

António Torres

# Desenvolvimento de um Glicómetro com comunicação sem fios

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia  
da Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos  
necessários à obtenção do grau de mestre em Engenharia Biomédica.

Setembro 2016







**FCTUC** FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**EXATRONIC**

Departamento de Física

Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica



# Desenvolvimento de um Glicómetro com comunicação sem fios

António João Magalhães Torres

**Coordenador na FCTUC: Prof. Dr. Custódio Loureiro**  
**Supervisor na Exatronic: Eng. Nuno Figueiredo**

Coimbra, Setembro 2016



# EXATRONIC



**FCTUC** FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA



Esta cópia da tese é fornecida na condição de que quem a consulta reconhece que os direitos de autor são pertença do autor da tese e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a referência apropriada.

This copy of the thesis has been supplied on condition that anyone who consults it is understood to recognize that its copyright rests with its author and that no quotation from the thesis and no information derived from it may be published without proper acknowledgement.

# Agradecimentos

---

Desde o dia da chegada, o meu percurso na Universidade de Coimbra foi recheado de pessoas fantásticas, ótimos profissionais, aventuras e aprendi muito mais do que sonhava aprender na vida.

Cresci muito em Coimbra e é minha obrigação reconhecer que apenas foi possível, porque muitos tornaram o acesso ao ensino de qualidade a minha realidade. Infelizmente ainda demasiados não têm essa oportunidade, gostaria de deixar para todos os que querem estudar e não podem, uma palavra de alento. Muitas vezes foram a minha fonte de força e motivação na lembrança de que há um mundo melhor para construir.

Agradeço por tudo e porque nada me faltou, aos meus pais, ao meu irmão e avós. E ao meu avô António que já tendo partido sei que acreditou em mim e que gostaria de cá estar a acompanhar-me no culminar de um sonho partilhado. À minha restante família, que por vários cantos do mundo, deixam uma casa de portas abertas para mim, são o meu porto seguro e fizeram de mim quem sou hoje.

Saúdo toda a comunidade do Departamento de Física, desde os corpos gerentes, docentes e funcionários, aos atual e transato coordenadores de curso Dr. Miguel Morgado e Dr. João Gil, que sem exceção tornaram o Departamento uma segunda casa e uma biblioteca sempre disponível, a toda a comunidade do DF agradeço por terem sido exímios no desempenho das vossas funções.

Agradeço a toda a gente que participou neste projeto, a toda a equipa da Exatronic que esteve comigo, Manuel Loureiro, Marco Camisão, Deniz Martins, Pedro Marques, João Vilela, Pedro Correia, Nuno Figueiredo e Pedro do Mar pelo método diferente, mas eficaz de ensino.

Ao meu orientador, o professor Doutor Custódio Loureiro pela disponibilidade, pelo interesse demonstrado, por todas as dúvidas esclarecidas e pelos conselhos essenciais na alavancagem deste projeto.

# Resumo

---

Nos últimos anos, o número de mortes causadas por *Diabetes Mellitus* tem vindo a aumentar em Portugal, assim como o envelhecimento da população. Apesar da consciência da população, os hábitos de alimentação errados, juntamente com a pouca atividade física estão progressivamente a tornar a nossa população mais suscetível a esta doença.

A única maneira de atenuar os problemas e complicações que surgem do comportamento patofisiológico complexo de Diabetes é pela monitorização da concentração de glicose no sangue e, portanto, ajustar os níveis de insulina para manter os níveis de glicose baixos, nos vasos sanguíneos.

Na presente dissertação são expostos o problema da Diabetes por todo o mundo e os passos seguidos para desenvolver uma solução para monitorizar glicose que inclui *hardware*, *firmware* para o protótipo final e o *software* para comunicar com o dispositivo, usando o protocolo *Bluetooth Low Energy*.

Numa fase inicial foram estudados os fundamentos do sinal amperimétrico de glicose e os possíveis algoritmos a implementar. Foram apresentados vários métodos para monitorização de glicose, houve um estudo de mercado simples para encontrar as principais características necessárias para fazer um produto competitivo. As características necessárias do protótipo final foram previamente definidas, para orientar o desenvolvimento.

As fases mais avançadas foram focadas no cumprimento dos requisitos e nos testes realizados. Foi desenvolvida uma aplicação *Android* para permitir a visualização de dados após o ensaio, assim como um *software Matlab* que representa os dados armazenados num computador, obtidos por porta série, para armazenamento.

As principais características do dispositivo são a portabilidade, comunicação sem fios e autonomia.

**Palavras-chave:** Diabetes Mellitus, Dispositivos Médicos, Hardware, Bluetooth Low Energy, Altium Designer, Firmware, linguagem de programação C.

# Abstract

---

In recent years, the number of deaths caused due to Diabetes Mellitus has been increasing in Portugal, as well as the aging of the population. Despite population awareness, bad eating habits along with poor physical activity are gradually making our population more susceptible to this disease.

The only way to mitigate the problems and complications arising from Diabetes complex pathophysiological behaviour is monitoring the Glucose concentration in the blood and thus adjust the levels of insulin to maintain low Glucose levels in the blood vessels.

This master thesis exposes the Diabetes problem worldwide and the steps taken to develop a solution for Glucose monitoring, which includes hardware, firmware for the final prototype and software to communicate with the device using the Bluetooth Low Energy Protocol.

In the first stages, the amperometric Glucose signal fundamentals were studied and the possible algorithms to implement. Various methods for Glucose monitoring have been presented, there was a simple market study to find the main characteristics required to make a competitive product. The required characteristics of the final prototype were previously defined to guide the development.

The final stages were focused on the fulfilment of the requirements and the tests taken. An Android app was developed to allow the visualization of data after the test, as well as a Matlab software that plots the data stored in a desktop obtained by serial port, to storage.

The key features of the device are portability, wireless communication and autonomy.

**Keywords:** Diabetes Mellitus, Medical Devices, Hardware, Bluetooth Low Energy, Altium Designer, Firmware, C programming language.

# Lista de Figuras

---

Figura 1 - Estrutura da população, segundo grupos etários, Portugal Continental (1960 – 2011).....	2
Figura 2 - Percentagem de óbitos associados a doenças. ....	3
Figura 3 - Calendarização inicial das principais tarefas do projeto. ....	6
Figura 4 - Calendarização final das tarefas realizadas. ....	7
Figura 5 - Estimativa do número total de adultos (entre 20 e 79 anos) com Diabetes em 2015.....	9
Figura 6 - Mecanismo de estimulação da produção de insulina. ....	11
Figura 7 - Processamento da glicose nas células beta do Pâncreas.....	11
Figura 8 - Classificação dos patamares e intervalos da concentração da glicose.	15
Figura 9 - Funções de uma tira de teste de Refletância. ....	19
Figura 10 - Fotografia dos LED's e do fotodectetor do One Touch meter da Lifescan. ....	20
Figura 11 - Polímero redox.....	24
Figura 12 - Secções de uma tira eletroquímica do Abbott Precision.....	27
Figura 13 - Esquema reativo eletrocatalítico com representação dos elétrodos de paládio.....	28
Figura 14 - Corrente elétrica em função da tensão aplicada. ....	33
Figura 15 - Beckman Coulter Glucose Analyser.....	35
Figura 16- YSI 2300 Stat Plus.....	35
Figura 17 - Needle type sensor. ....	37
Figura 18 - Representação da Iontoforese Reversa. ....	40
Figura 19 - Gluowatch® Biographer.....	41
Figura 20 - Disposição dos elétrodos. ....	41

Figura 21 - Representação gráfica da dependência da Impedância com a Frequência e a concentração de glicose. ....	44
Figura 22 - Instrumento de obter fluido intersticial. ....	46
Figura 23 - Esquema da emissão do FITC fluorescência (verde) e emissão do TRITC (vermelho). ....	47
Figura 24 Diagrama de Jablonski para o processo de FRET. ....	48
Figura 25 - Biossensor de glicose por competição usando ConA. ....	49
Figura 26 - - Esquemático do sistema de OCT. ....	51
Figura 27 - Balança de Precisão utilizada (esquerda), recipiente receptor da quantidade medida e glicose em pó (à direita). ....	59
Figura 28 - Macro Arquitetura do sistema desenvolvido ....	61
Figura 29 – Estrutura da tira One Touch Verio. ....	63
Figura 30 - Esquema 3D da colocação espacial dos conectores. ....	64
Figura 31 - Duas placas desenvolvidas para o Arduino mega 2560 ....	65
Figura 32 - Esquema de ligações elétricas usadas na placa para o Arduino. ....	65
Figura 33 - Tensão elétrica medida em função do tempo. ....	67
Figura 34 - Tensão elétrica medida em função do tempo. ....	67
Figura 35 - Sobreposição da aquisição de sinal sem tira (baseline), sem filtro analógico e sinal de uma tira com filtro arquitetado. ....	67
Figura 36 - Sobreposição de três amostragens da mesma solução de 600mg/dL mas em tempos diferentes. ....	68
Figura 37 - Alongamento do tempo de espera pelo início de variação da diferença de potencial entre os elétrodos da tira. ....	68
Figura 38 - Sobreposição de três sinais da mesma solução. ....	69
Figura 39 - Sobreposição de três sinais de soluções de glicose distintas: 600, 125 e 45 mg/dL. ....	70
Figura 40 - Gráficos dos sinais previamente adquiridos com marcação de alguns pontos de interesse. ....	71

Figura 41 - Layout da PCB removível para condicionamento de sinal.....	73
Figura 42 - Organização da PCB de controlo .....	73
Figura 43 - Esquema de ligações do circuito de alimentação.....	75
Figura 44 - Esquema elétrico das ligações na placa de condicionamento.....	77
Figura 45 - Pinout do Atmega 48/88/168 visto de cima na caixa usada neste projeto (TQFP).....	81
Figura 46 – Flowchart inicial do firmware. ....	82
Figura 47 - Organização do código da última versão de firmware .....	83
Figura 48 - Esquema de Funcionamento do Protocolo SPI.....	84
Figura 49 - Sinal de teste enviado por SPI .....	85
Figura 50 - Esquema de funcionamento do protocolo USART .....	85
Figura 51 - Layout de abertura da aplicação Android.....	88
Figura 52 - Testes Preliminares da aplicação Android desenvolvida.....	88
Figura 53 - Gráfico do ajuste da média de pontos para cada solução, após seleção das medições consideradas válidas .....	94
Figura 54 - Gráfico do ajuste da média de pontos para cada solução, após seleção das medições consideradas válidas.....	94
Figura 55 - Gráfico do ajuste da média de pontos para cada solução, após seleção das medições consideradas válidas.....	95
Figura 56 -Gráfico do ajuste da média de pontos homólogos para cada solução, após seleção das medições consideradas válidas. ....	95
Figura 57 - Esquema elétrico da placa desenvolvida para encaixar no Arduino mega 2560.....	115
Figura 58 - Representação gráfica do top layer da PCB .....	115
Figura 59 - Representação 3D da PCB.....	116
Figura 60 - Representações da solução de conexão desenvolvida.....	116
Figura 61 - Esquema de ligações entre as diversas partes do sistema .....	117

Figura 62 - Esquemático de ligações da alimentação, interruptor e LED, pertencentes a U-Alimentation. ....	117
Figura 63 -Ligações ao conector, pertencentes a U-Aquisition_Female.....	118
Figura 64 - Esquema de dois DAC's, do TL431 (referência elétrica de precisão). .....	118
Figura 65 - Esquemático do header de programação e do sensor de temperatura e filtragem à entrada .....	119
Figura 66 - Esquemático do microcontrolador com pull ups e decouplings .....	119
Figura 67 - Top Layer da PCB de Controlo .....	120
Figura 68 - Esquemático de ligações ao módulo Bluetooth e de um header de 3 pinos para usar a porta UART.....	120
Figura 69 - Representação 3D da placa de Controlo.....	121
Figura 70 - Bottom Layer da PCB de controlo retratada na capa do documento aqui com as dimensões maximizadas para a caixa escolhida.....	121
Figura 71 - Esquema elétrico da placa desenvolvida para as Tiras One Touch Verio .....	122
Figura 72 - Top Layer da placa removível.....	123
Figura 73 - Bottom Layer da Placa removível.....	123
Figura 74 - Representação 3D da placa removível.....	123
Figura 75 - Placa de Controlo fixa na base da caixa final ainda sem o módulo BT. .....	124
Figura 76 - Principais elementos do sistema final. PCB com os componentes todos soldados. ....	124

# Lista de Tabelas

---

Tabela 1 - Competências desenvolvidas ao longo do Projeto .....	8
Tabela 2 - Requisitos Funcionais .....	54
Tabela 3 - Requisitos Não-Funcionais .....	54
Tabela 4 - Interfaces .....	54
Tabela 5 - Autonomia e Consumo .....	55
Tabela 6 – Requisitos de Mecânica e Design .....	55
Tabela 7 - Alarmes e Erros .....	55
Tabela 8 - Requisitos Regulamentares .....	56
Tabela 9 - Representação das diluições efetuadas no estabelecimento de soluções controlo de glicose .....	58
Tabela 10 - Classificação de 5 tiras de acordo com as vendas em Portugal. ....	62
Tabela 11 - Comparação de diversos DAC analisados. ....	77
Tabela 12 - Comparação entre os módulos Bluetooth estudados. ....	79
Tabela 13 - Comparação entre valores medidos com o sensor incluído na placa de controlo e obtidos com uma câmara termográfica. ....	92
Tabela 14 - Pontos de interesse homólogos retirados das curvas cronoamperimétricas.....	93

# Lista de Acrónimos

---

<b>AAL</b>	Ambient Assisted Living
<b>AMPc</b>	Monofosfato de Adenina cíclico
<b>AVC</b>	Acidente Vascular Cerebral
<b>BLE</b>	Bluetooth Low Energy
<b>CAD</b>	Desenho Assistido por Computador
<b>DAC</b>	Digital to Analog Converter
<b>DIP</b>	Dual in-line Package
<b>DGS/MS</b>	Direção Geral de Saúde / Ministério da Saúde
<b>DM</b>	Dispositivo Médico
<b>EEPROM</b>	Electrically Erasable Programmable Read-Only Memory
<b>ERO</b>	Espécies Reativas de Oxigénio
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>GEI</b>	Grupo de Eletrónica e Instrumentação
<b>HDL</b>	Lipoproteínas de alta densidade
<b>HMI</b>	Human Machine Interface
<b>HPLC</b>	High-Performance Liquid Chromatography
<b>HW</b>	Hardware
<b>IMC</b>	Índice de Massa Corporal
<b>INE</b>	Instituto Nacional de Estatística
<b>ISO</b>	International Organization for Standardization

<b>ITU</b>	International Telecommunication Union
<b>LDO</b>	Low Dropout Regulator
<b>LED</b>	Díodo Emissor de Luz
<b>LSB</b>	Bit Menos Significativo
<b>MFR</b>	Medicina Física e de Reabilitação
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PCB</b>	Placa de Circuito Impresso
<b>PCM</b>	Módulo de Proteção de Circuito
<b>PME</b>	Pequenas e Médias Empresas
<b>PTC</b>	Positive Temperature Coefficient
<b>RNA<sub>m</sub></b>	Ácido Ribonucleico mensageiro
<b>ROM</b>	Read-Only Memory
<b>SMT</b>	Tecnologia de Montagem Superficial
<b>SPI</b>	Serial Peripheral Interface
<b>SRAM</b>	Static Random Access Memory
<b>TCP</b>	Tubo Contornado Proximal
<b>UART</b>	Universal Asynchronous Receiver/Transmitter
<b>UC</b>	Universidade de Coimbra



# Conteúdos

---

Agradecimentos .....	vi
Resumo.....	vii
Abstract .....	viii
Lista de Figuras .....	ix
Lista de Tabelas .....	xiii
Lista de Acrónimos.....	xiv
Conteúdos .....	xvii
I. Introdução .....	1
II. Diabetes Mellitus.....	9
1. Classificação e Epidemiologia.....	9
2. Princípios Fisiopatológicos .....	10
3. Diagnóstico .....	14
4. Consequências e Complicações .....	15
III. Monitorização da Concentração de Glicose no Sangue .....	17
1. Importância da Monitorização da Glicose.....	17
2. Métodos de Monitorização de Glicose Discretos .....	18
3. Métodos de Monitorização de Glicose Contínuos .....	36
IV. Requisitos do Sistema .....	53
1. Descrição.....	53
2. Requisitos .....	54
V. Desenvolvimento .....	57
1. Método de Calibração .....	57
2. Hardware .....	60

3.	Firmware: .....	80
4.	Software: .....	88
VI.	Testes ao Sistema .....	91
1	Consumos.....	91
2	Sensor de temperatura.....	91
3	Calibração final .....	92
VII.	Discussão .....	97
1.	Conclusão.....	97
2.	Trabalho futuro e complementos ao sistema.....	99
3.	Apreciação final .....	100
VIII.	Referências Bibliográficas.....	103
IX.	Anexos .....	115
	Anexo A. PCB de encaixe em Arduino.....	115
	Anexo B. Placa de Controlo .....	117
	Anexo C. Placa Removível.....	122
	Anexo D. Sistema .....	124





# I. Introdução

---

Este capítulo tem como objetivo expor a envolvente, a necessidade deste projeto na Exatronic, a delimitação dos principais objetivos e calendarização das metas.

## 1. Âmbito

Neste documento pretende-se descrever o trabalho desenvolvido na disciplina de Projeto durante o ano letivo 2015/2016.

Este trabalho tem como base uma longa preocupação da Exatronic em desenvolver soluções próprias na área do AAL.

Com este projeto pretende-se o desenvolvimento de um protótipo de um glicómetro na forma de um PCB, com capacidade de poder ser integrada num DM com algumas características que o tornam competitivo no mercado.

## 2. Enquadramento

A Exatronic está enquadrada na categoria das PME estando o seu principal meio de negócio ligado à produção e desenvolvimento de placas eletrónicas, que inclui conceção, desenvolvimento, logística de compras e armazém de componentes, montagem de PCB's com os respetivos componentes, testes e controlo de qualidade.

Em 2010 surgiu uma nova área de negócio no sector dos DM, a Exa4Life que tem vindo a desenvolver, certificar e produzir DM; exemplo disso são os produtos disponíveis na área da MFR, nomeadamente um dispensador de fármacos transcutâneo por iontoforese e o ExaAllinOne, um dispositivo que permite a monitorização de pressão arterial, oximetria, ritmo cardíaco, temperatura, ritmo respiratório e IMC [1].

No caso particular da monitorização de Diabetes ainda não havia nenhum produto/estudo nesse sentido, portanto é de todo o interesse a reunião de informação sobre o tema de forma organizada, de forma a mais tarde a Exatronic ter mais condições

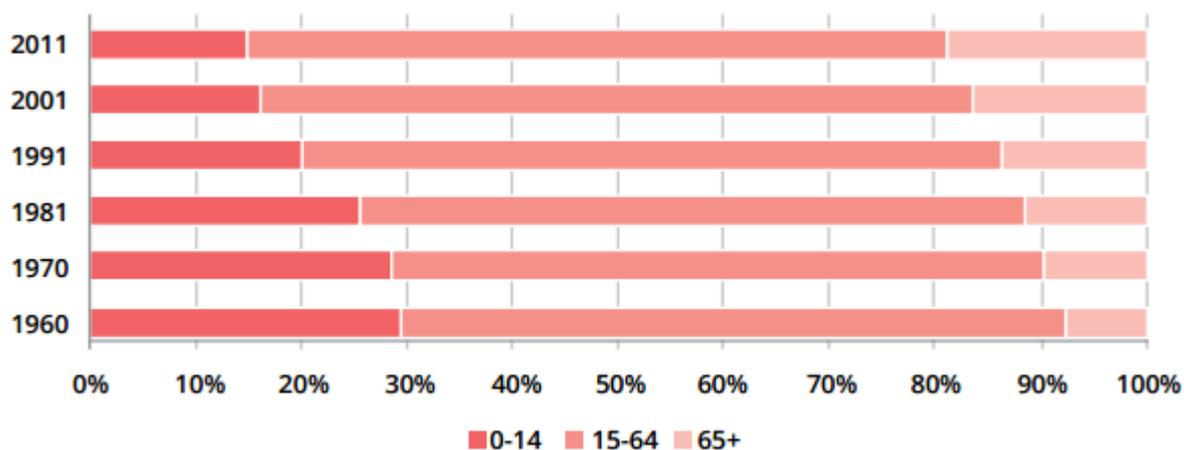
para ponderar uma evolução para um produto industrializado com características melhoradas e uma investida no mercado, após certificação.

A *Diabetes Mellitus* é uma doença endócrina intimamente ligada à regulação da concentração de glicose, na corrente sanguínea e surge como consequência de problemas relacionados com a insulina, uma hormona produzida no Pâncreas.

Após ser detetada, o tratamento é essencial para prevenir o aparecimento das consequências mais graves, que incluem cegueira, retinopatia diabética, doenças cardiovasculares, falência renal, perda de sensibilidade nervosa nas extremidades corporais e amputação. Só a terapia intensiva, aliada à medição regular da glicose, pode impedir o aparecimento destes problemas. Para isso é necessário uma alimentação cuidada, exercício físico frequente e redução de peso para os doentes com peso excessivo. A medição frequente, se registada, tem o benefício de fornecer informação necessária ao endocrinologista para definir as melhores estratégias do tratamento.

Em 2012 morreram cerca de 1,5 milhões de pessoas no mundo devido à *Diabetes Mellitus*, de acordo com a OMS, sendo uma das 10 maiores causas de morte no mundo, ocupando 2,7% do conjunto de todas as causas de morte [2].

Em Portugal, segundo a Pordata, é a terceira maior causa de morte identificada, sendo a maior provocadora de mortes a categoria das doenças do sistema circulatório, que como pode ser constatado no capítulo II, podem ser consequência da Diabetes. No entanto constata-se também que o aumento das mortes devidas à Diabetes tem crescido



Fonte: INE, Censos 2011

Figura 1 - Estrutura da população, segundo grupos etários, Portugal Continental (1960 – 2011). Imagem adaptada de: [5]

a um ritmo muito inferior ao dos tumores malignos [3]. Estes dados podem ser analisados no gráfico da figura 2.

Segundo um relatório do Observatório Nacional da Diabetes estima-se que em 2013, a prevalência da Diabetes na população portuguesa, com idades compreendidas entre os 20 e os 79 anos (grupo que engloba 7,8 milhões de indivíduos) foi de 13,0%, isto significando que mais de 1 milhão de portugueses neste grupo etário tem Diabetes [4]. Este relatório sugere também que o aumento na taxa de prevalência na faixa etária dos 20 aos 79 anos está relacionada com o aumento da população envelhecida em Portugal e, portanto, reflete-se num incremento de 1,3 pontos percentuais da prevalência apenas entre 2009 e 2013, o que é bastante preocupante dada a tendência de envelhecimento da população Portuguesa, com base nos censos de 1960 a 2011 representada na figura 1 [5].

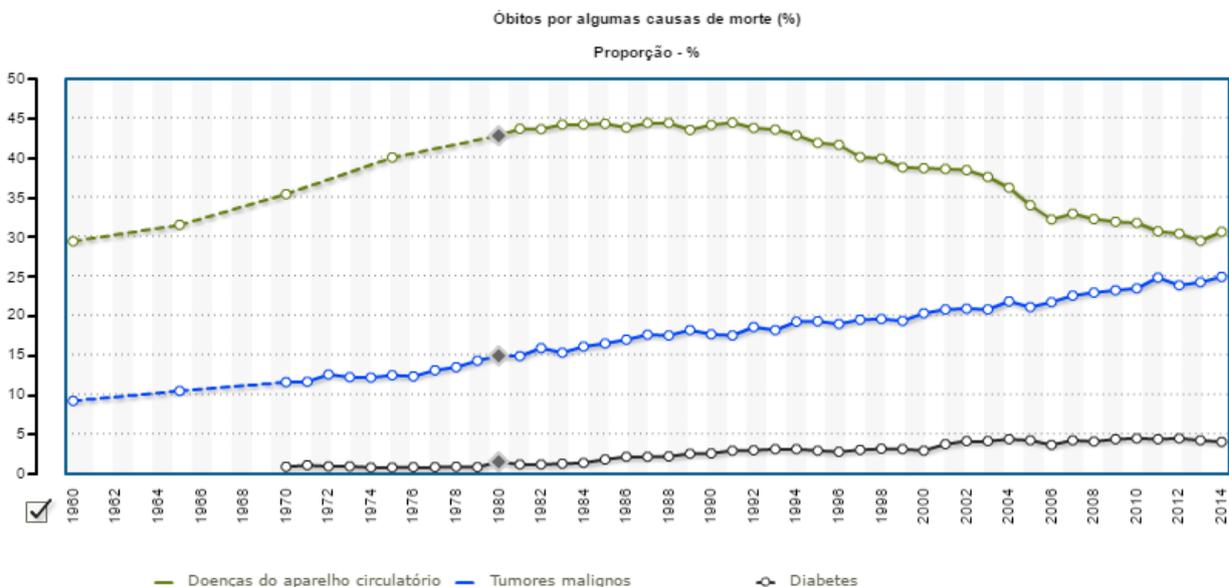


Figura 2 - Percentagem de óbitos associados a doenças. Imagem adaptada de [3].

Pelo estudo desenvolvido ao longo deste projeto foi possível perceber que atualmente, os Glicómetros presentes no mercado são portáteis, e de fácil utilização. E define-se um glicómetro ideal como aquele que tem grande durabilidade, possibilita várias medições diárias, realizadas pelo próprio doente e mantém, durante a utilização regular, resultados com a exatidão e precisão requeridas para obter um resultado com valor clínico, a partir do qual se deve tirar ilações sobre o procedimento a tomar para ajustar o nível sanguíneo de glicose.

Os biossensores de uso doméstico, particularmente, os biossensores de glicose no sangue, dominam atualmente 80% do mercado mundial em biossensores. Destes, os biossensores de glicose amperimétricos portáteis são os mais eficientes e com mais sucesso no mercado [6].

Existem investigações que comprovam a evolução. Por exemplo, os medidores de glicose da geração 1990-2000 são mais pequenos, mas apelativos esteticamente e ligeiramente mais precisos em comparação com os aparelhos da geração anterior [7]. Mas apesar de toda evolução conseguida e de ser uma doença com parâmetros de tratamento estabelecidos pelos intervenientes na medicina, atualmente ainda reside o subtratamento. O controlo da glicemia ainda não é o ideal, especialmente para os diabéticos de tipo 1 [8].

