionogel puro e dopado com as três concentrações de partículas; já o segundo (B) formado pelo ionogel dopado com concentração fixa (25 mg/mL) de PN e funcionalizadas. Foram aplicados 40 µL do ionogel na parte ativa do eletrodo interdigitado (Figura 20A), formando um filme fino por *spin coating* (10000 rpm por 5 s). Os sensores produzidos foram secos em dessecador sob vácuo por 15h. Os eletrodos interdigitados de cobre (espaçamento 200 µm) foram aplicados apenas no capítulo 4, sendo os eletrodos de níquel cobertos com ouro (espaçamento 100 µm) utilizados nos demais capítulos.

Os sensores foram testados em um nariz eletrônico totalmente construído em nosso laboratório com um sistema de amostragem dinâmica, mostrado esquematicamente na Figura 20B. Um ciclo completo de medida é composto por uma fase de exposição (bomba 1 ligada, bomba 2 desligada), quando os voláteis da amostra são conduzidos até a câmara onde estão os sensores, e uma fase de recuperação (bomba 1 desligada, bomba 2 ligada), quando o ar do ambiente passa diretamente através dos sensores, removendo os voláteis e recuperando os ionogéis. Três válvulas anti-retorno foram utilizadas para garantir que o fluxo do ar fosse sempre na direção dos sensores. Cada analito foi mantido no compartimento da amostra a 30 °C

durante todo o experimento, e o fluxo do ar foi mantido a 0,5 L/min. Para todos os analitos, os ciclos de exposição (5 s) e de recuperação (100 s) foram repetidos: no conjunto A, 12 vezes; no conjunto B, 10 vezes. Contudo, para facilitar a comparação dos dois conjuntos, utilizaram-se 10 repetições no tratamento dos dados. A condutância foi registrada por um condutivímetro[168], operando com tensão alternada com frequência de 2 KHz, onda triangular, e amplitude de 80 mV pico a pico, conectado a um computador via um conversor analógico-digital de 10-bit. Não houve necessidade de limpar ou preparar novos eletrodos entre as medidas.

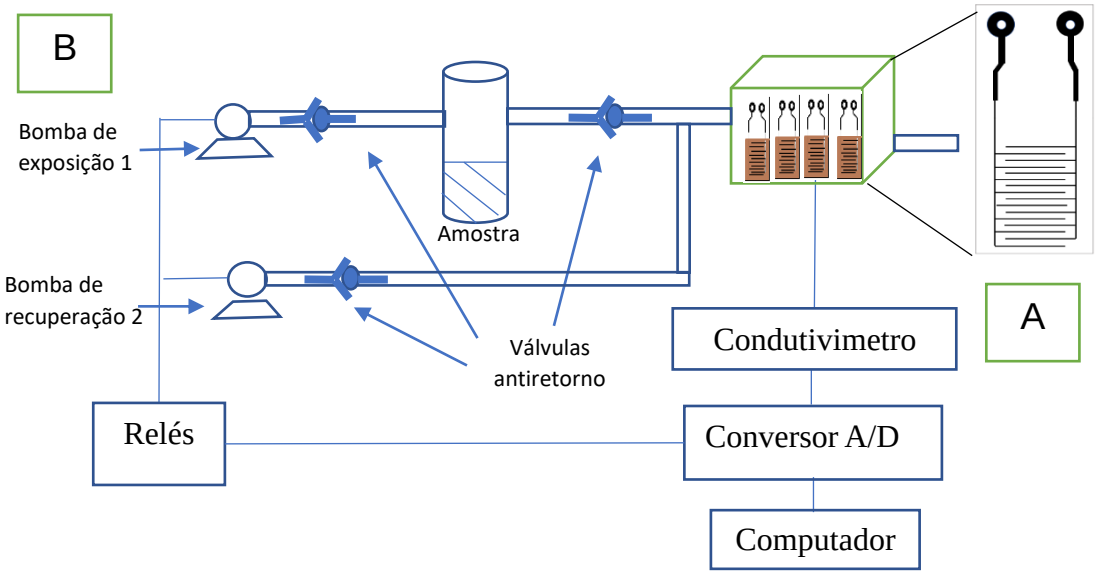


Figura 20: A) Eletrodo interdigitado usado na preparação dos sensores de gás e B) representação do nariz eletrônico utilizado.

3.8 Preparação das culturas de bactérias e contaminação das carnes

Todos os meios foram preparados seguindo as instruções do fabricante. Primeiramente, todas as bactérias foram individualmente suspensas em um tubo Falcon contendo 25 mL de caldo BHI e incubadas a 35 °C por um período de 24 h.

Para a avaliação do comportamento de *S*. Typhimurium e outras bactérias em meio não seletivo, 25 mL de TSA foi preparado em tubo Falcon. A solidificação do ágar foi realizada de maneira inclinada, permitindo uma área maior para o crescimento bacteriano. Após a solidificação, 10 µL de solução de BHI contendo as bactérias (*S*. Typhimurium, *E. coli*, *P*. *fluorescens*, *P*. *aeruginosa* ou *S*. *aureus*) foram semeados na superfície do TSA. O meio de cultura foi incubado a 35 ° C por um período de 24 h.

Para o comportamento em meio seletivo, os meios BSA, XLD e BGA foram preparados, seguindo o mesmo procedimento do TSA. Nesse caso,10 µL de BHI contendo *S*. Typhimurium, *E. coli* ou *P*. *fluorescens* foram espalhados na superfície do meio seletivo. Os tubos foram incubados a 35 ° C por um período de 24 h.

Tubos com o branco de cada meio (não seletivo e seletivo) foram incubados sem bactérias e usados para leitura com o nariz eletrônico.

Alíquotas de 5 g de carnes bovina (Bov), suína (Sui) e frango (Fr) foram acondicionadas em tubos Falcon e contaminadas com *S*. Typhimurium, *E. coli* e *P. fluorescens* (2 log UFC/g). Após a contaminação, as amostras foram incubadas a 20°C e analisadas após 0, 24, 48 e 72 h.

Capítulo 4: Prova de conceito

4.1 Resultados e discussão

Primeiramente, foram feitas a síntese e a caracterização das partículas de óxido de ferro, que foram empregadas como dopantes no ionogel, seguido da preparação dos compósitos como mencionado na parte experimental. Os dois conjuntos de sensores foram submetidos a testes preliminares para averiguar o padrão de respostas a diferentes substâncias voláteis modelos sendo expandido posteriormente à uma maior variedade de substâncias, com o objetivo de servir como prova do conceito proposto inicialmente.

4.2 Caracterização de Fe_3O_4.

As partículas nuas foram sintetizadas utilizando o método de coprecipitação descrito previamente por Roque e col.[169] O diâmetro médio das partículas, assim como a polidispersão foram obtidas por meio de espalhamento dinâmico de luz (DLS), sendo 168 nm e 0,351, respectivamente.

As funcionalizações foram confirmadas, utilizando espectroscopia na região do infravermelho (FTIR, KBr) (Figura 21). Três bandas aparecem no espectro para as PN, em 580 cm^{-1} referente à ligação Fe-O da estrutura cristalina do Fe_3O_4, e em 1630 e 3405 cm^{-1} que são correspondentes às hidroxilas presentes na superfície das partículas devido ao método de síntese utilizado.[170] Comparativamente, o espectro das partículas funcionalizadas com AA apresentam bandas em 2921 e 2975 cm^{-1} correspondentes à vibração de estiramento C-H do anel aromático, bandas em 1428 e 1385 cm^{-1} referentes a deformação angular da ligação C-O-H do ácido carboxílico, assim como vibração de estiramento C-O em 1318 e 1276 cm^{-1}, além da banda correspondente à deformação angular fora do plano C-O-H em 951 cm^{-1}.[171,172]

As partículas funcionalizadas com AL e AO apresentam espectros similares, com bandas entre 2800 e 3000 cm^{-1} pertencentes às vibrações de estiramento assimétrico e simétrico da ligação C-H de CH_2, e as bandas em 1522 e 1464 cm^{-1} correspondentes às vibrações de estiramento assimétrico e simétrico do grupo -COO da carboxila.[170]

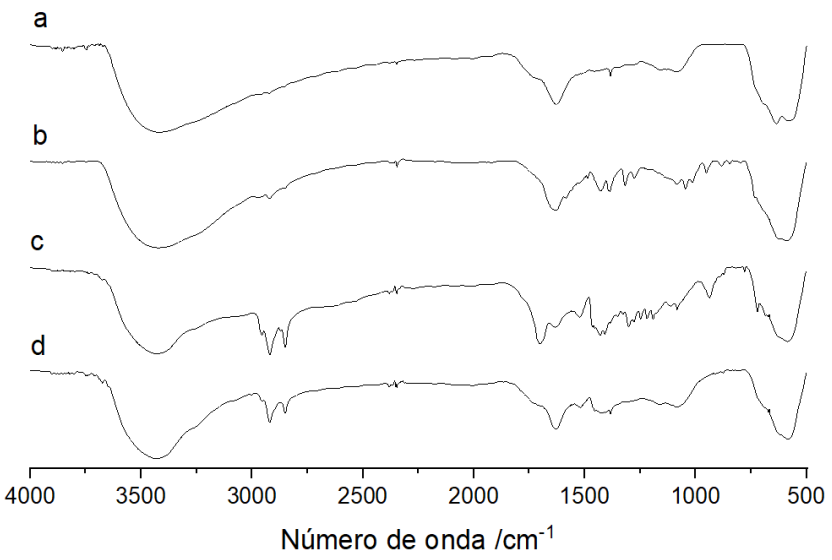
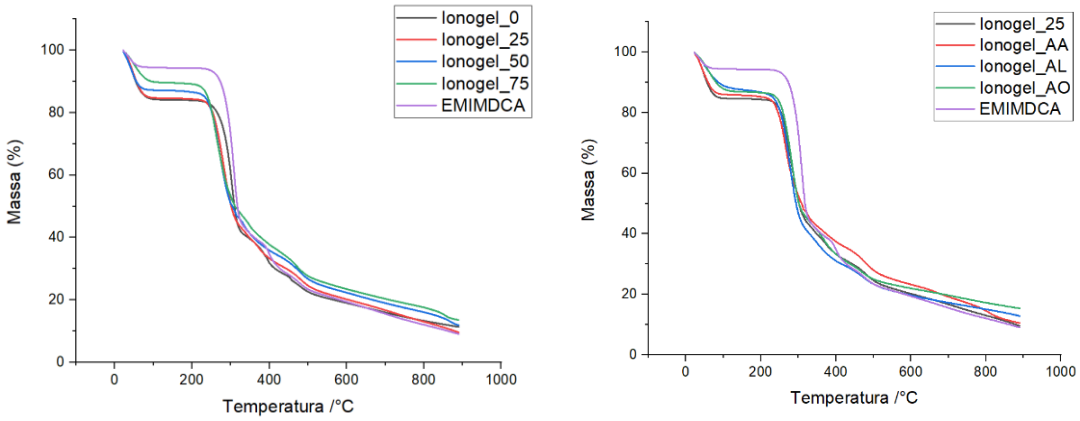


Figura 21: Espectro na região do infravermelho das partículas de Fe_3O_4 a) nuas e revestidas com b) AA; c) AL; d) AO

4.3 Caracterização térmica dos ionogéis

A análise termogravimétrica (TGA) revelou que o LI aprisionado no ionogel possui temperatura de decomposição menor quando comparado ao LI livre, indicando uma diminuição na interação entre os ions.[65] Além do aprisionamento do LI, o aumento da concentração de partículas também ocasiona a diminuição da temperatura de decomposição do EMIMDCA (Figura



22), isto deve ocorrer pela interação entre o LI e as partículas de óxido de ferro.[173] Quando observada a temperatura de decomposição do LI no ionogel dopado com partículas hidrofóbicas, também há uma diminuição na temperatura de decomposição, apesar de possuir a mesma concentração de partículas, independente do composto utilizado para realizar a funcionalização. No entanto, esta diferença não é tão acentuada quando comparado aos ionogéis compostos por elevadas concentrações de partículas. A Tabela 5 mostra a temperatura de decomposição do LI confinado na gelatina com os diferentes dopantes

Figura 22: Análise termogravimétrica do EMIMDCA e ionogéis a) conjunto de sensores A e b) conjunto de sensores B.

Tabela 5: Influência dos diferentes dopantes na temperatura de decomposição do LI no ionogel.

Material	Temperatura de decomposição/°C
EMIMDCA	308
Ionogel_0	303
Inogel_25	281
Ionogel_50	268
Ionogel_75	265
Ionogel AA	265
Ionogel_AL	273
Ionogel_AO	285

4.4 Ionogel – conjunto A

A partir do líquido iônico EMIMDCA, gelatina de pele bovina e água, foi preparado o único ionogel. Selecionaram-se três concentrações de PN (25, 50 e 75 mg/mL) para dopagem do ionogel durante o preparo do material. Os

solventes orgânicos utilizados como moléculas modelo, com diferentes grupos funcionais, polaridades e pontos de ebulição foram: etanol, acetona, clorofórmio, acetato de etila, tolueno e hexano. A Figura 23 apresenta as condutividades dos sensores durante exposição a etanol por 10 ciclos de 5 s de exposição e 100 s de recuperação com um fluxo de 0,5 L/min.

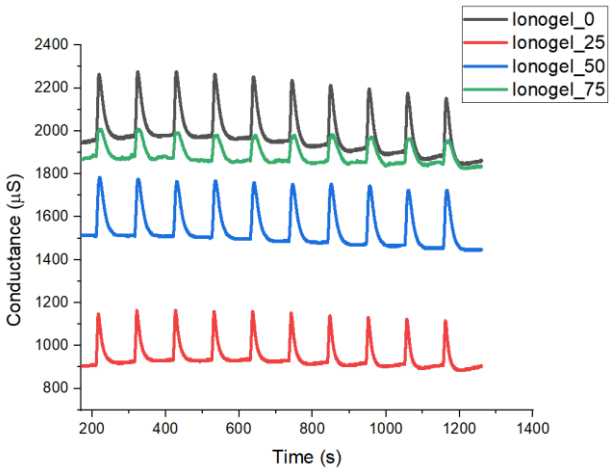


Figura 23: Resposta do conjunto de sensores dopados com diferentes concentrações de Fe_3O_4 em ciclos de exposição (5s)/recuperação (100s) a etanol. (preto) Ionogeis puro; (vermelho) dopado com 25 mg/mL; (azul) dopado com 50 mg/mL e (verde) dopado com 75 mg/mL.

Utilizou-se as respostas elétricas dos sensores (condutâncias) e calculou-se as respostas relativas (Ra) de cada sensor para todos os voláteis estudados de acordo com a Equação 1.

$$Ra = \frac{G2 - G1}{G1} \qquad \text{Eq. 1}$$

em que G2 é condutância do sensor no fim da exposição e G1 é a condutância do sensor no início da exposição.

As respostas relativas do conjunto dos quatro sensores são mostradas na Figura 24. Observa-se a diminuição na intensidade da resposta relativa dos compostos estudados com a diminuição da polaridade. Além disso, é possível notar que o etanol apresenta um aumento da Ra com o aumento da concentração de partículas no ionogel. A acetona apresenta um pequeno aumento com a concentração de 25 mg/mL, mas ocorre uma diminuição da Ra com o aumento da concentração de partículas no ionogel. Os demais solventes não apresentam mudanças significativas nas Ras com a presença das partículas no ionogel. Vale ressaltar que não há um padrão de resposta para os VOCs estudados com o aumento da concentração de partículas, ou seja, cada sensor responde diferentemente à exposição aos voláteis.

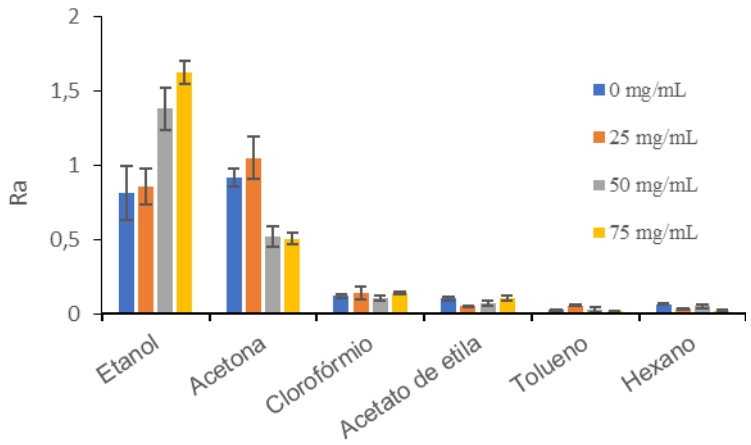


Figura 24: Resposta relativa para filmes com diferentes concentrações de partículas de Fe3O4.

Apesar do emprego de apenas um ionogel, a dopagem com as partículas de Fe_3O_4 mostrou que é possível obter diferentes padrões de respostas, alterando a concentração de um dos componentes. A influência da polaridade na intensidade da resposta sugere que quanto menor a polaridade das moléculas, menor é a Ra.

4.5 Ionogel - Conjunto B

A partir do estudo do conjunto A, realizou-se funcionalizações nas partículas para aumentar a interação entre o ionogel e moléculas que apresentaram menos intensidade de resposta, que foram clorofórmio, acetato de etila, tolueno e hexano. Considerando o estudo inicial com as diferentes concentrações de dopante, onde não se notou uma concentração ótima, escolheu-se a menor delas (25 mg/mL), obtendo-se o ionogel com PN e diferentes revestimentos. A Figura 25 apresenta as Ras dos VOCs para o ionogel com as diferentes dopagens. Quando comparado com a Figura 24, a tendência é a mesma, porém, para o hexano, tolueno e clorofórmio apresentaram um aumento na resposta quando comparado com as partículas nuas, houve uma diminuição na intensidade das respostas para o etanol e a acetona frente ao ionogel dopado com ácido láurico.

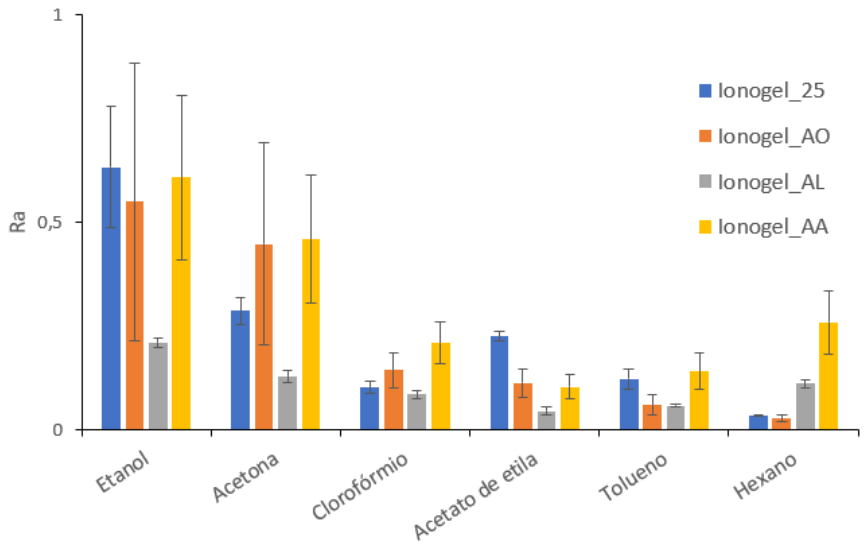


Figura 25: Resposta relativa dos filmes dopados com partículas de Fe_3O_4 com funcionalizações diferentes.

4.6 Nariz eletrônico

Os histogramas mostrados nas Figuras 24 e 25 sugerem que o conjunto de sensores produzem diferentes padrões de resposta para cada composto volátil, sendo característicos de cada VOC e que podem ser usados como dados de entrada em um programa de reconhecimento de padrões. Considerando os diferentes padrões de resposta dos dois conjuntos de sensores, estendeu-se o estudo para um número maior de VOCs incluindo: metanol, acetonitrila, diclorometano, éter etílico, pentano e heptano. As Ras dos VOCs foram utilizadas como variáveis de entrada no PCA para reduzir a dimensionalidade, visto que trabalhou-se com quatro sensores, gerando novos vetores ortogonais entre si, de acordo com o número de dimensões iniciais, mantendo o máximo de informação dos dados originais.[79] As três primeiras componentes compreendem 99,9% de cobertura dos dados para os dois sistemas. A Figura 26A mostra os agrupamentos dos pontos gerados pelos dados das Ras dos solventes aplicadas no PCA. Os sensores compostos apenas por partículas nuas foram capazes de distinguir oito dos 12 VOCs, sendo eles: acetato de etila, acetona, acetonitrila, clorofórmio, etanol, metanol, tolueno e éter dietílico. Apesar de alguns VOCs estarem próximos, como o tolueno e clorofórmio, a região do gráfico que ocupam é bem distinta, não havendo superposição. Já os sensores dopados com as partículas funcionalizadas foram capazes de distinguir todos os 12 VOCs, como mostrado na Figura 26B. Moléculas que apresentaram semelhanças estruturais como o pentano, hexano e heptano, clorofórmio e diclorometano, metanol e etanol, foram diferenciadas de maneira satisfatória.

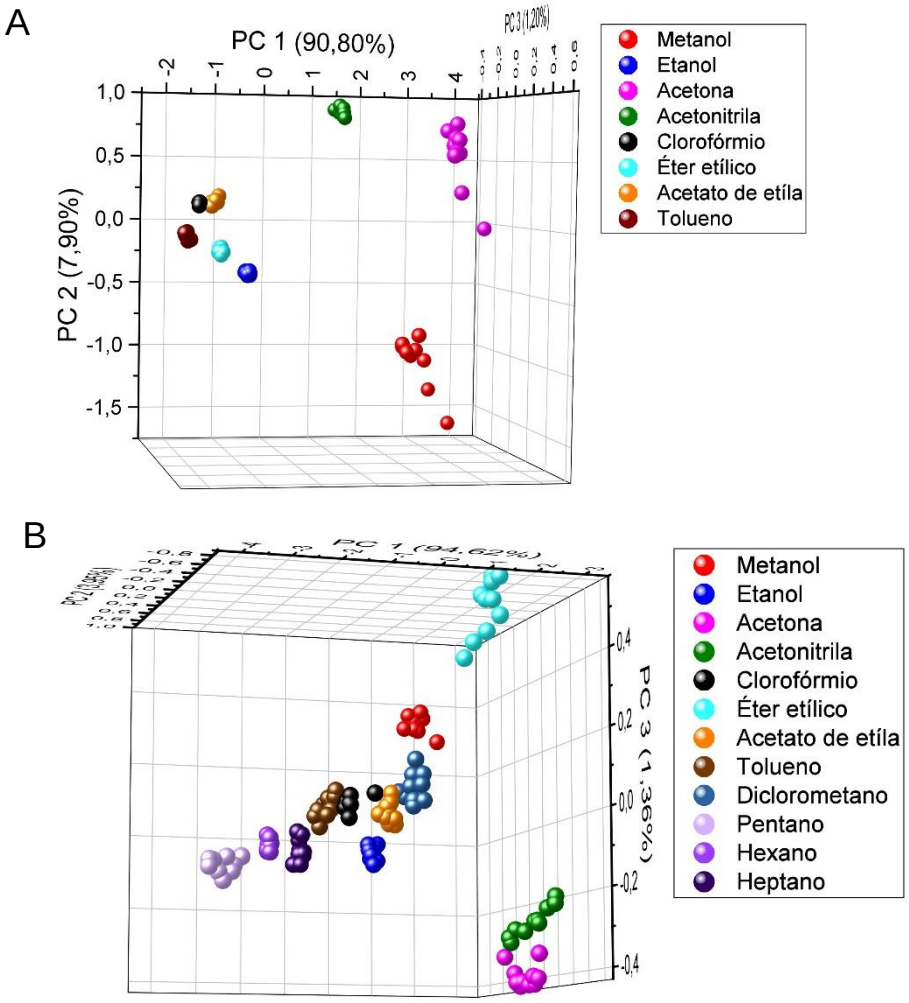


Figura 26: Gráfico do PCA para os sensores A) com diferentes concentrações de partículas de Fe_3O_4 nuas e B) com três funcionalizações das partículas de Fe_3O_4.