### 3. Objetivos

Os principais objetivos a cumprir delineados para este projeto, proposto pela Exatronic foram os seguintes:

- Estudo do estado da arte, identificando equipamentos médicos de medição de glicemia e quais as suas características técnicas;
- Levantamento dos requisitos para o protótipo do dispositivo médico a desenvolver;
- Familiarização com o software de desenvolvimento de PCB's Altium Designer;
- Desenvolvimento do Hardware necessário à leitura de sinais glicométricos;
- Familiarização com linguagem de programação C;
- Desenvolvimento do Firmware necessário para o funcionamento esperado do protótipo;
- Testes ao Sistema desenvolvido;
- Desenvolvimento de uma HMI.

## 4. Gestão do Projeto

O presente documento surge como resultado do trabalho desenvolvido ao longo da disciplina de projeto para colmatar a necessidade e interesse da Exatronic no tema da Diabetes, concretamente no mercado dos Glicómetros.

Para este projeto foi desenvolvido HW no sentido de possibilitar a leitura de diferentes tiras eletroquímicas para medição de glicemia, comunicação por *Bluetooth* e operação por bateria. O *Firmware* foi concebido para permitir a estimulação das tiras eletroquímicas, com capacidade para detetar a inserção da gota de sangue e correspondente leitura da concentração de glicose. Foi também elaborado um modo de "sleep", ativado quando o utilizador liga o aparelho e não o utiliza por mais de 30 segundos e a possibilidade de ligação do aparelho com inserção da tira descartável.

O resultado final é um protótipo capaz de gerar curvas amperimétricas e enviar os resultados da medição de glicose e temperatura para *smartphone* por *Bluetooth*.

Esta solução proposta poderá facilmente evoluir para um produto final preparado para o mercado, com características diferenciadoras, tendo sido desenvolvida com esse propósito.

O trabalho realizado teve início a 7 de outubro de 2015 e terminou a 8 de agosto de 2016, estando dividido em duas macro fases, a primeira, até 6 de fevereiro de 2016, foi desenvolvida nas instalações do GEI, na UC e a segunda metade, a partir de 7 de fevereiro, até ao final, nas instalações da Exatronic.

Na figura 3 está representado um diagrama de Gantt das macro tarefas propostas pela Exatronic com a respetiva previsão da sua duração e calendarização.

Nº	Nome da Tarefa	Duração	2015			2016									
			Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	
1	Familiarização com Ambiente GEI e Enquadramento projeto	7 dias	█												
2	Estudo do estado da arte	15 dias	█	█											
3	Estudo Teórico dos conceitos inerentes ao projeto	15 dias	█	█											
4	Especificação de Requisitos	30 dias		█	█										
5	1º Relatório Intermédio	15 dias			█										
6	Apresentação Intercalar	3 dias				█									
7	Familiarização com desenvolvimento de HW	7 dias						█							
8	Desenvolvimento do Hardware	37 dias						█	█						
9	2º Relatório Intermédio	7 dias							█						
10	Familiarização com desenvolvimento de FW	7 dias								█					
11	Desenvolvimento de Firmware	20 dias								█	█				
12	Testes do Sistema	7 dias										█			
13	Desenvolvimento de uma HMI	15 dias										█			
14	Elaboração Tese Mestrado	15 dias											█		

Figura 3 - Calendarização inicial das principais tarefas do projeto.

Dos objetivos propostos, todos foram cumpridos, no entanto surgiram algumas tarefas adicionais, essenciais para a viabilidade do protótipo e do projeto e acabaram por impor um pequeno atraso ao projeto.

Nº	Nome da Tarefa	Duração	2015			2016									
			Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	
1	Familiarização com Ambiente GEI e Enquadramento projeto	7 dias	█												
2	Estudo do estado da arte	30 dias	█	█											
3	Estudo Teórico dos conceitos inerentes ao projeto	30 dias	█	█	█										
4	Especificação de Requisitos	10 dias			█										
5	1º Relatório Intermédio	15 dias			█	█									
6	1ª Apresentação Intercalar	3 dias				█									
7	Familiarização com desenvolvimento de HW	7 dias					█								
8	Desenvolvimento de uma placa para ligar a um arduino	30 dias						█	█						
9	Familiarização com programação de Arduinos (IDE)	3 dias							█						
10	Programação do Arduino e testes	20 dias							█	█					
11	Desenvolvimento do Hardware	30 dias								█	█				
12	2ª Apresentação Intercalar	3 dias									█				
13	Familiarização com desenvolvimento de FW	15 dias									█	█			
14	Desenvolvimento de Firmware	30 dias										█	█		
15	Testes do Sistema	7 dias											█		
16	Desenvolvimento de uma HMI	20 dias												█	
17	Elaboração Tese Mestrado	7 dias													█

Figura 4 - Calendarização final das tarefas realizadas.

As tarefas adicionais estão representadas no diagrama de Gantt final, na figura 4, assim como calendarização final realizada, que acabou por ser ajustada.

Todos os objetivos inerentes ao projeto foram cumpridos.

Para tornar a execução deste projeto possível, algumas tarefas assinaladas acima impuseram a necessidade de adquirir diversas competências novas, assinaladas na tabela 1.

Tabela 1 - Competências desenvolvidas ao longo do Projeto

Competências	Descrição
Arduino IDE	Ferramenta de programação de <i>Arduinos</i> usada em testes preliminares, para analisar as respostas da tira eletroquímica em causa e estabelecer o método de deteção, da entrada da gota mensurável.
Altium Designer	Ferramenta CAD usada na elaboração da PCB, onde se incluem componentes com algumas dificuldades a nível de hardware, tais como o microcontrolador e no desenho de <i>footprints</i> para componentes a partir da interpretação de desenhos técnicos.
Programação em C	Elaboração de todo o <i>firmware</i> desenvolvido para este projeto.
Desenvolvimento de Hardware	Estudo de conceitos de hardware, componentes a usar e adequação de tamanhos. Conceitos básicos de desenho de PCB's e de esquemas elétricos, melhorados com a experiência.
Desenvolvimento de Firmware	Análise de Requisitos de sistema, organização de código, uso de diversos protocolos de comunicação tais como RS-232 e SPI.
Bluetooth	Aquisição de conhecimento relativamente ao protocolo de comunicação, quer da versão 2.0, quer da versão <i>Low Energy</i> .
Android Studio	Desenvolvimento de uma interface para <i>Android</i> que permite recolher os dados enviados via BLE e gerir a conexão ao módulo <i>bluetooth</i> de forma automatizada.

## II. Diabetes Mellitus

---

Este capítulo incide sobre os conceitos e mecanismos da regulação da glicemia, da classificação da Diabetes, na descrição dos mecanismos afetados pela doença e as suas complicações.

### 1. Classificação e Epidemiologia

A Diabetes é uma doença com um longo passado na vida humana. A doença foi descoberta quando se observou que a urina dos doentes atraía formigas. Mais tarde eram os médicos, ou os seus encarregados, que provavam a urina, para aferir se tinha um sabor adocicado (prova de que a glicose se manteve elevada na Corrente sanguínea após várias horas) e desta forma diagnosticar a doença.

Foi precisamente pelo sabor adocicado se designou a doença de *Mellitus* (latim para “adocicado”) por oposição à *Diabetes Insipidus* (latim para “sem sabor”) esta segunda pouco se relaciona com a primeira; trata-se de uma doença hormonal que se caracteriza pela incapacidade de produzir vasopressina, que leva a produção de urina muito diluída mesmo quando não é ingerida muita água.

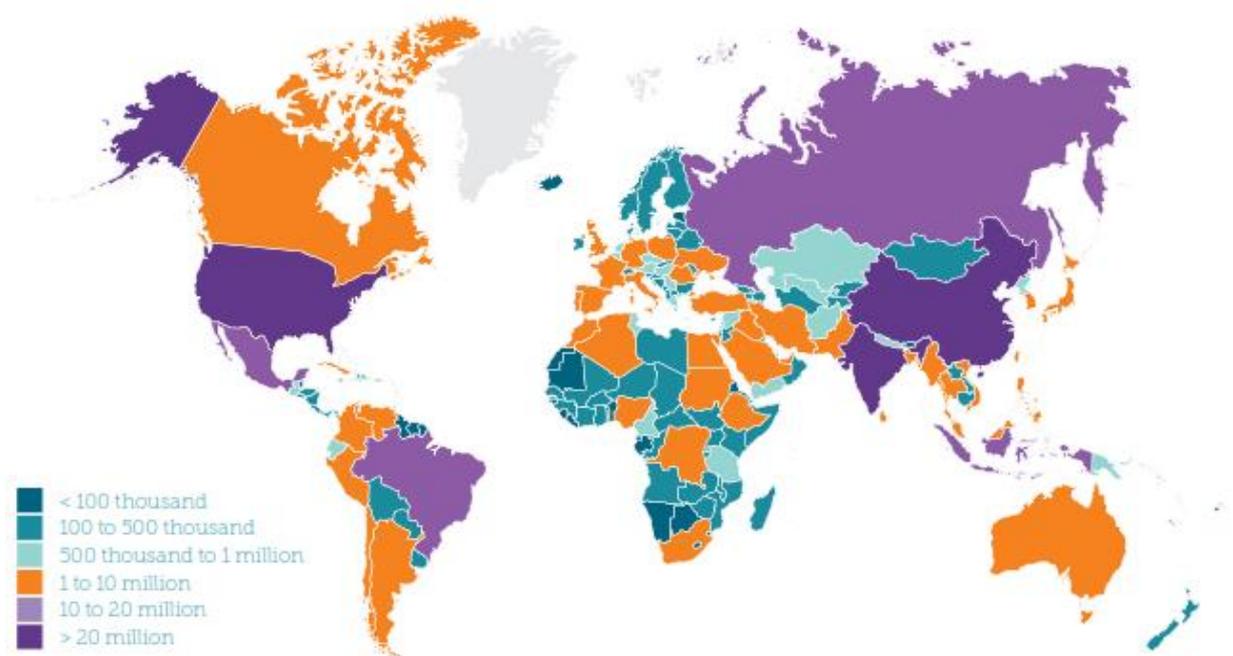


Figura 5 - Estimativa do número total de adultos (entre 20 e 79 anos) com Diabetes em 2015. Imagem adaptada de: [10]

Atualmente a Diabetes Mellitus é reconhecida como uma síndrome, é considerada a reunião de um conjunto de doenças metabólicas que se caracterizam por um fenótipo comum, a hiperglicemia. Esta resultante da intolerância a glicose proveniente da produção insuficiente de insulina, ou resistência celular à atuação da insulina ou a junção das duas; verificam-se alterações metabólicas dos hidratos de carbono, dos lípidos e das proteínas e a presença de alguns marcadores genéticos que indiciam a predisposição para a doença por alguns indivíduos. [9, 10].

Na maioria dos doentes, particularmente na Diabetes tipo II e como os sintomas não são graves, a hiperglicemia pode manter-se durante alguns anos sem o diagnóstico da doença e por esse motivo prevalecem apresentações de estimativas do número total de doentes, que difere bastante do número total de diagnosticados. De facto são considerados à volta de 40% de indivíduos não diagnosticados do total de diabéticos portugueses [4].

Existem vários tipos de Diabetes e a sua classificação é etiológica e por oposição à classificação pelo tratamento farmacológico como na maioria das doenças.

A categorização etiológica da Diabetes divide-se em quatro ramos essenciais: Tipo I, Tipo II, Gestacional e outros tipos específicos. Dentro dos restantes tipos separam-se 7 subcategorias: defeitos genéticos de função das células beta; defeitos genéticos na atuação da insulina; doenças na parte exócrina do Pâncreas; endocrinopatias; Diabetes induzida por fármacos/químicos; Diabetes induzida por infeções; formas incomuns de Diabetes imuno-mediada e outras síndromes genéticas [9].

Serão focados no subcapítulo 2 as formas mais comuns, mais estudadas e predominantes em Portugal, isto é, tipo I e tipo II.

## 2. Princípios Fisiopatológicos

Para entender a doença devemos ter em conta que os processos que envolvem a Diabetes estão intimamente relacionados com a ação pancreática.

O Pâncreas é um órgão do sistema endócrino que é constituído por dois tipos de tecidos: **ácinos** que segregam o suco digestivo no duodeno, que inclui protéases, lípases, amílases e nucleases e os **ilhéus de Langerhans**, que segregam insulina e glucagina

directamente no sangue. O ilhéu contém 3 tipos de células principais: beta (segregam insulina), alfa (segregam glucagina) e delta (segregam somatostatina). Todas comunicam entre si para regulação da glicemia. Os ilhéus compõem cerca de 2% da massa total do Pâncreas e dentro destas as células beta são as mais abundantes (entre 60% a 80%) [11, 12].

No seu funcionamento normal, as células beta são estimuladas para produzir insulina a partir de concentrações de glicose superiores a 70mg por decilitro de sangue pelo aumento da tradução e transdução do gene da insulina e libertação de insulina [13].

A secreção de insulina é iniciada pelo transporte da glicose para as células beta por parte da proteína GLUT2. A fosforilação da glicose pela glucokinase regula a taxa de secreção de insulina. Inicia-se então uma cascata de reações eletroquímicas que levam à despolarização da membrana para permitir a entrada de  $Ca^{2+}$  e culminam na libertação de insulina. As figuras 6 e 7 representam esquematicamente o processo suprarreferido. Em paralelo é estimulada a transcrição do gene da insulina no núcleo da célula beta, geração de RNAm, traduzido para a formação de Proinsulina que amadurece para insulina e fica armazenada em lisossomas [12].

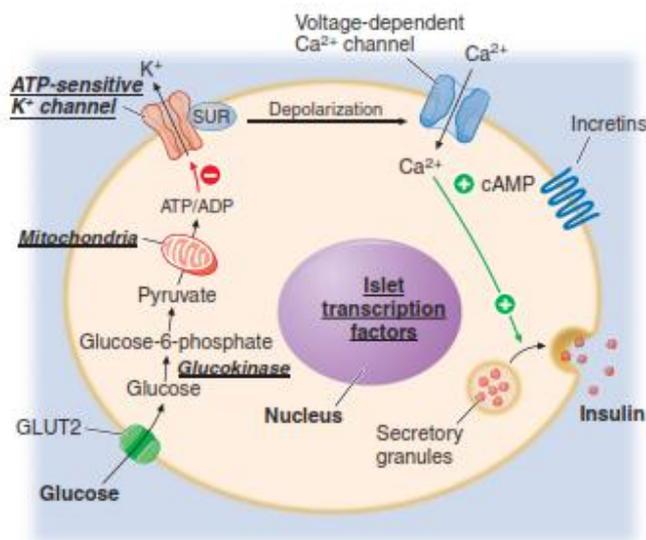


Figura 7 - Processamento da glicose nas células beta do Pâncreas. Imagem adaptada de: [13].

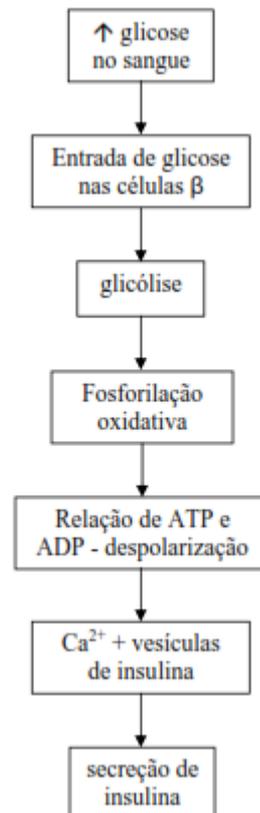


Figura 6 - Mecanismo de estimulação da produção de insulina. Adaptado de: [11].

As incretinas são libertadas pelas células neuroendócrinas do trato gastrointestinal quando há ingestão de alimentos, amplificam a libertação de insulina e impedem a libertação de Glucagina. Quando a concentração de insulina é suficiente há retrocontrolo negativo pela cessação de produção de insulina.

A insulina é drenada na veia porta e aproximadamente 50% da que foi produzida é degradada no fígado; a restante, que entra na circulação sistémica liga-se a recetores membranares específicos das células que iniciam uma cascata de sinalização que culmina na abertura da membrana plasmática à entrada de glicose (captação), transportada, por exemplo, pela GLUT4 para o músculo-esquelético e tecido adiposo (tecidos sensíveis à atuação da insulina). Posteriormente, nas células receptoras de glicose, esta é processada para o ciclo de Krebs ou para armazenamento.

Para balançar a concentração de glicose nos valores ideais tem de haver um equilíbrio entre a glicose que é produzida no fígado a partir das reservas do tecido adiposo (Gluconeogenese), estimulada pelo Glicogénio e o consumo e armazenamento da glicose nos tecidos periféricos estimulados pela insulina [14].

Este sistema de regulação não é muito intuitivo à partida, mas a regulação com hormonas antagónicas é bastante comum no organismo humano e permite a homeostase da maior fonte energética do corpo humano, a glicose. Dá-se mais relevância à insulina, por ser a sua função genérica diminuir a quantidade de glicose no sangue e essa é a incapacidade pela qual a Diabetes se caracteriza.

No entanto o Glicogénio desempenha um papel importante na regulação da glicose. Segregado pelas células alfa dos ilhéus, tem um processo de produção estimulado pelos baixos níveis de glicose no sangue, ou baixos níveis de insulina, promove a Gluconeogenese e a Glicogenólise. Nesta regulação o tecido nervoso é um caso especial, responsável por 25% do consumo basal usa a glicose independentemente da insulina [13, 11, 10].

Existem duas grandes categorias da doença: tipo I e tipo II, ambas precedidas de uma fase pré-patogénica caracterizada por valores incomuns na hemóstase da regulação de glicose, tanto pela excessiva produção de insulina [revelando uma tendência de resistência à sua atuação] como pela concentração de glicose superior a 100 mg/dL [12].

A Diabetes tipo I é idiopática, caracteriza-se pela incapacidade total ou parcial de produzir insulina, derivada da crônica destruição autoimune das células beta do Pâncreas e está presente em cerca de 10% dos indivíduos da população diabética. Pode ser identificada num período pré-clínico pela detecção da presença no sangue de anticorpos para antígenos das células beta. Sendo o caso mais distinto de Diabetes, a destruição das células beta, por ação das células T do sistema imunitário leva à incapacitação e destruição de quase todas as células beta [13, 12].

Tipo II é genericamente um grau de resistência à insulina provocada por uma variedade de desordens relacionadas com a secreção de insulina enfraquecida e excesso de produção de glicose. Concretamente os distúrbios patogénicos conhecidos são:

- Resistência à atuação da insulina no músculo-esquelético, que leva à diminuição da captação de glicose;
- Resistência à insulina no fígado, levando ao aumento da produção de glicose;
- Resistência à insulina do tecido adiposo (gordura), que aumenta a quantidade de ácidos gordos livres no plasma sanguíneo;
- Incapacitação progressiva das células beta até à sua falência total;
- Concentração da glucagina aumentada, aumentando a sensibilidade do fígado à glucagina;
- Enfraquecimento da atuação da incretina;
- Aumento da reabsorção de glicose nos rins;
- Disfunção de neurotransmissores que levam à incapacitação da supressão de apetite, potenciando o aumento de peso [12, 9].

O Pâncreas adulto é composto por estruturas altamente ramificadas, que se desenvolvem continuamente a partir de epitélios tubulares mais primitivos. A organização morfológica das estruturas celulares dos ilhéus e a comunicação/sinalização intercelular são os fatores críticos para o normal funcionamento do Pâncreas e alterações a estes níveis levam aos diversos tipos de Diabetes [13].

Particularmente na Diabetes tipo II, a identificação do mecanismo de formação da doença não é ainda consensual, havendo teorias relacionadas com excesso de nutrientes, deposição amilóide e inflamações nas células beta, havendo no entanto

consenso em relacionar e associar claramente o desenvolvimento da Diabetes com a disfunção das células beta [12].

O maior fator de risco para a Diabetes tipo II é o excesso de tecido adiposo, um dos principais impulsionadores da intrínseca resistência à insulina. Mas existem outros fatores de risco para o desenvolvimento da doença tais como a idade, sedentarismo, má nutrição e a predisposição genética [10, 15].

### 3. Diagnóstico

A Hemoglobina Glicosilada (A1C ou HbA1C) é reconhecida como o Gold Standard para o controlo dos níveis glicose no sangue a longo prazo, serve para medir a percentagem de hemoglobina Glicosilada face à hemoglobina total e é usada no diagnóstico da Diabetes e reflete o estado da glicemia nos 3 a 4 meses anteriores ao teste [9, 11, 15].

O teste à HbA1C tem as vantagens de ser menos sensível a variações do metabolismo quotidiano, é estável durante uma semana a temperatura ambiente enquanto a glicose após ser retirada é bastante susceptível a glicólise apesar da ação estabilizadora de oxalato de fluoreto [12].

O diagnóstico de Diabetes Tipo II é realizado pela quantificação da glicemia em jejum, a qual deve ser superior 126 mg/dL [no plasma venoso] para se considerar Diabetes.

A outra forma de diagnosticar Diabetes é pela prova de tolerância à glicose. O teste é realizado duas horas após ingestão de água com concertação de glicose igual ou superior a 200mg/dL. Se a glicemia medida ocasionalmente for igual ou superior a 200mg/dL [no plasma venoso] e apresentar poliúria, polidipsia e polifagia, considera-se Diabetes [9, 11].

Um individuo normal dever apresentar valores de concentração de glicose inferiores a 100mg/dL [no plasma venoso] em jejum e inferiores a 149mg/dL [no plasma venoso] duas horas após ingestão da solução glicosilada [11].

Um indivíduo diabético deve idealmente ter sempre glicose no plasma venoso regulada entre 70 a 180 mg/dL como pode ser visto na figura 8, mantendo, no entanto, um esforço para ajustar os seus valores para os mais baixos possíveis.

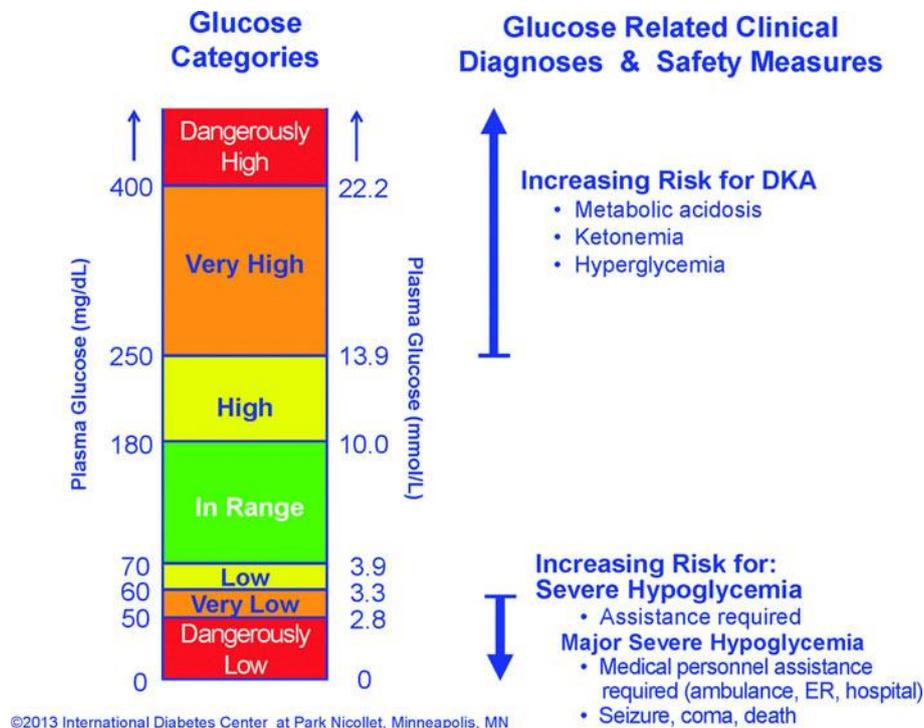


Figura 8 - Classificação dos patamares e intervalos da concentração da glicose. Imagem adaptada de [8].

## 4. Consequências e Complicações

A Diabetes tem impactos metabólicos severos na fisiologia humana, existindo alguns padrões comportamentais do organismo bem conhecidos como o desenvolvimento de dislipidemia: elevados níveis de triglicerídeos, baixa concentração de colesterol HDL [também conhecido como o colesterol bom]. Estes fatores aliados a obesidade e alta pressão sanguínea alicerçam a doença conhecida como síndrome metabólica [10, 12].

A glicose em níveis elevados (hiperglicemia) de forma persistente leva a situações de stresse oxidativo a nível celular, gerando ERO [8].

Este stresse oxidativo provoca múltiplas lesões a nível celular de diversos órgãos, particularmente nervos, olhos, rim, vasos sanguíneos e coração.

Reconhece-se em particular que a Diabetes é um fator de risco para disfunção endotelial, pela produção de ERO, disfunção essa que é associada à criação aterosclerose, que a prazo leva à criação de obstruções sanguíneas que podem gerar AVC's ou enfartes [17, 18].

A disfunção endotelial é causadora de inúmeras complicações devido à geração de respostas inflamatórias nas paredes vasculares, e alterações de permeabilidade que alteram significativamente a homeostase do endotélio [19].

No sistema renal é característico o desenvolvimento de nefropatia diabética. Esta doença é o retrato da esclerose glomerular nos nódulos renais, que vai diminuir a área de filtração. Como consequências surgem a Glicosúria e a Proteinúria; sendo a primeira provocada por lesões no TCP renal, que levam à incapacidade de captação de glicose no TCP por não haverem transportadores de glicose suficientes face à quantidade presente no sangue, surgindo assim glicose na urina [13].

A proteinúria é um processo semelhante, sendo que são proteínas que atravessam a barreira de filtração renal, principalmente a albumina pela sua abundância e tamanho reduzido [11].

A nefropatia surge como consequência das patologias vasculares, assim como a neuropatia, a retinopatia diabética que surgem e se agravam à medida que a duração da hiperglicemia aumenta. Os problemas vasculares podem levar a amputações por incapacidade de cicatrização de pequenas feridas, muitas vezes amplamente infectadas [18].