Apesar de ser visualmente perceptível a separação entre os VOCs em ambos os conjuntos de sensores, é necessária a utilização de um método de validação para avaliar o grau de acerto nas previsões. Para isso, os dados das Ras de cada conjunto de sensores foram treinados usando diferentes métodos de classificação, então a acurácia de cada classificador foi computada e

validada pelo método de validação cruzada *k-fold*. Os classificadores *Bayes Network*, *Linear Discriminant Analysis*, *instances Based (IBK), Random SubSpace* e LMT foram selecionados a partir do software WEKA.[174] Com o conjunto A foram feitas 80 medidas no total, com 10 repetições para cada VOC, já com o conjunto B, 120 medidas no total, com 10 repetições para cada VOC. A validação cruzada utilizou 90% dos dados em ambos os conjuntos para treinar os algorítmicos e 10% dos dados para predição; o valor de k do *K-fold* foi de 10. A percentagem de acerto para ambos os conjuntos foi superior a 98%, independente do classificador utilizado, sendo mostrado na Figura 27. A acurácia dos classificadores para o conjunto A foi de 100% com todos os classificadores testados, enquanto que para o conjunto B houve acurácia de 99,2% para os classificadores *Bayes Network*, LDA e IBK e 98,3% para *Random SubSpace* e LMT.

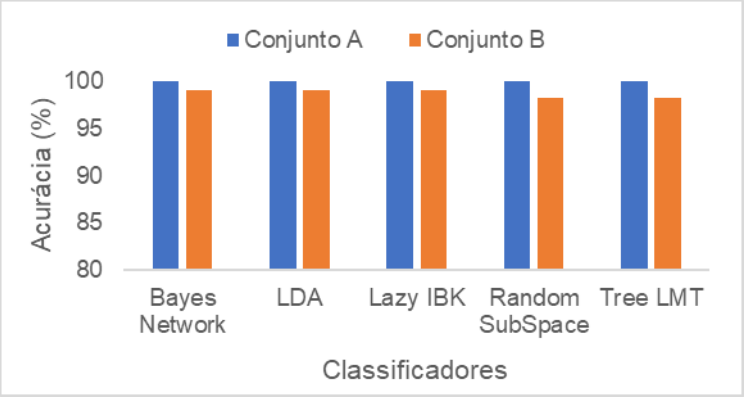


Figura 27: Comparação da acurácia nos diferentes classificadores para os sensores do conjunto A e B.

A Figura 27 mostra o percentual de acerto, considerando todo o conjunto dos dados. Observando o grau de acerto para cada VOC individualmente, pode-se analisar quais solventes foram atribuídos erroneamente. A Figura 28 apresenta a matriz de confusão com o percentual de acerto de cada solvente

para os dois conjuntos de sensores estudados, utilizando o classificador IBK. O conjunto de sensores A obteve uma acurácia de 100%, utilizando esse classificador. Observa-se na Figura 28A que para todos os solventes a classificação é máxima, não havendo confusão entre os solventes estudados. O conjunto de sensores B apresentou 99,2% de acurácia com o IBK, com o clorofórmio sendo confundido com o acetato de etila (Figura 28B).

Conjunto A

	Metanol	Etanol	Acetona	Acetonitrila	Clorofórmio	Éter etílico	Acetato de etila	Tolueno
Metanol	100	0	0	0	0	0	0	0
Etanol	0	100	0	0	0	0	0	0
Acetona	0	0	100	0	0	0	0	0
Acetonitrila	0	0	0	100	0	0	0	0
Clorofórmio	0	0	0	0	100	0	0	0
Éter etílico	0	0	0	0	0	100	0	0
Acetato de etila	0	0	0	0	0	0	100	0
Tolueno	0	0	0	0	0	0	0	100

Conjunto B

	Metanol	Etanol	Acetona	Acetonitrila	Clorofórmio	Éter etílico	Acetato de etila	Tolueno	Diclorometano	Pentano	Hexano	Heptano
Metanol	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Etanol	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acetona	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acetonitrila	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
Clorofórmio	0	0	0	0	90,0	0	10,0	0	0	0	0	0
Éter etílico	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0
Acetato de etila	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0
Tolueno	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0
Diclorometano	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0
Pentano	0	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0
Hexano	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0
Heptano	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100

Figura 28: Matriz de confusão do classificador IBK aplicado em a) predição dos VOCs no conjunto A e b) predição dos VOCs no conjunto B.

4.7 Conclusão

Dois conjuntos de sensores a base de um único ionogel foram preparados. O estudo das respostas de ambos os conjuntos frente a moléculas modelos gerou diferentes padrões de respostas. As respostas relativas dos sensores diminuíram com a diminuição da polaridade das moléculas, havendo uma melhora nas respostas relativas de moléculas apolares quando usado o conjunto de sensores B. Os sensores foram usados em um nariz eletrônico, que por meio de um sistema de reconhecimento de padrões foi capaz de distinguir até doze diferentes solventes com estruturas moleculares semelhantes. Empregando diferentes algoritmos e um método de validação cruzada K-fold, avaliou-se o grau de acerto dos narizes eletrônicos, obtendo acurácia acima de 98% para os dois conjuntos de sensores. Este trabalho mostrou que a partir de um único ionogel, alterando apenas a composição de um dos componentes, é possível a produção de um nariz eletrônico capaz de distinguir diversos solventes com estruturas moleculares semelhantes ou variadas com alto grau de acerto.

Capítulo 5: Identificação de méis adulterados

5.1 Resultados e discussão

No capítulo anterior, mostrou-se que os sensores desenvolvidos são capazes de distinguir moléculas simples como solventes, provando que a proposta inicial foi alcançada. A partir dos resultados obtidos, buscaram-se aplicações práticas para o nariz eletrônico desenvolvido. O primeiro estudo de caso proposto consistiu na identificação de méis adulterados.

Estudaram-se 17 amostras de méis de diferentes floradas (eucalipto, laranjeira e silvestre) em que 6 amostras eram méis e 11 adulterações (Figura 29) fornecidas pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP campus Botucatu. As amostras foram sabidamente fraudadas e não-fraudadas através de metodologias oficiais recomendadas. As amostras foram submetidas a medidas com os dois conjuntos de sensores desenvolvidos. Para isso, foram mantidas à 30 °C em banho-maria, seguido de 7 ciclos com 10 s de exposição e 150 s de recuperação. Análise multivariada revelou que, apesar de difícil detecção, é possível realizar a separação dos dois grupos (mel verdadeiro e adulterado).

Figura 29: Amostras de méis verdadeiros (1 - 6) e adulterados (7 - 17) utilizados no estudo do nariz eletrônico.

5.2 Conjunto A

O conjunto A foi empregado na diferenciação dos méis verdadeiros das adulterações. A Figura 30A apresenta a resposta dos sensores quando

expostos a uma amostra de mel durante 8 ciclos. É notório que há uma redução na intensidade da resposta com o aumento da concentração de partículas no ionogel. As respostas dos sensores foram utilizadas para calcular as Ra, que foram utilizadas como variáveis de entrada para a PCA mostrada na Figura 30B, na qual as amostras de mel aparecem separadas das adulterações.

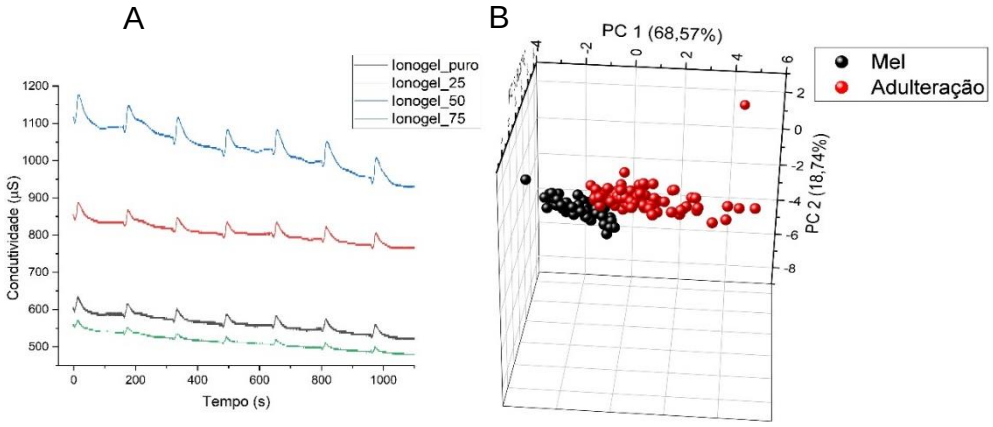


Figura 30: Resposta dos sensores do conjunto A quando expostos a uma amostra de mel (A) e PCA para as 17 amostras de mel.

A variância alcançada no PCA foi de 95,68%, distribuída entra as 3 componentes PC1 (68,57%), PC2 (18,74%) e PC3 (8,37%). A contribuição de cada sensor para as componentes principais foi analisada, sendo mostrada na Figura 31. Os ionogeis 25, 50 e 75 apresentam uma contribuição semelhante para a PC1 (0,56, 0,53 e 0,52, respectivamente), enquanto o ionogel_puro mostrou menor contribuição (0,36). Para PC2, o ionogel_puro é mais importante (contribui com 0,92), seguindo do ionogel_75 e dos ionogeis_25 e 50 com contribuição semelhante. Os ionogeis_50 e 75 possuem o maior peso

para PC3, enquanto os demais sensores praticamente não contribuem para esta componente.

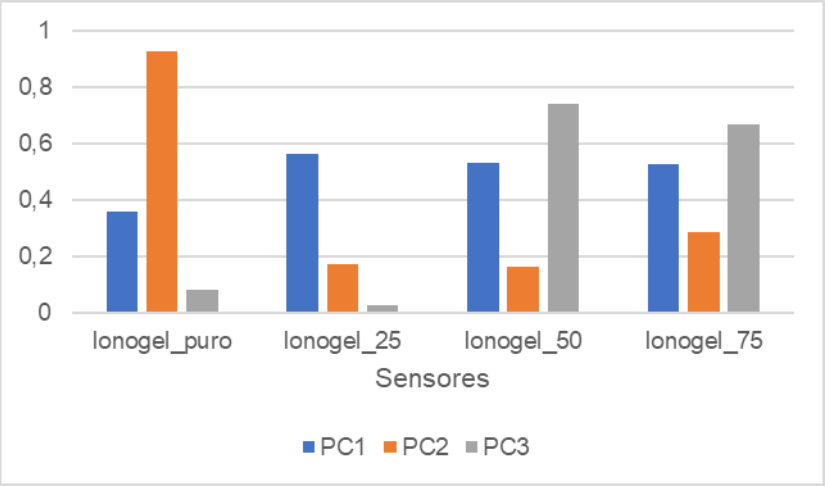


Figura 31: Peso de cada sensor na formação das componentes principais para o conjunto A.

5.3 Conjunto B

Considerando que o conjunto B foi capaz de diferenciar um número maior de voláteis (ver capítulo 4), utilizaram-se estes sensores para diferenciação dos méis verdadeiros das adulterações. A Figura 32A apresenta a resposta dos sensores quando expostos aos voláteis de uma amostra de mel, enquanto a Figura 32B mostra a análise do PCA. Diferentemente do conjunto A, há uma sobreposição entre as amostras de mel verdadeiro e as adulterações, indicando que a distinção entre as duas classes com este conjunto de sensores é mais difícil.

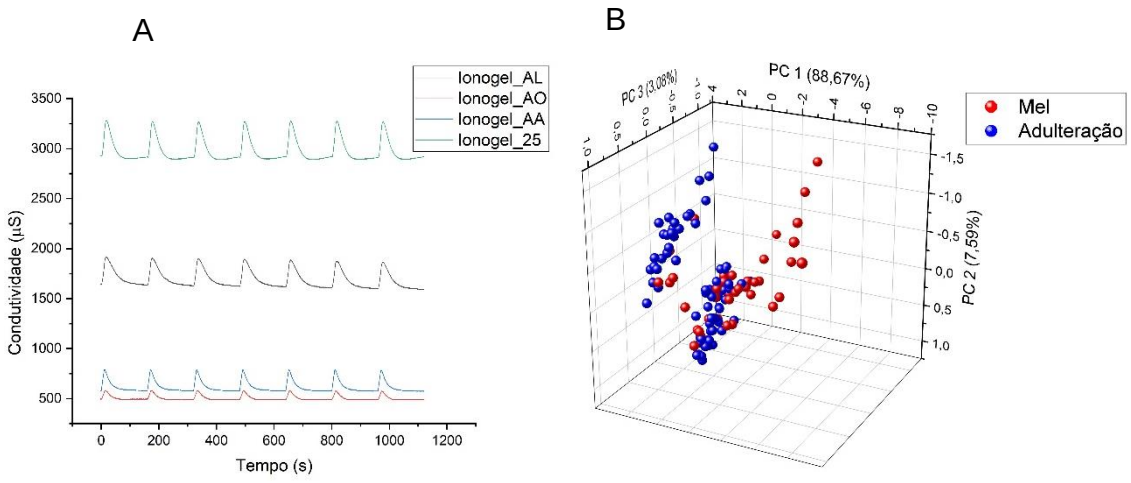


Figura 32: Resposta dos sensores do conjunto B quando expostos a uma amostra de mel (A) e PCA para as 17 amostras de mel.

A variância do PCA da Figura 32B atingiu 99,34%. Apesar de ter uma menor perda de informação que o PCA do conjunto A, a capacidade de separação dos grupos é menor. A variância está distribuída entre as três componentes como PC1 (88,67%), PC2 (7,59%) e PC3 (3,08%). A contribuição de cada sensor para as componentes principais é mostrada na Figura 33. Os ionogeis contribuem da mesma maneira para PC1 (0,50 para os ionogeis_AL, AO e 25, 0,49 para o ionogel_AA). Para PC2, o ionogel_AA possui o maior peso (contribui com 0,85), seguindo do ionogel_AO _25 e _AL (0,42, 0,30 e 0,09, respectivamente). A PC3 recebe maior peso do ionogel_AL, diminuindo gradativamente com o ionogel_AO, _AA e _25 (0,84, 0,49, 0,21 e 0,14, respectivamente).

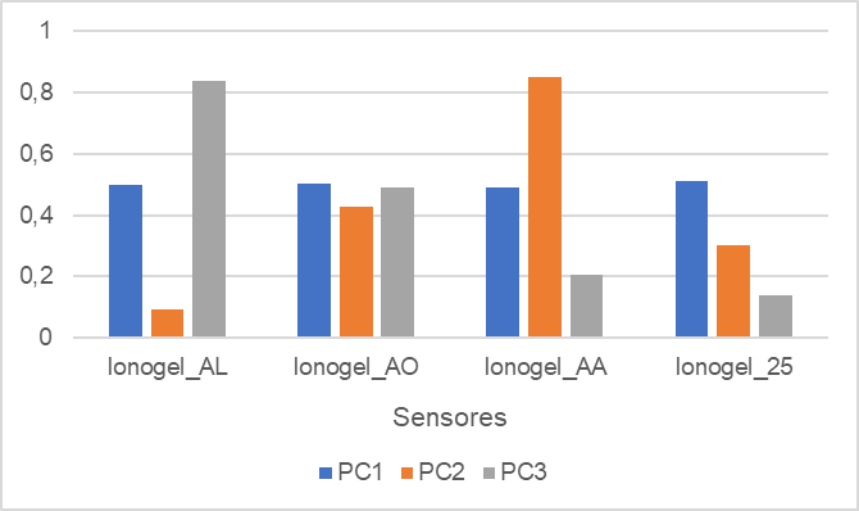


Figura 33: Peso de cada sensor na formação das componentes principais para o conjunto B.

5.4 Análise multivariada

Pelo PCA o conjunto A apresentou melhor desempenho na separação das duas classes estudadas. Porém, para determinar o acurácia de ambos os conjuntos de sensores na classificação das amostras de mel, empregou-se diferentes classificadores para avaliar quão robustos são os resultados obtidos. Nesta análise foram utilizados os classificadores: MLP, IBK, Kstar, RF e *Trees-J48*. A Figura 34 mostra a acurácia para o conjunto A, que variou de 95,45% - 97,40% (IBK e J48 – 95,45%, MLP e Kstar – 96,10% e RF – 97,40%), concordando com o resultado do PCA e confirmando o desempenho do nariz eletrônico com valores de acurácia semelhantes. O conjunto B, como esperado, apresentou valores de acurácia inferiores, variando de 64,94% - 78,57% (J48 - 64,94%, MLP – 70,78%, RF – 75,32%, Kstar – 75,97% e IBK – 78,57%). Pensando em classificação de méis como verdadeiros ou adulterados, o conjunto B não apresentou desempenho satisfatório, porém, talvez um ajuste fino nos parâmetros dos classificadores estudados poderia

melhorar a classificação, pois há uma diferença considerável entre os valores de acurácia apresentados.

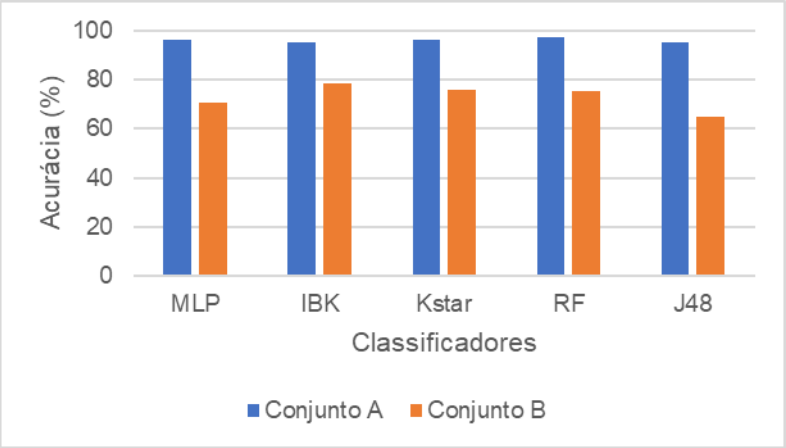


Figura 34: Comparação da acurácia nos diferentes classificadores na diferenciação de méis verdadeiros de adulterados para os sensores do conjunto A e B.

Outra maneira de avaliar-se a capacidade de identificação dos méis, considerando o erro dos sensores na atribuição da classe, é observando os parâmetros de sensibilidade e especificidade. A sensibilidade é a quantidade de amostras verdadeiramente positivas que o método aplicado identificou corretamente, enquanto que a especificidade é a taxa de verdadeiros negativos que foram corretamente atribuídos. Estes parâmetros são calculados do seguinte modo:

Sensibilidade = verdadeiro positivo/(verdadeiro positivo + falso negativo)

Especificidade = verdadeiro negativo/(verdadeiro negativo + falso positivo).

A Figura 35 ilustra os verdadeiros positivos (VP), verdadeiros negativos (VN), falsos positivos (FP) e falsos negativos (FN).

		Previsão de classe	
		Positivo	Negativo
Atual classe	Positivo	VP	FN
	Negativo	FP	VN

Figura 35: Classificação de VP, VN, FP e FN aplicados no cálculo da sensibilidade e especificidade de um método de análise.

Para isto, selecionaram-se os classificadores que apresentaram melhor desempenho na classificação das amostras e calcularam-se os valores de sensibilidade e especificidade para cada conjunto. Para o conjunto A, o RF apresentou melhor acurácia (97,40%). Tanto a sensibilidade como a especificidade foram de 97,40% (acertando 75/77), mostrando que a probabilidade de identificar uma mostra de mel corretamente e uma adulteração corretamente é a mesma. O IBK foi o classificador que apresentou melhor desempenho com o conjunto B (78,57% de acurácia), revelando valores de sensibilidade e especificidade de 84,42% e 72,73%, respectivamente. A capacidade dos sensores dos conjuntos B de identificar uma amostra de mel como verdadeiro é maior que identificar uma amostra como mel adulterado. Logo, um teste para averiguar se uma determinada amostra está adulterada pode gerar falsos negativos em pouco mais de ¼ das análises.

5.5 Conclusão

Dois conjuntos de sensores foram empregados em um nariz eletrônico para distinguir amostras de méis adulterados e mel puro. Em análise preliminar utilizando o PCA, o conjunto A apresentou maior separação entre os dois *clusters* com um ponto de interseção, enquanto o PCA do conjunto B não

separou efetivamente os dois grupos. A aplicação de diferentes classificadores revelou uma elevada acurácia para o conjunto A, acima de 97% com o RF. O conjunto B, apesar da sobreposição dos grupos no PCA, obteve acurácia acima de 78% com o IBK. Cálculos de sensibilidade e especificidade mostraram que o conjunto A é capaz de identificar amostras de mel puro e adulterado com elevada precisão, enquanto o conjunto B apresentou melhores valores para sensibilidade do que especificidade. Assim, os sensores do conjunto A demonstraram um bom desempenho na análise das amostras de mel, sendo preferível sua aplicação em detrimento do conjunto B. Mais estudos devem ser conduzidos para apurar a reprodutibilidade dos métodos, além de utilizar um número maior e com maior variedade de amostras.

Capítulo 6: Detecção de parvovirose canina

6.1 Resultados e discussão

Seguindo com os estudos de caso com os sensores desenvolvidos, buscamos diagnosticar parvovirose canina em amostras de fezes de cães. Como mencionado anteriormente, esta é uma doença com elevada mortalidade para os cães, principalmente filhotes, e o rápido diagnóstico é essencial para aumentar as chances de vida dos animais.

6.2 Detecção de parvovirose canina

Utilizou-se 15 amostras de fezes de cães que apresentavam um quadro clínico de gastroenterite hemorrágica e foram submetidas a análise de PCR no Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva da UNESP-campus Botucatu. As amostras foram divididas em dois grupos, o primeiro com 10 amostras de cães infectados pelo vírus (controle positivo) e o segundo com 5 amostras de cães que não estavam infectados (controle negativo).

Primeiramente, aplicou-se os sensores do conjunto B para averiguar a capacidade de diferenciação dos sensores das amostras positivas das negativas. Para as medidas com o nariz eletrônico, as amostras foram acondicionadas em tubos Falcon, e durante os períodos de exposição (5 s) e recuperação (100 s) foram aquecidas à 30 °C (condições semelhantes ao experimento conduzidos com mel). Assim como nos demais estudos, calculou-se as respostas relativas das medidas para cada amostra e utilizou-se como variáveis de entrada no PCA. As respostas dos sensores durante 8 ciclos em que foram submetidos aos voláteis de uma amostra controle negativo é mostrado na Figura 36A, além do gráfico do PCA gerado a partir das 15

amostras que é mostrado na Figura 36B. Fazendo uso das três componentes principais alcançamos 99,58% da variância, mostrando uma perda mínima de informação. A partir do PCA da Figura 36B percebe-se que os sensores não foram capazes de separar as amostras positivas das negativas, ocorrendo uma sobreposição, assim como foi observado com as amostras de mel.

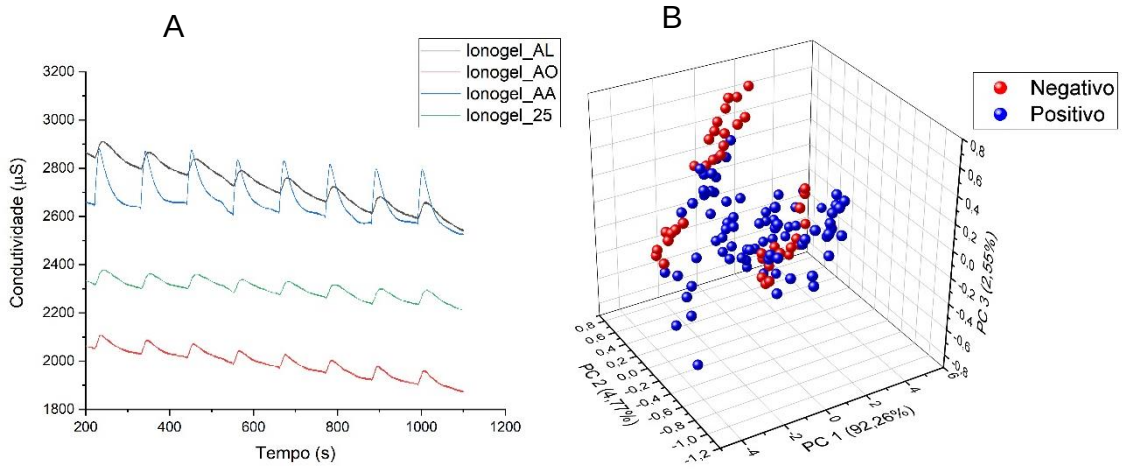


Figura 36: Resposta dos sensores quando expostos aos voláteis de uma amostra controle negativo (A) e PCA das 15 amostras que foram medidas no nariz eletrônico a base de MOS (B).

Apesar de os sensores do conjunto B não apresentarem resultados promissores na diferenciação das amostras, repetiu-se o procedimento com os sensores do conjunto A, no entanto, aumentou-se a temperatura do banho-maria para 40 °C para que uma quantidade maior de voláteis fosse conduzida à superfície dos eletrodos. A Figura 37A mostra a resposta dos sensores durante 8 ciclos, e o gráfico do PCA está representado na Figura 37B. Fazendo uso das três componentes principais alcançamos 99,80% da variância, com uma evidente separação entre as amostras positivas das negativas. A primeira componente é responsável pela separação das amostras

negativas, enquanto a segunda componente apresenta maior contribuição para separar as amostras positivas. A terceira componente possui 0,25% da variância, contribuindo para uma melhor visualização.

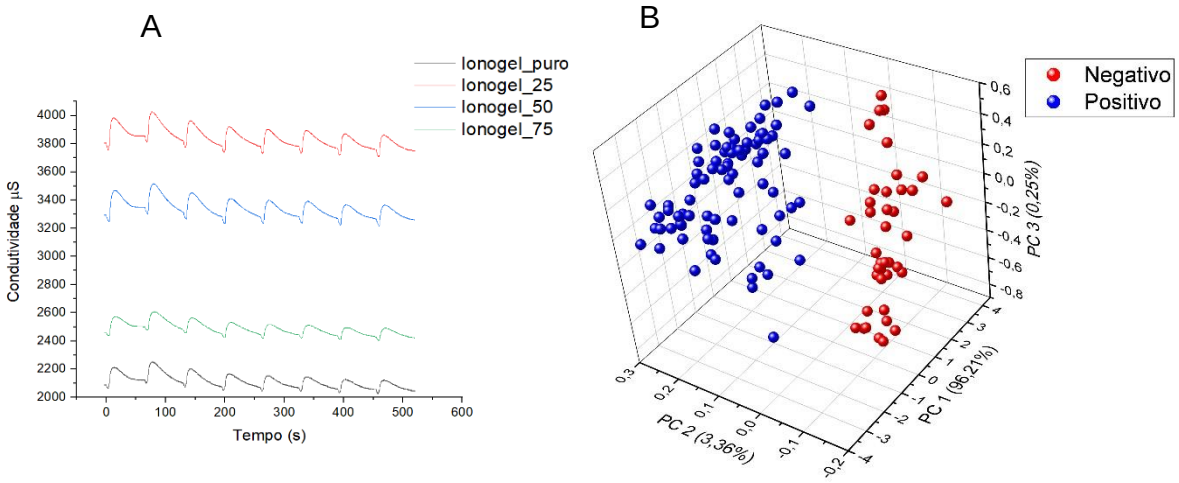


Figura 37: Medidas do nariz eletrônico durante os 8 ciclos de exposição e recuperação a uma amostra controle negativo (A) e PCA das 15 amostras para os sensores a base de ionogel (B).

Considerando que as componentes principais são uma combinação linear das respostas relativas calculadas a partir de cada sensor, é possível avaliar a contribuição de cada sensor para as componentes utilizadas no gráfico do PCA. A Figura 38 apresenta o gráfico da contribuição de cada sensor para as componentes principais. É possível perceber que todos os sensores contribuem de maneira semelhante para a primeira componente (contribuição de 0,50 do Ionogel_puro, 0,48 do ionogel_25, 0,51 do ionogel_50 e 0,51 do ionogel_75), associada a discriminação das amostras negativas. Já a segunda componente, associada a discriminação das amostras positivas, o ionogel_25 (contribuição de 0,82) contribui mais que os demais, seguido pelo ionogel_puro e ionogel_75 (contribuição de 0,48 e 0,30, respectivamente), e o

ionogel_50 que praticamente não contribui para esta componente. Para terceira componente, o ionogel_75 apresenta maior relevância, seguido em ordem decrescente pelo ionogel_puro, ionogel_50 e ionogel_25, respectivamente.

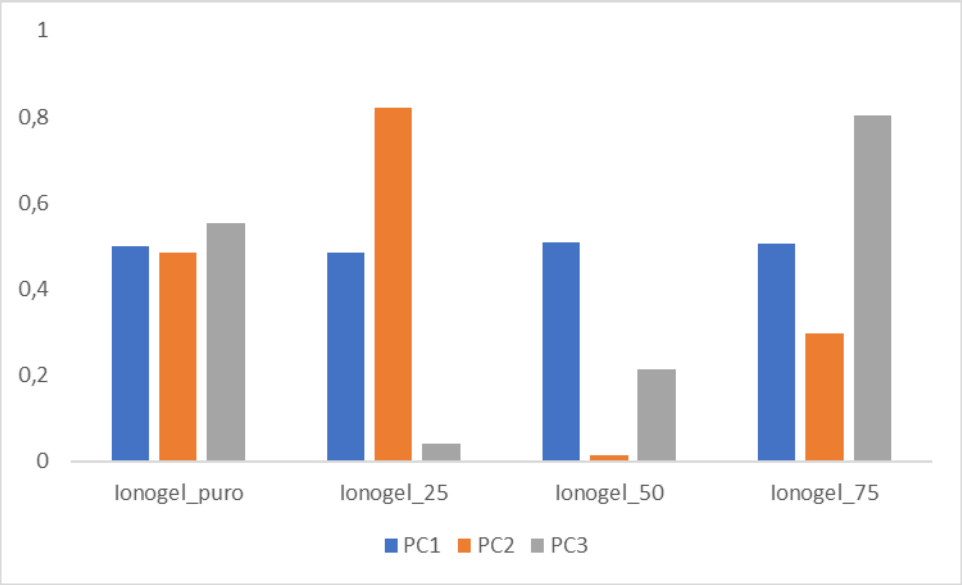


Figura 38: Contribuição dos sensores na formação das componentes principais do PCA.

6.3 Análise multivariada

Os gráficos de PCA gerados pelos dois conjuntos de sensores são opostos, o conjunto A apresenta uma excelente separação entre as amostras negativas e positivas, enquanto com o conjunto B as amostras estão sobrepostas. Focando agora em um método que possa fazer previsões, testou-se cinco algoritmos de classificação nos dois casos estudados: LDA, MLP, IBK, LMT e RF. Como trabalhamos com 5 amostras negativas e 10 positivas, há o dobro do número de pontos para o grupo positivo. Com a finalidade de homogeneizar o tamanho dos grupos, os dados originais passaram por uma etapa de pré-processamento, utilizando a técnica de balanceamento de dados

conhecida como *Synthetic Minority Oversampling Technique* (SMOTE).[175] Assim, garantiu-se que o desbalanceamento dos grupos não afete a porcentagem de acerto e/ou erro de cada classificador. Como método de validação aplicou-se o K-fold, com K igual a 10.

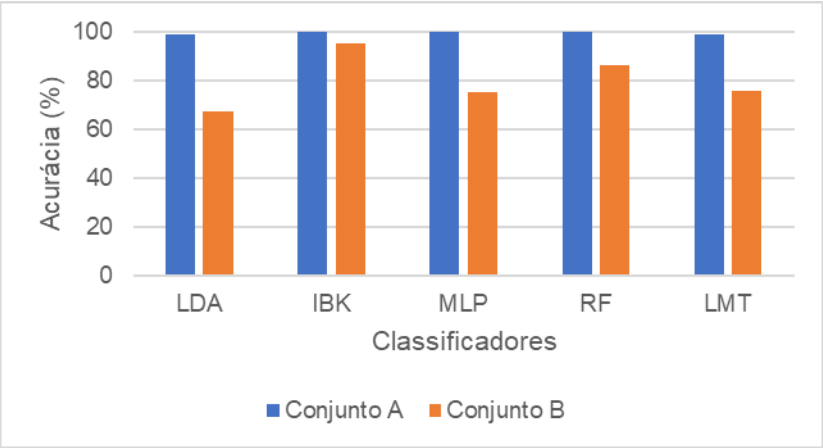


Figura 39: Acurácia de diferentes classificadores na separação das amostras positivas das negativas para os dois conjuntos de sensores estudados.

A Figura 39 mostra a acurácia dos classificadores para cada um dos conjuntos de sensores empregados. A acurácia na classificação para o nariz eletrônico aplicando o conjunto A chegou a 100% aplicando os classificadores IBK, MLP e RF, além de ser 99% para o LMT e LDA. Um elevado índice de acerto independente do classificador empregado. O conjunto B, apesar de apresentar sobreposição no PCA entre as duas classes, obteve valores de acurácia elevados, alcançando 95% com o classificador IBK, 86,25% com o RF, 75,62% e 75% com o LMT e MLP, respectivamente, e 67,5% com o LDA. As acurácias dos classificadores para o conjunto B, apesar de serem inferiores ao do conjunto A, revela que é possível a utilização desses sensores com um grau de acerto razoável, além de mostrar a necessidade da utilização de uma variedade de algoritmos de aprendizagem de máquina para obter um resultado mais consistente com os dados utilizados. A elevada acurácia para o conjunto

A em todos os classificadores mostra que a diferenciação entre as amostras positivas e negativas são consistentes, entretanto, o conjunto B apresentou grande variação na acurácia, que dependeu do classificador utilizado.

6.4 Comparação com outros métodos

A importância do desenvolvimento de novas tecnologias para o rápido e fácil diagnóstico da Parvovirose está associada tanto a letalidade da doença como a resistência do vírus, que pode sobreviver por longos períodos no meio ambiente, desde que protegido por material orgânico. Além disso, a fácil transmissão do vírus por via oral e nasal, torna necessário o isolamento do local em que o animal infectado se encontrava para evitar a proliferação da doença para outros animais.[176]

O nariz eletrônico é uma tecnologia aplicada nas diversas áreas do conhecimento, deixando de ser apenas um conceito acadêmico e tornando-se uma ferramenta viável no cotidiano da sociedade. Com relação ao diagnóstico de doenças em cães, os trabalhos são escassos e para detecção de parvovirose não há, até o momento, nenhum trabalho na literatura. Outros métodos já foram publicados buscando reduzir o tempo de espera no diagnóstico dessa doença.

Decaro *et al.*[177] desenvolveram um dispositivo que permita ao proprietário de cães e/ou veterinário realizar o exame para detecção da parvovirose sem a necessidade de enviar amostras do animal para laboratórios. Este dispositivo é vendido comercialmente com o nome de Teste SNAP Parvovirose (IDEXX Laboratórios) e utiliza um método imunoenzimático para detecção do antígeno do CPV nas fezes dos cães. Os autores utilizaram

201 amostras de cães provenientes de quatro países (Itália, Reino Unido, Espanha e Grécia) divididas pelas três categorias do vírus (CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c). Aplicando o teste é possível detectar 80,4% das amostras do CPV-2a, 78% do CPV-2b e 77% do CPV- 2c. Kim *et al.*[178] aplicaram a microbalança a cristal de quartzo para detecção do Parvovírus. Essa técnica consiste em utilizar o efeito piezoelétrico dos cristais de quartzo que ao sofrer uma deformação produz um campo elétrico que pode oscilar de acordo com a polaridade da perturbação, essa propriedade confere a capacidade de estudar fenômenos de interface tendo uma relação direta da variação de massa do cristal com a sua frequência de ressonância.[179] Os autores funcionalizaram a superfície do cristal de quartzo com o antígeno do vírus e utilizaram a variação da frequência para determinar se as amostras estudadas eram CPV positivas ou CPV negativas, concluindo que o biossensor é capaz de identificar corretamente 95,4% das amostras positivas e 98% das negativas.

Comparados ao nariz eletrônico, esses métodos apresentam algumas desvantagens, pois no sistema proposto neste trabalho, não há necessidade de preparo de amostra ou restrição na quantidade utilizada, não é necessário o uso de antígenos para detecção, além de ser um método de baixo custo, rápida análise e de fácil aplicação (um limitante para a microbalança que possui um alto valor agregado e necessidade de especialistas para funcionalização do cristal de quartzo). Contudo, deve ser levado em consideração que não separou-se as amostras de acordo com a variação na cepa do vírus, como fez Decaro *et al.*, além de ter uma quantidade de amostras reduzidas em relação aos dois trabalhos anteriormente citados.

6.5 Sensibilidade e especificidade

Os valores de acurácia para os dois narizes eletrônicos foram reportados anteriormente para uma série de classificadores, mostrando que o conjunto A apresenta maior acurácia que o conjunto B em todos os classificadores. No entanto, esses valores em si não trazem informações sobre a sensibilidade e/ou a especificidade. Para isso, calculou-se ambos os parâmetros, utilizando IBK como classificador (apresentou maior acurácia em ambos os casos estudados) e comparou-se com os valores descritos na literatura. A Tabela 6 apresenta as taxas de sensibilidade e especificidade para métodos descritos na literatura.

Tabela 6: Comparação da sensibilidade e especificidade na detecção de parvovirose canina dos narizes eletrônicos utilizados com os métodos descritos na literatura.

Método	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
QCM	95,4	98
CIAK	80,7	89,5
Conjunto A	100	100
Conjunto B	92,5	97,5

Os dois conjuntos de sensores apresentaram valores de sensibilidade e especificidade maiores ou equivalentes aos métodos descritos na da literatura. O conjunto A exibiu maior sensibilidade e especificidade que o conjunto B, ocorrendo correta classificação em todas as medidas. No caso do conjunto B,

das amostras positivas, 74/80 foram atribuídas corretamente, enquanto 78/80 das amostras negativas foram atribuídas sem erro.

6.6 Conclusão

Os dois conjuntos de sensores foram aplicados na detecção da parvovirose canina. O conjunto A apresentou fácil separação entre as amostras positivas e negativas, enquanto a separação foi mais difícil para o conjunto B. Foram empregados cinco classificadores para avaliar a capacidade de previsão do nariz eletrônico com os sensores desenvolvidos. O conjunto A exibiu resultados de acurácia consistentes, havendo mínima variação independente do classificador. Já o conjunto B apresentou maior variação na classificação, mostrando que mais parâmetros devem ser ajustados para estes sensores. Os dois conjuntos apresentaram elevados valores de sensibilidade e especificidade, sendo o primeiro exemplo na literatura até o momento, de um nariz eletrônico para detecção de parvovirose. Apesar das amostras estudadas não terem sido separadas por tipo de cepas do vírus, ambos narizes apresentaram boa performance na detecção da parvovirose com uma metodologia simples, rápida, de baixo custo e fácil implementação.

Capítulo 7: Detecção de *Salmonella* em diferentes meios de cultura

7.1 Resultados e discussão

S. Typhimurium é um dos mais importantes patógenos que causa doenças pela ingestão de alimentos contaminados e ainda é uma preocupação mundial. Em laboratórios de controle de qualidade, o monitoramento de *S.* Typhimurium é baseado em análises microbiológicas e bioquímicas, consistindo em várias etapas que levam até 7 dias.[180,181]

De acordo com a metodologia padrão, as primeiras etapas para a pesquisa de *S.* Typhimurium são o pré-enriquecimento e enriquecimento, onde o crescimento da bactéria ocorre em um meio contendo uma abundante fonte de nutrientes, nos quais uma ampla variedade de microrganismos podem crescer, normalmente, *Buffered Peptone Water* e *Lactose Broth* (caldos de pré-enriquecimento), além de *Tetrathionate* e *Rappaport-Vassiliadis* (caldos de enriquecimento seletivo). Após estas etapas, ocorre o isolamento da bactéria, sendo o material previamente cultivado transferido para um meio de cultura sólido e seletivo, o qual favorece o crescimento de *Salmonella* em detrimento de outras bactérias. Os principais meios seletivos são BSA, XLD e BGA.[180,182]

Na prática, o isolamento de *Salmonella* é realizado de forma complementar, utilizando mais de um meio seletivo. Mesmo através destes meios, outras bactérias, como *E. coli* e *P. fluorescens*, crescem junto com a *S.* Typhimurium, sendo necessário a realização de testes bioquímicos adicionais para confirmação de que se trata da *S.* Typhimurium.[183,184]

Considerando o exposto acima, aplicou-se os sensores desenvolvidos para a discriminação de *S.* Typhimurium de outros microrganismos, tal como *E. coli, P. fluorescens, P. aeruginosa*, e *S. aureus* em meio não seletivo, além da discriminação de *S.* Typhimurium de *E. coli* e *P. fluorescens* em meios seletivos

e específicos para *Salmonella*. Tendo em vista os melhores resultados obtidos anteriormente com o conjunto A em detrimento do conjunto B, aplicou-se apenas o conjunto A neste estudo.

7.2 Bactérias em meio não seletivo

Primeiramente, estudou-se a capacidade do nariz eletrônico em discriminar *S.* Typhimurium de *E. coli, P. fluorescens, P. aeruginosa*, e *S. aureus* em um meio de crescimento de bactérias não seletivo. Para isto, selecionou-se o meio TSA, um meio de cultura bem conhecido e adequado para crescimento de bactérias, utilizado na etapa de pre-enriquecimento de várias bactérias[185]. A interação entre os voláteis das bactérias neste meio de cultura e os sensores é mostrada na Figura 40. Foram realizados 7 ciclos com 5 s de exposição e 150 s de recuperação, para evitar influência das amostras anteriores desconsideramos os dois primeiros ciclos.

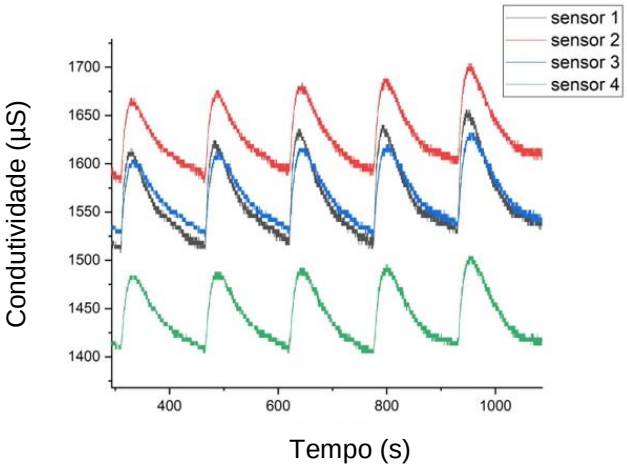


Figura 40: Resposta dos sensores quando expostos aos voláteis da *S.* Typhimurium no meio de cultura TSA.

As respostas dos sensores foram utilizadas para calcular as Ras que foram aplicadas como variáveis de entrada na produção do PCA. A Figura 41

mostra o PCA (99,7% de variância) com os clusters das 5 bactérias e o TSA sem bactéria (branco). É evidente que a separação entre as bactérias não foi bem sucedida, havendo sobreposição entre as classes. A *S. aureus* intersecta a *E. coli* e *S.* Typhimurium, *P. fluorescens* intersecta *E. coli* e *P. aeruginosa*, além da sobreposição entre *E. coli* e *P. aeruginosa*

.

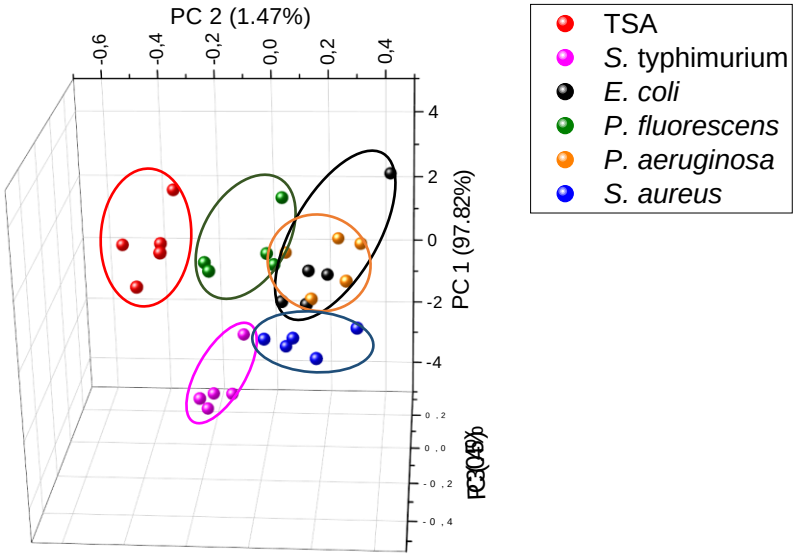


Figura 41: PCA para *S.* Typhimurium de *E. coli, P. fluorescens, P. aeruginosa*, e *S. aureus* no meio não seletivo TSA.

7.2.1 Análise multivariada das bactérias em meio não seletivo

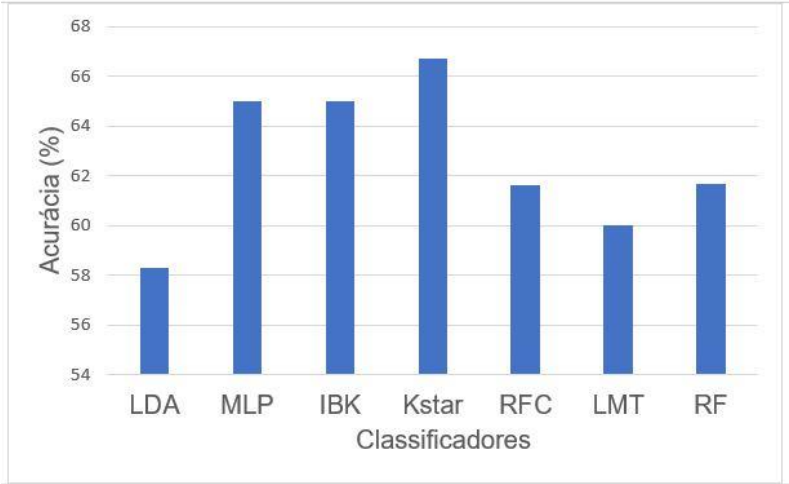
Para avaliar a capacidade de previsão dos sensores foram utilizados diferentes algoritmos de classificação, para análise multivariada dos dados de Ras calculados a partir dos sensores. Os classificadores empregados foram: LDA, MLP, IBK, Kstar, *Randomizable Filtered Classifier* (RFC), LMT e RF. O método de validação cruzada utilizado foi o K-fold com o valor de K igual a 10.

Apesar de assumir 7 ciclos como padrão das medidas para todas as medidas, não conseguimos o padrão para todas as amostras. Para homogeneizar o tamanho dos dados de cada classe, os dados originais foram submetidos a uma etapa de pré-processamento utilizando uma técnica de balanceamento SMOTE[186], garantindo que o desbalanceamento dos dados não afetasse a acurácia dos classificadores.

A Figure 42A mostra a acurácia obtida com cada classificador. Os classificadores que apresentaram a menor e maior acurácia foram, respectivamente, LDA, 58,3% e Kstar, 66,7%. Para o IBK e MLP, a acurácia foi 65%, enquanto o for RFC e RF, obtiveram 61,7% e 60.0%, respectivamente. Selecionou-se o classificador que mostrou melhor desempenho na classificação das bactérias (Kstar com 66,7%) para fazer a matriz de confusão (Figura 42B). Essa matriz traz informações sobre quais bactérias foram classificadas corretamente e quais foram atribuídas erroneamente. A bactéria com maior acerto foi a *S*. Typhimurium, 90,0% (taxa de erro de 10,0% com *E. coli*), enquanto a *P. fluorescens* apresentou um acurácia de 80,0% (taxa de erro de 20,0% com TSA). Esses resultados concordam com o gráfico do PCA, no qual pode ser visto uma região de interseção de *S*. Typhimurium e *E. coli*, e a proximidade entre *P. fluorescens* e TSA. Para *E. coli* e *P. aeruginosa*, que se sobrepuseram no PCA, o acerto foi de 60,0% para as duas bactétias, ocorrendo erro na classificação entre pelo menos dois outros grupos (para *E. coli*: 10,0% com *P. fluorescens* e 30,0% com *P. aeruginosa*; para *P. aeruginosa*: 10,0%, 10,0% e 20,0% com TSA, *E. coli* e *P. fluorescens*, respectivamente). Além disso, diferente do sugerido pelo PCA, 40,0% dos dados do TSA foram erroneamente classificados como *P. fluorescens* e a

menor acurácia foi para *S. aureus*, 50,0% (50,0% com *S.* Typhimurium), o que destaca a necessidade de complementar graficamente a análise de *clusters* com o uso de classificadores.

A)



B)

	TSA	*S. aureus*	*S.* Typhimurium	*P. fluorescens*	*P. aeruginosa*	*E. coli*
TSA	60%			40%		
S. aureus		50%	50%			
S. Typhimurium			90%			10%
P. fluorescens	20%			80%		
P. aeruginosa	10%			20%	60%	10%
E. coli				10%	30%	60%

Figura 42: A) Comparação da acurácia dos classificadores empregados na separação das bactérias no meio TSA, B) Matriz de confusão feita a partir da análise dos dados com Kstar.

7.3 Crescimento em meio seletivo

Como mencionado anteriormente, a *E. coli* e *P. fluorescens* são bactérias importantes que interferem no isolamento da *S.* Typhimurium. Geralmente, *S.* Typhimurium e *E. coli* são discriminadas pela morfologia das colônias, após um período de incubação de 24 horas em BSA, uma vez que as colônias desta última não são circuladas por um halo de brilho metálico. As colônias de *P. fluorescens* são bastante semelhantes às *S.* Typhimurium, e testes bioquímicos adicionais são necessários para diferenciá-las. Além disso,

como os meios de isolamento são específicos para bactérias gram-negativas, o crescimento do *S. aureus*, que é gram-positivo, não é favorável. Além disso, a *P. aeruginosa* apresenta crescimento escasso no meio BSA e é facilmente diferenciada da *S*. Typhimurium, pois as colônias de *P. aeruginosa* são verdes e a halo não é observada.[182,187,188] Assim, focamos nossos estudos na diferenciação de *S*. Typhimurium, *E. coli* e *P. fluorescens* utilizando meios de cultura específicos para *S*. Typhimurium (BSA, XLD e BGA) e avaliamos o desempenho na distinção das bactérias com o nariz eletrônico durante a etapa de isolamento.