A retinopatia é um processo com muitas etapas e começa a provocar dificuldades de visão com a neovascularização da retina para combater o estado de hipoxia provocado pelas alterações no fluxo da microvascularização impostos pela hiperglicemia. A neovascularização surge inicialmente junto do nervo ótico e mácula que geram pequenas hemorragias, desenvolvem-se fibroses e pode ocorrer deslocamento da retina.

Por outro lado a terapia da Diabetes com insulina é vista por muitos doentes com alguma relutância e resistência devido a receios de crises hipoglicémicas. A hipoglicemia leva a situações penosas, desconfortáveis, de potencial risco e pode levar a uma situação socialmente bastante embaraçosa. [8]

### III. Monitorização da Concentração de Glicose no Sangue

---

Nesta secção serão abordados alguns métodos que existem para detetar glicose no sangue, alguns deles presentes em mercado, autorizados pelas agências reguladoras dos dispositivos médicos.

#### 1. Importância da Monitorização da Glicose

A concentração de glicose no sangue tem então um papel crucial no funcionamento do corpo humano. Atualmente ganha progressivamente importância na saúde pública nacional pela dimensão dos problemas e da crescente má alimentação [21].

Prevenir o aparecimento dos sintomas relacionados com as complicações, que advém do tratamento da Diabetes, é apenas um dos argumentos que impõem a monitorização da concentração da glicose sanguínea. Segundo um estudo realizado nos Estados Unidos da América pela *Diabetes Control and Complications Trial Research Group* em 1996, o tratamento intensivo da Diabetes tipo 1 com a monitorização intensiva e insulinação adequada, estabelecidos pelos critérios desenvolvidos pela *DCCT*, leva ao aumento do tempo e qualidade de vida dos doentes.

Isto é conseguido pelo atraso do aparecimento das complicações associadas a níveis elevados de glicose no sangue, por doentes de Diabetes tipo 1 (insuficiência renal, amputações de extremidades e cegueira a título de exemplo), em relação a doentes que tinham o tratamento normal estabelecido pela clínica [22].

Noutro estudo foi testado o uso de insulino-terapia intensiva para manter a glicose no sangue imperativamente entre 80-110 mg/dL de sangue. Nos resultados foi possível ver que estes doentes tiveram menos complicações e a mortalidade reduziu substancialmente na unidade de cuidados intensivos, assim como foram reduzidas a

mortalidade intra-hospitalar e a morbidade entre doentes internados em estado crítico [23].

Foi também provado por Diana Vilar-Compte et al. que a hiperglicemia é um fator de risco no aparecimento de infecções cirúrgicas após mastectomias [24].

A hiperglicemia é muito frequente em doentes adultos em regime de cuidados intensivos, mesmo nos não-diabéticos. Estes sintomas são conhecidos como uma forma extrema de stresse de hiperglicemia e devem-se a resistência à insulina causada pelas catecolaminas (endo e exógenas) e aos glucocorticóides. Níveis elevados de ácidos gordos inibem a captação de glicose e a sua utilização, mantendo-se na corrente sanguínea que vai causar estenose hepática, prejudicando a regulação glicosídica por parte do fígado nos doentes em estado crítico [25].

Existem monitorizadores da concentração de glicose no sangue contínuos ou discretos, disponíveis no mercado internacional. Os medidores podem ser categorizados segundo a sua invasividade como: invasivos, minimamente invasivos e não invasivos. Este trabalho é orientado para desenvolver um Glicómetro discreto que tire partido do uso de tiras de teste descartáveis, onde a amostra é recolhida com uma picada no dedo para obtenção de uma pequena amostra sanguínea (discreto e invasivo).

A molécula de glicose é muito difícil de detetar por ser, entre outros fatores, muito pequena e incolor e, portanto, as técnicas de medição são geralmente indiretas, exigindo reações químicas entre a glicose e outras moléculas.

## **2. Métodos de Monitorização de Glicose Discretos**

### **2.1 Tiras Descartáveis**

Apesar dos progressos já obtidos nas técnicas não invasivas, os testes realizados com a maior frequência são os que usam o método da picada do dedo e colocação de uma gota de sangue na tira, por fornecerem a melhor informação de forma mais simples para o tratamento e controlo da Diabetes [26].

Este método tem muitas limitações, mas é o usado em ambiente hospitalar na prática médica comum e até em doentes internados nas unidades de cuidados intensivos [27].

### A. Método colorimétrico

As tiras descartáveis de medição ótica são geralmente construídas com várias camadas que conferem as várias funções necessárias para este sistema: suporte à tira, uma função reflectora, uma função de análise, e uma função de dispersão da amostra, tal como ilustrado na figura abaixo.

A primeira camada filtrante é constituída por membranas semipermeáveis e serve para evitar a coloração da tira de teste com os glóbulos vermelhos (hemoglobinas) do sangue. Inicialmente era usada uma camada de acetato de celulose sobre o papel impregnado de enzimas e corante num suporte de plástico. Nesta altura a análise da cor era feita pelo utilizador numas tiras de teste mergulhadas em urina. A cor posteriormente formada era comparada com uma tabela de cores para estipular a gama de concentração medida.

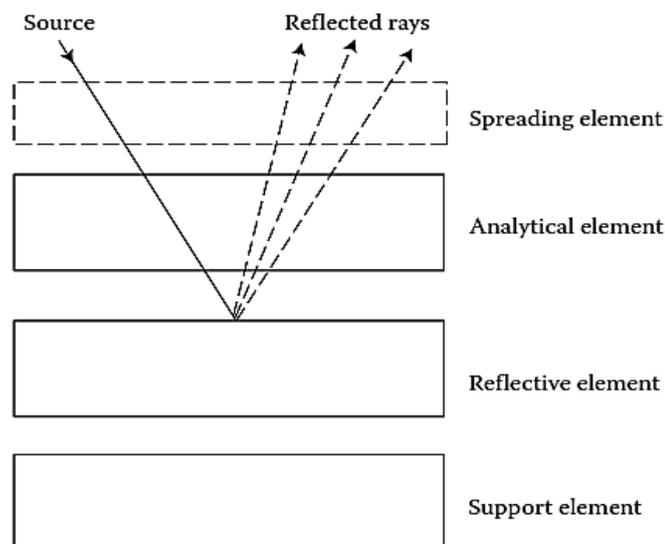


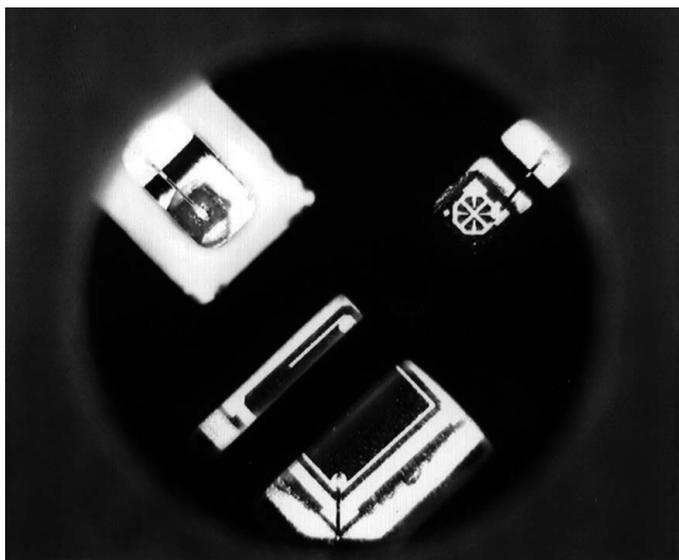
Figura 9 - Funções de uma tira de teste de Refletância. (Retirado de: Henning TP and Cunningham DD. Biosensors for personal Diabetes management. In: Commercial Biosensors, 3-46, 1998. Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.)

O elemento analítico contém a enzima no seu estado ativo. A componente dispersiva tem de espalhar rapidamente a solução da amostra, após a sua aplicação na tira e formar, sobre a componente enzimática, uma solução uniforme no que toca à sua concentração. Filmes e membranas semipermeáveis expansíveis, particularmente lãs de fibras de vidro, são utilizadas para espalhar a amostra e separar o plasma do restante sangue. Este processo de separação é, aliás, transversal a todo o tipo de tiras.

Na componente analítica da tira ocorre uma reação enzimática com glicose e depois reações de formação de cor subsequentes. Apesar de apenas as enzimas mais estáveis serem escolhidas para o desenvolvimento do produto, existe sempre alguma perda de actividade enzimática no processo fabríco. Isto acontece devido a fatores como pH, temperatura, tensão física, solventes orgânicos, entre outras acções ou agentes de desnaturação proteica.

Na formulação dos reagentes geralmente incluem-se agentes de viscosidade, emulsionantes, pigmentos, plastificantes, formadores de poros, entre outros. Isto permite a formação de uma camada de reação uniforme necessária para uma boa precisão e exatidão.

Na imagem seguinte é possível ver a instrumentação utilizada num aparelho disponível no mercado, o OneTouch meter da Lifescan, sendo essa instrumentação ótica vista através do furo 4,5 mm da tira após a remoção da membrana de reagente de tira de teste.



*Figura 10 - Fotografia dos LED's e do fotodetector do One Touch meter da Lifescan.*

Uma consideração técnica que foi tida em conta no seu desenvolvimento prende-se com a medição da componente da amostra que apresenta glóbulos vermelhos (percentagem de hematócrito).

A percentagem de hematócrito no sangue ronda, usualmente, os 30-55% e a gama de concentrações de glicose é 40-500 mg/dL (2.2-28mM). O medidor da Lifescan, o *OneTouch meter* contém dois LED's (díodos emissores de luz) (635nm no canto superior esquerdo e 700 nm no canto superior direito), que vão permitir a medição da reflexão provocada pela presença das hemoglobinas (células vermelhas do sangue) e da intensidade da cor que advém das reações com a glicose (corante).

O componente eletrónico que permite a recolha de dados é um fotodetector que mede a refletância a partir de ambos os LED's tal como mostrado na figura 10. Todos os medidores de glicose medem o sinal do detector em vários pontos temporais e, se a forma da curva não estiver dentro de limites razoáveis, é gerada uma mensagem de erro no ecrã do display. Alguns medidores medem a temperatura ambiente para corrigir o resultado, uma vez que as reações químicas são influenciadas por este parâmetro.

Os sistemas óticos, mesmo os atuais apresentam várias limitações, estão sujeitas à interferência de condições de luz ambiente e não podem trabalhar sob a luz solar direta. Estes sistemas têm perdido gradualmente quota de mercado para sistemas eletroquímicos. As tiras de teste óticas geralmente requerem uma amostra de sangue maior e levam mais tempo para produzir o resultado em relação às tiras eletroquímicas.

Atualmente, os medidores de reflexão óptica são mais caros a nível do fabrico, necessitam de baterias maiores, e são mais difíceis de calibrar do que os aparelhos de tecnologia electroquímica. [28]

## B. Método Eletroquímico (Amperimétrico)

É um método designado amperimétrico precisamente porque o princípio de funcionamento baseia-se na medição da corrente elétrica produzida, quando enzimas catalisam a oxidação de moléculas de glicose (em solução aquosa) proveniente do sangue. Esta oxidação da glicose liberta eletrões para um mediador redox inorgânico, alocado num dos eléctrodos e que irá produzir uma corrente proporcional à concentração de glicose [25].

### Princípio Físico-Químico

Todas as tiras eletroquímicas utilizam um mediador eletrónico inorgânico e doravante será mencionado apenas como mediador por motivos de simplificação de escrita.

Após a redução do mediador com eletrões provenientes da glicose, o mediador é oxidado num dos eléctrodos sólidos [no eléctrodo de trabalho], sob a ação de um potencial positivo.

Os eletrões fluem entre o mediador e a superfície do eléctrodo quando é obtido um mínimo de energia. Dito de outra forma, para os eletrões saírem do mediador em direcção ao eléctrodo de medição, é necessário aplicar um estímulo. Esse estímulo é a aplicação de uma diferença de potencial entre os eléctrodos das tiras.

A energia dos electrões do mediador é sempre constante e é estabelecida tendo em conta a estrutura química deles, mas a energia dos electrões no eléctrodo sólido pode ser alterada por aplicação de uma tensão elétrica entre o eléctrodo de trabalho e um segundo eléctrodo.

A taxa da reação de transferência electrónica entre o mediador e uma superfície de eléctrodo de trabalho é dada pela equação Butler-Volmer [29]. Quando o potencial é suficientemente grande, todos os mediadores que atingem o eléctrodo reagem rapidamente, então é possível aproximar a taxa da reação à difusão da solução de glicose do topo até ao interior [onde estão os eléctrodos] tira.

É razoável considerar a dependência da reação com a difusão, uma vez que as tiras, apesar de pequenas, são constituídas por muitas camadas separadas por

membranas para permitir a separação dos componentes do sangue que interferem com a medição de glicose.

A corrente a partir de uma reação limitada por difusão segue a seguinte equação:

*1 - Equação de Cottrell*

$$i = (nFAD^{1/2}C)(\pi^{1/2}t^{1/2})$$

Onde  $i$  é a corrente,  $n$  o número de electrões,  $F$  constante de Faraday,  $A$  a área do eléctrodo,  $C$  a concentração,  $D$  o coeficiente de difusão e  $t$  é o tempo.

Pela análise da equação de Cottrell, se considerarmos que as amostras são sempre do mesmo tamanho e esta é uma presunção razoável, uma vez que o design estrutural das tiras estabelece um limite ao volume de amostra que entra, a corrente vai diminuir com o inverso da raiz quadrada do tempo. As restantes componentes da equação podem ser tratadas como constantes para cada conjunto tira/amostra.

Isto significa que o sinal máximo nos sensores electroquímicos ocorre em tempos curtos, por oposição às reações de formação de cor, onde a cor torna-se mais intensa ao longo do tempo.

Quando um potencial eléctrico é inicialmente aplicado ao eléctrodo [tensão de polarização], os momentos dipolares das moléculas do solvente vão se alinhar com o campo eléctrico na superfície do eléctrodo causando uma corrente eléctrica. Assim, em tempos muito curtos, esta corrente de carga interfere com a medição analítica.

## Reações Químicas e Constituintes

Atualmente existem dois tipos de sistemas de oxidação enzimática usados comercialmente. Um deles tira partido da Glicose Oxidase, a enzima usada mais classicamente na deteção de glicose e o outro esquema comum usa a glicose Desidrogenase, que apresenta a grande vantagem de não reagir com o Oxigénio.

As taxas de transferência de electrões entre a forma reduzida da Glicose Oxidase e os mediadores, geralmente derivados de iões de ferroceno, são muito rápidas em comparação com a reação secundária e indesejada com o oxigénio. Anteriormente, aliás, pela alta afinidade com os electrões, o oxigénio era usado como aceitador de electrões em vez dos mediadores, mas isto trazia problemas a nível de difusão de oxigénio porque a rarefação de oxigénio na tira face ao necessário era grande e por isso as medições levavam mais tempo a estarem concluídas que atualmente [limitação estequiométrica].

O oxigénio teria de difundir do exterior impondo um atraso na reação e sendo esta medição em algumas marcas realizada com a medição da dependência do tempo, a largura de banda do sensor era menor, tinham um limite superior mais baixo [30].

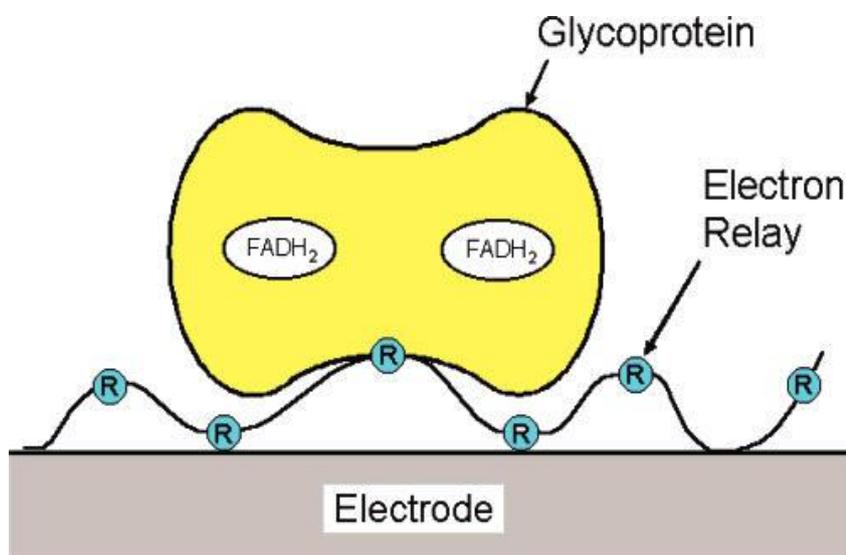


Figura 11 - Polímero redox proposto num trabalho científico para fazer a ligação entre a enzima e a superfície do eletrodo, como solução de mediação eletrónica. Imagem adaptada de: [30]

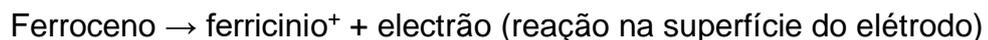
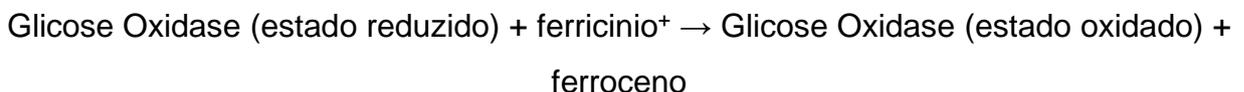
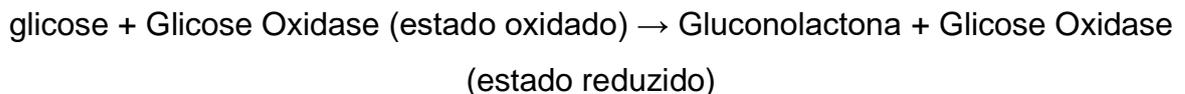
A necessidade da utilização de um mediador advém do facto de, por exemplo no caso da Glicose Oxidase, a transferência de electrões entre o local ativo da enzima e a

superfície do eléctrodo ser condicionada pela espessa camada proteica que envolve o centro redox da enzima (este local ativo da glicose oxidase é composto por FAD-Dinucleótido de Flavina e Adenina) que impede a transferência directa de electrões [26].

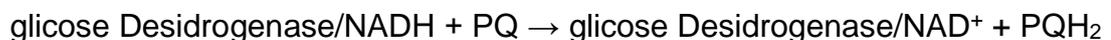
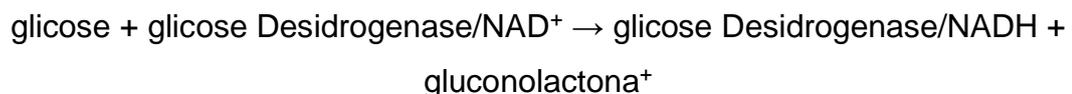
Um mediador tipicamente usado é o 1,1-dimetil-3-(2-amino-1-hidroxietil)ferroceno. Este tem as características desejáveis de elevada solubilidade em água, rápido *shuttling* de electrões (à taxa bimolecular constante de  $4,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ), é estável quimicamente e independente do pH em relação ao potencial redox.

A oxidação electroquímica do derivado de ferroceno é realizada a 0,6 V e a oxidação de interferências, tais como o ácido ascórbico e o acetaminofeno presentes no sangue, são corrigidas medindo a corrente num segundo eléctrodo da tira que não contém glicose oxidase [no contra eléctrodo].

As equações químicas das reações que ocorrem nas tiras à base de Glicose Oxidase e ferroceno como mediador estão descritas abaixo na sua ordem temporal de ocorrência.



Outro mediador usado é o ferricianeto, mas neste, o potencial necessário para a oxidação é superior à dos derivados de ferroceno. A enzima glicose Desidrogenase (GDH) não reage com o oxigénio e o mediador PQ (fenantrolina quinona) pode ser oxidado a 0,2 V, o que está abaixo do potencial de oxidação da maior parte das substâncias que podem formar interferências no sinal.



A glicose Desidrogenase (**GDH**) é usualmente acoplada a um elemento redox para captar os eletrões. Existem várias possibilidades usadas pelas marcas, sendo o **FAD** (dinucleótido de flavina-adenina), o **NAD** (dinucleótido de nicotinamida-adenina) e o **PQQ** (pirroloquinolina quinona).

Este último complexo GDH/PQQ foi desaconselhado e retirado do mercado pela FDA, porque produz leituras falsamente elevadas entre 3 a 15 vezes superiores aos níveis reais em doentes que tomam fármacos de análogos de glicose. O GDH/PQQ reage/processa também a maltose, a lactose, galactose, manose e xilose [31]. Normalmente estes açúcares estão em baixas concentrações na corrente sanguínea e a taxa de reação entre o GDH/PQQ e estes açúcares é bastante mais baixa que a taxa de reação com a glicose. Mas na presença em concentrações elevadas induzidas por fármacos esta interferência leva a valores muito elevados nas leituras.

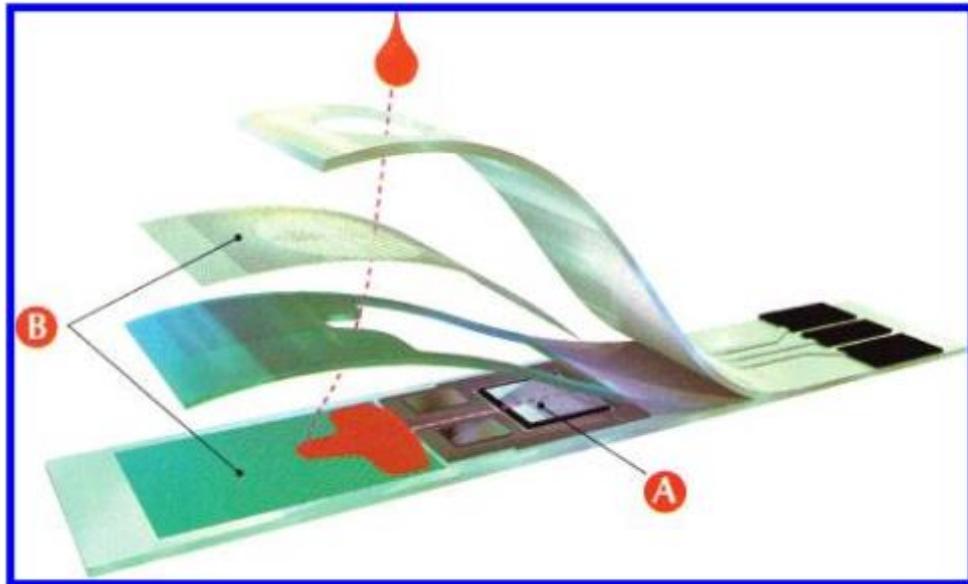
Esta interferência está associada a alguns tratamentos de hemodiálise que usam estes fármacos, o mais citado é a icodextrina, uma solução de diálise peritoneal [32]. Foram até associadas 16 mortes por overdose de insulina, num total de 82 casos reportados que foram associados a leituras elevadas deste tipo de tiras [33]. Em Portugal foram lançadas notas de segurança para o uso destas tiras não específicas de glicose em pessoas que tomavam o Extraneal (icodextrina) por parte da Baxter Médico-Farmacêutica Lda, a detentora da produção do fármaco em questão que foi descontinuado em Portugal.

Muitos esquemas reativos e sistemas enzimáticos estão bem descritos num trabalho publicado em 2008 por Joachim Hönes et al. e pode ser consultado na bibliografia deste trabalho, indicado com o índice [34].

#### Constituintes estruturais das tiras

Na figura abaixo é possível verificar a estrutura esquemática de uma tira, contendo os elétrodos de referência, de trabalho, um contra elétrodo. Algumas tiras apresentam

para além destes um eléctrodo de baseline. As tiras eletroquímicas são também constituídas por enzimas, estabilizantes, surfactantes, membranas e agentes de ligação.



*Figura 12 - Secções de uma tira eletroquímica do Abbott Precision. Assinalado com a letra A está o sistema de eléctrodos; em B indicam-se as membranas hidrofóbicas para separação do sangue. Imagem adaptada de [30].*

O eléctrodo de trabalho na maioria das tiras electroquímicas disponíveis comercialmente é feito por serigrafia [screen printing] de uma tinta de carbono condutora sobre um substrato de um polímero. No entanto, também existem tiras, em que os eléctrodos são metais nobres como o ouro ou o paládio.

Até há alguns anos atrás, as tiras de teste eram fabricadas, testadas e era-lhes atribuído um código de calibração. O código de calibração fornecido em cada embalagem das tiras era em alguns casos inserido manualmente no medidor por parte do utilizador, noutros a leitura deste código era realizada automaticamente pelo aparelho quando era inserida.

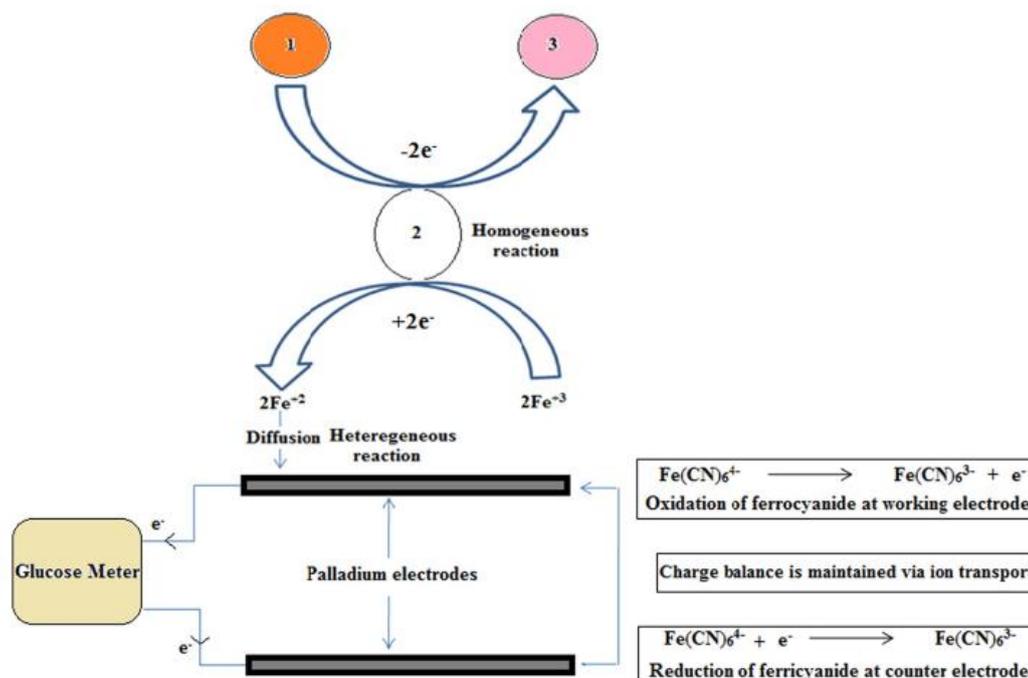


Figura 13 - Esquema reativo eletrocatalítico com representação dos elétrodos de paládio. Imagem adaptada de: [97]

Atualmente não existe essa necessidade, na generalidade dos aparelhos disponíveis, tendo sido o Ascensia Contour o primeiro aparelho de larga distribuição a sair sem necessidade de códigos de calibração [35].