Com base nos valores de Ra, construíram-se os gráficos de PCA para os meios BSA, XLD e BGA (Figuras 43A, B e C, respectivamente), com variância superior a 99,0% para todos os meios, indicando mínima perda de informação. As classes BSA, XLD e BGA são os meios de cultura sem as bactérias (branco).

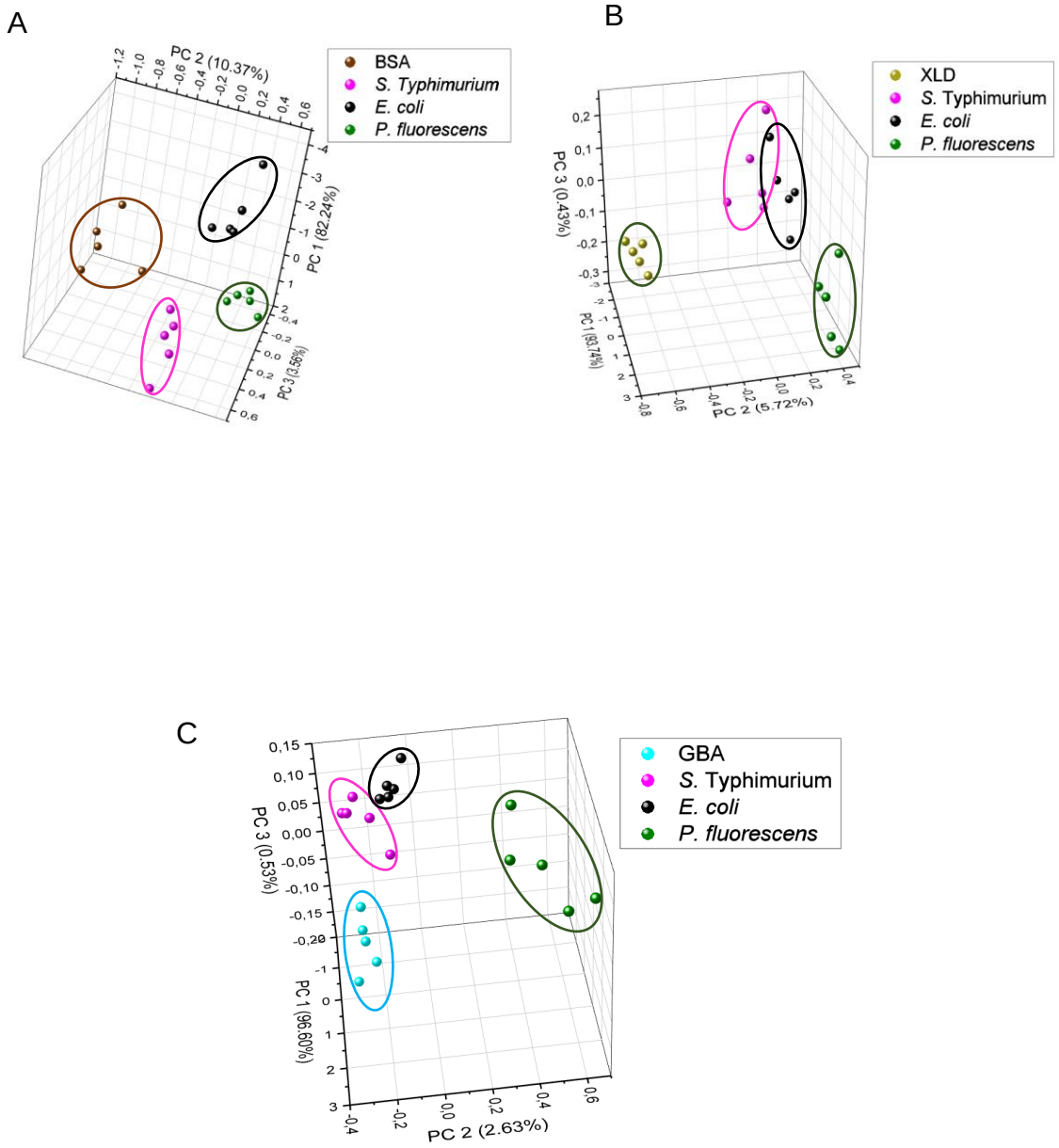


Figura 43: PCAs for *S*. Typhimurium, *E. coli*, e *P. fluorescens* em A) BSA, B) XLD and C) BGA media.

O BSA apresentou *clusters* mais bem definidos e distribuídos (Figura 43A) do que XLD e BGA (Figuras 43B e C, respectivamente), uma vez que *S*. Typhimurium e *E. coli* estavam mais próximas umas das outras nos dois últimos. Além disso, em XLD e BGA, as distribuições de *clusters* foram

semelhantes, com *E. coli* colocado entre *S*. Typhimurium e *P. fluorescens*. Essa característica não foi observada no BSA e, de alguma forma, pode estar relacionado à fonte de carboidratos, via metabólica e, consequentemente, composição/evolução dos gases, uma vez que os BGA e XLD usam lactose e sacarose. Além disso, a xilose também está presente no XLD, enquanto que apenas a glicose é usada no BSA.[182,189]

7.3.1 Análise multivariada – bactérias em meio seletivo

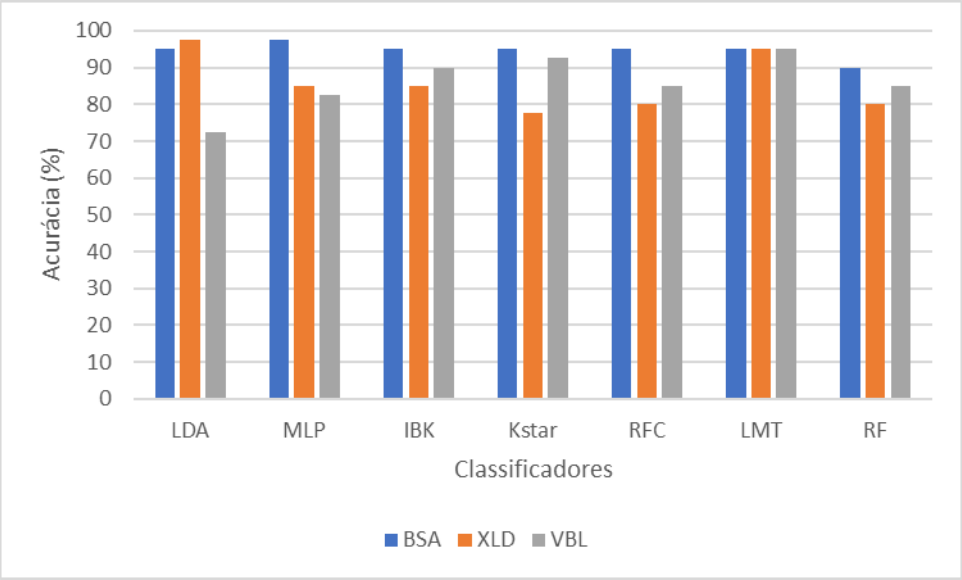
Aplicaram-se os mesmos classificadores usados anteriormente para o meio não seletivo, procurando o classificador que melhor se ajusta a cada sistema (Figura 44A). No geral, a menor acurácia obtida na distinção das bactérias foi de 72,5% para o meio BGA usando LDA, superando o melhor resultado obtido ao analisar todas as cinco bactérias no meio TSA, que foi de 66,7% com o Kstar.

Para o BSA, a acurácia dos classificadores variou de 90,0% a 97,5%, sendo o MPL e o RF os algoritmos que apresentaram maior e menor precisão, respectivamente. No caso do XLD, o melhor resultado foi obtido para o classificador LDA (97,5%), enquanto o Kstar apresentou a menor acurácia (77,5%). No BGA, o valor máximo foi de 95,0%, com LMT. O classificador LMT também apresentou uma acurácia de 95,0% para meios BSA e XLD.

Como feito anteriormente, seleciou-se os classificadores que apresentaram maior acurácia para cada meio, MPL, LDA e LMT, para BSA, XLD e BGA, respectivamente, para análise das matrizes de confusão (Figura 44B, C e D, respectivamente). Embora os *clusters* das bactérias do gráfico do PCA para BSA fossem mais separados que o XLD, as matrizes de confusão

para ambos os meios apresentaram valores idênticos. Em outras palavras, o branco, a *E. coli* e a *P. fluorescens* foram classificados com 100,0% de acurácia e apenas 10,0% dos dados da *S.* Typhimurium foi atribuída à *E. coli*. A partir da matriz de confusão do BGA, a *E. coli* e a *P. fluorescens* foram classificadas com 100% de acerto, enquanto o branco (10,0%) e a *S.* Typhimurium (10,0%) foram classificadas incorretamente e atribuídas à *P. fluorescens*.

A



B	BSA	*S. Typhimurium*	*E. coli*	*P. fluorescens*
BSA	100%			
S. Typhimurium		90%	10%	
E. coli			100%	
P. fluorescens				100%

C	XLD	*S.* Typhimurium	*E. coli*	*P. fluorescens*
XLD	100%			
S. Typhimurium		90%	10%	
E. coli			100%	
P. fluorescens				100%

D	BGA	*S.* Typhimurium	*E. coli*	*P. fluorescens*
BGA	90%			10%
S. Typhimurium		90%		10%
E. coli			100%	
P. fluorescens				100%

Figura 44: A) Comparação da acurácia dos classificadores para os meios BSA, XLD e BGA, B) Matriz de confusão do BSA com MPL, C) Matriz de confusão do XLD com LDA e D) Matriz de confusão do BGA com LMT.

7.4 Conclusão

O presente trabalho avaliou a capacidade do nariz eletrônico, baseado nos sensores do conjunto A, na diferenciação de *S.* Typhimurium de *E. coli*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* incubados em um meio não seletivo (TSA) e *S.* Typhimurium de *E. coli* e *P. fluorescens*, após incubação em meios de cultura seletivos para *S.* Typhimurium (BSA, XLD e BGA). Os resultados obtidos foram avaliados usando algoritmos PCA e diferentes classificadores (LDA, MLP, KNN, Kstar, RFC, LMT e RF). Independentemente dos meios, a variância alcançada para o PCA foi superior a 99,0% para todos os casos, e uma boa separação foi observada entre os *clusters* nos meios seletivos. Para o TSA, houve sobreposição e interseções das classes, o que dificulta a diferenciação das bactérias a partir do PCA.

Com relação à avaliação dos classificadores, para o TSA, a maior precisão foi obtida com a Kstar, 66,7%, enquanto para a BSA, XLD e BGA, a

maior precisão foi de 97,5%, 97,5% e 95,0% com MLP, LDA e LMT, respectivamente.

Finalmente, este método é uma alternativa simples e de baixo custo para a análise de bactérias em meios de cultura, com potencial para ser utilizada como uma ferramenta complementar para o diagnóstico de organismos microbiológicos em alimentos, reduzindo o tempo de análise e etapas. Mais estudos devem ser realizados para otimizar e validar o sistema proposto.

Capítulo 8: Diferenciação de bactérias em carnes

8.1 Resultados e discussão

No capítulo anterior três bactérias (*S.* Typhimurium, *E. coli* e *P. fluorescens*) foram diferenciadas em diferentes meios de cultura. Os classificadores empregados revelaram elevada acurácia em todos os três meios específicos para *S.* Typhimurium, além de ser possível distinguir estas três bactérias no meio não seletivo. Considerando os bons resultados obtidos, estendeu-se este estudo inoculando as mesmas bactérias em três tipos de carnes: bovina, suína e frango. Para cada tipo de carne, foram separadas quatro amostras, sendo estocadas a 11 °C e monitoradas durante três dias com o auxílio de um nariz eletrônico (cada dia uma amostra diferente). Preliminarmente, o PCA foi empregado para avaliar a separação dos *clusters* para posterior análise mais detalhada. Para melhor entendimento do trabalho, este capítulo será dividido em duas secções, primeiramente, será discutido a capacidade do nariz eletrônico em diferenciar às três bactérias em cada uma das categorias de carnes. Em seguida, será discutida a capacidade do nariz em diferenciar o número de dias em que uma amostra de carne está contaminada com as bactérias utilizadas neste estudo. Todas as medidas foram feitas a temperatura ambiente com sete ciclos com 5 s de exposição e 150 s de recuperação. Assim como no capítulo 7, aplicamos apenas o conjunto de sensores A.

8.2 Carne bovina

A Figura 45 mostra os PCAs para cada um dos três dias que realizou-se as medidas das amostras no nariz eletrônico. Em todos os casos as variâncias foram superiores a 99%. No dia 0 (Figura 45A), assim que ocorreu a inoculação das bactérias, não houve diferença entre às três amostras, havendo superposição principalmente entre as contaminadas com *E. coli* e *S.* Typhimurium. A partir do dia 1 (Figura 45B), a separação entre às três bactérias começou a ficar mais evidente, sendo perfeitamente separadas no dia 2 (Figura 45C) e mantendo a separação no dia 3 (Figura 45D).

Este resultado pode ser comparado com o trabalho de Abdallah *et al.*[163], mencionado anteriormente (secção 1.8). A carne bovina foi uma das amostras analisada pelos autores, mostrando que quando contaminada com *S.* Typhimurium e *E. coli* há um aumento na liberação de voláteis entre 2 - 4h de contaminação. Isto pode acontecer dentro das primeiras horas devido as condições de incubação, que foi a 22 °C, enquanto, no presente estudo as amostras foram mantidas a uma temperatura de 11 °C, retardando o deterioramento da carne.

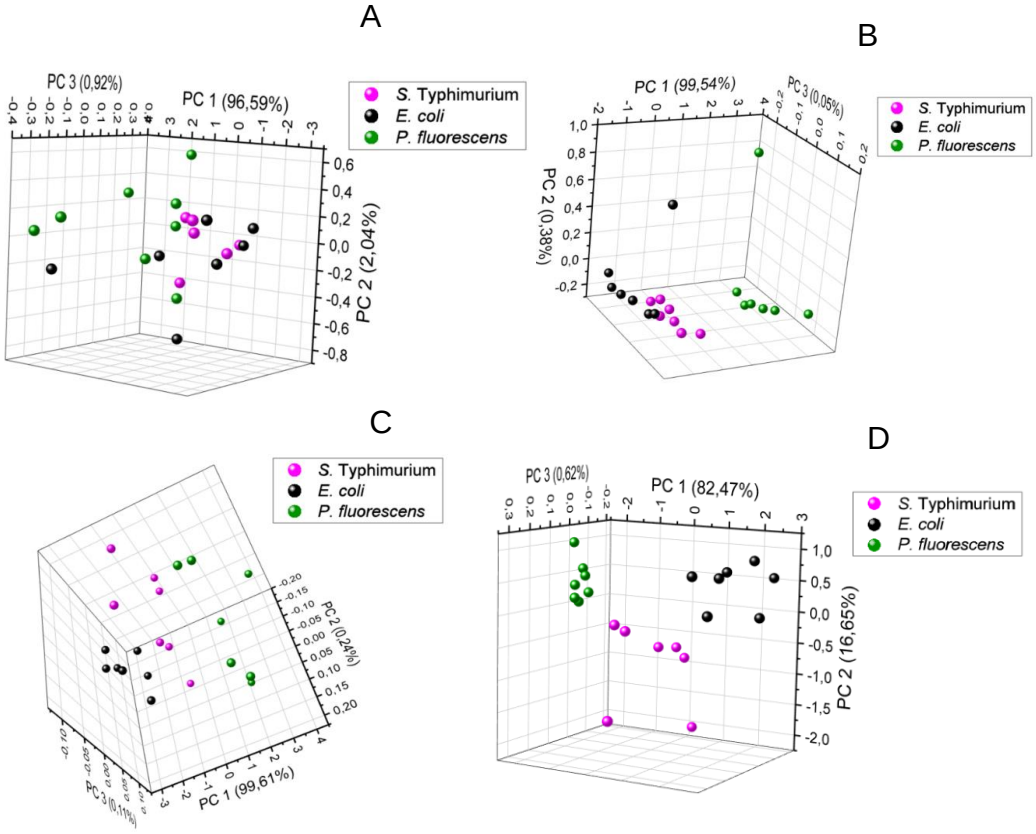


Figura 45: PCA das medidas feitas com amostras de carne bovina contaminada com *S*. Typhimurium, *E. coli* e *P. fluorescens* A) dia 0; B) dia 1; C) dia 2 e D) dia 3.

Submeteram-se os dados a algoritmos de classificação para avaliar a capacidade de previsão do nariz eletrônico. Observando os gráficos dos PCAs, espera-se que o dia 0 seja mais difícil de distinguir as bactérias, pois os clusters estão próximos, enquanto o dia 3 apresenta maior separação entre os conjuntos. Aplicaram-se 4 classificadores (LDA, MLP, Kstar e RF), que foram utilizados nos demais estudos deste capítulo, para avaliar a acurácia na

classificação em cada um dos dias. O método de validação cruzada utilizado foi o K-fold com K=10. A Figura 46 mostra os valores de acurária obtidos, revelando uma tendência que coincide com as imagens dos PCAs. Em todos os casos o dia 0 possui menor taxa de acerto, aumentando gradualmente até atingir 100%. Os classificadores MLP e Kstar atingiram 100% de acurácia no dia 2, mantendo o mesmo valor no dia 3, além disso, o Kstar e o RF apresentaram um índice de acerto acima de 95% no dia 1, enquanto o LDA e MLP apresentaram 80,95% e 85,71, respectivamente.

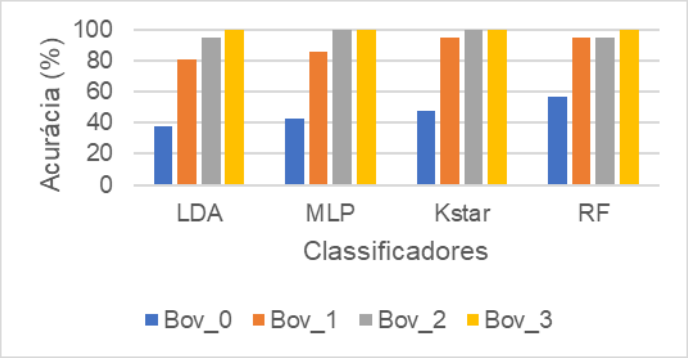


Figura 46: Classificadores aplicados para averiguar a acurácia da distinção da carne bovina contaminada com diferentes bactérias.

As matrizes de confusão para carne bovina são mostradas na Figura 47. A matriz referente ao dia 0 (Figura 47A) mostra que a contaminação com *P. fluorescens* obteve maior acurácia na discriminação, com 71,43%. Tanto as amostras contaminadas com *P. fluorescens* como as contaminadas com *S.* Typhimurium foram confundidas com *E. coli*, enquanto a amostra contaminada com *E. coli* foi confundida com *P. fluorescens* e *S.* Typhimurium. Este resultado está de acordo com o PCA, que mostrou grande sobreposição dos *clusters*, assim como os classificadores que registraram uma baixa acurácia no dia 0. A matriz referente ao dia 1 (Figura 47B) mostra que as amostras

contaminadas com *P. fluorescens* e *S.* Typhimurium são classificadas com 100% de acurácia, enquanto a carne contendo *E. coli* chega a 85,71% de acerto. No dia 2 (Figura 47C) é possível distinguir as três bactérias com 100% de acurácia, sendo mantido no dia 3 (Figura 47D). As matrizes de confusão concordam tanto com os PCAs da Figura 45 e com a acurácia dos classificadores mostradas na Figura 46, mesmo sendo geradas a partir de um único classificador (Kstar). Além disso, a carne bovina contaminada com *P. fluorescens* pode ser diferenciada das demais contaminações no dia 1 com 100% de acurácia, seguida da contaminação com *E. coli* e *S.* Typhimurium.

E. coli	*P, fluorescens*	*S.* Typhimurium	A
28,57	14,29	57,14	*E. coli*
28,57	71,43	0	*P, fluorescens*
57,14	0	42,86	*S.* Typhimurium

E. coli	*P, fluorescens*	*S.* Typhimurium	B
85,71	0	14,29	*E. coli*
0	100	0	*P, fluorescens*
0	0	100	*S.* Typhimurium

E. coli	*P, fluorescens*	*S.* Typhimurium	C
100	0	0	*E. coli*
0	100	0	*P, fluorescens*
0	0	100	*S.* Typhimurium

E. coli	*P, fluorescens*	*S.* Typhimurium	D
100	0	0	*E. coli*
0	100	0	*P, fluorescens*
0	0	100	*S.* Typhimurium

Figura 47: Matriz de confusão para carne bovina A) dia 0; B) dia 1; C) dia 2 e D) dia 3 a partir do classificador Kstar.

8.3 Carne suína

Os PCAs referente à carne suína são mostrados na Figura 48, na qual é possível observar que no dia 0 (Figura 48A) já há uma separação entre a amostra que foi inoculada com *E. coli* das demais. Enquanto no dia 1 (Figura 48B), após 24h, já foi possível a distinção entre às três bactérias, sendo mantido no dia 2 e 3 (Figuras 48C e D). Assim como nos PCAs da carne bovina, as variâncias foram superiores a 99%.

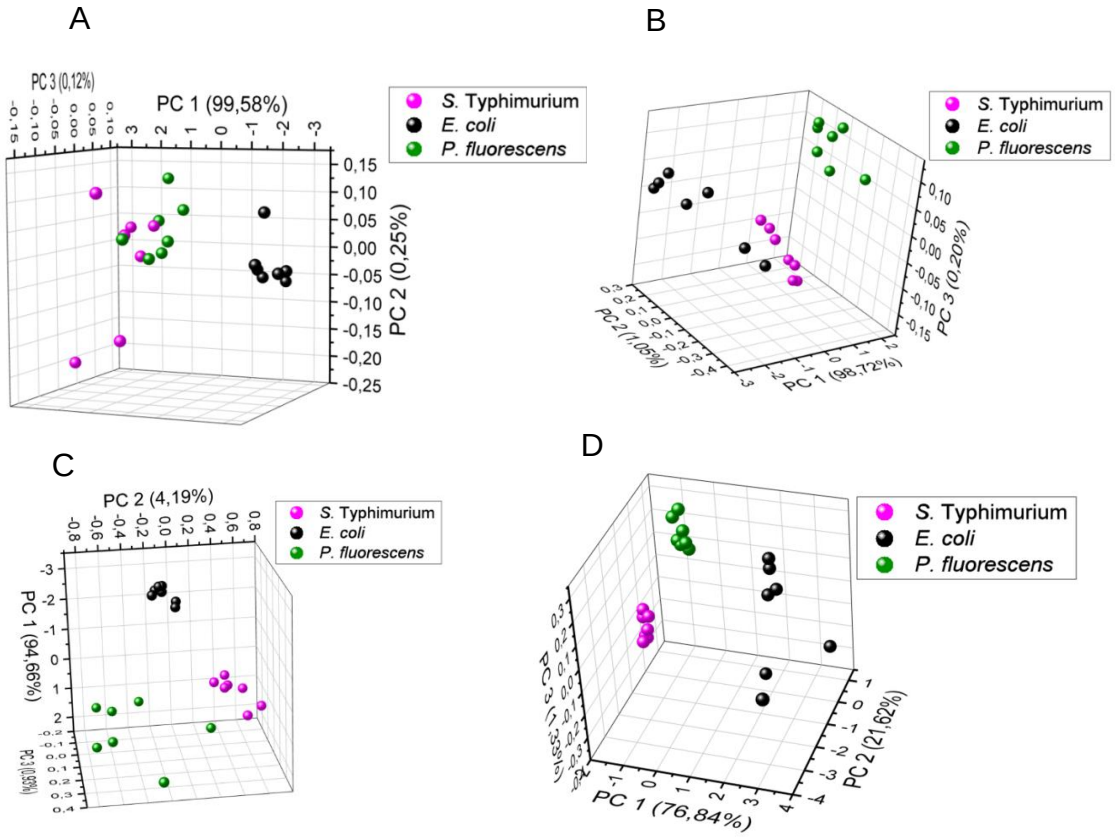


Figura 48: PCA das medidas feitas com amostras de carne suína contaminada com *S*. Typhimurium, *E. coli* e *P. fluorescens* A) dia 0; B) dia 1; C) dia 2 e D) dia 3.