Foram realizados vários trabalhos experimentais no sentido de avaliar as características de precisão das tiras e desenvolver técnicas de produção para melhorar a reprodutividade das tiras. Num estudo realizado em 2005, foi demonstrado o problema da influência da variação entre lotes de tiras, que leva a diferentes leituras, com desvios com significado clínico, tanto em soluções controlo, como em amostras sanguíneas [36].

Já em 2009 a ISO, com apoio da FDA emitiu uma recomendação para estabelecer um padrão de precisão mínima para Glicómetros comerciais mais apertado. Esta recomendação sugeriu algumas alterações à versão publicada, que vigorava desde 2003,

o ISO 15197:2003 e desde então tem sido atualizado e estabelece o standard para avaliar a precisão dos Glicómetros.

As recomendações mais atuais foram lançadas em 2013 e terão de ser cumpridas por todas as marcas em maio de 2016, trata-se da ISO: 15197:2013 e pode ser consultada em:

[http://www.iso.org/iso/catalogue\\_detail?csnumber=54976](http://www.iso.org/iso/catalogue_detail?csnumber=54976)

A precisão requerida, que vigora desde maio, diz que 95% das leituras têm de estar dentro da gama de  $\pm 15\text{mg/dL}$  de desvio em relação a um método laboratorial de referência para concentrações menores a  $100\text{mg/dL}$  e dentro de um desvio máximo de  $\pm 20\%$ , em concentrações superiores ou iguais a  $100\text{ mg/dL}$  [37].

## FONTES DE ERROS

Apesar de um Glicómetro ser um produto farmacêutico, de ter bastantes parâmetros que devem cumprir e haverem muitas entidades de controlo e regulação, a sua precisão, a meu ver, é ainda baixa. Nos Glicómetros a precisão é uma medida do desvio da média de uma série de valores ao valor de referência e muitos dispositivos presentes no mercado atualmente terão de ser descontinuados e substituídos para cumprir com as novas regras de precisão.

Isto acontece porque existem muito fatores que contribuem para desvios nos resultados e entre eles encontram-se os seguintes:

- Fatores relacionados com as tiras:

Esta é provavelmente a maior fonte de erros. Existem diferenças entre cada tira produzida. Essas diferenças podem ser na cavidade que aloca o sangue para reagir, normalmente um furo com 2 a 3 milímetros. Caso haja um desvio de 50 micrómetros nesse furo, a consequência será um desvio aproximado de 3% no valor final. Basta pensar que se um volume diferente reagir, mais ou menos glicose estará disponível na zona de reação da tira, apesar de ter a mesma concentração sanguínea.

Outra questão é a quantidade de enzima e de mediador. Uma boa prática é imobilizar enzimas em excesso, caso haja alguma desnaturação enzimática, o sinal não se altera muito. O maior problema é quando não há enzimas suficientes na superfície do eletrodo, quando a distribuição não é uniforme existem zonas nos eletrodos com 'buracos' de enzimas. Dito por outras palavras, uma camada fina de enzimas não é um grande problema, mas uma camada de enzimas com falhas, um género de picotado traz um erro de absoluto, o resultado aparece subestimado.

Existe também o factor da instabilidade a relativa alta temperatura do mediador (40°). Os mediadores devem estar no estado oxidado, quando a tira está armazenada [não utilização], mas existe a tendência de se reduzirem espontaneamente. Isto acontece em interações com o seu meio envolvente e, portanto, não devido exclusivamente a electrões provenientes da oxidação da glicose. Esta tendência aumenta com o aumento da temperatura e da humidade (o mediador também capta electrões do vapor de água), portanto quando se fazem as medições o valor devolvido pelo aparelho aparece supraestimado [35].

- Fatores físicos:

Os fatores físicos que mais influenciam as leituras de glicose são a temperatura e a altitude.

A relação entre a temperatura e a reação química envolvida na tira e é do conhecimento dos fabricantes. Os aparelhos atuais monitorizam a temperatura, com um sensor térmico incorporado para ajustar o valor devolvido, uma vez que, baseando-se esta medição numa reação química, a temperatura pode beneficiar ou prejudicar as condições termodinâmicas da reação e desta forma influenciar o sinal.

Já a altitude influencia a concentração de oxigénio no ar, que é um competidor directo dos mediadores. O oxigénio capta parte dos electrões libertados na oxidação da glicose. Se os electrões não forem exclusivamente para os mediadores e posteriormente para as tiras, há um défice nominal no sinal. Se a concentração de oxigénio fosse constante e igual à do momento de estabelecimento da calibração, isto não seria um problema porque a influência do oxigénio era sempre a mesma e a calibração já teria isso em conta. Mas variações em relação a essa concentração influenciam diretamente o sinal

final, porque maior concentração de oxigénio traduzir-se-á em maior competição por eletrões e menor sinal, para o mesmo estímulo em glicose e menor concentração [maiores altitudes] levará a uma sobrestimação da leitura.

- Interações com o utilizador:

Neste campo o maior problema surge quando os utilizadores não limpam as mãos. Se estiverem a comer algo com as mãos rico em açúcar como fruta ou bolachas, ou até tocar num reбуçado, sendo a picada muito pequena, qualquer interferência de comida altera muito os valores porque a amostra é muito pequena [à volta de 1µL]. Geralmente, quando educados pelos médicos, os doentes são avisados para lavar as mãos antes de realizar o teste também para prevenir infecções aquando da picada para obter a amostra.

- Fatores fármaco/biológicos:

O pior caso reportado nesta secção de erros foi supracitado, a icodextrina nos sensores que usam GDH, mas para além deste também o acetaminofeno, o L-dopa, a tolazamida, e o ácido ascórbico são conhecidos como pequenos interferentes na Glicometria [35].

A maior inconveniência deste processo mantém-se, o facto da necessidade de uma picada para obter uma amostra de sangue causa incómodo, dor, desconforto e tende a inviabilizar a monitorização frequente por parte do doente. Noutra perspectiva, a má interpretação dos resultados nas medições em contexto pessoal podem ser um grande problema no tratamento da Diabetes e pode levar ao acelerar das consequências ou a eventos de hipo ou hiperglicemia.

Estes problemas podem ser evitados, na sua maioria, impedindo más condições de armazenamento das tiras ou impedir a utilização das tiras quando estão fora do prazo de validade. Para ter um bom armazenamento, as tiras devem permanecer no seu recipiente original e por abrir [lacrado], a temperatura baixa [menor que 30°C] [38].

- Percentagem de Hematócrito:

O sangue recolhido das amostras é uma mistura bastante complexa de plasma e glóbulos vermelhos e ambos contêm glicose. Uma maior percentagem de glóbulos vermelhos no sangue em relação ao normal leva a um decréscimo do sinal medido, uma vez que estas células em abundância formam uma “barreira” à passagem por difusão da glicose da gota de sangue para a câmara de reação da tira.

O efeito inverso acontece com menores percentagens de glóbulos vermelhos.

Existem duas formas de combater este efeito: compensar as alterações na medição, ajustando o valor a apresentar tendo em conta a quantidade de glóbulos vermelhos presentes, sendo para isso necessário identificar essa quantidade pela análise do sinal [o que ainda permanece um desafio]; ou ajustes no desenho estrutural das tiras e/ou melhoramentos nas técnicas de fabrico que permitam suprimir este efeito [39].

Os Glicómetros revolucionaram o tratamento da Diabetes assim que surgiram. Foram um sucesso tão grande que criaram um novo mercado (movimenta cerca de 10 mil milhões de euros) e impulsionaram um novo ramo científico, os biossensores. Dentro do mercado dos Biossensores, os sensores de glicose dominam cerca de 85%.

Atualmente é um tópico de muito interesse, porque estes sensores permitirem a deteção atempada da presença de analitos de origem biológica ou contaminantes em soluções industriais e isso traz grande benefício a nível económico e ambiental pela redução de perdas e permite um melhor controlo operacional, oferecendo mais garantias [40, 41].

Ao longo do estudo de mercado, foi possível descobrir que sobre o Accu-Chek Mobile da Roche recaiu a circular informativa 171/CD/8.1.7. de 2014 com instruções e avisos acerca do seu manuseamento, uma vez que, quando incorreto existe a possibilidade de apresentar valores de glicemia falsamente elevados. Este aparelho não usa tiras descartáveis, apenas recolhe uma amostra para o seu interior.

Da análise do mercado e da bibliografia que foi analisada sabe-se que existem vários algoritmos para determinar a concentração da glicose. Estes algoritmos baseiam-se na cronoamperimetria, o estudo dos efeitos causados na corrente elétrica resultante

da reação eletroquímica no sensor, provocados por uma mudança brusca no potencial aplicado nos terminais do sensor [42].

Este efeito é o caracterizado na equação de Cottell e será esse o estudo realizado neste trabalho. A definição do potencial mais adequado é uma característica específica de cada sensor e pode ser descoberto a partir de um estudo de voltametria cíclica. Esse estudo consiste na aplicação de vários níveis de potencial elétrico no sensor de forma a observar-se a resposta e a partir dessa curva saber para que valores de potencial aplicado existe resposta mais elevada. A variação do potencial é realizada à mesma concentração de glicose e à mesma taxa [42]. Está representada na figura abaixo uma curva voltamétrica.

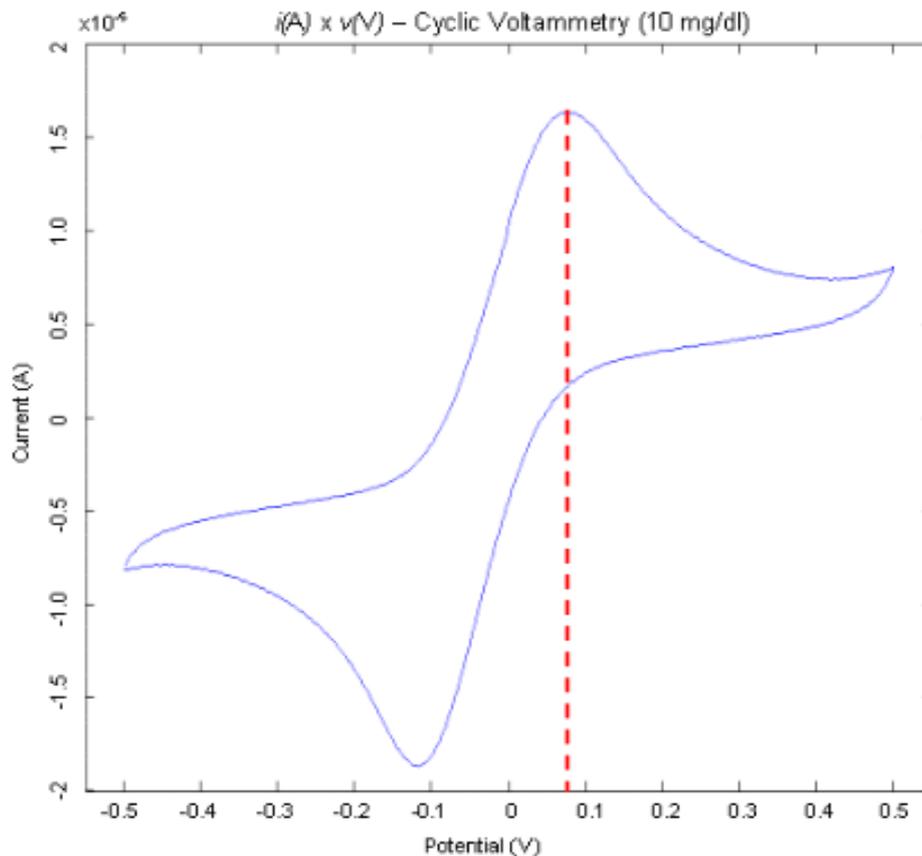


Figura 14 - Corrente elétrica em função da tensão aplicada. Imagem adaptada de: [42]]

Para caracterizar um sensor são realizadas curvas para diferentes concentrações, calcula-se a média das abcissas dos picos das curvas voltamétricas e sabe-se assim a tensão que em média provoca uma resposta com mais amplitude de sinal.

## 2.2 Testes Laboratoriais

A máquina mais citada para testes laboratoriais é a YSI-2300 Stat Plus (Yellow Spring Instruments) e é reconhecido como o método de referência para medir a glicose no sangue. Apesar da comunidade científica ainda não lhe ter atribuído o título de Gold Standard é usado como método de referência em trabalhos onde se avalia a precisão de outro aparelho por comparação de resultados, tomando o resultado da YSI como o verdadeiro e o valor da imprecisão é dado pelo desvio entre esse valor e o valor medido no aparelho sobre testes [16, 43, 44].

O princípio de medição é o mesmo dos Glicómetros amperimétricos convencionais mudando apenas a análise dos dados e os materiais envolvidos na deteção; necessita de uma amostra de 25µL de sangue [volume aspirado].

O sensor deste sistema tem três camadas. A primeira é composta por uma membrana de policarbonato poroso que controla a difusão da amostra para a zona da enzima evitando que a reação fique limitada pela resposta da enzima. O substrato é oxidado à medida que entra na zona das enzimas, produzindo peróxido de hidrogénio. Este produto passa através da membrana de acetato de celulose até um eléctrodo de platina, onde o peróxido de hidrogénio é oxidado. A corrente resultante é proporcional à concentração do substrato [45].

Existem outras versões do *YSI analyser* sendo parte deles analisadores para vários analitos incluindo Sacarose (é conseguido com uma cascata de reações enzimáticas com a invertase e mutarotase para detetar a glicose formada com Glicose Oxidase). No entanto não são muito usados em ensaios de tiras de glicose como o modelo 2300, sendo mais comuns para testes de produtos culinários. Existem, por exemplo, os modelos 2700, 2900 e 2950 que medem glicose podendo em alguns casos exigir diluição da amostra numa solução buffer de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . Todos têm em comum a utilização da Glicose Oxidase como enzima de deteção da glicose [46, 47].



Figura 15- YSI 2300 Stat Plus. Fonte: <https://www.ysi.com/ysi-2300-stat-plus-glucose-lactate-analyzer> (18/02/2016)



Figura 16 - Beckman Coulter Glucose Analyser. Fonte: <http://www.godove.com/en/auction/view?auctionId=10590992>

O Beckman Coulter Glucose Analyser é um sistema de laboratório não tão usado, mas produz bons resultados com uma imprecisão máxima de 3%.

O método deste aparelho consiste na fosforilação da glicose da amostra pela Hexoquinase (HK), na presença de Adenosina Trifosfato (ATP) e de íões de Magnésio para produzir glicose-6-fosfato (G-6-P) e Adenosina Difosfato (ADP). A Desidrogenase de glicose-6-fosfato (G6PDH) oxida especificamente o G-6-P para 6-fosfogluconato com a redução simultânea do Dinucleótido de Adenina Nicotinamida ( $\text{NAD}^+$ ) e para NAD reduzido (NADH). A mudança na absorvância a 340/380 nm da amostra é proporcional à quantidade de glicose nela presente.

## 3. Métodos de Monitorização de Glicose Contínuos

### 3.1 Invasivos

Estes sistemas são sistemas de amostragem direta; todos eles captam glicose de uma zona do organismo, geralmente o fluido intersticial na zona subcutânea ou de capilares sanguíneos.

#### 3.1.1 Microdiálise

Os sistemas de microdiálise são particularmente interessantes porque funcionam como uma interface entre os fluidos corporais e o biossensor. O princípio de funcionamento é baseado na captação da glicose da área subcutânea (fluido intersticial), com recurso a um tubo de baixo calibre, colocado na área subcutânea. Este tubo é perfusado com fluido isotónico proveniente de um reservatório *ex vivo*. Este fluido perfusa até à área subcutânea e vai permitir que a glicose se espalhe, formando uma solução com concentração uniforme. Posteriormente, a glicose, através de uma membrana semi-permiável, difunde, sem auxílio de forças externas, para o tubo de microdiálise (esta solução toma o nome de dialisato) [48].

O sensor responsável por detetar a glicose encontra-se *ex vivo* e geralmente a deteção é realizada por um sensor amperimétrico, que usa enzimas oxidorreduzidas [43].

Existe uma marca que comercializa um sistema deste tipo na Europa com as devidas aprovações, trata-se do GlucoDay da Menarini. Existem vários trabalhos onde soluções destas foram estudadas para uma futura implementação [50, 51].

Têm como maior vantagem a medição contínua, no local de interesse sem encrustamento de substâncias biológicas que é sem dúvida o maior problema dos implantes *in vivo* que a prazo levam a reações imunitárias severas e à incapacidade de funcionamento dos sensores [52].

Estes sistemas, no entanto, têm algumas limitações relacionadas com o atraso temporal em relação à concentração sanguínea, o atraso imposto pelo equilíbrio da concentração depois de inserida a solução de perfusato no fluido intersticial. A captação

de glicose no dialisato também é lenta e quando auxiliada por uma bomba o aparelho torna-se ainda maior. Noutra perspectiva, estas agulhas criam um “furo” na pele com um diâmetro considerável, consomem grande quantidade de líquido intersticial, e são desconfortáveis durante a inserção e quando sofrem desgaste prolongado [53].

### 3.1.2 Sensores subcutâneos (Needle-type)

Estes sistemas estão usualmente associados a Pâncreas Artificiais fazendo a medição da concentração da glicose para depois calcular a dose de insulina a ser dispensada diretamente na corrente sanguínea.

Estes sensores seguem o princípio potencioestático (amperimétrico) de medição com um elétrodo de trabalho que contém Glicose Oxidase imobilizada, um contra elétrodo e um de referência.

O elétrodo de trabalho é usualmente de Platina para detetar diretamente o  $H_2O_2$  produzido na oxidação da glicose. Estes elétrodos estão contidos numa espécie de sonda que é implantada no organismo, delimitada por uma membrana semi-permiável. Esta agulha que contém os elétrodos fica no interior do organismo, geralmente na zona abdominal. Os restantes componentes eletrónicos são mantidos na zona exterior ao organismo [54, 48, 55].

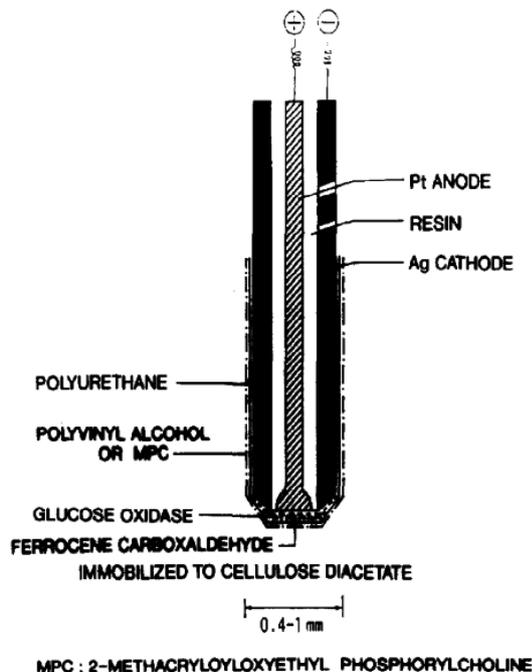


Figura 17 - Needle type sensor. Imagem adaptada de: [54]

Após a inserção na pele do sensor, há a necessidade de calibração com recurso a testes em aparelhos de tiras descartáveis. O sensor tem de ser substituído após um curto tempo de vida para evitar reações imunitárias adversas [28].

Existem algumas marcas disponíveis no mercado europeu, mas não em Portugal. Entre as marcas disponíveis estão o Enlit™ Sensor da Medtronic (Medtronic MiniMed, Inc., Northridge, CA) [erro absoluto médio de 20%], o Dexcom® G4 Platinum [erro absoluto médio de 15% na gama (40-400mg/dl)], o Freestyle Libre da Abbott) [erro absoluto médio de 12%] [56, 57].

O maior problema dos sensores contínuos invasivos é transversal a todos os que usam o método amperimétrico. O *fouling* é o maior defeito da utilização destes aparelhos, porque os sensores electroquímicos são geralmente operados num regime limitado de difusão e uma diminuição na transferência de massa ou na taxa dessa transferência leva à diminuição do sinal de sensor. Enzimas livres em solução podem catalisar reações secundárias e os produtos destas reações pode levar a um incremento do ruído e falsos positivos para o sensor. Proteínas livres atraídas pelo campo elétrico formado nos sensores também podem interromper a função das enzimas, levando a um decréscimo do sinal [58].

## **3.2 Minimamente Invasivos**

### **3.2.1 Microagulhas (com moléculas de reconhecimento acoplados)**

As microagulhas captam bastante interesse da comunidade científica. São chamadas “microagulhas” precisamente pelo seu tamanho na ordem dos micrómetros, que lhes permite serem muito pouco invasivas mas mesmo assim atingirem o espaço intradermal da pele, atingindo fluido intersticial que apresenta glicose em concentração correlacionada com a concentração sanguínea de glicose [59].

Atualmente, as microagulhas de centro oco (usualmente de vidro) já são usadas na injeção de insulina, como sensores de vários analitos e usam-se também como meio de extração de sangue de forma menos dolorosa para fazer testes às amostras em

sensores externos, permitindo assim teranóstica (diagonóstico e tratamento em simultâneo) da Diabetes [48, 60].

Uma abordagem possível para a construção de um sensor integrado em microagulhas é realizada através do revestimento das “pontas” das microagulhas de aço revestido com platina, com um polímero condutor que contém Glicose Oxidase imobilizada nesse polímero. A medição da concentração da glicose segue o mesmo princípio de deteção utilizado no método das tiras eletroquímicas descartáveis.

Mas os elétrodos de microagulhas trazem muitos problemas no que toca à biocompatibilidade. Geralmente as microagulhas provocam inflamação, são citotóxicas, permitem encrustamento de substâncias de origem biológica (*biofouling*) [60].

### **3.2.2 Microporos**

As técnicas dos microporos são realizadas na pele com a ajuda de um laser pulsado ou uma fonte de calor para levar à abertura de poros na pele. Sobre estes poros é aplicado vácuo de forma a captar fluido transdermal (mais rico em analitos que o fluido intersticial), que posteriormente é analisado com um método amperimétrico.

Apesar de conseguir amostras suficientes para fazer a deteção de glicose nos aparelhos de tiras e de conseguir uma aproximação melhor do conteúdo dialisado da zona intersticial em relação ao sangue, esta continua a ser uma medida indireta e vem com um atraso temporal em relação à concentração sanguínea, pelo que só poderia ser compensada com mais medições.

Apresenta como maior defeito, reportado por alguns autores, que após a aplicação de vácuo formam-se bolhas na pele [61].

### **3.2.3 Iontoforese Reversa**

Existem dois mecanismos principais para estimular o transporte de iões através da pele por iontoforese. São eles a repulsão eletrónica exercida num ião com um elétrodo com a mesma carga eléctrica ou a eletroosmose, que consiste na aplicação de um campo





Figura 19 - Gluowatch® Biographer – Retirada de:  
<http://www.gizmag.com/go/1399/pictures> a 26/02/2016

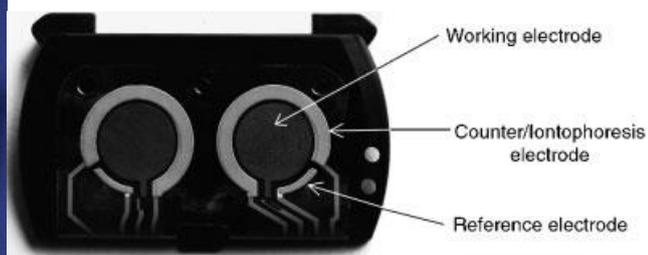


Figura 20 - Disposição dos eléttodos.  
Imagem retirada de: [58]

Aplica-se uma diferença de potencial entre dois eléttodos de Ag/AgCl (Contra Eléttodo e Eléttodo de Referência), a glicose é atraída para o hidrogel, catalisada e o  $H_2O_2$  é detetado no Eléttodo de Trabalho, um compósito de Platina e Carbono [64, 65].

Como lado negativo surge a calibração deste aparelho, seria feita 4 vezes por dia com um aparelho de tiras descartáveis que por si só já é bastante impreciso e iria adicionar à imprecisão característica deste aparelho pelas limitações intrínsecas do método de extração utilizado, uma vez que o pH da pele varia ao longo do dia e potenciais contaminantes que influenciam as medições.

Foi aprovada a primeira versão em 2001 pela FDA como complemento de medição para acompanhar a tendência dos níveis para adultos, sob a aprovação de prescrição médica, mas deixou de estar disponível quando os seus direitos intelectuais foram comprados em 2008 pela Animas Corporation, uma empresa do grupo Johnson & Johnson.

Foi provado que em aproximadamente 25% das medições estas surgiam com desvios de cerca de 30%, precisava de um período de iniciação de 3 horas, precisava de calibração sensivelmente a cada cinco medições e por vezes a calibração exigia dois ou mais testes com tiras descartáveis e mesmo assim este aparelho apresentava muitas dificuldades em detetar picos de hipoglicemia (precisão era muito baixa em baixos níveis de glicose no sangue) característica crónica, ainda não resolvida em todos os meios que usam o fluido intersticial [66, 67, 68].

### **3.3 Não-Invasivos**

Alguns métodos categorizados nesta secção como não-invasivos, nomeadamente a tecnologia transdermica, apesar de não romperem a pele para aceder ao tecido intersticial, alteram propriedades da pele e podem causar eritema, irritação local e bolhas. Por oposição os métodos baseados na leitura de alterações óticas são puramente não-invasivos [48].

#### **3.3.1 Método Fotoacústico**

Este método é baseado na correlação existente entre a concentração de glicose presente no fluido intersticial e o sangue capilar. Os maiores problemas do ponto de vista clínico são o longo tempo requerido, para a medição e esta ser feita indiretamente, estando sujeita ao atraso temporal entre a concentração da glicose nos capilares sanguíneos e no tecido intersticial.