Aplicamos os mesmos classificadores e método de validação cruzada utilizados anteriormente para as amostras de carne suína. A Figura 49 revela uma tendência para os classificadores MLP, Kstar e RF semelhante à tendência observada para a carne bovina. A acurácia na diferenciação das bactérias na carne aumenta de acordo com o tempo de incubação, porém, diferente das amostras de carne bovina, a menor acurácia para a carne suína no dia 0 foi de 80,95% com os três classificadores citados anteriormente, enquanto a melhor classificação no dia 0 para carne bovina foi de 57,14% com o RF. As medidas do dia 2 para estes três classificadores (MLP, Kstar e RF)

alcançaram 100% de acurácia e no dia 1 todos os classificadores apresentaram acurácias superiores a 90%. O LDA, diferente dos demais, atingiu 100% de acurácia no dia 1, no entanto, diminuiu progressivamente a taxa de acerto na diferenciação das bactérias nos dias 2 e 3 (95,24% e 90,48, respectivamente), seguindo uma tendência inversa aos demais classificadores. Esta tendência inversa apresentada no LDA mostra a importância de aplicar uma variedade de classificadores para não chegar a conclusões equivocadas por observar os dados de modo enviesado por um classificador. Os valores obtidos com a classificação das bactérias estão de acordo com os PCAs, que mostram a separação da amostra contaminada com *E. coli* separada das demais no dia 0 e a separação das 3 amostras no dia 1.

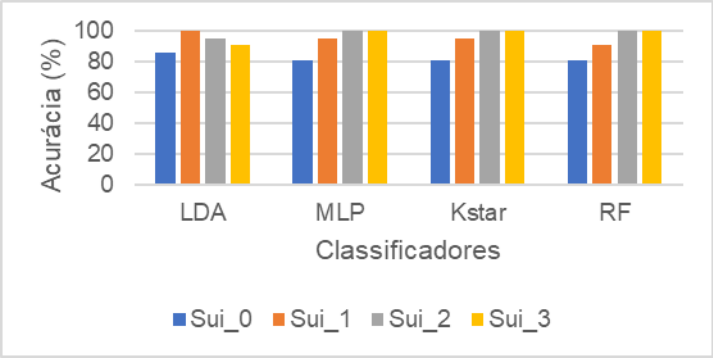


Figura 49: Classificadores aplicados para averiguar a acurácia da distinção da carne suína contaminada com diferentes bactérias.

As matrizes de confusão obtidas a partir do Kstar são mostradas na Figura 50 e concordam com a análise do PCA e com a acurácia observada na Figura 48. A matriz referente ao dia 0 (Figura 50A) apresenta 100% de acurácia na discriminação da amostra contendo *E. coli* e 85,71% na classificação da amostra com *P. fluorescens*. No dia 1 (Figura 50B), apenas a carne com *S.* Typhimurium foi classificada com acurácia inferior a 100%, chegando ao

máximo de acurácia no dia 2 (Figura 50C) e mantendo-se no dia 3 (Figura 50D).

E. coli	*P. fluorescens*	*S.* Typhimurium	A
100	0	0	*E. coli*
0	85,71	14,29	*P. fluorescens*
0	42,86	57,14	*S.* Typhimurium

E. coli	*P. fluorescens*	*S.* Typhimurium	B
100	0	0	*E. coli*
0	100	0	*P. fluorescens*
0	14,29	85,71	*S.* Typhimurium

E. coli	*P. fluorescens*	*S.* Typhimurium	C
100	0	0	*E. coli*
0	100	0	*P. fluorescens*
0	0	100	*S.* Typhimurium

E. coli	*P. fluorescens*	*S.* Typhimurium	D
100	0	0	*E. coli*
0	100	0	*P. fluorescens*
0	0	100	*S.* Typhimurium

Figura 50: Matriz de confusão das amostras de carne suína contaminadas com bactérias para o classificador Kstar do A) dia 0; B) dia 1; C) dia 2 e D) dia 3.

8.4 Carne de frango

A Figura 51 mostra os PCAs para cada um dos dias de medida para carne de frango. O PCA do dia 0 (Figura 51A) apresentou uma característica similar à carne suína, separando a amostra contaminada com *E. coli* das demais. No dia 1 (Figura 51B), as amostras contaminadas com *S.* Typhimurium e *P. fluorescens* já podem ser diferenciadas, alcançando a maior separação no dia 3 (Figura 51D). As variâncias para os PCAs dos dias 0 – 2 foram acima de 99%, enquanto o PCA do dia 3 apresentou variância de 97,6%.

Como mencionado no capitulo 1 (secção 1.8), Timsorn *et al.*[165] estudou o crescimento de colônias de bactérias em carne de frango em duas temperaturas, 30 °C e 4 °C. Apesar de os autores não submeterem as colônias de bactérias a uma análise microbiológica para identificar quais microrganismos estavam presentes na carne, foi possível concluir que há um aumento substancial na quantidade de colônias nas primeiras 24h quando a carne é estocada a 30 °C. No entanto, quando acondicionadas a 4 °C, o

crescimento substancial das colônias ocorrem a partir do segundo dia. Este resultado concorda tanto com os dados do PCA da carne de frango quanto das demais amostras, que apresentaram menor acurácia no dia 0 e que aumentou gradativamente.

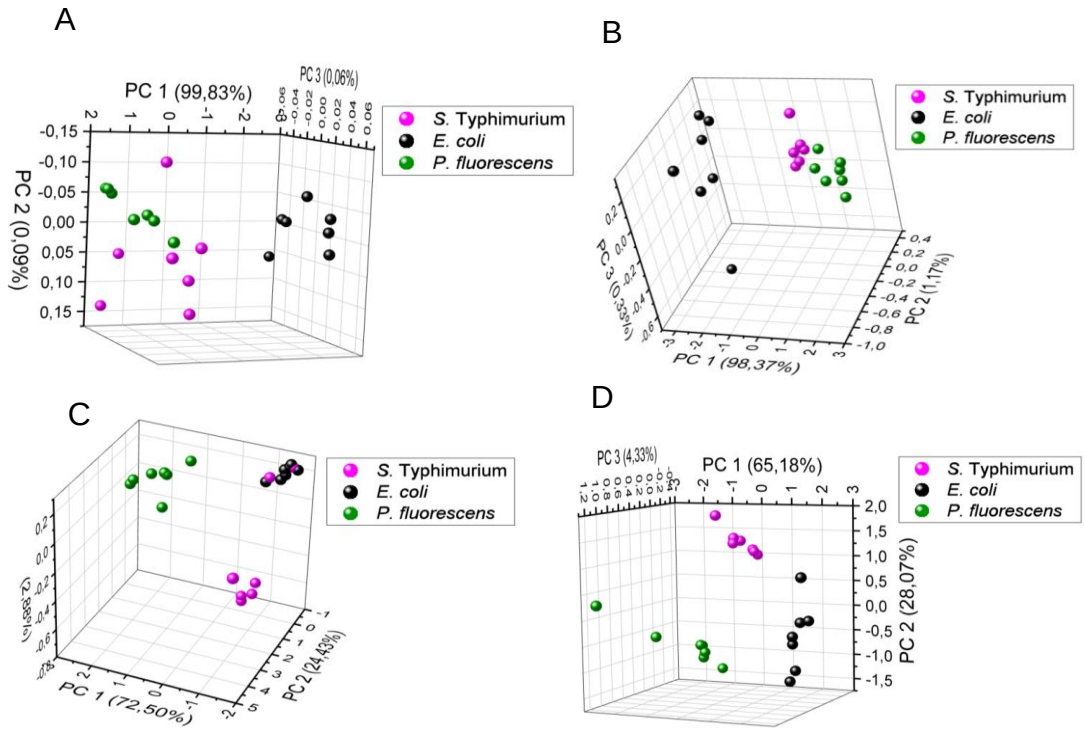


Figura 51: PCA das medidas feitas com amostras de carne de frango contaminada com *S*. Typhimurium, *E. coli* e *P. fluorescens* A) dia 0; B) dia 1; C) dia 2 e D) dia 3.

A classificação aplicada às amostras de carne de frango revelou uma tendência diferente dos tipos de carnes anteriores. É possível observar pela Figura 52 que de modo geral, para todos os classificadores houve um aumento na acurácia do dia 0 para o dia 1, seguido de uma diminuição no dia 2 e um aumento no dia 3. O MLP e Kstar apresentaram melhor desempenho, produzindo 100% de acurácia na classificação das bactérias no dia 1. A taxa de acerto para o dia 0 foi inferior à registrada para as amostras de carne suína,

porém superior as amostras de carne bovina, ficando entre 71,43% - 80,95%. A classificação das bactérias no dia 2 obteve menor acurácia que no dia 0 para os classificadores Kstar e RF. Observando os PCAs é notável que no dia 0 a *S*. Typhimurium e a *P. fluorescens* estão mais próximas, enquanto no dia 2 há pontos da *S*. Typhimurium que estão sobrepostos com o *cluster* da *E. coli*. Logo, são bactérias diferentes que estão causando a confusão na classificação.

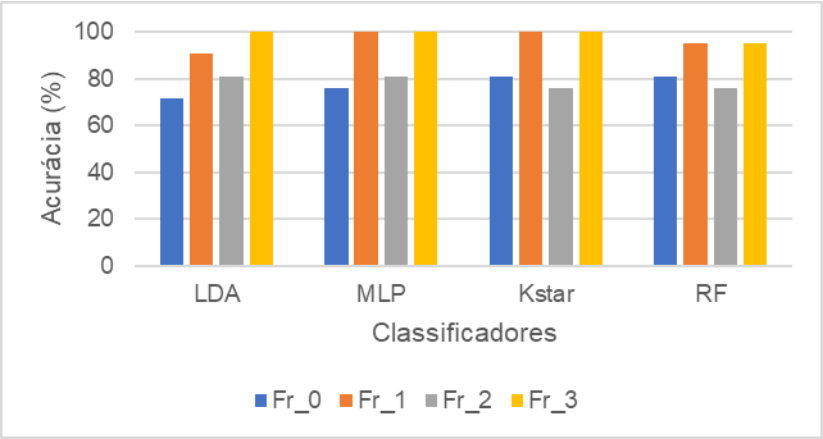


Figura 52: Classificadores aplicados para averiguar a acurácia da distinção da carne de frango contaminada com diferentes bactérias.

A Figura 53 mostra as matrizes de confusão com a acurácia de cada microrganismo usando o Kstar. As matrizes do dia 1 e 3 não confundem nenhuma das bactérias (Figuras 53B e D), concordando com os PCAs (Figuras 51B e D). Como mencionado anteriormente, no dia 0 (Figura 53A) a amostra com *E. coli* é discriminada com 100% de acurácia das demais, porém as amostras com *S*. Typhimurium e *P. fluorescens* são confundidas. No dia 2 (Figura 53C), as amostras com *S*. Typhimurium e *E. coli* são confundidas, enquanto a amostra contaminada com *P. fluorescens* possui 100% de acurácia, confirmando o resultado obtido com os PCAs.

E. coli	*P, fluorescens*	*S.* Typhimurium	A
100	0	0	*E. coli*
0	85,72	14,28	*P, fluorescens*
0	42,86	57,14	*S.* Typhimurium

E. coli	*P, fluorescens*	*S.* Typhimurium	B
100	0	0	*E. coli*
0	100	0	*P, fluorescens*
0	0	100	*S.* Typhimurium

E. coli	*P, fluorescens*	*S.* Typhimurium	C
71,43	0	28,57	*E. coli*
0	100	0	*P. fluorescens*
42,86	0	57,14	*S.* Typhimurium

E. coli	*P, fluorescens*	*S.* Typhimurium	D
100	0	0	E. coli
0	100	0	P, fluorescens
0	0	100	*S.* Typhimurium

Figura 53: Matriz de confusão das amostras de carne de frango contaminadas com bactérias para o classificador Kstar A) dia 0; B) dia 1; C) dia 2 e D) dia 3.

Embora a tendência observada com a acurácia (Figura 52) das bactérias na carne de frango nos diferentes dias de media (que é diferente das tendências observadas nas acurácias das carnes bovinas e suínas) cause estranheza, Timsorn *et al.*[165] observaram algo semelhante. Os autores perceberam que, apesar do aumento das colônias de bactérias causar um aumento na resposta dos sensores, alguns sensores respondiam de maneira inversa, diminuindo a intensidade da resposta com os dias de estoque para as amostras que foram armazenadas a 30 °C, enquanto as amostras estocadas a 4 °C, a diminuição na intensidade da resposta ocorria apenas no dia 1 em alguns sensores. A explicação proposta para este comportamento foi associada ao aumento de compostos voláteis presentes na carne devido à degradação, sendo estes álcoois, aldeídos, cetonas, fenóis, hidrocarbonetos, etc. Estes VOCs se comportam como agentes redutores ou oxidantes que interferem no mecanismo de condutividade dos sensores, que são a base de MOS (no caso de Timsorn). Outra observação dos autores foi que os sensores sensíveis a álcoois não diminuíram a intensidade da resposta com o aumento dos dias de estoque. Os voláteis liberados pela carne foram analisados por

CGMS com 0 e 5 dias de estocagem, revelando que além do aumento no número de VOCs, alguns álcoois, que não foram detectados antes, apareceram depois dos 5 dias de estocagem.

É evidente que não se pode comparar a redução da acurácia que se observa no segundo dia de estocagem do presente estudo com a redução da sensibilidade dos sensores de Timsorn, porém, pode-se observar o que ocorre com a resposta média de cada sensor quando foi exposto aos voláteis das amostras durante os três dias de estocagem. A Figura 54 apresenta a resposta relativa média dos quatro sensores quando expostos aos voláteis das amostras de frango contaminadas com *P. fluorescens* durante os três dias.

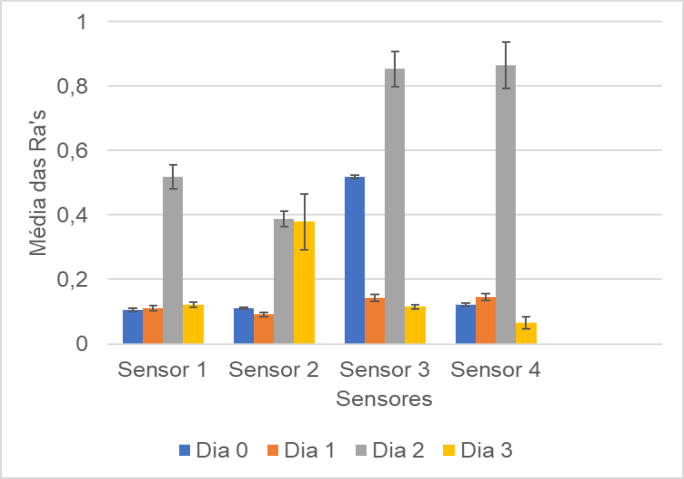


Figura 54: Resposta relativa média dos sensores nos três dias de medida, quando expostos a voláteis da carne de frango contaminada com *P. fluorescens*.

A resposta para todos os sensores é maior no dia 2, indicando que os sensores responderam diferentemente aos voláteis liberados pela carne nesse dia. Apesar de um estudo do mecanismo de condução dos ionogéis não ter sido feito, observou-se nos experimentos com solventes que moléculas polares produziam uma maior intensidade na resposta dos sensores, como álcoois e

cetonas, enquanto moléculas apolares produziram respostas com menor intensidade. Com base nas observações experimentais e no trabalho de Timsorn, pode-se sugerir que a liberação de VOCs pela carne, contendo álcoois como grupos funcionais, pode ter ocasionado respostas semelhantes dos sensores às amostras de carne contaminadas com diferentes bactérias, resultando em padrões de respostas similares e consequentemente menor capacidade de diferenciação. A mesma tendência encontrada nas amostras contaminadas com *P. fluorescens* foi encontrada para as demais bactérias.

8.5 Determinação do tempo de contaminação

Os dados extraídos a partir do nariz eletrônico podem revelar não apenas o que se espera neste estudo (distinguir entre três bactérias em carne bovina, suína e de frango), mas também podem evidenciar informações que não se estava buscando. Após o tratamento dos dados, percebeu-se que, além de diferenciar as bactérias, pode-se também distinguir entre os dias que uma determinada amostra de carne foi contaminada por um dos microrganismos estudados. Assim, nesta secção busca-se identificar o tempo de contaminação de cada amostra de carne (separaram-se os tópicos por bactéria trabalhada para facilitar a compreensão).

8.5.1 Carnes contaminadas com *S.* Typhimurium

A Figura 55 mostra o PCA das carnes contaminadas com *S.* Typhimurium entre os dias 0 e 3. A distribuição dos *clusters* nas três categorias de carnes analisadas é semelhante, os dias 0 e 1 estão próximos, enquanto os

dias 2 e 3 estão em regiões bem definidas. Nos três PCAs a variância obtida foi acima de 99%.

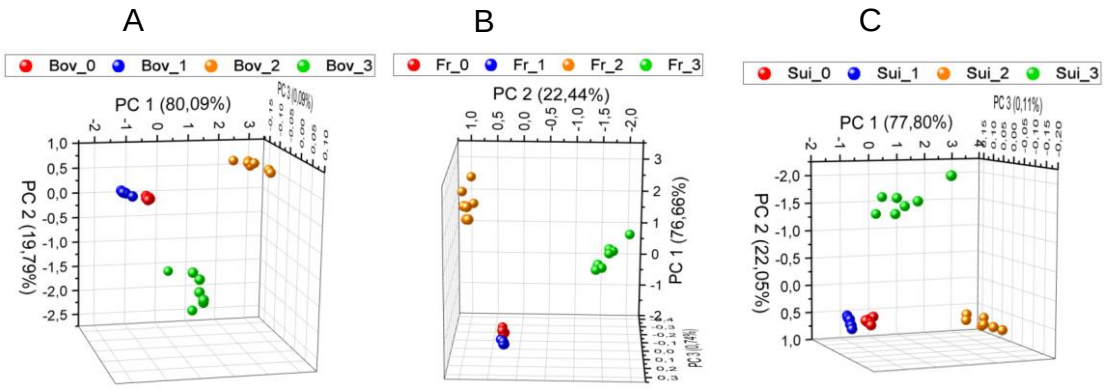


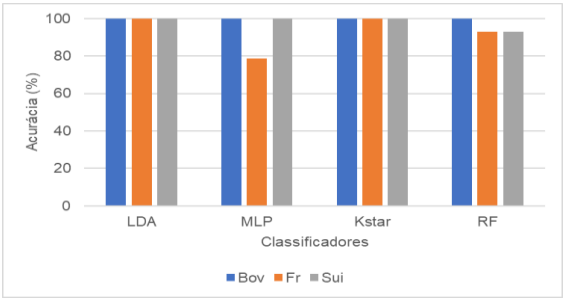
Figura 55*:* PCA das carnes (A) bovina, (B) de frango e (C) suína durante três dias de contaminação com *S*. Typhimurium.

Os mesmos classificadores empregados nos itens 8.1 – 8.3 foram utilizados para avaliar a acurácia na determinação do tempo de contaminação das carnes. A Figura 56A revela que a *S*. Typhimurium inoculada em carne bovina pôde ser diferenciada nos três dias com 100% de acurácia para todos os classificadores. Mesmo os dias 0 e 1 estando próximos no PCA (Figura 55A), é possível distinguir entre eles. A carne suína obteve 100% de acurácias em todos os classificadores, exceto no RF, que foi 92,86%. Já a carne de frango alcançou 100% de acerto para o LDA e Kstar, 92,86% para o RF e 78,57% para o MLP. O menor acerto para a carne de frango está de acordo com o PCA da Figura 55C, no qual os dias 0 e 1 estão muito próximos, contudo, há classificadores que chegam a 100% de acurácia.

Selecionou-se os classificadores com menor desempenho para mostrar os dias que podem ser confundidos na classificação. As matrizes de confusão das carnes contaminadas com *S*. Typhimurium são apresentadas na Figura

56B-D. Como não houve erro de atribuição na carne bovina em nenhum dos classificadores, todos os dias foram classificados com 100% de acurácia. A matriz referente à carne de frango, feita a partir do MLP, mostra que os dias 0 e 1 são confundidos, principalmente o dia 1, que é atribuído erroneamente ao dia 0 em 57,14% dos casos. A matriz da carne suína, feita com o RF, é semelhante à carne de frango, porém a confusão é em menor proporção, em apenas 14,28% dos casos.

A



B

	Bov_0	Bov_1	Bov_2	Bov_3
Bov_0	100	0	0	0
Bov_1	0	100	0	0
Bov_2	0	0	100	0
Bov_3	0	0	0	100

C

	Fr_0	Fr_1	Fr_2	Fr_3
Fr_0	71.43	28.57	0	0
Fr_1	57.14	42.86	0	0
Fr_2	0	0	100	0
Fr_3	0	0	0	100

D

	Sui_0	Sui_1	Sui_2	Sui_3
Sui_0	85.72	14.28	0	0
Sui_1	14.28	85.72	0	0
Sui_2	0	0	100	0
Sui_3	0	0	0	100

Figura 56: Acurácia dos classificadores utilizados na distinção dos dias de contaminação das carnes *S.* Typhimurium (A) e matriz de confusão da evolução da contaminação das carnes (B) bovino com LDA; (C) frango com MLP e (D) suíno com RF.

8.5.2 Carnes contaminadas com *E. coli*

Os PCAs para as carnes contaminadas com *E. coli* (Figura 57) revelam um comportamento semelhante à contaminação com *S.* Typhimurium, porém nas carnes bovina e suína os dias 0 e 1 estão mais afastados (Figuras A e B), enquanto os mesmos dias na carne de frango (Figura C) estão semelhantes a contaminação com *S.* Typhimurium. Os dias 2 e 3 também estão separados

para as três carnes, apenas um pouco mais próximos na carne de frango. A variância para os 3 PCAs foi acima de 99%.

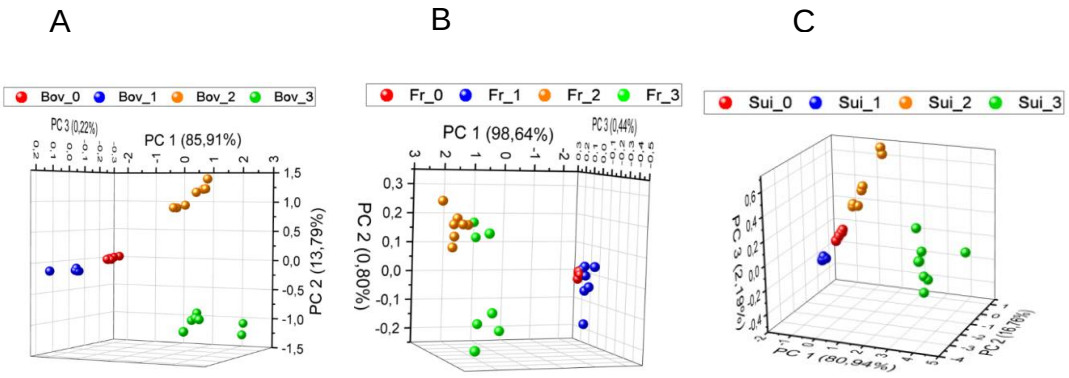
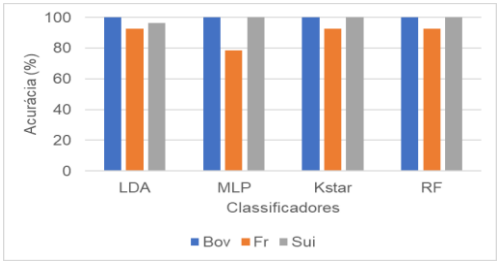


Figura 57: PCA das carnes (A) bovina, (B) de frango e (C) suína durante três dias de contaminação com *E. coli*.

A Figura 58A mostra o resultado da classificação para as carnes contaminadas com *E. coli* durante os três dias. As amostras de carne bovina com *E. coli*, o resultado foi idêntico à contaminação com *S.* Typhimurium, isto é, 100% de acurácia para todos os classificadores. As amostras de carne suína também obtiveram resultados semelhantes com a contaminação com *S.* Typhimurium, com 96,43% de acerto com LDA e 100% com os demais classificadores, seguida da carne de frango, que obteve 78,57% de acerto novamente com o MLP e 92,86% com os demais classificadores. Isto mostra uma tendência para os três tipos de carnes contaminados com diferentes bactérias, o nariz eletrônico apresenta maior facilidade em distinguir o número de dias de contaminação da carne bovina com *E. coli* e *S.* Typhimurium, seguido da carne suína, e com a carne de frango sendo a mais difícil de diferenciar.