A espectroscopia de laser fotoacústico é um método de alta sensibilidade. Este método usa um feixe laser para irradiar a matéria em análise; feixe esse que produz uma expansão térmica na matéria, gerando uma onda sonora (onda de pressão) como consequência direta da irradiação [26].

As características da onda sonora são dependentes da matéria irradiada e são determinadas pelo coeficiente de absorção ótico e parâmetros físicos como a expansão térmica, calor específico e velocidade de propagação do som. Para além destas a onda sonora pode ser afetada pela dispersão ótica (scattering) que influencia a distribuição da luz. No caso da glicose, quanto maior for a sua concentração nos tecidos, menor será a capacidade de aumentar o calor específico do tecido, aumentando a velocidade das ondas do pulso gerado [48].

Ao contrário das ondas sonoras comuns, as produzidas pelo método fotoacústico contém informação sobre as propriedades do material da substância que as gerou. Mas tal como os métodos óticos este método sofre de várias limitações relacionadas com a análise e processamento do complexo sinal obtido.

O sinal recebido é, frequentemente, muito fraco, facilmente sofre interferências dos vários analitos do sangue e entre outros, a variabilidade e heterogeneidade da pele e a

constante variação dos parâmetros fisiológicos também impedem a análise assertiva do sinal resultante [69].

### 3.3.2 Bioimpedância

As propriedades eléctricas dos tecidos biológicos podem ser classificadas com base na fonte da energia eléctrica, isto é, a respostas passiva e ativa. A resposta ativa (bioelectricidade) ocorre quando o tecido biológico induz electricidade a partir de actividades iónicas no interior das células, é sobre esse princípio que se fazem as medições de electrocardiogramas (ECG) e electroencefalogramas (EEG). A resposta passiva ocorre quando os tecidos biológicos são estimulados com uma fonte, externa ao organismo, de corrente eléctrica [70].

A impedância de um material (biológico ou não) é, de forma simplificada, a resistência oferecida pelo material à fluência de corrente eléctrica através dele. A impedância pode ser formulada como a razão no domínio da frequência entre a tensão e corrente eléctricas com base na Lei de Ohm  $V = RI$  onde  $V$  representa a tensão eléctrica,  $R$  a resistência eléctrica e  $I$  a corrente eléctrica.

A impedância está dividida em duas componentes: a resistência e a reactância. Estes conceitos estão intimamente relacionados com a capacidade que os materiais apresentam para dissipar ou armazenar energia. Ora, a energia eléctrica é em parte armazenada e essa componente corresponde à reactância e a restante é dissipada e corresponde à resistência.

Quando a electricidade flui através do corpo humano ocorrem dois tipos de interações impostas pelo corpo, a  $C$  capacitiva (reativa) e resistiva  $R$  (resistência). A capacitância surge devido à membrana celular e a resistência surge devido à água do corpo (intracelular ou água extracelular). A membrana celular é constituída por uma camada de material lipídico não condutor intercalada entre duas camadas de moléculas de proteína condutoras.

Alto valor de reactância indica boa saúde e integridade da membrana celular. A estrutura da membrana celular faz com que elas se comportem como condensadores quando lhe é aplicada corrente alternada. Assim a impedância do tecido varia com a

frequência. A alta frequência, a corrente pode fluir através da água intra ou extracelular, o que significa que pode penetrar a membrana celular, enquanto que a corrente de baixa frequência não penetra na membrana celular fluindo apenas no fluido extracelular.

Como resultado, a baixa frequência, a impedância é resistiva na natureza e a alta frequência tem componentes reativa e resistiva [71].

Com instrumentação adequada, que envolve dois elétrodos de contacto com o corpo, um sistema de conversão de impedância de alta precisão, amplificação e conversão em tensão do sinal em corrente é possível obter um gráfico que relaciona a impedância com as frequências aplicadas para várias concentrações de glicose, medidas estas primeiro com um método invasivo para a calibração deste método.

Pode-se observar que o módulo da impedância diminui quando a frequência aumenta e o módulo da impedância diminui quando o nível de glicose no sangue aumenta.

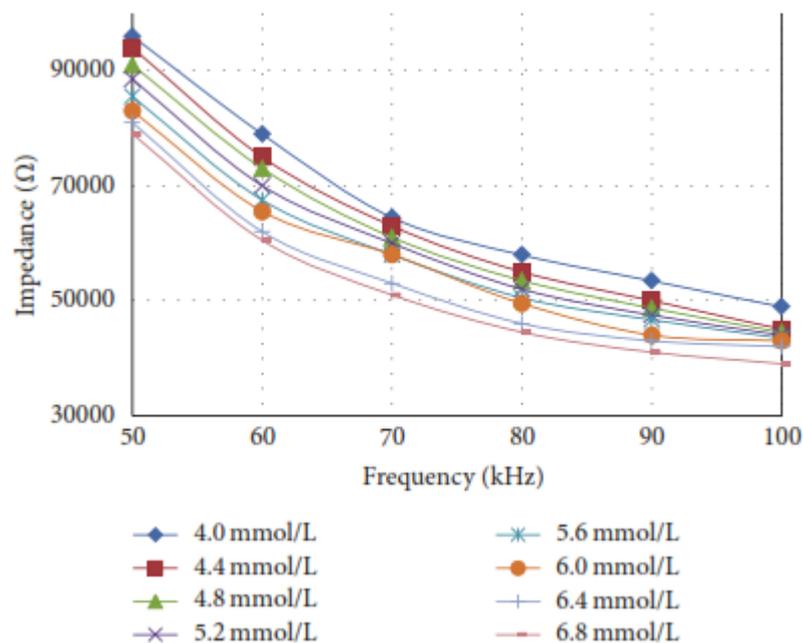


Figura 21 - Representação gráfica da dependência da Impedância com a Frequência e a concentração de glicose. Imagem adaptada de: [71]

### 3.3.3 Ultrassons (Sonoforese)

A aplicação de ultrassons na pele promove o aumento da permeabilidade da pele a algumas moléculas, incluindo macromoléculas. Esta técnica toma o nome de sonoforese e já foi provado ser uma boa ferramenta para a dispensa de fármacos através da pele.

Foram testados ultrassons desde 20 kHz até 16 MHz mas são os ultrassons abaixo de 100 KHz que apresentam melhores resultados na melhoria da permeabilidade que chega a atingir valores de 1000x mais permeável em comparação com a permeabilidade normal da pele.

Na extração de glicose, a técnica usada consiste na aplicação de ultrassons num curto intervalo de tempo seguida da aplicação de vácuo (pressão negativa na pele). A glicose atravessa a pele até um depósito colocado à superfície a um fluxo na ordem dos  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ . Dentro das hipóteses existentes para explicar este mecanismo, a mais consensual é a de que as ondas de pressão geram cavidades gasosas que posteriormente colapsam, um processo chamado de cavitação acústica.

Esta técnica foi usada em simultâneo com outras semelhantes e foi provada a existência de sinergia no processo com os outros intensificadores, incluindo químicos e iontoforese reversa [72].

### 3.3.4 Skin Suction Bilister

Este é um método muito simples, é um meio de obter fluido intersticial. Este fluido é captado pela aplicação de pressão negativa numa área muito pequena da pele (ordem dos  $\text{mm}^2$ ), forma-se uma pequena bolha que liberta o fluido [42, 66].

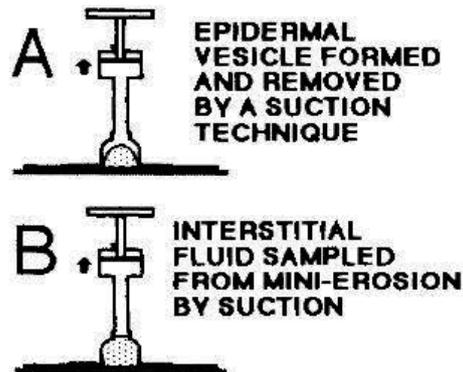


Figura 22 - Instrumento de obter fluido intersticial. Imagem adaptada de: [73]

Depois do fluido captado ele tem de ser analisado com um dos métodos conhecidos para medir a quantidade de glicose nele contida. No trabalho analisado, o autor usou um HemoCue um aparelho que faz testes fotométricos [descrito em 2.1] o que parece uma boa decisão pelo facto do fluido amostrado ter poucas proteínas dado a sua origem.

### 3.3.5 Meios Óticos

#### i) FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer)

Há vários trabalhos onde se constrói um sensor de fibra óptica que usa a técnica de medição de fluorescência do efeito FRET, o efeito de transferência de energia de forma não radiativa entre dois cromóforos, dito de outra forma, quando um elemento dador se encontra no estado eletrónico excitado transfere energia para um aceitador, passando o dador para o estado fundamental e ficando o aceitador excitado. Essa transferência é dependente da distância entre esses cromóforos [74].

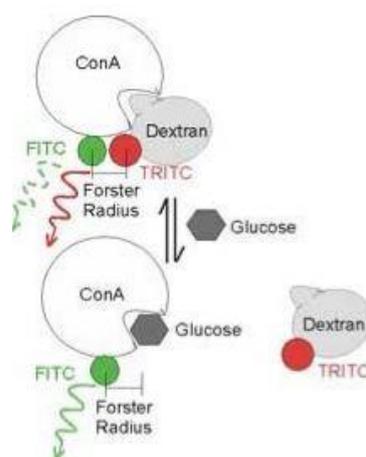


Figura 23 - Esquema da emissão do FITC fluorescência (verde) e emissão do TRITC (vermelho).

O sensor baseia-se na FRET entre 2 moléculas: o isotiocianato de fluoresceína (FITC) ligado à lectina ou Concanavalina A (Con A) e isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC) ligado a dextrano.

Quando o complexo FITC-Con A liga ao complexo TRITC-dextrano os fluoróforos ficam à distância crítica de Foster ( $\sim 50 \text{ \AA}$ ) que permite a inibição de fluorescência do FITC por FRET com uma eficiência de 50%. O dador é a FITC e o aceitador é a TRITC [75].

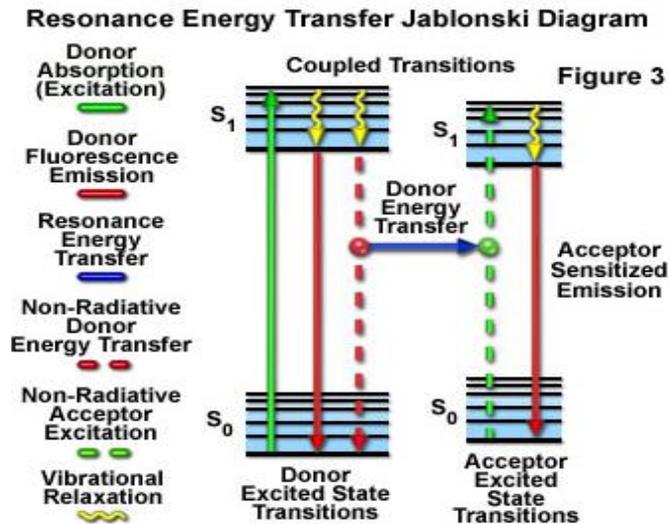


Figura 24 Diagrama de Jablonski para o processo de FRET.  
 Imagem adaptada de: [68]

A lectina tem uma afinidade muito elevada com a glicose e na presença de glicose esta liga-se à lectina, removendo o complexo TRITC-Dextrano parando a emissão de fluorescência. A taxa de transferência de energia segue a seguinte equação:

2 - Equação de Förster

$$K_t = \frac{1}{t_D} \cdot \left(\frac{R_0}{r}\right)^6$$

Onde  $K_t$  é a constante de velocidade de transferência de energia entre dador e aceitador,  $r$  é a distância entre os cromóforos,  $t_D$  é o tempo de vida de fluorescência do dador e  $R_0$  é a distância crítica de Förster.

Uma sonda com o sensor mede indirectamente as concentrações de glicose a partir do nível de inibição de fluorescência causada pela competição homogénea entre TRITC marcado com a concanavalina A (receptor) e FITC/dextrano (ligando). O sinal da emissão FITC é usado como um indicador para as concentrações de glicose e o sinal de TRITC é usado para calibração interna.

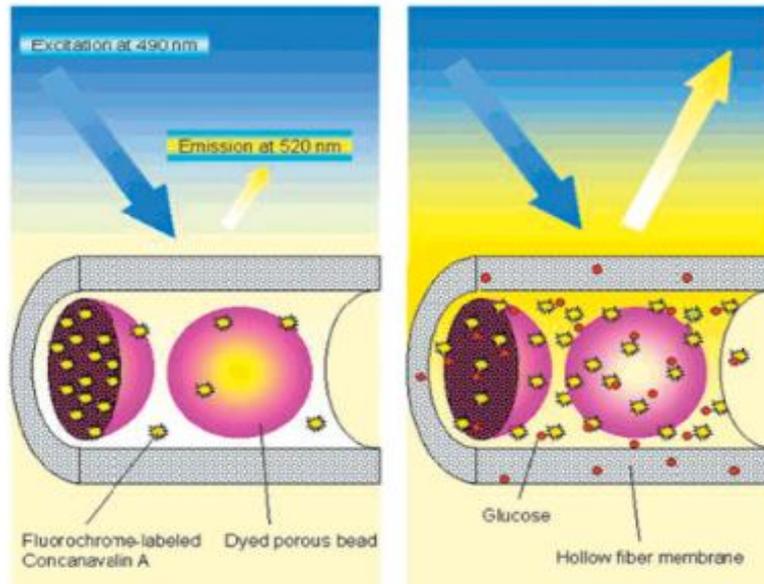


Figura 25 - Biossensor de glicose por competição usando ConA. Imagem Adaptada de: [69]

Estes sensores com FITC-Dextrano têm um limite de detecção de 0,05 µg/ml e conseguem medir concentrações de glicose de 1600 mg/dl com um tempo de resposta de cerca de 10 min [76, 77].

Este exemplo de sensores é mais usado em contexto de investigação na Biologia e é bastante caro atualmente para poder representar soluções comerciais, uma vez que o sinal ótico recebido tem de ser amplificado e transduzido num fotomultiplicador, mas com a sua elevadíssima seletividade e sensibilidade poderá vir a ser uma solução, eventualmente, em meio hospitalar, para monitorizar a concentração de glicose a partir de outros fluidos para além do sangue, como a urina, o suor, lágrimas ou saliva.

Existem, no entanto, alguns trabalhos que usaram esta técnica ligando fibras óticas diretamente a sondas de microdiálise [48].

## ii) Tomografia de Coerência Ótica

O OCT (Optical Coherence Tomography) foi inicialmente desenvolvido para obter imagens de elevada resolução do olho para diagnosticar doenças oftalmológicas.

O feixe da fonte é dividido num divisor de feixe. O componente reflectido é dirigido para um espelho, enquanto a componente transmitida é dirigida para a amostra. As diferentes camadas dos tecidos irão provocar *backscatter* da luz para o divisor de feixe.

No separador de feixe, a luz de *backscatter* da amostra irá interferir com a luz reflectida num espelho colocado na extremidade do braço ajustável (braço de referência) do interferómetro.

No entanto a interferência ocorre apenas (produção de franjas de interferência) se os dois feixes de luz percorrem a mesma distância (geralmente pequena, dependente do comprimento de coerência, o que permite grande resolução axial) e se as ondas mantiverem uma relação de fase constante, isto é, se as duas ondas forem coerentes [sincronizadas em espaço e tempo]. Ajustando simplesmente o comprimento do braço de referência, é possível detectar o sinal de luz a partir de profundidades específicas dentro da amostra e assim construir uma imagem 3D [78].

Existem fontes de erro difíceis de combater nesta técnica, desde já relacionados com movimento involuntário durante as medições (geralmente no antebraço) e também a própria heterogeneidade da pele.

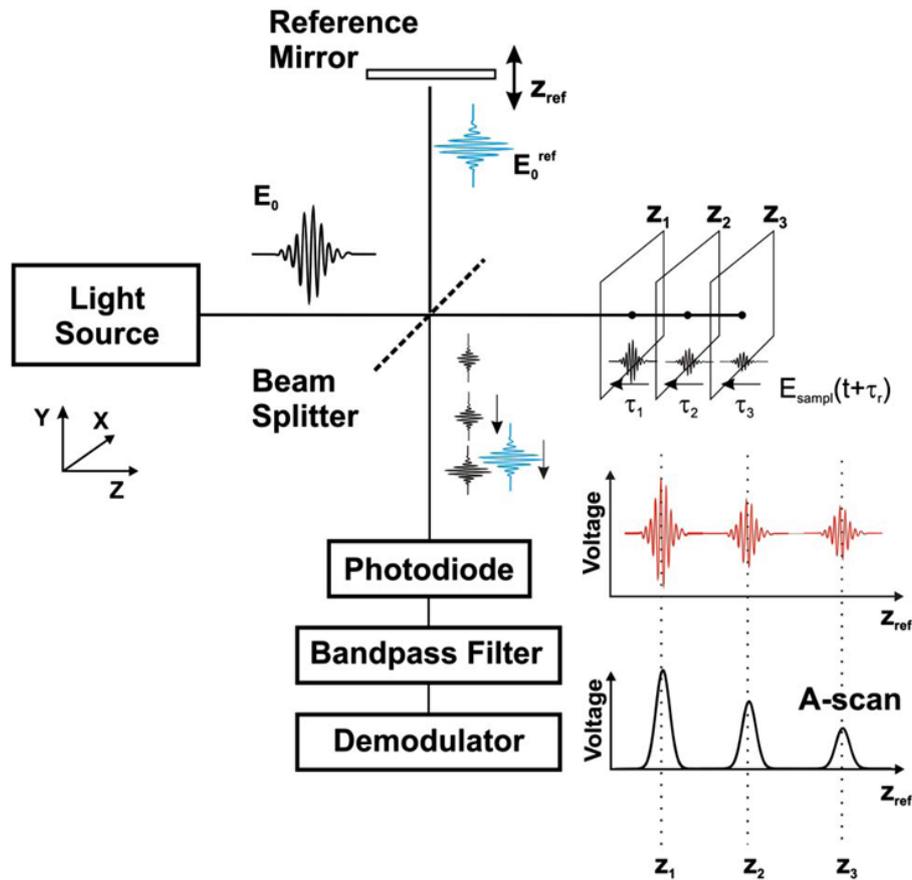


Figura 26 - - Esquemático do sistema de OCT. Imagem adaptada de: [71]

As imagens de OCT da pele obtidas são comparadas para mensurar alterações na microcirculação/microvascular ou a alteração do coeficiente de refração do tecido intersticial, devido à alteração do volume celular, que depende da concentração de glicose no tecido intersticial [79, 80].

Foram apresentados vários métodos para a monitorização da glicose. Estes métodos são baseados em tecnologias diferentes, mas grande parte destes métodos amostra diretamente a glicose do sangue ou do fluido intersticial.

A evolução dos métodos não invasivos tem sido a mais crescente e esse é o caminho mais promissor para uma interação mais positiva com o controlo da diabetes. A medição será sempre necessária para combater e diagnosticar a doença e tudo o que permitir uma medição com menos embaraço e dor será uma grande mais valia para os envolvidos.

Atualmente, são os métodos discretos que têm mais aprovação pelo seu preço, tamanho reduzido e precisão, que apesar de ser ainda insuficiente, é maior comparada com os restantes métodos, ainda pouco 'amadurecidos', que carecem de evolução nesse sentido.

Pelas restrições da produção em massa e da imobilização enzimática, as tiras descartáveis estão a atingir o limite da melhoria da precisão que conferem, pelo que cada vez mais surge a necessidade de apostar na investigação e desenvolvimento de metodologias alternativas e por isso surgem algumas propostas descritas neste documento.

Ainda assim, hoje o melhor método, que produz resultados com mais precisão e com mais facilidade de utilização ainda é o das tiras descartáveis. Continuará a ser até que surja alguma forma alternativa que pelo menos seja menos invasiva, mais precisa e com um preço relativamente próximo às tiras e, portanto, a pertinência deste trabalho mantém-se.

## IV. Requisitos do Sistema

---

Nesta secção são definidos os requisitos que o sistema final deverá conter de acordo com as expectativas da Exatronic. Estes requisitos estão divididos em 7 categorias e a cada requisito é atribuído um nível de importância de 1 (obrigatório) a 3 (facultativo).

### 1. Descrição

O pré-estabelecimento de requisitos permite uma melhor estruturação do trabalho e melhor gestão de tempo no estabelecimento de prioridades.

O objetivo deste trabalho será desenvolver um sistema capaz de medir com eficiência a glicemia de doentes com Diabetes Tipo I e Tipo II, através de tiras eletroquímicas de decomposição da gota de sangue usada na amostra.

O sistema deve ser capaz de enviar os resultados obtidos para uma interface móvel ou outro aparelho recetor, através de comunicação Bluetooth.

Para além disso, o dispositivo deve possuir uma bateria que permita a utilização do aparelho em situações nas quais não há disponibilidade de rede elétrica. A portabilidade é importante para os doentes com Diabetes, que vêm o seu nível sanguíneo de glicose a variar bastante e isso pode levar a desmaios (hipoglicémia) que terão de ser prevenidos, com medição e ingestão de alimentos adequados para aumentar o nível de glicose rapidamente.

O objetivo principal deste projeto é a realização de *hardware*, *firmware* e *software* de todo o sistema de modo a cumprir as características propostas.

## 2. Requisitos

Tabela 2 - Requisitos Funcionais

ID	Tipo	Requisito	Nível de Importância	Interfere com
F-01	Funcional	O Glicómetro deve ser capaz de analisar o sinal de tiras eletroquímicas.	1	
F-02	Funcional	A medição deve seguir o método amperimétrico.	1	F-01
F-03	Funcional	O valor final da medição deve ser enviado via Bluetooth para um aparelho recetor que fará a apresentação (display) do valor medido/lido.	1	I-02 N-01
F-04	Funcional	O aparelho deve desligar-se ao fim de 30 segundos sem utilização, de forma automática.	1	I-01

Tabela 3 - Requisitos Não-Funcionais

ID	Tipo	Requisito	Nível de Importância	Interfere com
NF-01	Não-Funcional	As leituras não devem demorar mais que um minuto (tão rápido quanto possível).	2	F-02
NF-02	Não-Funcional	O tamanho do aparelho no seu todo deve ser suficientemente pequeno para ser portátil.	1	M&D-02
NF-03	Não-Funcional	O aparelho deve leve ser (menos de 1kg no total).	3	
NF-04	Não-Funcional	O preço de produção do aparelho não deve exceder os 60€.	1	

Tabela 4 - Interfaces

ID	Tipo	Requisito	Nível de Importância	Interfere com
I-01	Interface	Deve ter um botão para ligar e desligar o sistema.	1	F-02
I-02	Interface	Deve ter uma interface digital que consiga receber e mostrar o valor da medição efetuada.	2	A&E-02 F-03
I-03	Interface	O sistema deverá possuir uma entrada micro-usb para carregamento da bateria	2	A&C-04

Tabela 5 - Autonomia e Consumo

ID	Tipo	Requisito	Nível de Importância	Interfere com
<b>A&amp;C-01</b>	Autonomia e Consumo	Operado por fonte autónoma de alimentação elétrica (bateria confere portabilidade).	1	I-03
<b>A&amp;C-02</b>	Autonomia e Consumo	Permitir ligação à rede elétrica para carregamento da bateria.	3	I-03 A&C-01
<b>A&amp;C-03</b>	Autonomia e Consumo	Permitir, quando operado exclusivamente por bateria, 60 medições.	2	F-02
<b>A&amp;C-04</b>	Autonomia e Consumo	Carregar a bateria em menos de 3 horas.	3	A&C-01

Tabela 6 – Requisitos de Mecânica e Design

ID	Tipo	Requisito	Nível de Importância	Interfere com
<b>M&amp;D-01</b>	Mecânica e Design	O dispositivo final estará envolvido por uma caixa.	1	A&E-01 NF-02 NF-03
<b>M&amp;D-02</b>	Mecânica e Design	A caixa que envolve o aparelho não deverá ter volume superior a 200 cm <sup>3</sup> .(ou 10x2,5x8 cm)	2	NF-02
<b>M&amp;D-03</b>	Mecânica e Design	Conter indicações claras do local onde inserir cada tira de medição descartável.	1	

Tabela 7 - Alarmes e Erros

ID	Tipo	Requisito	Nível de Importância	Interfere com
<b>A&amp;E-01</b>	Alarmes e Erros	Conter um LED vermelho que liga quando a bateria necessita de ser mudada/carregada.	3	A&C-01
<b>A&amp;E-02</b>	Alarmes e Erros	Caso a amostra sanguínea não seja suficiente para produzir uma medição/resposta, enviar uma mensagem de erro via Bluetooth para o mostrador final.	1	N-01
<b>A&amp;E-03</b>	Alarmes e Erros	Conter um LED verde que indica que a bateria está a ser carregada.	3	A&C-01

Tabela 8 - Requisitos Regulamentares

<b>ID</b>	<b>Tipo</b>	<b>Requisito</b>	<b>Nível de Importância</b>	<b>Interfere com</b>
<b>N-01</b>	Normativos	O sistema deverá possuir um LED de cor verde para indicar que o dispositivo se encontra a carregar a bateria e um LED vermelho para indicar que o dispositivo se encontra com níveis de bateria baixos.	3	A&E-01 A&E-03
<b>N-02</b>	Normativos	Seguir as recomendações para dispositivos médicos para o controlo da Diabetes do Infarmed I.P.	1	

## V. Desenvolvimento

---

Neste capítulo estão descritos os passos dados no desenvolvimento do Hardware e os componentes estudados e usados, assim como todas as considerações tomadas no desenho da PCB. São explicadas a organização do firmware e as suas funções, bem como a preparação dos testes na escolha do método de calibração e o Software para o display que foi desenvolvido.

### 1. Método de Calibração

A precisão é uma questão crítica no desenvolvimento de um Glicómetro. Até agora, apesar de lentamente, a precisão dos aparelhos tem vindo a aumentar, mas há fatores que podem melhorar a precisão e são independentes do desenvolvimento do aparelho. Por exemplo, caso os testes fossem realizados em ambiente hospitalar, como a generalidade das medições de parâmetros fisiológicos, a presença de técnicos treinados, de um ambiente controlado em humidade e temperatura e manutenção constante do aparelho que executa o teste são pequenas condições que levam a que os resultados sejam mais confiáveis.