Assim como anteriormente, selecionaram-se os classificadores com menor desempenho para analisar a matriz de confusão das carnes

contaminadas com *E. coli* (Figura 58). Para a carne bovina, independente de qual classificador fosse selecionado, o resultado seria o mesmo: 100% de acurácia na classificação de todos os dias. Para fins de comparação utilizou-se a matriz gerada pelo LDA (Figura 58B). Para carne de frango aplicou-se MLP (Figura 58C), que concordou com a análise do PCA da Figura 57B, na qual os dias 0 e 1 estão próximos, sendo complexa a tarefa de separação dos dois dias. O dia 0 é atribuído erroneamente ao dia 1 em 28,57% dos dados, enquanto o inverso ocorre com 57,14% dos dados. Os dias 2 e 3 apresentaram 100% de acerto, mesmo estando próximos no PCA, a classificação pôde ser feita com alta acurácia. Para carne suína utilizou-se o LDA (Figura 58D), que apresentou elevada acurácia com erro na classificação apenas no dia 3 que foi erroneamente atribuído em 14,28% dos casos ao dia 0. Embora tenha ocorrido este erro de atribuição com o LDA, os demais classificadores atribuíram corretamente todas as classes estudadas.



	Bov_0	Bov_1	Bov_2	Bov_3	B
Bov_0	100	0	0	0	
Bov_1	0	100	0	0	
Bov_2	0	0	100	0	
Bov_3	0	0	0	100	

	Fr_0	Fr_1	Fr_2	Fr_3	C
Fr_0	71.43	28.57	0	0	
Fr_1	57.14	42.86	0	0	
Fr_2	0	0	100	0	
Fr_3	0	0	0	100	

	Sui_0	Sui_1	Sui_2	Sui_3	D
Sui_0	100	0	0	0	
Sui_1	0	100	0	0	
Sui_2	0	0	100	0	
Sui_3	14.28	0	0	85.72	

Figura 58: Acurácia dos classificadores utilizados na distinção dos dias de contaminação das carnes com *E. coli* (A) e matriz de confusão da evolução da contaminação com *E. coli* nas carnes (B) bovino com LDA; (C) frango com MLP e (D) suíno com LDA.

8.5.3 Carnes contaminadas com *P. fluorescens*

Os PCAs das carnes contaminadas com *P. fluorescens* mantiveram o comportamento observado nas secções anteriores (Figura 59), com os dias 0 e 1 próximos em todas as carnes e os dias 2 e 3 bem definidos. O *cluster* associado ao dia 2 para a carne de frango e suína apresenta maior dispersão que os observados nos PCAs das contaminações com *S*. Typhimurium e *E. coli* (Figuras 59B e C), porém está separado dos demais *clusters* pela componente principal 1, não havendo sobreposição. A variância para os três PCAs foi acima de 99%.

A B C

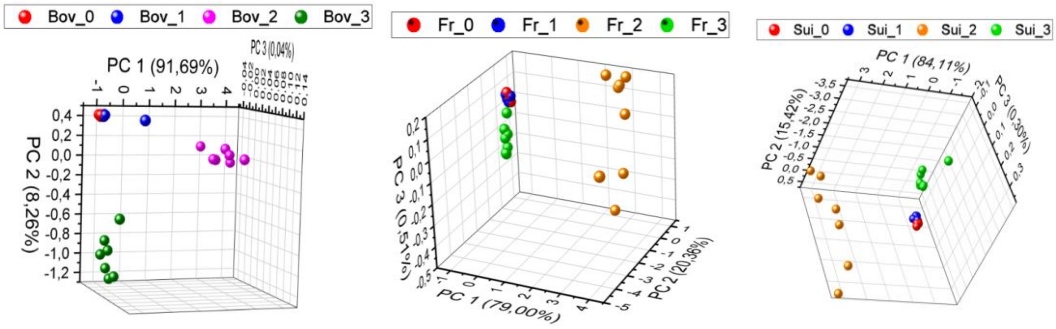
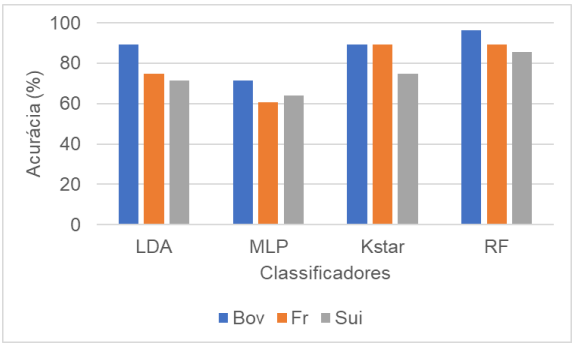


Figura 59: PCA das carnes (A) bovina, (B) de frango e (C) suína durante três dias de contaminação com *P. fluorescens*.

As amostras contaminadas com *P. fluorescens* apresentaram maior dispersão nos dados e, consequentemente, a tarefa de classificação do tempo de contaminação é mais difícil. Os valores das acurácias para cada classificador estão na Figura 60. A carne bovina, que havia apresentado acurácia de 100% em todos os classificadores na determinação do tempo de contaminação com a *S*. Typhimurium e *E. coli*, levou a resultados inferiores com a *P. fluorescens*. Com o RF apresentou 96,43% de acurácia, 89,28% para

o LDA e Kstar e 71,43% para o MLP. Para a carne suína a classificação foi ainda mais difícil 85,71%, 75%, 71,43% e 64,28% para o LDA, Kstar, RF e MLP, respectivamente. A carne de frango obteve acurácia de 89,28% para o Kstar e RF, 75% para o LDA e 60,71% para o MLP. A taxa de acerto do nariz eletrônico na classificação dos dias de contaminação foi menor para todas as carnes, revelando também maior dificuldade em distinguir entre os dias de contaminação para carne suína do que para carne de frango, exceto para o MLP. Estes resultados com a *P. fluorescens* são diferentes da tendência observada com as carnes contaminadas com *S*. Typhimurium e *E. coli*, em que a carne bovina apresentava 100% acurácia, seguida da carne suína e de frango. A Figura 60B-D apresenta as matrizes de confusão para todos os tipos de carne com o classificador que apresentou menor acurácia, MLP. A matriz de confusão da contaminação feita nas amostras de carne bovina (Figura 60B) mostra que assim como no PCA (Figura 59A), os dias 0 e 1 foram confundidos com o dia 1 sendo majoritariamente atribuídos ao dia 0, enquanto os dias 2 e 3 foram classificados com 100% de acurácia. A confusão entre os dias 0 e 1 ocorreu nas demais carnes. A carne de frango alcançou 85,72% de acurácia no dia 2 (18,28% confundido com dia 3) e 100% no dia 3 (Figura 60C), já a carne suína levou a 100% na classificação dos dias 2 e 3 (Figura 60D).



Bov_0	Bov_1	Bov_2	Bov_3	B
71.43	28.57	0	0	Bov_0
85.72	14.28	0	0	Bov_1
0	0	100	0	Bov_2
0	0	0	100	Bov_3

Fr_0	Fr_1	Fr_2	Fr_3	C
28.57	71.43	0	0	Fr_0
71.43	28.57	0	0	Fr_1
0	0	85.72	14.28	Fr_2
0	0	0	100	Fr_3

Sui_0	Sui_1	Sui_2	Sui_3	D
28.57	71.43	0	0	Sui_0
71.43	28.57	0	0	Sui_1
0	0	100	0	Sui_2
0	0	0	100	Sui_3

Figura 60: Acurácia dos classificadores utilizados na distinção dos dias de contaminação das carnes com *P. fluorescens* (A) e matriz de confusão da evolução da contaminação das carnes com MLP (B) bovino; (C) suíno e (D) frango.

8.6 Conclusão

Um nariz eletrônico composto pelos sensores do conjunto A foi aplicado na distinção de três bactérias (*S.* Typhimurium, *E. coli* e *P. fluorescens*) que foram inoculadas em três tipos de carnes (bovina, suína e frango) e monitoradas por um período de três dias. Para todas as carnes, a capacidade do nariz eletrônico de diferenciar as bactérias aumentou com o tempo de incubação, com exceção da carne de frango para a qual houve uma redução na acurácia do dia 1 para o dia 2. Quatro classificadores foram utilizados, mostrando resultados consistentes independente do classificador.

Os dados obtidos com as medidas também foram utilizados para determinar quantos dias uma determinada amostra de carne estava contaminada com as bactérias. Observou-se que em todas as carnes, os primeiros dias eram mais difíceis de distinguir, sendo determinado o tempo de contaminação a partir do segundo dia com mais facilidade. Os mesmos

classificadores foram aplicados, revelando que contaminação com *S*. Typhimurium ou *E. coli* podem ser acompanhadas com elevada acurácia pelo nariz eletrônico. No entanto, a contaminação por *P. fluorescens* apresentou maior dificuldade na identificação dos dias 0 e 1 em todas as carnes, obtendo elevada acurácia apenas nos dias 2 e 3.

Os sensores utilizados demonstraram serem robustos nas aplicações propostas, podendo ser aplicados tanto para determinação de diferentes bactérias em carne bovina, suína e frango, como na identificação do tempo de contaminação das bactérias *S*. Typhimurium, *E. coli* e *P. fluorescens* nas carnes, sendo um método simples e barato de análise.

Capítulo 9: Conclusões gerais

Compósitos a base de ionogéis foram preparados, utilizando um único LI, gerando sensores hidrofílicos e hidrofóbicos. Os sensores foram divididos em dois conjuntos: A – sensores a base de compósitos dopados com diferentes concentrações de magnetita e B – sensores a base de compósitos dopados com partículas de magnetita nuas e funcionalizadas com AO, AL e AA. Estes sensores foram empregados como camada sensível em um nariz eletrônico, estudando primeiramente a capacidade de separação (classificação) de compostos voláteis simples.

A prova de conceito revelou que utilizando um material em que apenas a concentração de um dos componentes é modificada (conjunto A) e/ou mantendo a mesma proporção dos componentes, porém funcionalizando a superfície (conjunto B), é possível obter sensores que respondem diferentemente a voláteis. O conjunto A foi capaz de distinguir 8 compostos, enquanto o conjunto B diferenciou 12 compostos. A análise de TGA mostrou que a estabilidade térmica do LI diminuiu com o aumento da concentração das partículas de Fe_3O_4 e quando se utilizou funcionalizações nas partículas, mesmo mantendo as mesmas concentrações. A análise multivariada, empregando diversos classificadores, resultou em elevada acurácia de ambos os conjuntos de sensores, provando que os sensores podem ser utilizados como camada sensível em nariz eletrônico.

Na busca por aplicações práticas dos sensores desenvolvidos, a análise de mel puro e adulterado foi realizada, utilizando os conjuntos A e B. O gráfico do PCA revelou a separação das amostras de mel adulteradas do mel puro para o conjunto A, sendo confirmado este resultado pela acurácia, obtida com os classificadores, acima de 97%. O Conjunto B, apesar de apresentar

sobreposição das duas classes no PCA, obteve resultados razoáveis de acurácia, chegando a 78,57%, apresentando desempenho inferior ao conjunto A.

Ainda, os sensores foram aplicados no diagnóstico da parvovirose canina a partir de amostras de fezes de cães. Semelhantemente ao que foi observado na aplicação anterior, o conjunto A apresentou melhor desempenho do que o conjunto B. A partir da análise do PCA, foi notória a separação entre amostras controle positivo e amostras controle negativo no conjunto A, enquanto houve sobreposição no PCA do conjunto B. A utilização de diferentes classificadores revelou que o conjunto A é capaz de distinguir entre as amostras independentemente do classificador utilizado, obtendo acurácias entre 99% – 100%. Já o conjunto B apresentou uma grande variação nos valores de acurácia que dependeram do classificador empregado, mesmo assim, aplicando o IBK foi possível obter 95% de acurácia. Considerando o número de amostras utilizadas, o conjunto A mostrou-se mais robusto para o diagnóstico da parvovirose que o conjunto B, que apresentou resultados comparáveis ao conjunto A em apenas um classificador.

Foi também explorada a capacidade do nariz eletrônico na diferenciação de *S*. Typhimurium em detrimento de outras bactérias em meios de culturas seletivos para *S*. Typhimurium e não seletivo. A partir desta aplicação, apenas o conjunto A foi utilizado devido ao melhor desempenho apresentado nas aplicações anteriores e maior facilidade de preparo. Inicialmente, trabalhou-se com cinco tipos de bactérias (*S*. Typhimurium, *E. coli*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*) cultivadas em TSA. O estudo mostrou baixa acurácia na diferenciação das cinco bactérias estudadas, porém foi possível separar a *S*.

Typhimurium das demais. Focando nos meios de cultura seletivos para *S*. Typhimurium, as bactérias que são interferentes são *E. coli* e *P. fluorescens*. Assim, utilizando os meios BSA, XLD e BGA, as três bactérias foram distinguidas, aplicando o nariz eletrônico nos três meios de cultura. A análise multivariada mostrou elevada acurácia na diferenciação das bactérias independente do meio.

Sabendo da capacidade do nariz eletrônico em diferenciar *S*. Typhimurium, *E. coli* e *P. fluorescens* em diferentes meios de cultura, a análise de carnes contaminadas com estas bactérias foi conduzida. Durante três dias as carnes foram avaliadas pelo nariz eletrônico, mostrando que para todas as carnes a acurácia na diferenciação das bactérias aumentava com o tempo de contaminação, exceto para carne de frango em que ocorreu um retrocesso na acurácia no dia 2. Além da diferenciação das bactérias nas carnes, estudou-se também o tempo em que uma determinada amostra de carne estava contaminada. Assim, observou-se que foi possível determinar a contaminação das carnes bovina e suína com *S*. Typhimurium e *E. coli* no primeiro dia, enquanto para a carne de frango, isto ocorreu apenas no dia 2. A contaminação com *P. fluorescens* foi difícil de identificar no primeiro dia em todos os tipos de carne, ocorrendo a identificação com maior acurácia apenas no dia 2.

Finalmente, apresentam-se neste trabalho dois conjuntos de sensores que foram utilizados como camada sensível em um nariz eletrônico para diversas aplicações. Apesar da prova de conceito mostrar o conjunto B distinguindo um maior número de voláteis, as maiores acurácias foram obtidas com o conjunto A nas aplicações propostas. Os sensores desenvolvidos foram

compostos dos mesmos componentes com variações sutis, mostrando que ionogéis podem ser eficientes alternativas em sensores de gás e narizes eletrônicos em situações reais com baixo custo e fácil operação.

10. Referências

(1) Silva, F. B. de F. Estudo Da Influência Dos Parâmetros de Síntese Na Preparação de Nanopartículas de Óxidos Magnéticos de Ferro Por Rota Solvotérmica. 66f. Dissertação (Mestrado Em Química), Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2013.

(2) Silva, A. K. da; Sobieski, E.; Viana, L. H.; Lanças, F. M.; Nazario, C. E. D. Extração Em Fase Sólida Magnética (MSPE): Fundamentos e Aplicações. *Sci. Chromatogr.* **2016**, *8* (4), 239–256. https://doi.org/10.4322/sc.2016.036.

(3) Magalhães, F. Síntese e Caracterização de Óxidos de Ferro e Compósitos Para Aplicações No Tratamento Redox de Efluentes Aquosos. 190f. Tese (Doutorado Em Ciências-Química), Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.

(4) Wu, W.; Wu, Z.; Yu, T.; Jiang, C.; Kim, W.-S. Recent Progress on Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Surface Functional Strategies and Biomedical Applications. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2015**, *16* (2), 023501. https://doi.org/10.1088/1468-6996/16/2/023501.

(5) Toma, H. E. Magnetic Nanohydrometallurgy: A Nanotechnological Approach to Elemental Sustainability. *Green Chem.* **2015**, *17* (4), 2027–2041. https://doi.org/10.1039/C5GC00066A.

(6) Singamaneni, S.; Bliznyuk, V. N.; Binek, C.; Tsymbal, E. Y. Magnetic Nanoparticles: Recent Advances in Synthesis, Self-Assembly and Applications. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21* (42), 16819. https://doi.org/10.1039/c1jm11845e.

(7) Hyeon, T. Chemical Synthesis of Magnetic Nanoparticles. *Chem. Commun.* **2003**, No. 8, 927–934. https://doi.org/10.1039/b207789b.

(8) Lu, A.-H.; Salabas, E. L.; Schüth, F. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2007**, *46* (8), 1222–1244. https://doi.org/10.1002/anie.200602866.

(9) Wu, W.; He, Q.; Jiang, C. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies. *Nanoscale Res. Lett.* **2008**, *3* (11), 397–415. https://doi.org/10.1007/s11671-008-9174-9.

(10) Keskin, S.; Kayrak-talay, D. Review Article A Review of Ionic Liquids towards Supercritical Fluid Applications. *J. Supercrit. Fluids* **2007**, *43*, 150–180. https://doi.org/10.1016/j.supflu.2007.05.013.

(11) Wang, X.; Zhang, Z.; Cao, Y.; Hao, J. Ionogels of Pseudogemini Supra-Amphiphiles in Ethylammonium Nitrate: Structures and Properties. *J. Colloid Interface Sci.* **2017**, *491*, 64–71. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.12.031.

(12) Ghandi, K. A Review of Ionic Liquids, Their Limits and Applications. *Green Sustain. Chem.* **2014**, *04* (01), 44–53. https://doi.org/10.4236/gsc.2014.41008.

(13) Zhang, S.; Li, X.; Chen, H.; Wang, J.; Zhang, J.; Zhang, M. Determination of Physical Properties for the Binary System of 1-Ethyl-3-Methylimidazolium Tetrafluoroborate + H2O. *J. Chem. Eng. Data* **2004**, *49* (4), 760–764. https://doi.org/10.1021/je030191w.

(14) Wasserscheid, P.; Keim, W. Ionic Liquids—New “Solutions” for Transition Metal Catalysis. *Angew. Chemie* **2000**, *39* (21), 3772–3789. https://doi.org/10.1002/1521-3773(20001103)39:21<3772::AID-ANIE3772>3.0.CO;2-5.

(15) SILVA, T. B. DA; MONOGRAFIA. Líquidos Iônicos - Alguns Aspectos Sobre as Ppropriedades , Preparaçãoe e Aplicações, Universidade Federal de Pelotas, 2004.

(16) Sasikumar, B.; Arthanareeswaran, G.; Ismail, A. F. Recent Progress in Ionic Liquid Membranes for Gas Separation. *J. Mol. Liq.* **2018**, *266*, 330–341. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.06.081.

(17) Jaeger, D. A.; Tucker, C. E. Diels-Alder Reactions in Ethylammonium Nitrate, a Low-Melting Fused Salt. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30* (14), 1785–1788. https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)99579-0.

(18) Welton, T. Room-Temperature Ionic Liquids. Solvents for Synthesis and Catalysis. *Chem. Rev.* **1999**, *99* (8), 2071–2084. https://doi.org/10.1021/cr980032t.

(19) Kaufmann, D.; Nouroozian, M.; Henze, H. Molten Salts as an Efficient Medium for Palladium Catalyzed C-C Coupling Reactions. *Synlett* **2000**, *1996* (11), 1091–1092. https://doi.org/10.1055/s-1996-5658.

(20) Zolfigol, M. A.; Khazaei, A.; Moosavi-Zare, A. R.; Zare, A. 3-Methyl-1-Sulfonic Acid Imidazolium Chloride as a New, Efficient and Recyclable Catalyst and Solvent for the Preparation of N-Sulfonyl Imines at Room Temperature. *J. Iran. Chem. Soc.* **2010**, *7* (3), 646–651. https://doi.org/10.1007/BF03246053.

(21) Maruyama, S.; Prastiawan, I. B. H.; Toyabe, K.; Higuchi, Y.; Koganezawa, T.; Kubo, M.; Matsumoto, Y. Ionic Conductivity in Ionic Liquid Nano Thin Films. *ACS Nano* **2018**, *12*, 10509–10517. https://doi.org/10.1021/acsnano.8b06386.

(22) Boruń, A. Conductance and Ionic Association of Selected Imidazolium Ionic Liquids in Various Solvents: A Review. *J. Mol. Liq.* **2019**, *276* (1), 214–224. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.11.140.

(23) Galiński, M.; Lewandowski, A.; Stepniak, I. Ionic Liquids as Electrolytes. *Electrochim. Acta* **2006**, *51* (26), 5567–5580. https://doi.org/10.1016/j.electacta.2006.03.016.

(24) Arbizzani, C.; Biso, M.; Cericola, D.; Lazzari, M.; Soavi, F.; Mastragostino, M. Safe, High-Energy Supercapacitors Based on Solvent-Free Ionic Liquid Electrolytes. *J. Power Sources* **2008**, *185* (2), 1575–1579. https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2008.09.016.

(25) Carvalho, T. I. S. Development of Ion Jelly Thin Films for Electrochemical

Devices. 5f. Tese (Doutorado Em Química Sustentável), Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universiade Nova de Lisboa, Universidade Nova de Lisboa, 2013.

(26) Gardner Swain, C.; Ohno, A.; Roe, D. K.; Brown, R.; Maugh, T. Tetrahexylammonium Benzoate, A Liquid Salt at 25°, a Solvent For Kinetics or Electrochemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89* (11), 2648–2649. https://doi.org/10.1021/ja00987a025.

(27) Wilkes, J. S.; Levisky, J. A.; Wilson, R. A.; Hussey, C. L. Dialkylimidazolium Chloroaluminate Melts: A New Class of Room-Temperature Ionic Liquids for Electrochemistry, Spectroscopy, and Synthesis. *Inorg. Chem.* **1982**, *21* (3), 1263–1264. https://doi.org/10.1021/ic00133a078.

(28) Li Chum, H.; Koch, V. R.; Miller, L. L.; Osteryoung, R. A. An Electrochemical Scrutiny of Organometallic Iron Complexes and Hexamethylbenzene in a Room Temperature Molten Salt. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97* (11), 3264–3265. https://doi.org/10.1021/ja00844a081.

(29) Robinson, J.; Osteryoung, R. A. An Electrochemical and Spectroscopic Study of Some Aromatic Hydrocarbons in the Room Temperature Molten Salt System Aluminum Chloride-n-Butylpyridinium Chloride. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101* (2), 323–327. https://doi.org/10.1021/ja00496a008.

(30) Katayama, Y.; Dan, S.; Miura, T.; Kishi, T. Electrochemical Behavior of Silver in 1-Ethyl-3-Methylimidazolium Tetrafluoroborate Molten Salt. *J. Electrochem. Soc.* **2001**, *148* (2), C102. https://doi.org/10.1149/1.1341243.

(31) Endres, F. Electrodeposition of Nanosized Germanium from GeBr[Sub 4] and GeCl[Sub 4] in an Ionic Liquid. *Electrochem. Solid-State Lett.* **2002**, *5* (3), C38. https://doi.org/10.1149/1.1448185.

(32) Mukhopadhyay, I.; Freyland, W. Electrodeposition of Ti Nanowires on Highly Oriented Pyrolytic Graphite from an Ionic Liquid at Room Temperature. *Langmuir* **2003**, *19* (6), 1951–1953. https://doi.org/10.1021/la020891j.

(33) Buzzeo, M. C.; Evans, R. G.; Compton, R. G. Non-Haloaluminate Room-Temperature Ionic Liquids in Electrochemistry - A Review. *ChemPhysChem* **2004**, *5* (8), 1106–1120. https://doi.org/10.1002/cphc.200301017.

(34) Sutto, T. E.; Duncan, T. T. Electrochemical and Structural Characterization of Mg Ion Intercalation into Co 3O 4 Using Ionic Liquid Electrolytes. *Electrochim. Acta* **2012**, *80*, 413–417. https://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.07.050.

(35) Hagen, M.; Dörfler, S.; Althues, H.; Tübke, J.; Hoffmann, M. J.; Kaskel, S.; Pinkwart, K. Lithium-Sulphur Batteries - Binder Free Carbon Nanotubes Electrode Examined with Various Electrolytes. *J. Power Sources* **2012**, *213*, 239–248. https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2012.04.004.

(36) MacFarlane, D. R.; Forsyth, M.; Howlett, P. C.; Pringle, J. M.; Sun, J.;

Annat, G.; Neil, W.; Izgorodina, E. I. Ionic Liquids in Electrochemical Devices and Processes: Managing Interfacial Electrochemistry. *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40* (11), 1165–1173. https://doi.org/10.1021/ar7000952.

(37) Yang, H.; Gu, Y.; Deng, Y.; Shi, F. Electrochemical Activation of Carbon Dioxide in Ionic Liquid: Synthesis of Cyclic Carbonates at Mild Reaction Conditions. *Chem. Commun.* **2002**, No. 3, 274–275. https://doi.org/10.1039/b108451h.

(38) Le Bideau, J.; Viau, L.; Vioux, A. Ionogels, Ionic Liquid Based Hybrid Materials. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (2), 907–925. https://doi.org/10.1039/C0CS00059K.