Ora, dadas as limitações conhecidas, supracitadas é expectável que mesmo com muitas medições para a calibração do aparelho desenvolvido, este apresente uma precisão aquém daquela que é necessária atualmente. Também pela falta de informação técnica sobre a tira e falta de conhecimento do comportamento elétrico nos diversos regimes de temperatura, hematócrito, altitude, entre outros.

Antes de começar qualquer desenho de Hardware, e apesar de já termos uma ideia pré-concebida do tipo de circuito de condicionamento que será necessário, pela análise da equação de Cottrell, é necessário realizar testes às tiras para saber qual é o comportamento delas, em relação à estimulação em vários potenciais elétricos e com várias concentrações de soluções de glicose que se comportarão de forma semelhante ao sangue [81].

Essa calibração irá ser feita com recurso a tiras descartáveis e soluções controlo. Idealmente estas soluções controlo deveriam ser com sangue, parte destas vindas de diabéticos e outras de pessoas não-diabéticas. Estas amostras deveriam abranger uma vasta gama de concentrações e essas concentrações deveriam ser determinadas em laboratório por HPLC.

Ora, tal não é possível, por não existirem meios na Exatronic para trabalhar com sangue, nem modo de obter essas amostras no volume e condições necessárias. Portanto, a forma que pareceu mais adequada seria usar soluções aquosas de glicose.

Foi pensado que se juntando água destilada e glicose em pó, com pesagens e pipetagens feitas com cuidado será possível fazer estas soluções. Conclui-se que seria até mais vantajoso não usar sangue nesta fase, porque dessa forma impedia-se o envolvimento de substâncias interferentes.

Portanto foi solicitado à Professora Doutora Ana Maria Antunes Dias, colaboradora do Departamento de Engenharia Química da FCTUC, que facultasse o material e o espaço no Departamento de Engenharia Química para fazer estas soluções.

Foram preparadas 10 soluções de 12 ml a diferentes concentrações de glicose. A glicose usada foi a *D(+)* – *Glucose* do laboratório Riedel-de Haën com o peso molecular de 180.16 g/mol e número CAS: 50-99-7. A fórmula linear da glicose é  $C_6H_{12}O_6$ .

Tabela 9 - Representação das diluições efetuadas no estabelecimento de soluções controlo de glicose

C2 = C.final (mg/dL)	V2 = V.final (ml)	v1 = Vol. a retirar da sol. C1 (ml)	Vol. de água (ml)
600	12	12	0
400	12	8	4
200	12	4	8
150	12	3	9
125	12	2,5	9,5
105	12	2,1	9,9
90	12	1,8	10,2
65	12	1,3	10,7
40	12	0,8	11,2
10	12	0,2	11,8

Para fazer 10 soluções em concentrações escolhidas representadas na tabela 9 é necessário preparar, pelo menos 35,7ml de uma solução a 600mg/dL. Os cálculos de diluição foram realizados através da equação  $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ .

Foi realizada uma solução de 40ml onde se dissolveu  $240,20 \pm 0,01$ mg de glicose. A pesagem foi realizada numa balança de precisão do modelo LE225D da Sartorius.

Foi usada água mili-q nas diluições [água desionizada, purificada num sistema da Millipore Corporation]. A condutividade da água foi medida, para garantir a maior purificação, uma vez que a condutividade elétrica da água baixa muito, com a ausência de iões responsáveis pela condução. Todas as soluções foram agitadas num *vortex* mecânico e foi usada apenas uma pipeta (capacidade 1000-5000 $\mu$ L), alternando as pontas entre a de água e outra para solução glicosada. O excedente da solução inicial de 600mg/dL foi armazenado noutra frasco.



*Figura 27 - Balança de Precisão utilizada (esquerda), recipiente recetor da quantidade medida e glicose em pó (à direita).*

## 2. Hardware

Tendo em conta as finalidades deste dispositivo, vários fatores foram cruciais no que diz respeito ao desenvolvimento do *hardware* do sistema. Nomeadamente, a portabilidade, autonomia e preço, com o compromisso numa boa precisão do sistema final. Deste modo, todas as decisões tomadas vão ao encontro destas características.

### 2.1 Arquitetura do Sistema

De forma a transitar dos requisitos pretendidos, para a estruturação de um sistema composto, foi desenhado um diagrama simples para organizar e estruturar as escolhas que seriam feitas, representado na figura 28.

A partir da macro arquitetura do sistema foram realizadas algumas escolhas e os componentes físicos essenciais serão:

- Fonte de alimentação interna recarregável – bateria de 3.7V
- Placa de controlo programável para definir o funcionamento dos componentes
  - PCB que implemente protocolos de comunicação, regulação de tensões elétricas, que reúna as interfaces físicas (botões, fichas e luzes informativas) e possibilite a ligação a diferentes placas de sinal.
- Placa removível que possa encaixar com facilidade na placa de controlo
  - Reúne as funcionalidades de condicionamento de sinal específicas para um conjunto tira/conector
- Sensor que se ligará na placa removível e receberá a amostra de sangue
- Caixa externa que fecha a placa de controlo

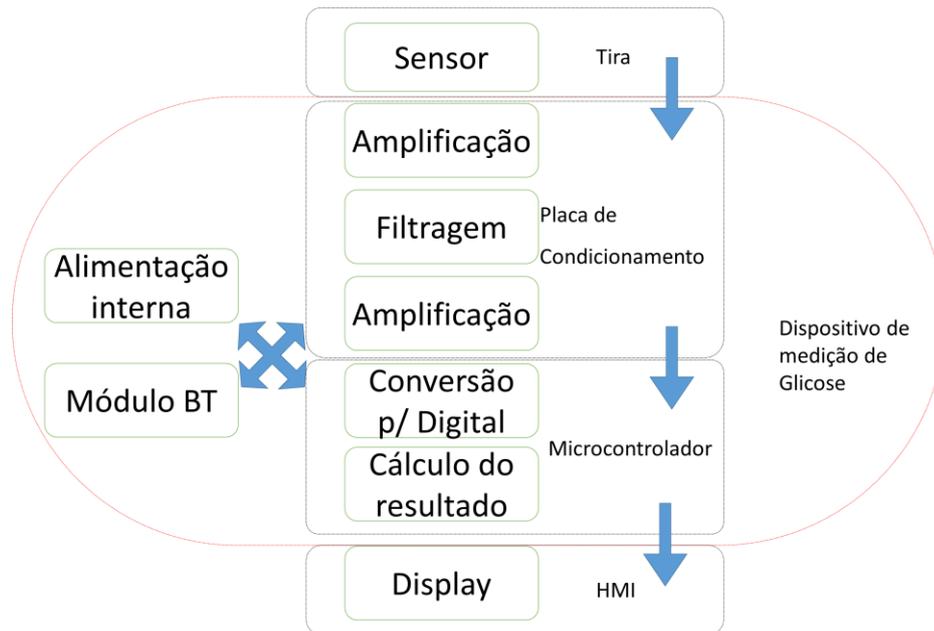


Figura 28 - Macro Arquitetura do sistema desenvolvido

Analisando o esquema de cima é possível verificar que o sistema final terá uma componente da entrada do sinal, neste caso será a tira descartável, que nesta fase não se conhecia qual era, apenas que seria responsável por transformar a glicose num sinal analógico.

Na secção seguinte é feito o condicionamento desse sinal analógico, uma vez que sinal proveniente tem muito baixa amplitude (ordem dos microamperes) e, portanto, é amplificado e convertido para tensão, filtrado e depois passa num *buffer* eletrónico (ganho unitário) para depois ser digitalizado e assim ser possível calcular o valor de glicose na secção do controlo. Em paralelo nesta parte achou-se adequado fazer uma medição da temperatura, por sabermos que a temperatura influencia muito a fluidez do sangue e a atividade enzimática. São também executadas uma série de outros cálculos, detalhados na Secção 2 (Firmware) deste capítulo.

Após o cálculo do valor da concentração e da temperatura, estes valores são enviados por protocolo UART para o módulo *Bluetooth* que, se emparelhado a um *smartphone*, os envia para serem vistos pelo utilizador.

## 2.2 Escolha da Tira

O passo seguinte foi a compra das tiras. Previamente, antes do desenvolvimento na Exatronic foi realizado um pequeno inquérito porta a porta em algumas farmácias de Coimbra e Braga. Questionou-se quais as marcas mais vendidas de tiras, mas infelizmente em nenhuma farmácia foi divulgada informação concreta ou suportada por números de vendas, apenas pela experiência dos funcionários.

Ora, face à pouca significância destas informações, apesar de se ver uma tendência de algumas marcas presentes nas respostas, procurou-se obter a informação pretendida de outra forma.

Assim, a Associação Nacional de Farmácias e a Associação de Farmácias de Portugal foram contactadas no sentido de disponibilizar informação sobre as marcas de tiras mais vendidas em Portugal. Esta informação serviu posteriormente de critério de escolha para a Exatronic, juntamente com uma tabela de custos de tiras, custo de Glicómetros e respectivas percentagens de participação estatal, assim como os locais onde adquirir. Essa tabela com todas as marcas disponíveis em Portugal foi ajustada de uma folha de Excel, disponível para consulta pública no sitio oficial do INFARMED (infarmed.pt).

Dos contactos com a ANF foi conseguida por contato em correio eletrónico uma tabela parcial do ranking nacional de vendas, que se encontra representada abaixo.

*Tabela 10 - Classificação de 5 tiras de acordo com as vendas em Portugal.*

<b>Ranking</b>	<b>Nome</b>
<b>1</b>	Accu-Check Aviva Tira Glicémia PL
<b>2</b>	Freestyle Precision Tira Glicémia PL
<b>3</b>	One Touch Verio Tira Glicémia PL
<b>4</b>	One Touch Ultra Tira Glicémia PL
<b>5</b>	Glucocard G Sensor Aviva Tira Glicémia PL

A Exatronic escolheu trazer as tiras One Touch Verio e foi recolhida informação acerca da estrutura e configuração das tiras de forma a poder iniciar o desenho do sistema de condicionamento do sinal.

Sobre estas tiras foi possível descobrir que são compostas por um eléctrodo polimérico na parte superior, revestido na face interna por ouro, uma camada de

separação e um elétrodo com base polimérica, revestido a paládio. A distância entre os elétrodos é  $95\mu\text{m}$ , usa glicose Desidrogenase e ferricianido no elétrodo que contém paládio. O tamanho da amostra usada é  $400\text{nL}$  (nanolitros) [39].

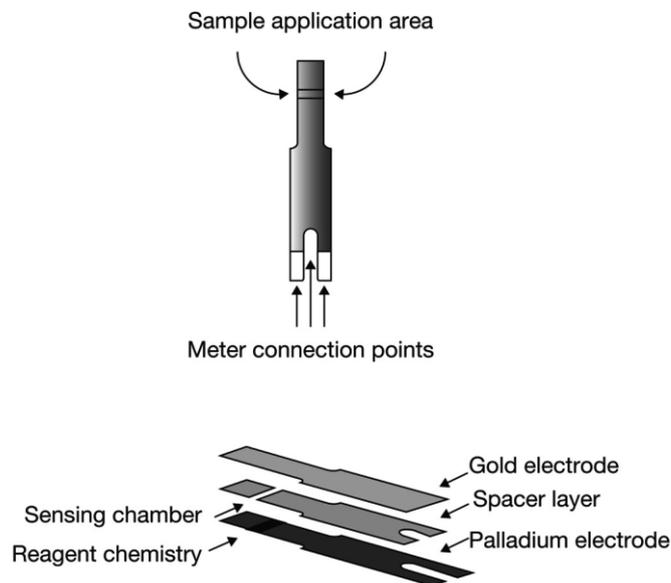


Figura 29 – Estrutura da tira One Touch Verio. Imagem adaptada de [39]

Sendo esta tira de apenas dois elétrodos após a análise de documentação sobre o tema devemos usar o elétrodo de ouro como referência e o de paládio como o elétrodo de medição, usualmente o maior [82, 83, 84, 85].

A escolha da tensão a usar para polarizar as tiras é provavelmente um dos passos mais cruciais no desenvolvimento do dispositivo, uma vez que se aplicarmos um potencial relativamente alto temos um sinal mais alto, mas com mais ruído, porque quanto maior for o potencial aplicado, maior será o número de substâncias biológicas interferentes que podem ser oxidadas no eléctrodo de trabalho e produzir um sinal falso.

As tensões escolhidas foram selecionadas com base num trabalho analisado sobre estas tiras, caso contrário seria realizado um estudo de voltametria cíclica, para escolher a tensão à qual há melhor resposta [42].

Por outro lado, a conexão das tiras é um fator que traz problemas, por não existirem conectores no mercado disponíveis. Para esta tira usaram-se dois conectores de três contactos sobrepostos cofacialmente, estando o superior deslizado cerca de  $2\text{mm}$  para trás em relação ao inferior, representados na figura seguinte.

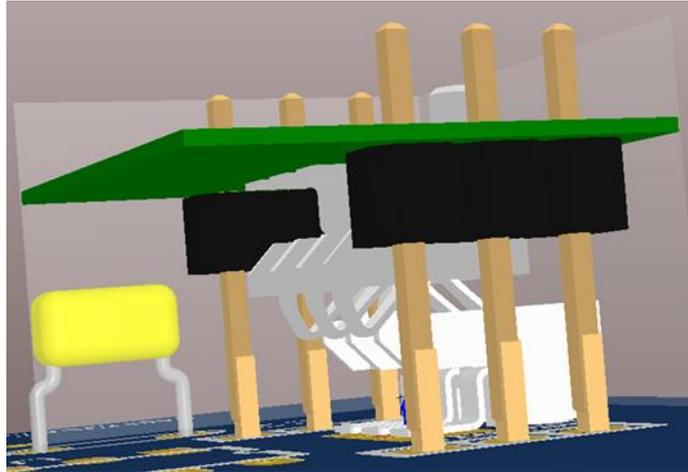


Figura 30 - Esquema 3D da colocação espacial dos conectores.

### 2.3 Placa de Encaixe no Arduino

Para fazer testes de caracterização das tiras foi desenvolvida uma PCB, no software Altium, para integrar os conectores, um amplificador para a conversão do sinal em tensão, um DAC e um *shunt voltage regulator* de forma a poder estabelecer uma diferença de potencial com precisão nos elétrodos da tira.

Esta placa foi desenvolvida de forma a encaixar superiormente num Arduino disponibilizado pela Exatronic, o mega 2560. Este Arduino é baseado no ATmega2560, tem 54 pinos I/O, 16 inputs analógicos, 4 UART, e uma ficha usb-b que permite comunicação com desktop. Opera a 5V, mas tem uma saída a 3,3V.

Foi desenvolvido código em IDE (Arduino Software) para configurar o DAC (TLC7528IN) e ler a saída de tensão do sinal e dois pinos para medir as tensões divididas, para desta forma proceder ao cálculo do número binário do DAC mais adequado.

Os esquemas elétricos da placa desenvolvida retratada na figura 31 estão representados na página seguinte na figura 32.

Para esta primeira placa escolheram-se componentes DIP, por serem maiores, por haver espaço na placa, que teria de ter a largura da placa suporte do Arduino, e por serem mais fáceis de soldar, uma atividade em que foi sentida bastante dificuldade.

Também porque estas placas foram manufacturadas numa LPKF Protomat93S na Exatronic, com o Software de controlo Board Master 3.0, a partir dos ficheiros '.gerber' extraídos no Altium. Identificam-se as zonas de eletrónica, as zonas de corte ou desbaste

de fresa, e os furos com brocas e nesta máquina a precisão não permite *footprints* para componentes mais pequenos.

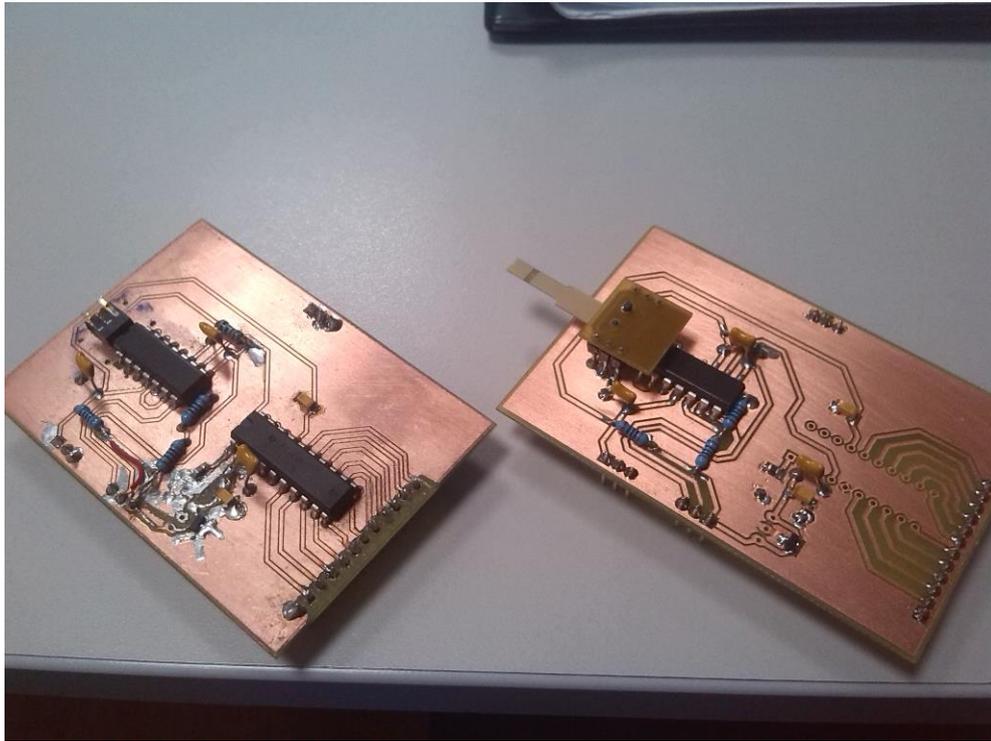


Figura 31 - Duas placas desenvolvidas para o Arduino mega 2560, à esquerda a primeira com alguns curto-circuitos e à direita a segunda produzida com correção dos problemas que surgiram na primeira.

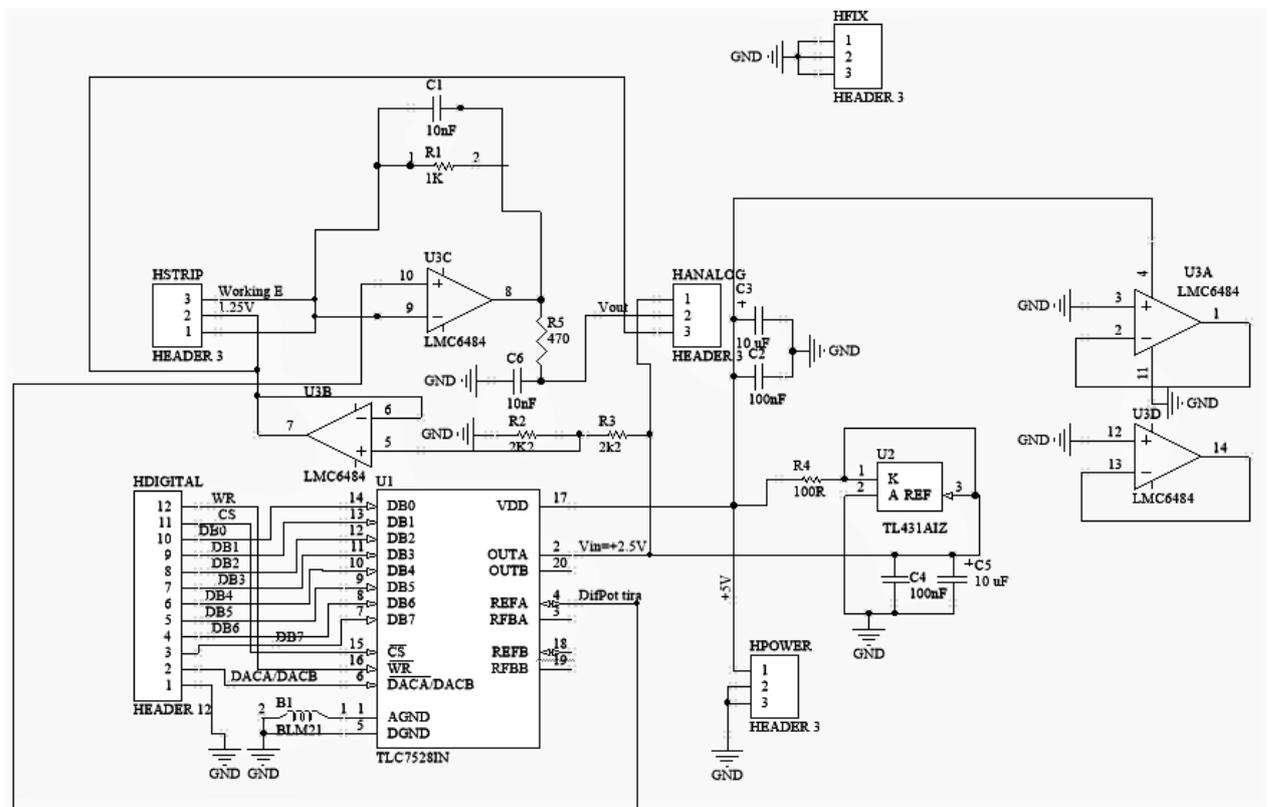


Figura 32 - Esquema de ligações elétricas usadas na placa para o Arduino.

As ferramentas usadas pela LPKF são mudadas manualmente. É uma máquina relativamente simples, tem uma zona de encaixe das ferramentas posicionada a 90° da placa de FR-4 revestida de cobre, que será trabalhada, sendo que esse bloco onde se inserem as diversas ferramentas movimenta-se sobre os eixos X e Y e está fixado num parafuso sem fim, que roda centrado no eixo dos X e outro parafuso sem fim movimenta o conjunto referido no eixo dos Y. São ambos controlados por motores de passo.

As placas realizadas na LPKF foram feitas no Altium para ocupar apenas a Top Layer (uma face), usando-se placas de FR-4 revestidas de cobre apenas numa face, por serem mais abundantes na Exatronic e mais baratas.

Foi escolhido um DAC de 8 bits, o TLC7528IN, com um pino para definir o estado de cada bit, não havendo necessidade de implementar um protocolo de comunicação. Este tem um erro linear máximo de meio LSB com 100ns de *setting time*.

Outro componente essencial escolhido para esta placa foi o Amplificador Operacional. O LMC6484 tem boas características para baixas tensões de alimentação por ser rail-to-rail, apenas 20fA de corrente elétrica nas entradas e por já ter sido usado noutros trabalhos com tiras de glicose com sucesso achamos que seria uma boa opção para este projeto [86].

Ora, os primeiros sinais registados foram gravados em ficheiros '.txt' no computador, obtidos através da interface de dados do Arduino, adquiridos pela leitura de uma das entradas de conversão analógica, uma entrada com ligação a um ADC de 10 bits referenciado a 5V. Foram posteriormente analisados em Matlab. Nesta fase, alguns dados foram convertidos para tensão em Matlab, para permitir análise em amplitude elétrica e para dimensionar a eletrónica mais adequada para as tiras que foram escolhidas. Os que não foram convertidos estão representados em ordem aos bits do ADC. Cada bit representa um intervalo de 4,88mV, já que a referência usada era 5V e a resolução do ADC era de 10 bits, havendo 1024 valores níveis discretos.

Nas figuras 33 e 34 podemos ver a evolução na filtragem, assim como na figura 35, em que até o sinal baseline, um degrau, conseguido pela subida do output do DAC para uma das entradas do amplificador, representado a azul, apresentava bastante ruído.

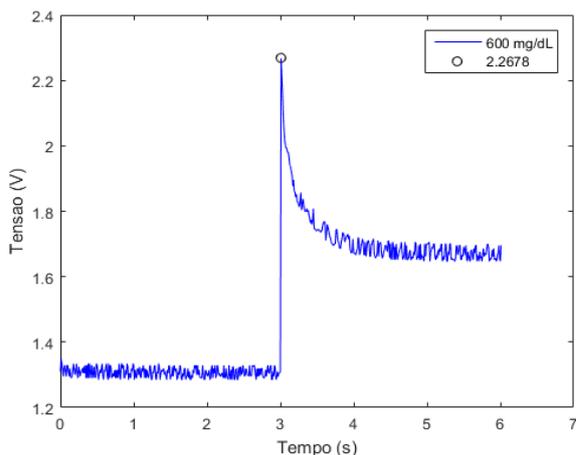


Figura 33 - Tensão elétrica medida em função do tempo.

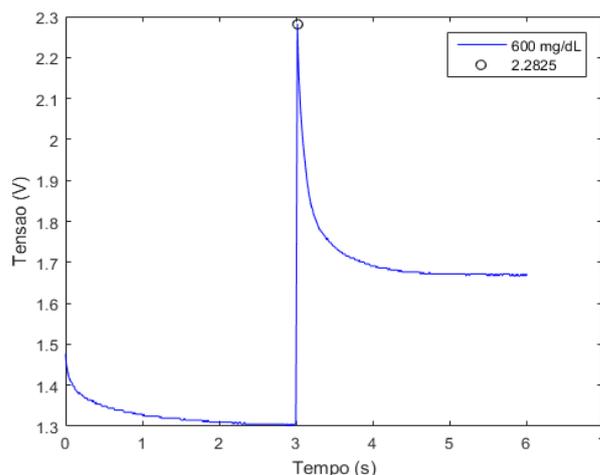


Figura 34 - Tensão elétrica medida em função do tempo.

Foi usada a solução de concentração mais alta, a solução de 600mg/dL, para ajustar ganho da amplificação para as zonas mais próximas dos limites do amplificador, uma vez que produz o sinal maior que se quer medir.

A filtragem foi realizada improvisando, na placa do Arduino, um filtro analógico, passa baixo, de primeira ordem. Este filtro consistiu numa resistência de 470 Ohms em série com a pista do sinal e a entrada para a pista do ADC do Arduino; e um condensador de 10 nanoFard ligado entre a entrada da pista do ADC do Arduino e o *ground* (0V). Este filtro tem uma frequência de corte de 33,86KHz.

Na figura 35 também se verifica como era feita a aquisição do sinal, o degrau imposto pelo DAC levava a uma resposta do sensor, mas como este degrau surgia em tempos diferentes em relação à inserção da amostra, as curvas eram inconsistentes.