(39) Néouze, M. A.; Le Bideau, J.; Gaveau, P.; Bellayer, S.; Vioux, A. Ionogels, New Materials Arising from the Confinement of Ionic Liquids within Silica-Derived Networks. *Chem. Mater.* **2006**, *18* (17), 3931–3936. https://doi.org/10.1021/cm060656c.

(40) Zhang, S.; Zhang, J.; Zhang, Y.; Deng, Y. Nanoconfined Ionic Liquids. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (10), 6755–6833. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00509.

(41) Andrzejewska, E.; Marcinkowska, A.; Zgrzeba, A. Ionogels – Materials Containing Immobilized Ionic Liquids. *Polimery* **2017**, *62* (05), 344–352. https://doi.org/10.14314/polimery.2017.344.

(42) Kimizuka, N.; Nakashima, T. Spontaneous Self-Assembly of Glycolipid Bilayer Membranes in Sugar-Philic Ionic Liquids and Formation of Ionogels. *Langmuir* **2001**, *17* (22), 6759–6761. https://doi.org/10.1021/la015523e.

(43) Minakuchi, N.; Hoe, K.; Yamaki, D.; Ten-no, S.; Nakashima, K.; Goto, M.; Mizuhata, M.; Maruyama, T. Versatile Supramolecular Gelators That Can Harden Water, Organic Solvents and Ionic Liquids. *Langmuir* **2012**, *28* (25), 9259–9266. https://doi.org/10.1021/la301442f.

(44) Yang, P.; Cui, W.; Li, L.; Liu, L.; An, M. Characterization and Properties of Ternary P(VdF-HFP)-LiTFSI-EMITFSI Ionic Liquid Polymer Electrolytes. *Solid State Sci.* **2012**, *14* (5), 598–606. https://doi.org/10.1016/j.solidstatesciences.2012.02.005.

(45) Liu, L.; Yang, P.; Li, L.; Cui, Y.; An, M. Application of Bis(Trifluoromethanesulfonyl)Imide Lithium-N-Methyl-N-Butylpiperidinium-Bis(Trifluoromethanesulfonyl)Imide-Poly(Vinylidene Difluoride-Co-Hexafluoropropylene) Ionic Liquid Gel Polymer Electrolytes in Li/LiFePO 4 Batteries at Different Tempe. *Electrochim. Acta* **2012**, *85*, 49–56. https://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.08.066.

(46) Izák, P.; Hovorka, Š.; Bartovský, T.; Bartovská, L.; Crespo, J. G. Swelling of Polymeric Membranes in Room Temperature Ionic Liquids. *J. Memb. Sci.* **2007**, *296* (1–2), 131–138. https://doi.org/10.1016/j.memsci.2007.03.022.

(47) Lu, J.; Yan, F.; Texter, J. Advanced Applications of Ionic Liquids in

Polymer Science. *Prog. Polym. Sci.* **2009**, *34* (5), 431–448. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2008.12.001.

(48) Noda, A.; Watanabe, M. Highly Conductive Polymer Electrolytes Prepared by in Situ Polymerization of Vinyl Monomers in Room Temperature Molten Salts. *Electrochim. Acta* **2000**, *45* (8–9), 1265–1270. https://doi.org/10.1016/S0013-4686(99)00330-8.

(49) Fukushima, T.; Kosaka, A.; Ishimura, Y.; Yamamoto, T.; Takigawa, T.; Ishii, N.; Aida, T. Molecular Ordering of Organic Single-Walled Carbon Nanotubes. *Science (80-.).* **2003**, *300* (June), 2072–2074.

(50) Chen, S.; Wu, G.; Sha, M.; Huang, S. Transition of Ionic Liquid [Bmim][PF6] from Liquid to High-Melting-Point Crystal When Confined in Multiwalled Carbon Nanotubes. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (9), 2416–2417. https://doi.org/10.1021/ja067972c.

(51) Shi, F.; Zhang, Q.; Li, D.; Deng, Y. Silica-Gel-Confined Ionic Liquids: A New Attempt for the Development of Supported Nanoliquid Catalysis. *Chem. - A Eur. J.* **2005**, *11* (18), 5279–5288. https://doi.org/10.1002/chem.200500107.

(52) Karout, A.; Pierre, A. C. Silica Gelation Catalysis by Ionic Liquids. *Catal. Commun.* **2009**, *10* (4), 359–361. https://doi.org/10.1016/j.catcom.2008.07.046.

(53) Li, Y.; Tian, Y.; Hua, Y.; Xu, S. Europium(III)-Doped Ionogels with Improved Luminescent Properties. *J. Non. Cryst. Solids* **2013**, *376*, 38–42. https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2013.04.038.

(54) Verma, Y. L.; Singh, M. P.; Singh, R. K. Ionic Liquid Assisted Synthesis of Nano-Porous TiO 2 and Studies on Confined Ionic Liquid. *Mater. Lett.* **2012**, *86*, 73–76. https://doi.org/10.1016/j.matlet.2012.07.025.

(55) Dai, S.; Ju, Y. H.; Gao, H. J.; Lin, J. S.; Pennycook, S. J.; Barnes, C. E. Preparation of Silica Aerogel Using Ionic Liquids as Solvents. *Chem. Commun.* **2000**, No. 3, 243–244. https://doi.org/10.1039/a907147d.

(56) Chen, N.; Zhang, H.; Li, L.; Chen, R.; Guo, S. Ionogel Electrolytes for High-Performance Lithium Batteries: A Review. *Adv. Energy Mater.* **2018**, *8* (12), 1702675. https://doi.org/10.1002/aenm.201702675.

(57) Ueno, K.; Hata, K.; Katakabe, T.; Kondoh, M.; Watanabe, M. Nanocomposite Ion Gels Based on Silica Nanoparticles and an Ionic Liquid: Ionic Transport, Viscoelastic Properties, and Microstructure. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112* (30), 9013–9019. https://doi.org/10.1021/jp8029117.

(58) Cheng, Y.; Lu, S.; Zheng, R.; Zhang, D.; Zhang, H. Silica-Based Ionogel Electrolyte with Porous Flower-like Structure Enables Safer Lithium Ion Battery. *Appl. Surf. Sci.* **2019**, *485* (April), 119–127. https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.04.128.

(59) Khurana, S.; Chandra, A. Ion Conducting Polymer-Silica Hybrid Ionogels Obtained via Non-Aqueous Sol-Gel Route. *Solid State Ionics* **2019**, *340*.

https://doi.org/10.1016/j.ssi.2019.115027.

(60) Li, X.; Li, S.; Zhang, Z.; Huang, J.; Yang, L.; Hirano, S. High-Performance Polymeric Ionic Liquid–Silica Hybrid Ionogel Electrolytes for Lithium Metal Batteries. *J. Mater. Chem. A* **2016**, *4* (36), 13822–13829. https://doi.org/10.1039/C6TA04767J.

(61) Vidinha, P.; Lourenço, N. M. T.; Pinheiro, C.; Brás, A. R.; Carvalho, T.; Santos-Silva, T.; Mukhopadhyay, A.; Romão, M. J.; Parola, J.; Dionisio, M.; Cabral, J. M. S.; Afonso, C. a M.; Barreiros, S. Ion Jelly: A Tailor-Made Conducting Material for Smart Electrochemical Devices. *Chem. Commun. (Camb).* **2008**, No. 44, 5842–5844. https://doi.org/10.1039/b811647d.

(62) Couto, R.; Neves, L.; Simões, P.; Coelhoso, I. Supported Ionic Liquid Membranes and Ion-Jelly® Membranes with [BMIM][DCA]: Comparison of Its Performance for CO2 Separation. *Membranes (Basel).* **2015**, *5* (1), 13–21. https://doi.org/10.3390/membranes5010013.

(63) Carvalho, T.; Augusto, V.; Brás, A. R.; Lourenço, N. M. T.; Afonso, C. A. M.; Barreiros, S.; Correia, N. T.; Vidinha, P.; Cabrita, E. J.; Dias, C. J.; Dionísio, M.; Roling, B. Understanding the Ion Jelly Conductivity Mechanism. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116* (9), 2664–2676. https://doi.org/10.1021/jp2108768.

(64) Couto, R. M.; Carvalho, T.; Neves, L. A.; Ruivo, R. M.; Vidinha, P.; Paiva, A.; Coelhoso, I. M.; Barreiros, S.; Simões, P. C. Development of Ion-Jelly Ò Membranes. **2013**, *106*, 22–31.

(65) Zhu, X.; Zhang, H.; Wu, J. Chemiresistive Ionogel Sensor Array for the Detection and Discrimination of Volatile Organic Vapor. *Sensors Actuators B Chem.* **2014**, *202*, 105–113. https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.05.075.

(66) Carvalho, T.; Vidinha, P.; Vieira, B. R.; Li, R. W. C.; Gruber, J. Ion Jelly: A Novel Sensing Material for Gas Sensors and Electronic Noses. *J. Mater. Chem. C* **2014**, *2* (4), 696–700. https://doi.org/10.1039/C3TC31496K.

(67) Axel, R.; Buck, L. B. Odorant receptors and the organization of the olfactory system. Available online: https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2004/press-release/ (accessed Oct 24, 2019).

(68) Sinha, W. Semiconductor Sensors for Detection of Low Concentrations of Alcohol and Acetone Vapour, 2009.

(69) Cordeiro, J. R. Síntese de Materiais Orgânicos Conjugados Com Baixa Egap Para Aplicação Em Células Solares , Magnetorresistores e Narizes Eletrônicos. 471f. Tese (Doutorado Em Química), Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2014.

(70) Chiu, S. W.; Tang, K. T. *Towards a Chemiresistive Sensor-Integrated Electronic Nose: A Review*; 2013; Vol. 13. https://doi.org/10.3390/s131014214.

(71) Moncrieff, R. W. An Instrument for Measuring and Classifying Odours. *J. Appl. Physiol.* **1961**, *16*, 742–749.

(72) WILKENS, W. F.; HARTMAN, J. D. An Electronic Analog for the Olfactory Processes. *J. Food Sci.* **1964**, *29* (3), 372–378. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1964.tb01746.x.

(73) Persaud, K.; Dodd, G. Analysis of Discrimination Mechanisms in the Mammalian Olfactory System Using a Model Nose. *Nature* **1982**, *299*, 352–355.

(74) Gardner, J. W.; Bartlett, P. N.; Dodd, G. H.; Shurmer, H. V. Pattern Recognition in the Warwick Electronic Nose. In *Proceedings of the 8th International Congress of European Chemoreception Reseach Organisation*; University of Warwick, UK, 18-22 July, 1988.

(75) Gardner, J. W.; Bartlett, P. N. *Sensors and Sensory Systems for an Electronic Nose*; Gardner, J. W., Bartlett, P. N., Eds.; Springer Netherlands: Dordrecht, 1991. https://doi.org/10.1007/978-94-015-7985-8.

(76) J. W., P. N. G.; Bartlett. A Brief History of Electronic Noses. *Sensors Actuators B Chem.* **1994**, *18* (1–3), 210–211. https://doi.org/10.1016/0925-4005(94)87085-3.

(77) Yan, J.; Guo, X.; Duan, S.; Jia, P.; Wang, L.; Peng, C.; Zhang, S. Electronic Nose Feature Extraction Methods: A Review. *Sensors* **2015**, *15* (11), 27804–27831. https://doi.org/10.3390/s151127804.

(78) Zohora, S. E.; Khan, A. M.; Hundewale, N. Chemical Sensors Employed in Electronic Noses: A Review. *Adv. Intell. Syst. Comput.* **2013**, *178*, 177–184. https://doi.org/10.1007/978-3-642-31600-5_18.

(79) Lim, S. H.; Martino, R.; Anikst, V.; Xu, Z.; Mix, S.; Benjamin, R.; Schub, H.; Eiden, M.; Rhodes, P. A.; Banaei, N. Rapid Diagnosis of Tuberculosis from Analysis of Urine Volatile Organic Compounds. *ACS Sensors* **2016**, *1* (7), 852–856. https://doi.org/10.1021/acssensors.6b00309.

(80) Rodriguez Gamboa, J. C.; Albarracin E., E. S.; da Silva, A. J.; Ferreira, T. A. E. Electronic Nose Dataset for Detection of Wine Spoilage Thresholds. *Data Br.* **2019**, *25*, 104202. https://doi.org/10.1016/j.dib.2019.104202.

(81) Ezhilan, M.; Nesakumar, N.; Babu, K. J.; Srinandan, C. S.; Rayappan, J. B. B. Freshness Assessment of Broccoli Using Electronic Nose. *Meas. J. Int. Meas. Confed.* **2019**, *145*, 735–743. https://doi.org/10.1016/j.measurement.2019.06.005.

(82) Deshmukh, S.; Bandyopadhyay, R.; Bhattacharyya, N.; Pandey, R. A.; Jana, A. Application of Electronic Nose for Industrial Odors and Gaseous Emissions Measurement and Monitoring – An Overview. *Talanta* **2015**, *144*, 329–340. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.06.050.

(83) Sun, H.; Tian, F.; Liang, Z.; Sun, T.; Yu, B.; Yang, S. X.; He, Q.; Zhang, L.; Liu, X. Sensor Array Optimization of Electronic Nose for Detection of Bacteria in Wound Infection. *IEEE Trans. Ind. Electron.* **2017**, *64* (9), 7350–7358. https://doi.org/10.1109/TIE.2017.2694353.

(84) Dragonieri, S.; van der Schee, M. P.; Massaro, T.; Schiavulli, N.; Brinkman, P.; Pinca, A.; Carratú, P.; Spanevello, A.; Resta, O.; Musti, M.; Sterk, P. J. An Electronic Nose Distinguishes Exhaled Breath of Patients with Malignant Pleural Mesothelioma from Controls. *Lung Cancer* **2012**, *75* (3), 326–331. https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2011.08.009.

(85) Haddi, Z.; Amari, A.; Alami, H.; El Bari, N.; Llobet, E.; Bouchikhi, B. A Portable Electronic Nose System for the Identification of Cannabis-Based Drugs. *Sensors Actuators B Chem.* **2011**, *155* (2), 456–463. https://doi.org/10.1016/j.snb.2010.12.047.

(86) Wilson, A. D.; Baietto, M. Applications and Advances in Electronic-Nose Technologies. *Sensors* **2009**, *9* (7), 5099–5148. https://doi.org/10.3390/s90705099.

(87) Westenbrink, E.; Arasaradnam, R. P.; O'Connell, N.; Bailey, C.; Nwokolo, C.; Bardhan, K. D.; Covington, J. A. Development and Application of a New Electronic Nose Instrument for the Detection of Colorectal Cancer. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *67*, 733–738. https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.10.044.

(88) Loutfi, A.; Coradeschi, S.; Mani, G. K.; Shankar, P.; Rayappan, J. B. B. Electronic Noses for Food Quality: A Review. *J. Food Eng.* **2015**, *144*, 103–111. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.07.019.

(89) Śliwińska, M.; Wiśniewska, P.; Dymerski, T.; Namieśnik, J.; Wardencki, W. Food Analysis Using Artificial Senses. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62* (7), 1423–1448. https://doi.org/10.1021/jf403215y.

(90) Zainab Yunusa, Mohd. Nizar Hamidon, A. K.; Awang, Z. Gas Sensors: A Review. *Sensors & Transducers* **2014**, No. 4, 61–75.

(91) Sanaeifar, A.; Mohtasebi, S. S.; Ghasemi-Varnamkhasti, M.; Ahmadi, H. Application of MOS Based Electronic Nose for the Prediction of Banana Quality Properties. *Meas. J. Int. Meas. Confed.* **2016**, *82*, 105–114. https://doi.org/10.1016/j.measurement.2015.12.041.

(92) Gancarz, M.; Wawrzyniak, J.; Gawrysiak-Witulska, M.; Wiącek, D.; Nawrocka, A.; Tadla, M.; Rusinek, R. Application of Electronic Nose with MOS Sensors to Prediction of Rapeseed Quality. *Meas. J. Int. Meas. Confed.* **2017**, *103*, 227–234. https://doi.org/10.1016/j.measurement.2017.02.042.

(93) Siadat, M.; Losson, E.; Ghasemi-Varnamkhasti, M.; Mohtasebi, S. S. Application of Electronic Nose to Beer Recognition Using Supervised Artificial Neural Networks. In *2014 International Conference on Control, Decision and Information Technologies (CoDIT)*; IEEE, 2014; pp 640–645. https://doi.org/10.1109/CoDIT.2014.6996971.

(94) Dey, A. Semiconductor Metal Oxide Gas Sensors: A Review. *Mater. Sci. Eng. B* **2018**, *229* (July 2017), 206–217. https://doi.org/10.1016/j.mseb.2017.12.036.

(95) Heeger, A.; MacDiarmid, A.; Shirakawa, H. For the discovery and development of conductive polymers

https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2000/summary/ (accessed Oct 31, 2019).

(96) Wang, Y.; Liu, A.; Han, Y.; Li, T. Sensors Based on Conductive Polymers and Their Composites: A Review. *Polym. Int.* **2019**, pi.5907. https://doi.org/10.1002/pi.5907.

(97) Esteves, C. H. A.; Iglesias, B. A.; Ogawa, T.; Araki, K.; Hoehne, L.; Gruber, J. Identification of Tobacco Types and Cigarette Brands Using an Electronic Nose Based on Conductive Polymer/Porphyrin Composite Sensors. *ACS Omega* **2018**, *3* (6), 6476–6482. https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00403.

(98) Cordeiro, J. R.; Li, R. W. C.; Takahashi, É. S.; Rehder, G. P.; Ceccantini, G.; Gruber, J. Wood Identification by a Portable Low-Cost Polymer-Based Electronic Nose. *RSC Adv.* **2016**, *6* (111), 109945–109949. https://doi.org/10.1039/c6ra22246c.

(99) Hussain, A.; Semeano, A. T. S.; Palma, S. I. C. J.; Pina, A. S.; Almeida, J.; Medrado, B. F.; Pádua, A. C. C. S.; Carvalho, A. L.; Dionísio, M.; Li, R. W. C.; Gamboa, H.; Ulijn, R. V.; Gruber, J.; Roque, A. C. A. Tunable Gas Sensing Gels by Cooperative Assembly. *Adv. Funct. Mater.* **2017**, *27* (27), 1700803. https://doi.org/10.1002/adfm.201700803.

(100) Sharma, P.; Ghosh, A.; Tudu, B.; Bandyopadhyay, R.; Bhattacharyya, N. Electronic Nose with Quartz Crystal Microbalance Sensors to Discriminate Indian Black Tea Varieties. In *2012 Sixth International Conference on Sensing Technology (ICST)*; IEEE, 2012; pp 410–413. https://doi.org/10.1109/ICSensT.2012.6461710.

(101) Zevenbergen, M. A. G.; Wouters, D.; Dam, V. A. T.; Brongersma, S. H.; Crego-Calama, M. Electrochemical Sensing of Ethylene Employing a Thin Ionic-Liquid Layer. *Anal. Chem.* **2011**, *83* (16), 6300–6307. https://doi.org/10.1021/ac2009756.

(102) Rehman, A.; Zeng, X. Methods and Approaches of Utilizing Ionic Liquids as Gas Sensing Materials. *RSC Adv.* **2015**, *5* (72), 58371–58392. https://doi.org/10.1039/C5RA06754E.

(103) Yan, J.; Tian, F.; He, Q.; Shen, Y.; Xu, S.; Feng, J.; Chaibou, K. Feature Extraction from Sensor Data for Detection of Wound Pathogen Based on Electronic Nose. *Sensors Mater.* **2012**, *24* (2), 57. https://doi.org/10.18494/SAM.2012.734.

(104) Richards, J. A. *Remote Sensing Digital Image Analysis*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1993. https://doi.org/10.1007/978-3-642-88087-2.

(105) Silva, R. M.; Almeida, T. A.; Yamakami, A. Análise de Métodos de Aprendizagem de Máquina Para Detecção Automática de Spam Hosts. In *Anais do 12th Simpósio Brasileiro de Segurança da Informação e de Sistemas Computacionais (SBSeg2012)*; 2012; pp 2–15.

(106) Li, Z.; Suslick, K. S. A Hand-Held Optoelectronic Nose for the Identification of Liquors. *ACS Sensors* **2018**, *3* (1), 121–127.

https://doi.org/10.1021/acssensors.7b00709.

(107) Moreno-Torres, J. G.; Saez, J. A.; Herrera, F. Study on the Impact of Partition-Induced Dataset Shift on k-Fold Cross-Validation. *IEEE Trans. Neural Networks Learn. Syst.* **2012**, *23* (8), 1304–1312. https://doi.org/10.1109/TNNLS.2012.2199516.

(108) Rodriguez, J. D.; Perez, A.; Lozano, J. A. Sensitivity Analysis of K-Fold Cross Validation in Prediction Error Estimation. *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* **2010**, *32* (3), 569–575. https://doi.org/10.1109/TPAMI.2009.187.

(109) Cawley, G. C.; Talbot, N. L. C. Efficient Leave-One-out Cross-Validation of Kernel Fisher Discriminant Classifiers. *Pattern Recognit.* **2003**, *36* (11), 2585–2592. https://doi.org/10.1016/S0031-3203(03)00136-5.

(110) Yadav, S.; Shukla, S. Analysis of K-Fold Cross-Validation over Hold-Out Validation on Colossal Datasets for Quality Classification. In *2016 IEEE 6th International Conference on Advanced Computing (IACC)*; IEEE, 2016; pp 78–83. https://doi.org/10.1109/IACC.2016.25.

(111) Manyi-Loh, C. E.; Ndip, R. N.; Clarke, A. M. Volatile Compounds in Honey: A Review on Their Involvement in Aroma, Botanical Origin Determination and Potential Biomedical Activities. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12* (12), 9514–9532. https://doi.org/10.3390/ijms12129514.

(112) Castro-Vázquez, L.; Díaz-Maroto, M. C.; de Torres, C.; Pérez-Coello, M. S. Effect of Geographical Origin on the Chemical and Sensory Characteristics of Chestnut Honeys. *Food Res. Int.* **2010**, *43* (10), 2335–2340. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.07.007.

(113) Souza-Kruliski, C. R. de; Ducatti, C.; Venturini Filho, W. G.; Orsi, R. de O.; Silva, E. T. Estudo de Adulteração Em Méis Brasileiros Através de Razão Isotópica Do Carbono. *Ciência e Agrotecnologia* **2010**, *34* (2), 434–439. https://doi.org/10.1590/S1413-70542010000200023.

(114) Zakaria, A.; Shakaff, A. Y. M.; Masnan, M. J.; Ahmad, M. N.; Adom, A. H.; Jaafar, M. N.; Ghani, S. A.; Abdullah, A. H.; Aziz, A. H. A.; Kamarudin, L. M.; Subari, N.; Fikri, N. A. A Biomimetic Sensor for the Classification of Honeys of Different Floral Origin and the Detection of Adulteration. *Sensors* **2011**, *11* (8), 7799–7822. https://doi.org/10.3390/s110807799.

(115) Subari, N.; Mohamad Saleh, J.; Md Shakaff, A.; Zakaria, A. A Hybrid Sensing Approach for Pure and Adulterated Honey Classification. *Sensors* **2012**, *12* (10), 14022–14040. https://doi.org/10.3390/s121014022.

(116) Kang, J.-I.; Park, N.-Y.; Cho, H.-S. Detection of Canine Parvovirus in Fecal Samples Using Loop-Mediated Isothermal Amplification. *J. Vet. Diagnostic Investig.* **2006**, *18* (1), 81–84. https://doi.org/10.1177/104063870601800111.

(117) Mylonakis, M.; Kalli, I.; Rallis, T. Canine Parvoviral Enteritis: An Update on the Clinical Diagnosis, Treatment, and Prevention. *Vet. Med. Res. Reports* **2016**, *Volume 7*, 91–100. https://doi.org/10.2147/VMRR.S80971.

(118) Fontana, D. S.; Rocha, P. R. D.; Cruz, R. A. S.; Lopes, L. L.; Melo, A. L. T.; Silveira, M. M.; Aguiar, D. M.; Pescador, C. A. A Phylogenetic Study of Canine Parvovirus Type 2c in Midwestern Brazil. *Pesqui. Vet. Bras.* **2013**, *33* (2), 214–218. https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000200013.

(119) Pintos, A. B.; Larrama, C. B. N.; Baratta, E. E. R.; Barthe, M. B. B.; Rodonz, J. R. A. Isolation and Characterization of Canine Parvovirus Type 2c Circulating in Uruguay. *Ciência Rural* **2011**, *41* (8), 1436–1440. https://doi.org/10.1590/s0103-84782011005000098.

(120) Cavalli, A.; Martella, V.; Elia, G.; Buonavoglia, D.; Pratelli, A.; Decaro, N.; Buonavoglia, C.; Carmichael, L.; Bozzo, G.; Tempesta, M. Evidence for Evolution of Canine Parvovirus Type 2 in Italy. *J. Gen. Virol.* **2001**, *82* (12), 3021–3025. https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-12-3021.

(121) Parrish, C. R. Host Range Relationships and the Evolution of Canine Parvovirus. *Vet. Microbiol.* **1999**, *69* (1–2), 29–40. https://doi.org/10.1016/S0378-1135(99)00084-X.

(122) Kapil, S.; Cooper, E.; Lamm, C.; Murray, B.; Rezabek, G.; Johnston, L.; Campbell, G.; Johnson, B. Canine Parvovirus Types 2c and 2b Circulating in North American Dogs in 2006 and 2007. *J. Clin. Microbiol.* **2007**, *45* (12), 4044–4047. https://doi.org/10.1128/JCM.01300-07.

(123) Hirasawa, T.; Kaneshige, T.; Mikazuki, K. Sensitive Detection of Canine Parvovirus DNA by the Nested Polymerase Chain Reaction. *Vet. Microbiol.* **1994**, *41* (1–2), 135–145. https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)90143-0.

(124) Elia, G.; Cavalli, A.; Desario, C.; Lorusso, E.; Lucente, M. S.; Decaro, N.; Martella, V.; Buonavoglia, C. Detection of Infectious Canine Parvovirus Type 2 by MRNA Real-Time RT-PCR. *J. Virol. Methods* **2007**, *146* (1–2), 202–208. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.06.017.

(125) Esfandiari, J.; Klingeborn, B. A Comparative Study of a New Rapid and One-Step Test for the Detection of Parvovirus in Faeces from Dogs, Cats and Mink. *J. Vet. Med. Ser. B* **2000**, *47* (2), 145–153. https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2000.00328.x.

(126) Drane, D. P.; Hamilton, R. C.; Cox, J. C. Evaluation of a Novel Diagnostic Test for Canine Parvovirus. *Vet. Microbiol.* **1994**, *41* (3), 293–302. https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)90109-0.

(127) Desario, C.; Decaro, N.; Campolo, M.; Cavalli, A.; Cirone, F.; Elia, G.; Martella, V.; Lorusso, E.; Camero, M.; Buonavoglia, C. Canine Parvovirus Infection: Which Diagnostic Test for Virus? *J. Virol. Methods* **2005**, *126* (1–2), 179–185. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.02.006.

(128) Tinky, S. S.; Ambily, R.; Nair, S. R.; Mini, M. Utility of a Rapid Immunochromatographic Strip Test in Detecting Canine Parvovirus Infection Compared with Polymerase Chain Reaction. *Vet. World* **2015**, *8* (4), 523–526. https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.523-526.

(129) Kumar, P.; Garg, S. K.; Bandyopadhyay, S. K.; Singh, R.; Shrivastava, S. Haemagglutinating Activity of Canine Parvovirus. *Indian J. Anim. Sci.*

2003, *73* (2), 123–125.

(130) Silva, M. M. O.; Castro, T. X.; Costa, E. M.; Trancoso, T. A. L.; Mendes-de-Almeida, F.; Labarthe, N. V.; Cubel Garcia, R. C. N. Comparison of Three Laboratorial Tests for Diagnosis of Canine Parvovirus Infection. *Arq. Bras. Med. Veterinária e Zootec.* **2013**, *65* (1), 149–152. https://doi.org/10.1590/S0102-09352013000100023.

(131) Zhuang, L.; Ji, Y.; Tian, P.; Wang, K.; Kou, C.; Gu, N.; Zhang, Y. Polymerase Chain Reaction Combined with Fluorescent Lateral Flow Immunoassay Based on Magnetic Purification for Rapid Detection of Canine Parvovirus 2. *BMC Vet. Res.* **2019**, *15* (1), 30. https://doi.org/10.1186/s12917-019-1774-3.

(132) Mochizuki, M.; San Gabriel, M. C.; Nakatani, H.; Yoshida, M.; Harasawa, R. Comparison of Polymerase Chain Reaction with Virus Isolation and Haemagglutination Assays for the Detection of Canine Parvoviruses in Faecal Specimens. *Res. Vet. Sci.* **1993**, *55* (1), 60–63. https://doi.org/10.1016/0034-5288(93)90035-E.

(133) Uwatoko, K.; Sunairi, M.; Nakajima, M.; Yamaura, K. Rapid Method Utilizing the Polymerase Chain Reaction for Detection of Canine Parvovirus in Feces of Diarrheic Dogs. *Vet. Microbiol.* **1995**, *43* (4), 315–323. https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)00102-3.

(134) Marenzoni, M. L.; Antognoni, M. T.; Baldelli, F.; Miglio, A.; Stefanetti, V.; Desario, C.; Di Summa, A.; Buonavoglia, C.; Decaro, N. Detection of Parvovirus and Herpesvirus DNA in the Blood of Feline and Canine Blood Donors. *Vet. Microbiol.* **2018**, *224* (August), 66–69. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.08.030.

(135) Decaro, N.; Elia, G.; Martella, V.; Desario, C.; Campolo, M.; Trani, L. Di; Tarsitano, E.; Tempesta, M.; Buonavoglia, C. A Real-Time PCR Assay for Rapid Detection and Quantitation of Canine Parvovirus Type 2 in the Feces of Dogs. *Vet. Microbiol.* **2005**, *105* (1), 19–28. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.09.018.

(136) Liu, Z.; Bingga, G.; Zhang, C.; Shao, J.; Shen, H.; Sun, J.; Zhang, J. Application of Duplex Fluorescence Melting Curve Analysis (FMCA) to Identify Canine Parvovirus Type 2 Variants. *Front. Microbiol.* **2019**, *10* (MAR), 1–8. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00419.

(137) Dunbar, C. A.; Callaway, H. M.; Parrish, C. R.; Jarrold, M. F. Probing Antibody Binding to Canine Parvovirus with Charge Detection Mass Spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (46), 15701–15711. https://doi.org/10.1021/jacs.8b08050.

(138) Cao, X.; Peng, G.; Gu, X.; He, C.; Yue, G.; Shi, J.; Zhong, Z. Development and Clinical Evaluation of a Direct Amplification Method to Diagnose Canine Parvovirus and Canine Distemper Viral Infections in Dogs without Nucleic Acid Extraction. *Pak. J. Zool.* **2019**, *51* (5), 1843–1852. https://doi.org/10.17582/journal.pjz/2019.51.5.1843.1852.

(139) Fend, R.; Geddes, R.; Lesellier, S.; Vordermeier, H.-M.; Corner, L. A. L.;

Gormley, E.; Costello, E.; Hewinson, R. G.; Marlin, D. J.; Woodman, A. C.; Chambers, M. A. Use of an Electronic Nose To Diagnose Mycobacterium Bovis Infection in Badgers and Cattle. *J. Clin. Microbiol.* **2005**, *43* (4), 1745–1751. https://doi.org/10.1128/JCM.43.4.1745-1751.2005.

(140) Cramp, A. P.; Sohn, J. H.; James, P. J. Detection of Cutaneous Myiasis in Sheep Using an 'Electronic Nose.' *Vet. Parasitol.* **2009**, *166* (3–4), 293–298. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.08.025.

(141) Wilson, A.; Oberle, C.; Oberle, D. Detection of Off-Flavor in Catfish Using a Conducting Polymer Electronic-Nose Technology. *Sensors* **2013**, *13* (12), 15968–15984. https://doi.org/10.3390/s131215968.

(142) Wlodzimirow, K. A.; Abu-Hanna, A.; Schultz, M. J.; Maas, M. A. W.; Bos, L. D. J.; Sterk, P. J.; Knobel, H. H.; Soers, R. J. T.; Chamuleau, R. A. F. M. Exhaled Breath Analysis with Electronic Nose Technology for Detection of Acute Liver Failure in Rats. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *53*, 129–134. https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.09.047.

(143) Peled, N.; Ionescu, R.; Nol, P.; Barash, O.; McCollum, M.; VerCauteren, K.; Koslow, M.; Stahl, R.; Rhyan, J.; Haick, H. Detection of Volatile Organic Compounds in Cattle Naturally Infected with Mycobacterium Bovis. *Sensors Actuators B Chem.* **2012**, *171–172*, 588–594. https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.05.038.

(144) Vila, J.; Gómez, M. D.; Salavert, M.; Bosch, J. Methods of Rapid Diagnosis in Clinical Microbiology: Clinical Needs. *Enfermedades Infecc. y Microbiol. Clin. (English ed.)* **2017**, *35* (1), 41–46. https://doi.org/10.1016/j.eimce.2017.01.014.

(145) Scott, E. Food Safety and Foodborne Disease in the 21 St Century. *Can. J. Infect. Dis.* **2003**, *14* (5), 277–280. https://doi.org/10.1155/2003/363984.

(146) Costa, P. D.; Andrade, N. J.; Brandão, S. C. C.; Passos, F. J. V.; Soares, N. de F. F. ATP-Bioluminescence Assay as an Alternative for Hygiene-Monitoring Procedures of Stainless Steel Milk Contact Surfaces. *Brazilian J. Microbiol.* **2006**, *37* (3), 345–349. https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000300026.

(147) Angeletti, S. Matrix Assisted Laser Desorption Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in Clinical Microbiology. *J. Microbiol. Methods* **2017**, *138*, 20–29. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.09.003.

(148) Jadhav, S.; Gulati, V.; Fox, E. M.; Karpe, A.; Beale, D. J.; Sevior, D.; Bhave, M.; Palombo, E. A. Rapid Identification and Source-Tracking of Listeria Monocytogenes Using MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *202*, 1–9. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.023.

(149) Postollec, F.; Falentin, H.; Pavan, S.; Combrisson, J.; Sohier, D. Recent Advances in Quantitative PCR (QPCR) Applications in Food Microbiology. *Food Microbiol.* **2011**, *28* (5), 848–861.

https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.02.008.

(150) Golding, C. G.; Lamboo, L. L.; Beniac, D. R.; Booth, T. F. The Scanning Electron Microscope in Microbiology and Diagnosis of Infectious Disease. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (1), 26516. https://doi.org/10.1038/srep26516.

(151) Gowen, A. A.; Feng, Y.; Gaston, E.; Valdramidis, V. Recent Applications of Hyperspectral Imaging in Microbiology. *Talanta* **2015**, *137*, 43–54. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.01.012.

(152) Banerjee, R.; Tudu, B.; Bandyopadhyay, R.; Bhattacharyya, N. A Review on Combined Odor and Taste Sensor Systems. *J. Food Eng.* **2016**, *190*, 10–21. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.06.001.

(153) Ivnitski, D.; Abdel-Hamid, I.; Atanasov, P.; Wilkins, E. Biosensors for Detection of Pathogenic Bacteria. *Biosens. Bioelectron.* **1999**, *14* (7), 599–624. https://doi.org/10.1016/S0956-5663(99)00039-1.

(154) Gibson, T. D.; Prosser, O.; Hulbert, J. N.; Marshall, R. W.; Corcoran, P.; Lowery, P.; Ruck-Keene, E. A.; Heron, S. Detection and Simultaneous Identification of Microorganisms from Headspace Samples Using an Electronic Nose. *Sensors Actuators B Chem.* **1997**, *44* (1–3), 413–422. https://doi.org/10.1016/S0925-4005(97)00235-9.

(155) Gardner, J. W.; Craven, M.; Dow, C.; Hines, E. L. The Prediction of Bacteria Type and Culture Growth Phase by an Electronic Nose with a Multi-Layer Perceptron Network. *Meas. Sci. Technol.* **1998**, *9* (1), 120–127. https://doi.org/10.1088/0957-0233/9/1/016.

(156) Magan, N.; Pavlou, A.; Chrysanthakis, I. Milk-Sense: A Volatile Sensing System Recognizes Spoilage Bacteria and Yeasts in Milk. *Sensors Actuators, B Chem.* **2001**, *72* (1), 28–34. https://doi.org/10.1016/S0925-4005(00)00621-3.

(157) Pavlou, A.; Turner, A. P. F.; Magan, N. Recognition of Anaerobic Bacterial Isolates in Vitro Using Electronic Nose Technology. *Lett. Appl. Microbiol.* **2002**, *35* (5), 366–369. https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2002.01197.x.

(158) Dutta, R.; Hines, E. L.; Gardner, J. W.; Boilot, P. Bacteria Classification Using Cyranose 320 Elcetronic Nose. *Biomed. Eng. Online* **2002**, *1*, 1–7.

(159) Green, G. C.; Chan, A. D. C.; Goubran, R. A. An Investigation into the Suitability of Using Three Electronic Nose Instruments for the Detection and Discrimination of Bacteria Types. *Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. - Proc.* **2006**, *320*, 1850–1853. https://doi.org/10.1109/IEMBS.2006.259250.

(160) Balasubramanian, S.; Panigrahi, S.; Logue, C. M.; Doetkott, C.; Marchello, M.; Sherwood, J. S. Independent Component Analysis-Processed Electronic Nose Data for Predicting Salmonella Typhimurium Populations in Contaminated Beef. *Food Control* **2008**, *19* (3), 236–246. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.03.007.

(161) Trincavelli, M.; Coradeschi, S.; Loutfi, A.; Söderquist, B.; Thunberg, P. Direct Identification of Bacteria in Blood Culture Samples Using an

Electronic Nose. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **2010**, *57* (12), 2884–2890. https://doi.org/10.1109/TBME.2010.2049492.

(162) Green, G. C.; Chan, A. D. C.; Dan, H.; Lin, M. Using a Metal Oxide Sensor (MOS)-Based Electronic Nose for Discrimination of Bacteria Based on Individual Colonies in Suspension. *Sensors Actuators B Chem.* **2011**, *152* (1), 21–28. https://doi.org/10.1016/j.snb.2010.09.062.

(163) Abdallah, S. A.; Al-Shatti, L. A.; Alhajraf, A. F.; Al-Hammad, N.; Al-Awadi, B. The Detection of Foodborne Bacteria on Beef: The Application of the Electronic Nose. *Springerplus* **2013**, *2* (1), 687. https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-687.

(164) Green, G. C.; Chan, A. D. C.; Lin, M. Robust Identification of Bacteria Based on Repeated Odor Measurements from Individual Bacteria Colonies. *Sensors Actuators B Chem.* **2014**, *190*, 16–24. https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.08.001.

(165) Timsorn, K.; Thoopboochagorn, T.; Lertwattanasakul, N.; Wongchoosuk, C. Evaluation of Bacterial Population on Chicken Meats Using a Briefcase Electronic Nose. *Biosyst. Eng.* **2016**, *151*, 116–125. https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2016.09.005.

(166) Suarez-Cuartin, G.; Giner, J.; Merino, J. L.; Rodrigo-Troyano, A.; Feliu, A.; Perea, L.; Sanchez-Reus, F.; Castillo, D.; Plaza, V.; Chalmers, J. D.; Sibila, O. Identification of Pseudomonas Aeruginosa and Airway Bacterial Colonization by an Electronic Nose in Bronchiectasis. *Respir. Med.* **2018**, *136* (February), 111–117. https://doi.org/10.1016/j.rmed.2018.02.008.

(167) Bonah, E.; Huang, X.; Yi, R.; Aheto, J. H.; Osae, R.; Golly, M. Electronic Nose Classification and Differentiation of Bacterial Foodborne Pathogens Based on Support Vector Machine Optimized with Particle Swarm Optimization Algorithm. *J. Food Process Eng.* **2019**, *42* (6), 1–12. https://doi.org/10.1111/jfpe.13236.

(168) da Rocha, R. T.; Gutz, I. G. R.; do Lago, C. L. A Low-Cost and High-Performance Conductivity Meter. *J. Chem. Educ.* **1997**, *74* (5), 572. https://doi.org/10.1021/ed074p572.

(169) Santana, S. D. F.; Dhadge, V. L.; Roque, A. C. A. Dextran-Coated Magnetic Supports Modified with a Biomimetic Ligand for IgG Purification. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2012**, *4* (11), 5907–5914. https://doi.org/10.1021/am301551n.

(170) Yang, K.; Peng, H.; Wen, Y.; Li, N. Re-Examination of Characteristic FTIR Spectrum of Secondary Layer in Bilayer Oleic Acid-Coated Fe3O4 Nanoparticles. *Appl. Surf. Sci.* **2010**, *256* (10), 3093–3097. https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2009.11.079.

(171) Moré, R.; Scholz, M.; Busse, G.; Busse, L.; Paulmann, C.; Tolkiehn, M.; Techert, S. Hydrogen Bond Dynamics in Crystalline β-9-Anthracene Carboxylic Acid—a Combined Crystallographic and Spectroscopic Study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14* (29), 10187. https://doi.org/10.1039/c2cp40216e.

(172) Moré, R.; Busse, G.; Hallmann, J.; Paulmann, C.; Scholz, M.; Techert, S. Photodimerization of Crystalline 9-Anthracenecarboxylic Acid: A Nontopotactic Autocatalytic Transformation. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114* (9), 4142–4148. https://doi.org/10.1021/jp909513v.

(173) Rodríguez-Pérez, L.; Coppel, Y.; Favier, I.; Teuma, E.; Serp, P.; Gómez, M. Imidazolium-Based Ionic Liquids Immobilized on Solid Supports: Effect on the Structure and Thermostability. *Dalt. Trans.* **2010**, *39* (32), 7565. https://doi.org/10.1039/c0dt00397b.

(174) Hall, M.; Frank, E.; Holmes, G.; Pfahringer, B.; Reutemann, P.; Witten, I. H. The WEKA Data Mining Software. *ACM SIGKDD Explor. Newsl.* **2009**, *11* (1), 10. https://doi.org/10.1145/1656274.1656278.

(175) Chawla, N. V.; Bowyer, K. W.; Hall, L. O.; Kegelmeyer, W. P. SMOTE: Synthetic Minority Over-Sampling Technique. *J. Artif. Intell. Res.* **2002**, *16*, 321–357. https://doi.org/10.1613/jair.953.

(176) Flores, E. F. *Virologia Veterinária*, 1ª Ed.; Santa Maria: Editora UFSM, **2007**.

(177) Decaro, N.; Desario, C.; Beall, M. J.; Cavalli, A.; Campolo, M.; DiMarco, A. A.; Amorisco, F.; Colaianni, M. L.; Buonavoglia, C. Detection of Canine Parvovirus Type 2c by a Commercially Available In-House Rapid Test. *Vet. J.* **2010**, *184* (3), 373–375. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.04.006.

(178) Kim, Y. K.; Lim, S.-I.; Choi, S.; Cho, I.-S.; Park, E.-H.; An, D.-J. A Novel Assay for Detecting Canine Parvovirus Using a Quartz Crystal Microbalance Biosensor. *J. Virol. Methods* **2015**, *219*, 23–27. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.03.015.

(179) Varela, H.; Malta, M.; Torresi, R. M. Técnicas in Situ de Baixo Custo Em Eletroquímica: A Microbalança a Cristal de Quartzo. *Quim. Nova* **2000**, *23* (5), 664–679. https://doi.org/10.1590/S0100-40422000000500016.

(180) Wallace H. Andrews, Hua Wang, A. J. and T. H. Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 5: Salmonella https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam-chapter-5-salmonella (accessed Mar 2, 2020).

(181) Bell, R. L.; Jarvis, K. G.; Ottesen, A. R.; McFarland, M. A.; Brown, E. W. Recent and Emerging Innovations in Salmonella Detection: A Food and Environmental Perspective. *Microb. Biotechnol.* **2016**, *9* (3), 279–292. https://doi.org/10.1111/1751-7915.12359.

(182) Busse, M. Media for Salmonella. *Int. J. Food Microbiol.* **1995**, *26* (1), 117–131. https://doi.org/10.1016/0168-1605(93)E0030-U.

(183) Warburton, D. W.; Bowen, B.; Konkle, A.; Crawford, C.; Durzi, S.; Foster, R.; Fox, C.; Gour, L.; Krohn, G.; LaCasse, P.; Lamontagne, G.; McDonagh, S.; Arling, V.; Mackenzie, J.; Todd, E. C. D.; Oggel, J.; Plante, R.; Shaw, S.; Tiwari, N. P.; Trottier, Y.; Wheeler, B. D. A Comparison of Six Different Plating Media Used in the Isolation of Salmonella. *Int. J. Food Microbiol.* **1994**, *22* (4), 277–289. https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90179-1.

(184) Ministério da saúde, S. de V. em S. *Technical Manual of Laboratorial Diagnostic from Salmonella Spp.: Laboratorial Diagnosis of Salmonella Genre*, 1st ed.; Ministério da Saúde: Brasília, **2011**.

(185) Gorski, L. Selective Enrichment Media Bias the Types of Salmonella Enterica Strains Isolated from Mixed Strain Cultures and Complex Enrichment Broths. *PLoS One* **2012**, *7* (4), e34722. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034722.

(186) Chawla, N. V.; Bowyer, K. W.; Hall, L. O.; Kegelmeyer, W. P. SMOTE: Synthetic Minority Over-Sampling Technique. *J. Artif. Intell. Res.* **2002**, *16*, 321–357. https://doi.org/10.1613/jair.953.

(187) Wray, C. W. and A. *Salmonella in Domestic Animals*; CABI publishing, **2000**.

(188) SAÚDE, M. DA. *Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial Da Salmonella App.*; Brasília, **2011**.

(189) MOATS, W. A. Update on Salmonella in Foods: Selective Plating Media and Other Diagnostic Media. *J. Food Prot.* **1981**, *44* (5), 375–380. https://doi.org/10.4315/0362-028X-44.5.375.

Súmula curricular

Nome: Wellington Belarmino Gonçalves

Local e data de nascimento: Recife – PE, 29 de junho de 1989

Educação:

- Centro de Ensino Experimental Ginásio Pernambucano, Recife-PE, 2005-2007 (Ensino médio)
- Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 2008-2013 (Bacharelado em química)
- Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2013-2015 (Mestrado em química)
- Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2015-2020 (Doutorado em química)
- Universidade Nova de Lisboa, Caparica-Portugal. 2018-2018 (Doutorado na modalidade sanduíche)

Artigo publicado

- NETTO, MARIANA M.O.; GONÇALVES, WELLINGTON B.; LI, ROSAMARIA W.C.; GRUBER, JONAS. Biopolymer based ionogels as active layers in low-cost gas sensors for electronic noses. SENSORS AND ACTUATORS B-CHEMICAL, v. 315, p. 128025, 2020.

Resumos em anais de congressos

- GONÇALVES, W. B.; TEIXEIRA, W. S. R. ; PEREIRA, J. G. ; GRUBER, J. . Electronic nose based on ionogel doped with iron (III) oxide particles applied to detection of honey adulteration. In: 42ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2019, Joinville. Eixos mobilizadores em química, 2019.
- GONÇALVES, W. B.; PADUA, A. C. C. S. ; SANTOS, Gonçalo ; LI, Rosamaria W. C. ; ROQUE, Ana C. A. ; GRUBER, J. . Ionogel Doped with Functionalized Fe3O4 Particles as Sensitive Layer in Gas Sensors for Electronic Nose Application. In: 10th International Conference on Materials for Advanced Technologies, 2019, Cingapura. 10th International Conference on Materials for Advanced Technologies. Programme Book, 2019.

Trabalhos apresentados em congressos

- GONÇALVES, W. B.; TEIXEIRA, W. S. R. ; PEREIRA, J. G. ; GRUBER, J. . Electronic nose based on ionogel doped with iron (III) oxide particles applied to detection of honey adulteration. 2019.

- GONÇALVES, W. B.; PADUA, A. C. C. S.; SANTOS, Gonçalo ; LI, Rosamaria W. C.; ROQUE, Ana C. A.; GRUBER, J. . Ionogel doped with functionalized Fe3O4 particles as sensitive layer in gas sensors for electronic nose application. 2019.

- PEREIRA, J. G.; GONÇALVES, W. B. ; TEIXEIRA, W. S. R.; SAMPAIO, A. N. C. E. ; MIONI, M. S. R. ; GRUBER, J. . Electronic nose based on ionogel doped with Fe3O4 particles applied for discrimination of spoilage and pathogenic microorganisms in raw meats. 2019.

- PEREIRA, J. G.; GONÇALVES, W. B. ; TEIXEIRA, W. S. R.; SAMPAIO, A. N. C. E.; MIONI, M. S. R.; MARTINS, O. A. ; MEGID, J. Fast detection of foodborne pathogens: an interdisciplinary approach. 2019.

Informação complementar

- Bolsista, Programa de educação tutorial pelo MEC/Sesu, 2011-2013
- Bolsista, Monitor da disciplina QFL0342-4 - Reatividade de Compostos Orgânicos, 2014
- Bolsista, Monitor da disciplina QFL0343 - Reatividade de Compostos Orgânicos II e Biomoléculas, 2016
- Bolsista, Monitor da disciplina QFL0314 - Química Orgânica Experimental, 2017