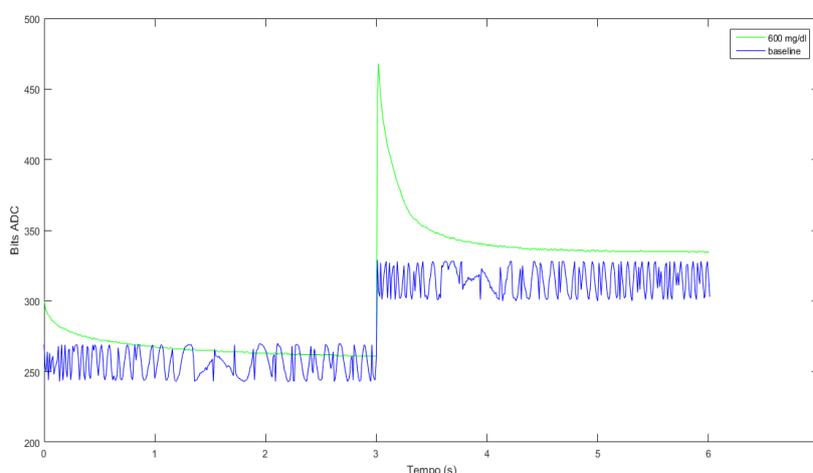


Figura 35 - Sobreposição da aquisição de sinal sem tira (baseline), sem filtro analógico e sinal de uma tira com filtro arquitetado.

Podemos verificar na figura 36 que foram realizados três registros para validar a existência dessa inconsistência, mas também para verificar se a filtragem já era adequada.

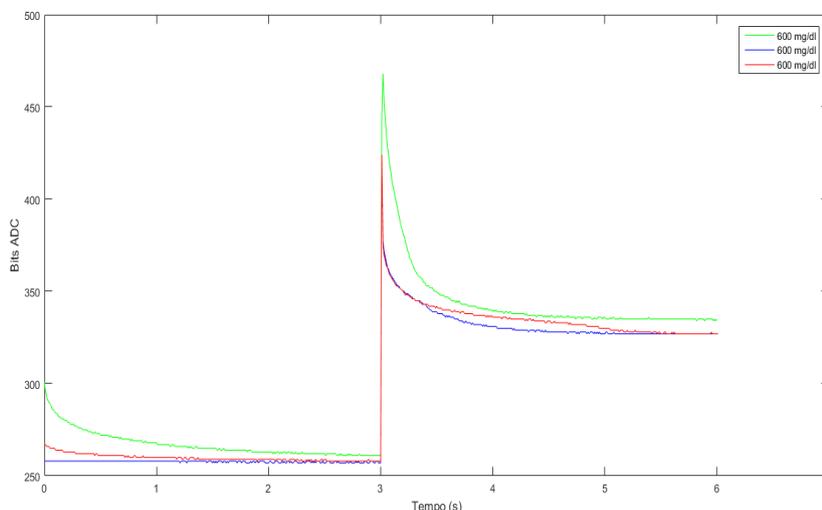


Figura 36 - Sobreposição de três amostragens da mesma solução de 600mg/dL mas em tempos diferentes.

Decidiu-se então fazer uma aquisição mais longa, em que se aguardava 15 segundos, numa tensão de 20mV acima da tensão de referência e só após esse tempo, o potencial era subido no output do DAC. Isto para dar tempo a inserir a gota da amostra, no tempo em que a diferença de potencial estava baixa e analisar no sinal registrado. O objetivo foi tentar associar o momento de inserção da amostra, com uma alteração concreta e mensurável do sinal. A figura 37 retrata esse teste.

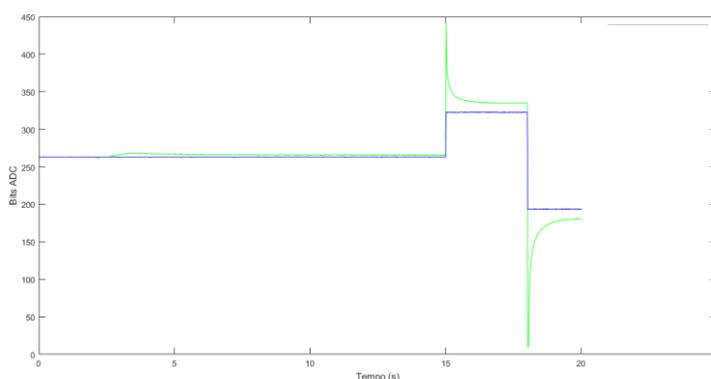


Figura 37 - Alongamento do tempo de espera pelo início de variação da diferença de potencial entre os eletrodos da tira.

Foram feitas várias aquisições. Apenas se publica esta, por ser a curva de sinal (a verde) que apresenta um salto maior, decorrente do aumento da condutividade imposto

pela entrada da amostra. A azul está representado o output do DAC adquirido previamente, para a mesma rotina de testes.

As várias curvas adquiridas no teste da detecção da entrada da amostra foram analisadas no Matlab. Foram analisadas as pequenas subidas e foi desenvolvido código para sincronizar o início do degrau imposto pelo DAC, com um tempo constante definido após a detecção da subida no sinal. Essa detecção foi sendo ajustada e quando o sistema ficou capaz de detetar a entrada da amostra, em todas as medições realizadas, foram registadas três medições com a solução mais alta.

Essas medições estão representadas na figura 38, desfasadas no tempo, precisamente devido à inserção da solução ter sido realizada em tempos diferentes. Obtiveram-se resultados bons, bastante consistentes, com diferenças nos picos de +/- 0.02V.

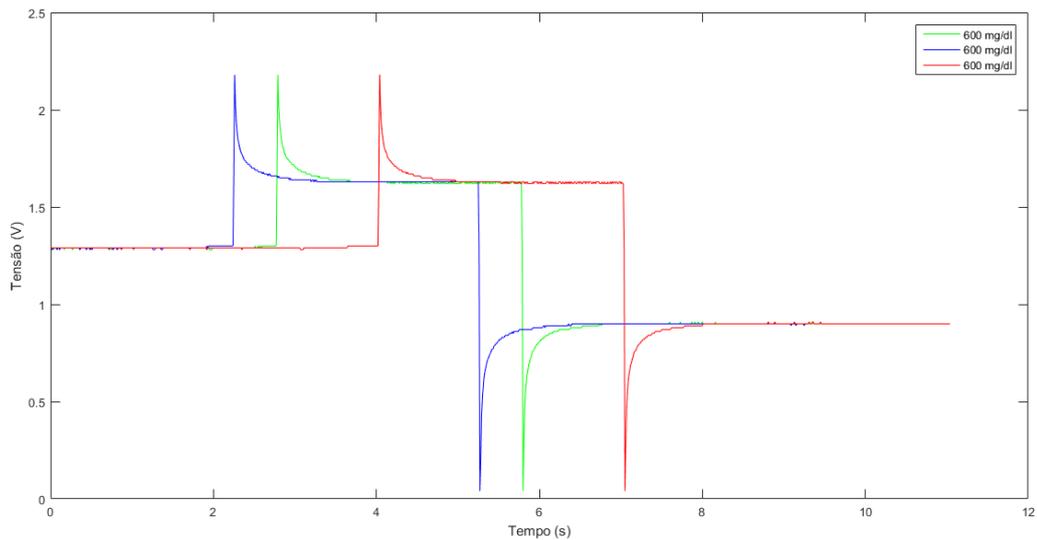


Figura 38 - Sobreposição de três sinais da mesma solução.

Por fim foram realizados três testes com soluções diferentes, representados na figura 39, para verificar se existiam evidências de proporcionalidade dos sinais.

Foram recolhidos 5 pontos com distâncias temporais iguais, medidas a partir do máximo absoluto em cada sinal representadas nos gráficos da figura 40. Desses pontos foram feitas retas de ajuste linear, para uma calibração provisória.

Verificou-se que a detecção de pontos homólogos na primeira 'metade' do sinal era mais difícil. Os melhores resultados de proporcionalidade foram obtidos na região abaixo da tensão de referência de 2V. Todos os sinais da figura 40 foram comparados à mesma referência, que foi previamente alterada, para haver mais margem de amplificação, uma vez que o pico mínimo do sinal apresenta uma distância maior à referência que o pico máximo.

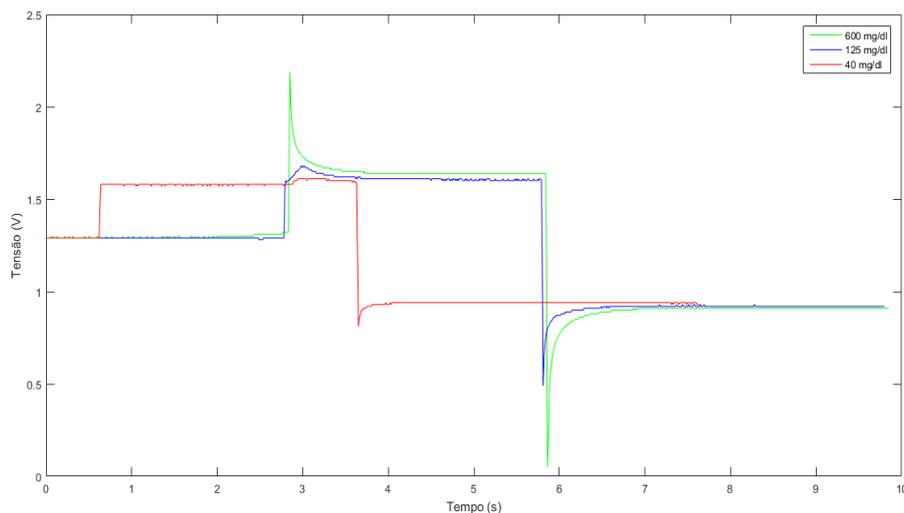


Figura 39 - Sobreposição de três sinais de soluções de glicose distintas: 600, 125 e 45 mg/dL.

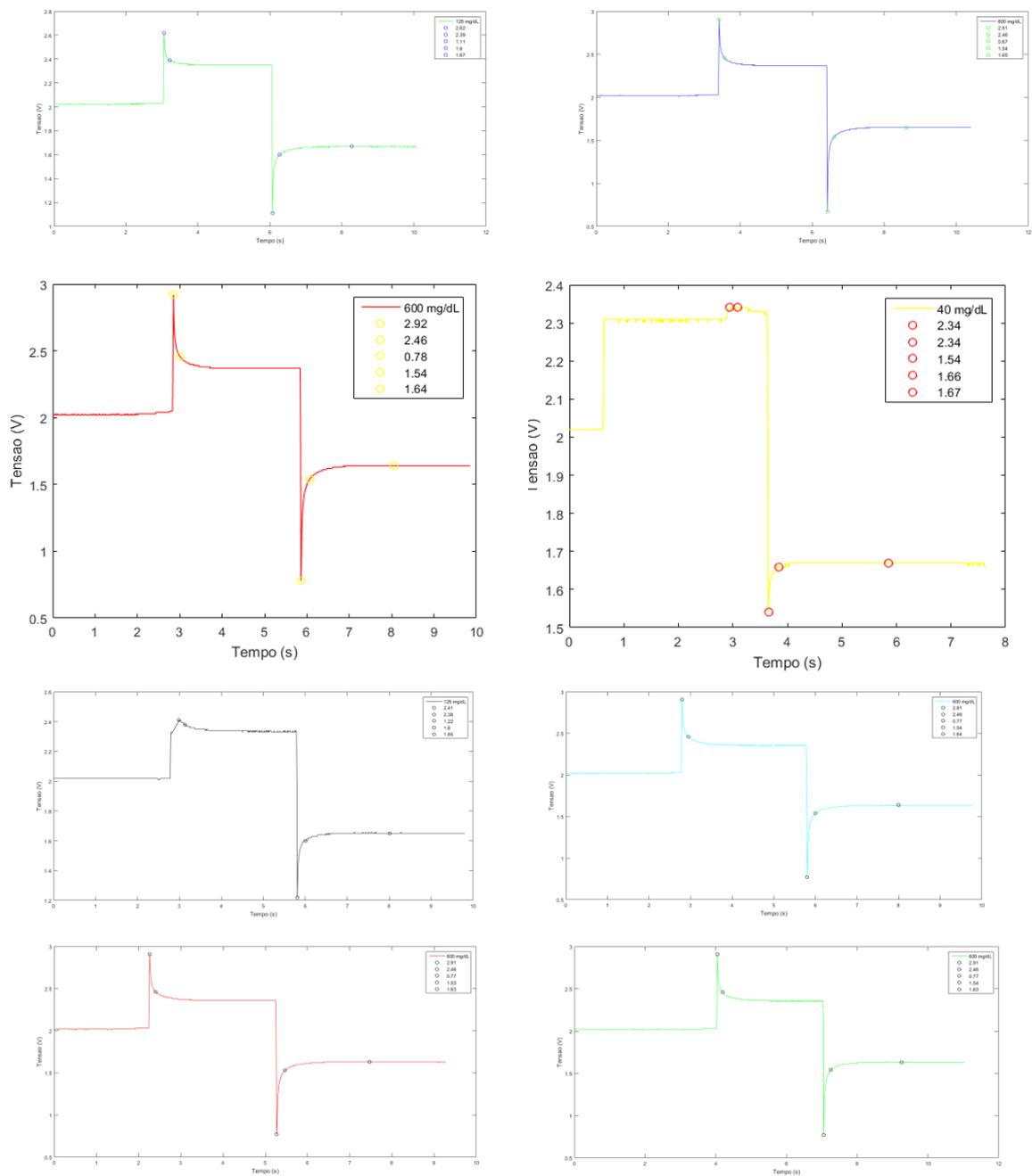


Figura 40 - Gráficos dos sinais previamente adquiridos com marcação de alguns pontos de interesse.

Era esperado pelo estudo realizado no estado da arte que nesta medição cronoamperimétrica os pontos homólogos da curva ascendente posterior ao mínimo apresentassem melhores resultados e isso foi comprovado nas regressões lineares efetuadas com os pontos recolhidos.

## 2.4 Placas de Circuito Impresso para o Protótipo Final

Após os testes realizado com a placa para Arduino foi desenvolvida uma nova solução, onde se pretendia integrar algumas funcionalidades adicionais. Foi desenvolvido um protótipo composto por duas PCB's, uma PCB para o condicionamento de sinal, com o seu circuito representado na figura 44, na secção 1.7 e uma placa de controlo, uma placa mãe, que reúne os componentes essenciais para um produto capaz de "ler" diferentes placas de condicionamento, específicas para cada tira.

As PCB's são o suporte físico das ligações elétricas presentes à nossa volta nos dispositivos eletrónicos. As PCB's desenvolvidas neste projeto foram concebidas no software Altium Designer, uma ferramenta CAD com diversas funcionalidades, bastante poderosa. Esta ferramenta permite com elevado grau de precisão desenhar placas de circuito impresso numa matriz de dimensões escolhidas pelo utilizador e permite definir muitas regras de acordo com as especificações pretendidas no desenho. Essas regras são por exemplo restrições de tamanhos de vias, pistas, espaçamento dos cortes, etc.

No desenho das placas posicionam-se os componentes no local mais adequado para permitir fazer pistas (ligações entre as *pads* dos componentes) mais curtas e simples. Define-se a fronteira da placa, que neste caso foi dimensionada para maximizar o uso do espaço oferecido pela caixa que envolve a placa, para ter mais estabilidade e permitir soldas mais simples por haver mais espaço entre os componentes.

Fez-se também a marcação no desenho dos furos e os limites do plano de massa, um plano de cobre que rodeia as ligações para minimizar o ruído, à excepção da zona inferior à antena do módulo *Bluetooth*.

A placa de controlo desenhada pode ser vista na figura 42 e a de condicionamento na figura 41 e os seus layouts foram organizados de forma a maximizar o espaço ente os componentes, para permitir a solda manual, e facilitando o desenho das pistas. Estes componentes podem vir a ser minimizados no futuro, uma vez que na sua maioria os fabricantes disponibilizam outras caixas mais pequenas e as soldas podem ser realizadas num processo automatizado numa máquina de solda seletiva.

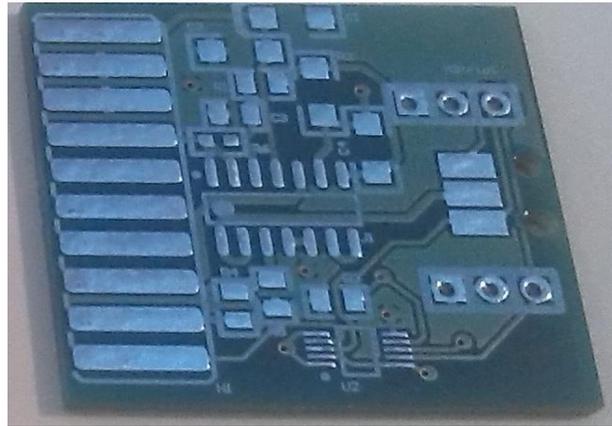


Figura 41 - Layout da PCB removível para condicionamento de sinal.

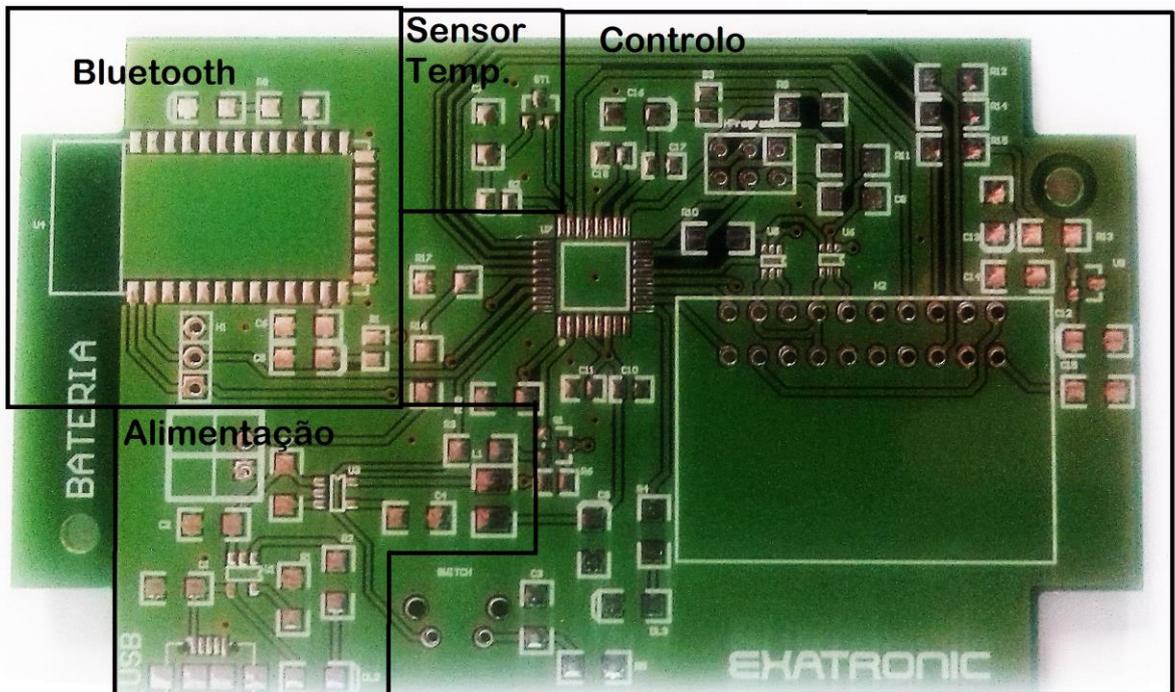


Figura 42 - Organização da PCB de controlo

Ambas as PCB do sistema final, representadas nas figuras 41 e 42 foram realizadas em FR-4, de 1.6mm de espessura, revestidos em cada face por cobre de 35 $\mu$ m, por um fornecedor da Exatronic para o qual se enviou ficheiros extraídos do Altium designer.

Uma consideração importante que foi tida em conta, foi o facto de colocar todas as interfaces encostadas à linha preta inferior, visível na imagem 42, abaixo de Exatronic (a branco). Os elementos escolhidos foram componentes pousados a 90° da placa e voltados para fora. Isto porque é nessa zona que a caixa escolhida tem um frontal para maquinar e furar. Permitindo assim ter todas as interações possíveis entre o dispositivo

e utilizador na mesma face, facilitando o seu uso. Os componentes referidos são a ficha *micro-usb* para carregamento da bateria, um *push-button*, e a ficha de para o encaixe da placa de condicionamento.

Os desenhos técnicos desenvolvidos no Altium, juntamente com os esquemas elétricos associados destas duas placas e imagens do sistema montado encontram-se nos anexos B, C e D.

## 2.5 Alimentação

Um dos requisitos do dispositivo que ficou definido foi a operação por bateria para possibilitar portabilidade. Escolheu-se uma bateria de iões de lítio recarregável da EWT Batteries. A LP603048 é uma bateria de 3.7V e 800mAh. Possui um corte de segurança via PCM a 2.8V integrado para estender a sua vida útil

A gestão da alimentação de sistema é garantida por um conversor tipo LDO, um TC1014, que mantém a tensão de alimentação de todo o sistema a 3.3V. Para a carga da bateria foi escolhido um chip de gestão de carga, o MCP73831, que permite recarregar a bateria a uma tensão de 4.2V à taxa de cerca de 500mAh, conseguido através de um conector *microUSB*. No circuito de carga incluiu-se um LED THT verde ligado ao pino STAT, cumprindo o requisito de acender um LED Verde enquanto a bateria está a carregar.

À partida a inclusão de um MOSFET, representado por Q1 na figura abaixo, não parece necessária, mas à medida que o sistema foi sendo arquitectado surgiu a ideia de incorporar um interruptor digital para permitir poupança energética uma vez que o sistema tem um consumo basal.

Todas as ligações que não poderiam ser desligadas da alimentação estavam conectadas diretamente à pista da bateria ( $V_{bat}$ ) ou da tensão de 3,3V à saída do regulador, representado por 3V3. Os componentes que poderiam ser desligados no modo *sleep*, como por exemplo o módulo *Bluetooth*, ficaram ligados à pista VCC que poderia ser 'cortada' pelo MOSFET consoante o valor lógico imposto pelo microcontrolador em ALIM\_PER.

Os MOSFET's são um tipo de transistor usados essencialmente para amplificar ou comutar sinais nas tecnologias CMOS. Têm a vantagem de possibilitar um longo período de vida útil e apresentam muito baixa resistência interna na aplicação de 'switch'.

Os esquemas do circuito elétrico descrito para a alimentação do sistema estão representados na figura 43.

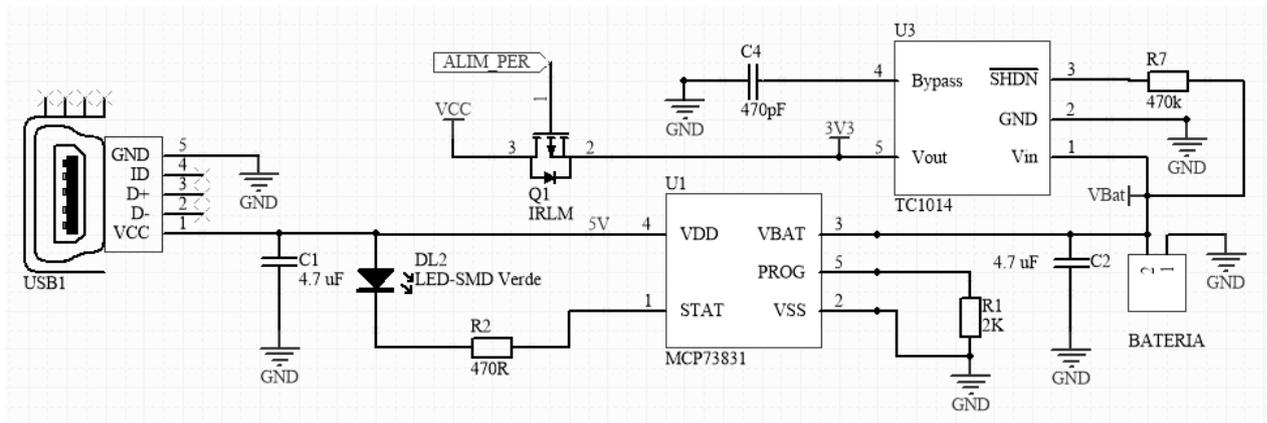


Figura 43 - Esquema de ligações do circuito de alimentação.

## 2.6 Controlo

Na secção do controlo da placa incluiu-se todo o *hardware* para o processamento dos eventos que são monitorizados pelo dispositivo. Aqui a escolha do microcontrolador foi um passo bastante importante. A pesquisa foi realizada no sítio web da Atmel, a marca mais usada na Exatronic.

No *site* da Atmel foram inseridos os seguintes critérios de pesquisa: número mínimo de pinos digitais necessários, possibilidade de protocolos UART e SPI, mínimo de 6 ADC's com pelo menos 10 bits de resolução e permitir trabalho a 3,3V.

Surgiu o ATmega48 como uma opção válida e acabou por ser escolhido em detrimento das outras possibilidades.

Os principais motivos prenderam-se com o facto da Exatronic apresentar grande experiência na programação de MCU's da família ATmega, a existência de ferramentas com bastante maturidade disponíveis gratuitamente, a obtenção de bons desempenhos noutros produtos da Exatronic e o menor número de pinos em relação aos outros permitia solda manual mais simples e mais rápida. No decorrer do projeto foi necessário substituir o ATmega48 por um ATmega88, por ter mais memória programável. Tal como o 168, o 88 é da mesma família do 48, tem o mesmo *pinout*, apenas diferindo na capacidade de

memória. O 88 que foi usado no dispositivo final tem 8k bytes de memória flash programável, 512 Bytes de EEPROM e 1kByte de memória RAM interna [87].

Nesta secção de controlo foram inseridos 6 pinos num *header* duplo para a comunicação ISP seguindo as recomendações da Atmel [88] representada no anexo B.

Foram inseridas *pull ups*, divisores de tensão e um LED Vermelho para deteções cujas funções serão explicadas na secção de Firmware.

Por fim, no *push button*, o botão de ligar o sistema foi inserido um circuito de *debounce* em série para estabilizar a tensão na entrada do pino de deteção do microcontrolador quando o botão é premido.

## 2.7 Condicionamento Sinal amperimétrico

A pesquisa dos DAC's mais adequados foi realizada nos sites da Texas Instruments e da Analog Devices. Os critérios de pesquisa incidiram nos seguintes parâmetros: resolução entre 8 e 10 bits, 1 canal de saída, exclusão da comunicação em paralelo para reduzir o número de pinos de comunicação necessários, máxima não linearidade de +/- um bit menos significativo, output em *buffer* de tensão e suportar alimentação a 3,3V.

Depois dessa pré-seleção sobraram os componentes da tabela 11. Os datasheets foram analisados e na escolha pesou a combinação das características mais ajustadas para aplicação final dentro dos parâmetros demonstrados.

Teve muito o peso o facto do componente escolhido ter um pino de referência de entrada/referência que aceita os 2.5V, que saem estáveis do TL431 e são de extrema importância na manutenção da saída constante. Selecionou-se o DAC5311 pelo output em tensão, pelo facto de incluir o protocolo SPI e porque tinha o package mais simples de soldar, uma vez que nos DAC SMT é bastante difícil encontrar packages com pitch (distância entre *pads*) superior a 0.2mm. Tanto o DAC5311 como o TL431, estão incluídos na placa de controlo do protótipo final.

Tabela 11 - Comparação de diversos DAC analisados.

	DAC5311	AD5602/AD5612	DAC5571	DAC6311	DAC081C081	AD5301
Fabricante	Texas Instruments	Analog Devices	Texas Instruments	Texas Instruments	Texas Instruments	Analog Devices
Alimentação	2.0 - 5.5 V	2.7 V - 5.5 V	2.7 - 5.5 V	2.0 - 5.5 V	2.7 - 5.5 V	2.5 V - 5.5 V
Consumo	0.55 mW	500 $\mu$ W	0.7 mW	160 $\mu$ W	380 $\mu$ W	700 $\mu$ W
Interface	Serial SPI	I2C	Serial I2C	Serial SPI	Serial I2C	I2C
Resolução (bits)	8	8/10	8	10	8	8
Preço (USD)	0.55	0.92/1.14	0.90	0.68	0.55	1.66
Numero de pinos	6	6	6	6	6	8
Package	SC70	SC70	SOT-23	SC70	SOT/WSON	MSOP/SOT-23
Não-linearidade máxima +/- LSB	0,25	1	1	0,5	0,6	1

Voltou-se a usar o LMC6484, mas desta vez num package SMT, na placa de condicionamento, esta opção revelou-se acertada porque este componente disponibiliza quatro amplificadores, permitindo ser usado para diferentes aplicações, isto é, amplificação, *buffering* e eventualmente noutras tiras, para além destas aplicações incluir um filtro de segunda ordem.

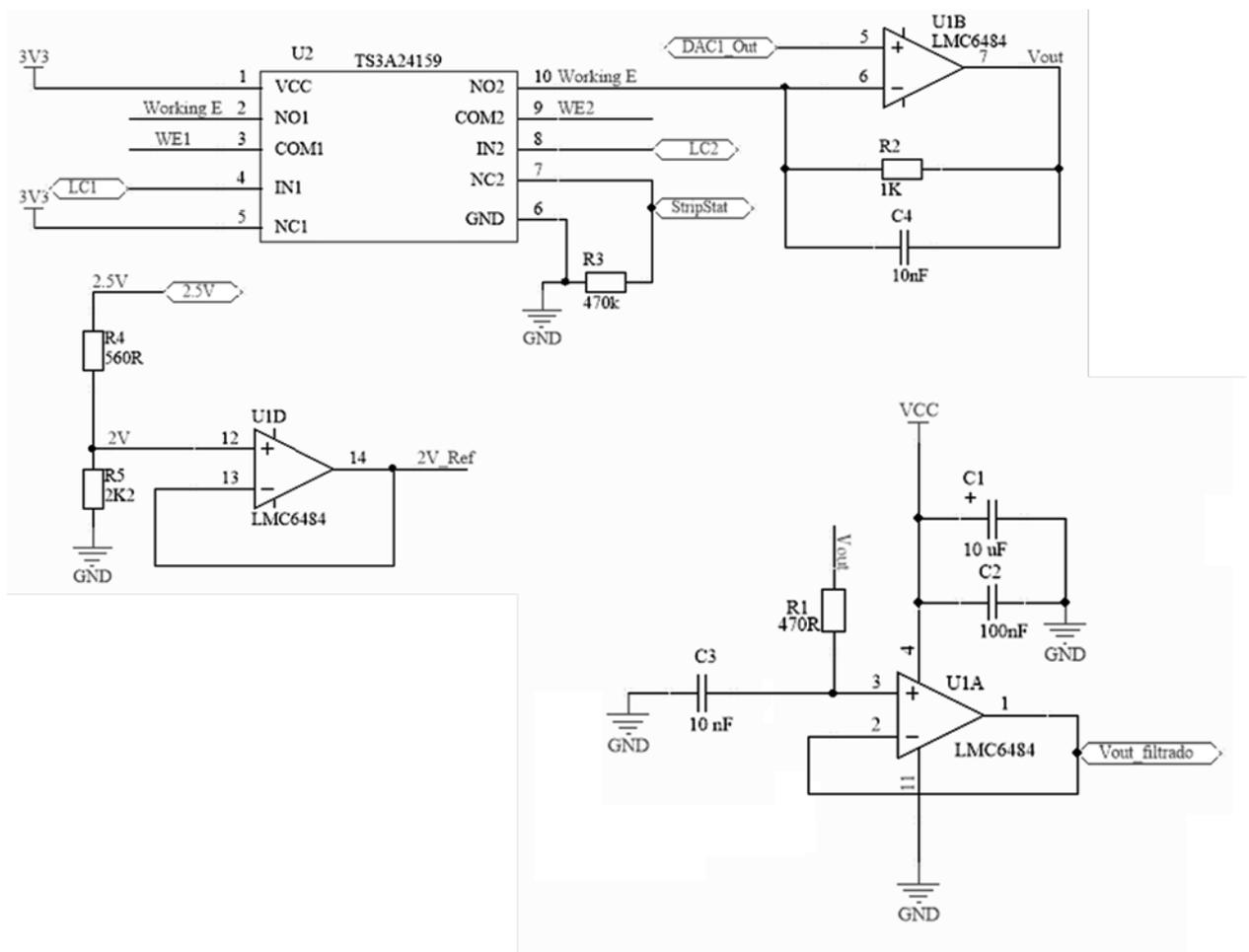


Figura 44 - Esquema elétrico das ligações na placa de condicionamento.

Incluiu-se um *dual switch*, o TS3A24159, para fazer uso da característica das tiras selecionadas possuírem um elétrodo comum ligado a dois elérodos na ficha de contacto. Assim permite com um circuito de *pull-up* associado a um pino assíncrono do microcontrolador ‘acordar’ o MCU de *sleep mode*.

Os esquemas das ligações presentes na placa de condicionamento estão representados na figura 44, onde WE1 e WE2 representam as duas ligações ao elétrodo de trabalho da tira no conector e 2V\_Ref a ligação ao elétrodo de referência da tira. Vout\_filtrado é a entrada de um ADC do microcontrolador, LC1 e LC2 representam dois pinos digitais do microcontrolador que alteram as ligações internas do *dual switch* e StripStat a entrada de um pino assíncrono.

## 2.8 Sensor de Temperatura

O sensor de temperatura escolhido apresenta o melhor compromisso entre consumo, preço e performance. A precisão da medição não necessita de ser muito elevada, uma vez que, mesmo medindo a temperatura nas proximidades da tira, esta temperatura pode ser diferente da temperatura na câmara de reação, da gota de sangue, portanto uma precisão de +/- 2°C parece ser suficiente, até porque nesta fase não é possível fazer a regulação/ajuste da medição à temperatura e será apenas um valor indicativo para depois ser possível fazer estudos mais aprofundados a partir deste dispositivo.

O sensor escolhido foi o MCP9700A, um termístor PTC da Microchip, que na gama de -40 a 125 °C apresenta uma precisão de +/-1°C, custa 0,25€, vem num package SOT-23 que permite solda manual com facilidade e devolve a saída em tensão: 10mV/°C. Tem um consumo típico de 6µA.

Este sensor apresenta também uma característica bastante interessante. Permite ser alimentado por um pino digital do microcontrolador, desde que sejam filtradas as flutuações desse pino, caso contrário refletir-se-iam no resultado final.

## 2.9 Módulo Bluetooth

Um dos principais requisitos do dispositivo é a comunicação sem fios. Para este tipo de dispositivos a banda de frequências usada para transmissão de dados é a banda

ISM (industrial, scientific, and medical radio band), à qual não é necessária atribuição de licença, definida como uso livre pela ITU, uma divisão da Organização das Nações Unidas.

Dentro desta banda existem diversos protocolos de comunicação sendo mais ou menos convenientes para uma determinada aplicação. Nesse sentido foi realizada uma análise a protocolos mais comuns para fazer a escolha mais adequada para este projeto; são eles o Bluetooth, Zigbee e Wi-fi.

A grande vantagem do Bluetooth e Wi-fi em relação ao Zigbee é a existência em quase todos os telemóveis e computadores e ser uma tecnologia com alguma maturidade e em evolução, atualmente existem as versões 4.0 ou Bluetooth Low Energy com consumos muito baixos, ideais para dispositivos em que o consumo tem de ser bem gerido. Já foi anunciada uma versão 5.0 que vai permitir o dobro da cobertura e velocidades de transmissão quatro vezes superiores [89].

Escolheu-se utilizar um módulo BLE principalmente por incluir um modo de *sleep* com consumos muito baixo, mas ainda assim consegue ser detetado.

Dentro dos BLE escolheu-se o HM10 por ser o mais barato e possuir certificação da componente de rádio, uma característica importante na perspectiva de certificar este dispositivo ou uma futura evolução.

Tabela 12 - Comparação entre os módulos Bluetooth estudados.

	PAN1721	PAN1760	HM10	BLE113	BL600	BT800	RN4020	ENW-89846A1KF
Preço (USD)	17	14	4,95	20	13,3	10,6	8,84	15
Sleep Mode (uA)	0,5	1	60	0,4	3.5	200	5	1,4
Tensão de Operação (V)	2 - 3.6	1.8 - 3.6	3.3	2 - 3.6	1.8 - 3.6	1.7 - 3.6	1.8 - 3.6	2.35 - 3.3
Tipo	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.1	4.1
Transmissão dados (kbps)	1000	40	16	2000	1000	3000	1000	-
RoHS	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim
Modo Transmissão/Receção (mA)	14/14,7	5.4/5.4	8.5/8.5	18.3/14.3	10.5/10.5	80/80	16/16	4.9/4.9
Interfaces	UART SPI USB I2C	SPI, UART	UART	ISP, PWM, SPI, UART	PC, SPI, UART	USB	SPI, UART	-
Antena	sim	não	sim	sim	sim	sim	sim	-

O HM10 apresenta outros fatores interessantes como a comunicação ser realizada pelo protocolo UART que foi também implementado para comunicar com desktop, já vem com *stacks* da Bluetooth integradas, tornando-o facilmente configurável, seguindo o *datasheet* com listagem de comandos AT.

## 3. Firmware:

Nesta parte do capítulo é descrito o processo de desenvolvimento de *firmware* usado, a estrutura do ATmega88, as funções dos seus pinos e uma breve descrição do que foi implementado.

O *firmware* de um dispositivo consiste num tipo específico de *software* ou num conjunto de instruções programadas no *hardware* e permitem o funcionamento esperado do sistema. O *firmware* de um dispositivo é tipicamente armazenado na unidade de *flash* ROM do dispositivo, neste caso integrada no MCU.

É no *firmware* que é realizada a comunicação entre a parte digital do sistema os componentes de *hardware*.

Para o desenvolvimento do *firmware* foram realizados alguns tutoriais, aprendizagem da linguagem C e alguns projetos simples numa placa de desenvolvimento.

### 3.1 ATmega 88

O *datasheet* do Atmega 88 foi extensivamente analisado de modo a perceber que tipo de pinos disponibilizados e as suas funções. Adquiriu-se essa informação aquando do desenvolvimento do *hardware*, escolhendo-se os pinos mediante função e disposição na placa, de modo a facilitar o seu desenho.

O Atmega 88 pertence à série dos Atmegas (megaAVR 8 bits). É um microcontrolador CMOS, baseado na arquitetura Harvard que reúne um grande número de instruções e 32 registos, ligados à Unidade Lógica Aritmética, permitindo consultar dois registos independentes numa instrução em apenas um ciclo do oscilador interno [87].

As principais características deste microcontrolador são:

- Memória flash de 8 KBytes
- EEPROM de 512 KBytes
- SRAM interna de 1KByte
- 2 timers de 8bits
- 1 timer de 16 bits

- 8 canais ADC de 10 bits multiplexados
- Oscilador interno calibrado com frequência máxima de 8MHz
- Uma interface USART
- Uma interface SPI

A disposição dos pinos no package usado está representada na figura abaixo.

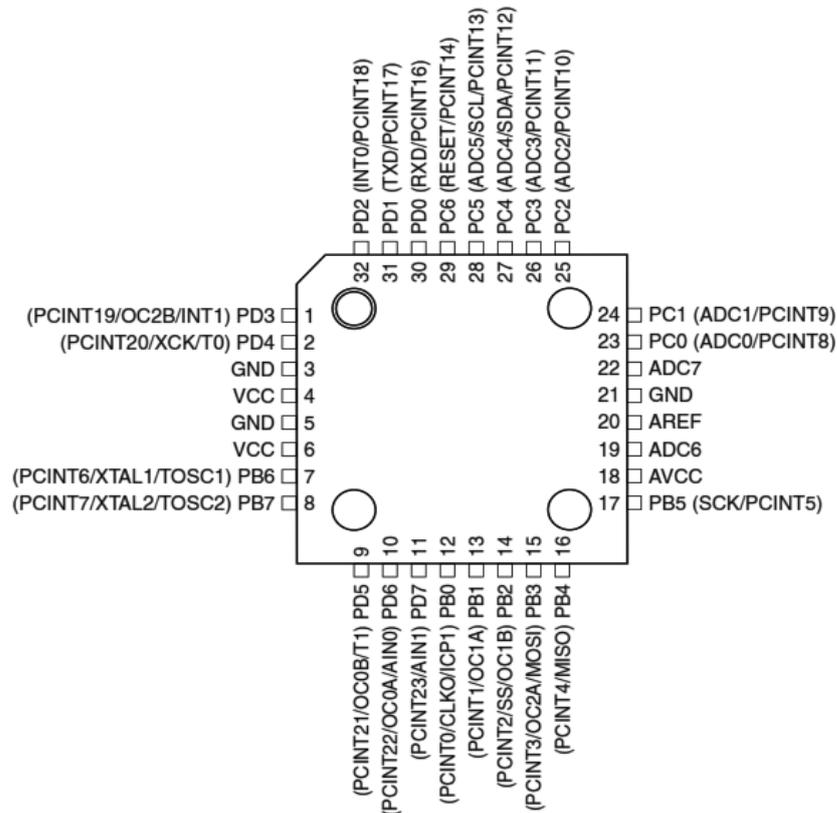


Figura 45 - Pinout do Atmega 48/88/168 visto de cima na caixa usada neste projeto (TQFP). Imagem adaptada de: [87]

Foram usadas as seguintes portas:

- **PORTB:** ligações SPI
- **PORTC:** Pinos de 1 a 6 de identificação e ligações a ADC's e o pino 7 de Reset ligado à ficha ISP
- **PORTD:** Ligações UART; pinos 2 e 3 permitem interrupções externas e estão ligadas ao push button e ao dual switch para ligação com entrada da tira e restantes ligações digitais.

### 3.2 Estrutura do código

Antes do início do desenvolvimento do código foi realizado um diagrama de blocos, representado na figura abaixo para facilitar o desenvolvimento do *firmware*, garantido que o código pudesse ser facilmente organizado e que cumpra, pelo menos, os requisitos mínimos estabelecidos.

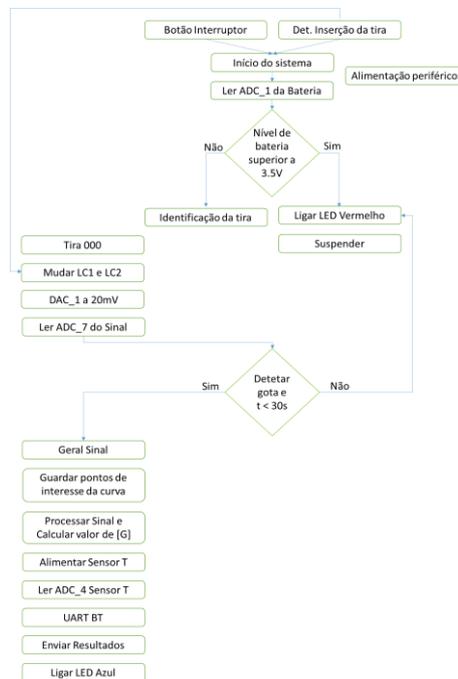


Figura 46 – Flowchart inicial do firmware.

O código foi estruturado de forma a separar em diferentes ficheiros as suas funcionalidades principais. Inicialmente foi usada a biblioteca pública de código ASF, mas surgiram problemas de memória. Por não haver qualquer prática no desenvolvimento de *firmware*, sendo este o primeiro projeto de *firmware*, foi cometido o erro de achar que a memória flash do ATmega 48 era suficiente para o código necessário, o que provocou sérias dificuldades no desenvolvimento. Daí que se tenha separado o código e eliminado a inclusão de bibliotecas, por ocuparem demasiada memória.

Cada secção foi feita de forma ‘isolada’ comentando o código que não cabia na memória para poder testar o *firmware* à medida que era desenvolvido.

Os problemas de memória foram descobertos após comportamentos irregulares, diferentes do que era instruído, após o carregamento dos ficheiros ‘.hex’. Após alguma pesquisa foi percebido que estes comportamentos aconteciam por sobreposições na memória. Isto porque as *stacks* dos ponteiros das funções nos ATmegas são gravadas na mesma memória que o restante código, sendo que as *stacks* são escritas da parte de

baixo da memória para cima e as variáveis usadas nos cálculos de cima para baixo. Ora, como não era sabido o espaço ocupado pelas stacks, à volta de 80% de ocupação de memória começavam a surgir sobreposições.

Assim que foi possível substituiu-se o Atmega 48 pelo 88 e o problema foi resolvido para este protótipo, mas ainda assim a memória disponível é insuficiente para o que se pretende que venha a ser o produto.

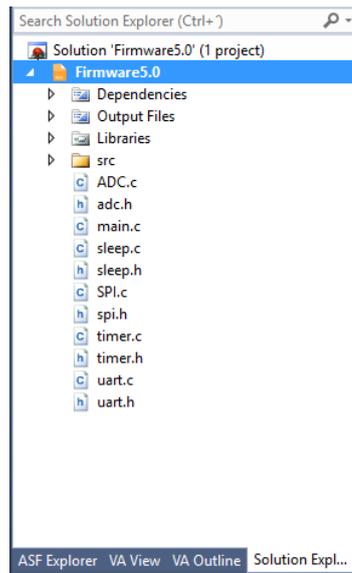


Figura 47 - Organização do código da última versão de firmware

O código foi organizado nas várias componentes como se pode verificar na figura acima e foram criadas funções personalizadas para permitir simples adição sobre o código construído para outras tiras, a partir das funções existentes, havendo apenas necessidade de alterações relativas a características diferentes das tiras.

Esta adição tornar-se-á simples mesmo para alguém que não conheça o projeto porque se encontra todo comentado e explicado nos comentários.

A gestão do código principal tira partido dos timers, das interrupções externas para fazer a saída do aparelho do modo *sleep* e interrupções de alteração do estado do pino *pin change*, e está separado por *flags* que separam a execução de cada instrução de forma dependente.

O código foi também blindado para prevenir *overflows* e *underflows*, isto é, por exemplo em contadores não ultrapassar o limite máximo ou mínimo que lhe foi atribuído.

### 3.3 SPI e UART

O Protocolo SPI é uma metodologia de transferência de dados síncrona muito usada na comunicação entre componentes eletrônicos. Esta comunicação recorre a pelo menos 3 ligações, Slave Select (SS) Master Out Slave In (MOSI) e Serial Clock (SCLK) podendo também existir uma ligação Master In Slave Out (MISO).

Tem uma estrutura de Master/Slave, permitindo ligação de múltiplos servos e várias velocidades de Clock [90].

Neste projeto foi usada para comunicar com os DAC5311 como Slaves, sendo o microcontrolador o Master. O SS é único em cada Slave e os outros pinos podem ser comuns aos vários Slaves, levando a que em caso de partilha desses pinos apenas se possa comunicar com um Slave de cada vez.

O pino SS serve para seleccionar o Slave com o qual se comunica. A seleção é feita baixando o nível lógico desse pino para 0.

Na imagem abaixo podemos ver o esquema de funcionamento.

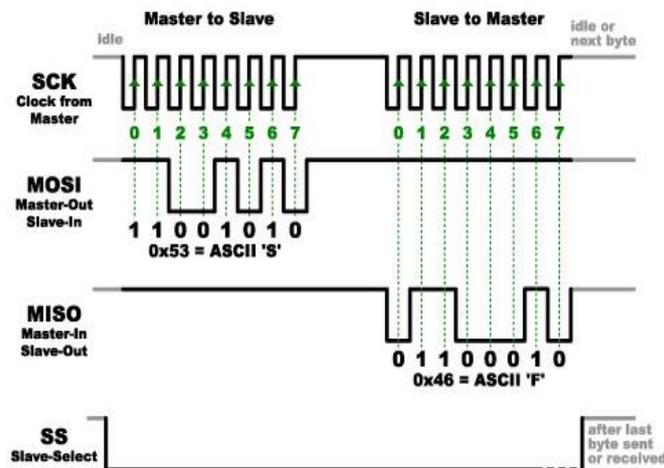


Figura 48 - Esquema de Funcionamento do Protocolo SPI.

Após o nível lógico do pino SS ser passado a 0 é iniciada a comunicação. É transmitido um bit a cada ciclo do relógio. Tem de se ter em conta qual o bit mais significativo e a sua ordem de transmissão.

Para os DAC5311 o formato da trama é de 16 bits, os 3 primeiros de configuração, os 8 seguintes configuram o output e os seguintes são ignorados, mas, no entanto, têm de

ser enviados, ou seja, tem de pelo menos haver mais 5 ciclos de clock antes de se passar o nível logico do SS para 1.

Um exemplo de um teste de SPI realizado com a placa de controlo e um osciloscópio no modo *trigger* está representado na fotografia presente na figura abaixo.

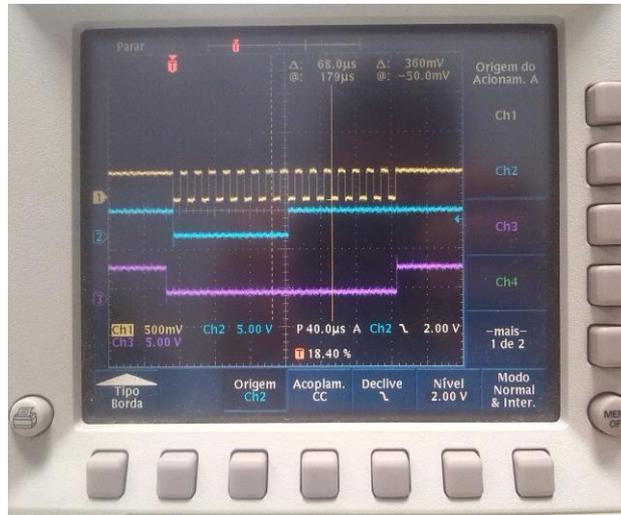


Figura 49 - Sinal de teste enviado por SPI com o sinal de clock no canal 1 a amarelo, sinal do pino de Slave Select no canal 3 usado como trigger e no canal 2 a trama de dados enviados (8bits a 0 e 8 bits a 1 perfazendo os 16 bits necessários em cada comunicação)

O protocolo UART foi implementado para fazer a comunicação entre o microcontrolador e um computador através da conversão para protocolo usb com um chip da FTDI o FT232R, disponibilizado pelo Marco Camisão numa pequena placa com uma ficha para ligar aos pinos que foram deixados nas pistas USART de ligação ao BLE e uma ficha usb para ligar ao computador.

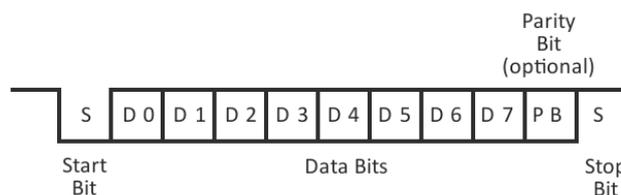


Figura 50 - Esquema de funcionamento do protocolo USART

É um protocolo bastante simples, unidirecional enviando dados num sentido e recebem-se os dados noutra pista independente no sentido oposto.

É necessário configurar o bit de início, o bit de finalização, o *baud rate* caso se trabalhe na forma assíncrona, que foi o caso. Sendo o *baud rate* a taxa de transmissão de dados.

Após a configuração do módulo *bluetooth* escolheu-se o registo do serviço e da característica que se pretende usar de acordo com o protocolo escolhido, o protocolo de transmissão de caracteres. Os dados são convertidos para o formato de carácter pelo microcontrolador e enviados byte a byte.

### 3.4 Temporizadores e ADC's

Os temporizadores consistem num tipo de controlador que permite a contagem de tempo a partir de contagens de ciclo do relógio interno, no caso do ATmega 88 um oscilador, que no dispositivo desenvolvido estava configurado para uma frequência de 8MHz.

A sua resolução máxima é dada pelo inverso da frequência usada, mas como se trabalhou com um sinal, que apesar da sua medição ser dependente do tempo, são tempos entre relativamente altos quando comparados com 8MHz. Foram, portanto, usados *prescalers* e contadores de 'tics' gerados pelos timers na geração de interrupções.

Estes timers permitiram, entre outros, sincronizar a aplicação do sinal de degrau do DAC para as tiras usadas neste trabalho, garantir verificar se há respostas no protocolo USART 50ms após o envio da mensagem, na configuração do *push button* e na definição da frequência de amostragem dos sinais.

Os ADC's deste sistema são de 10 bits e permitem medir a tensão da bateria, para poder avisar o utilizador quando a tensão da bateria atinge 3.5V. Esta medição não é realizada diretamente uma vez que para a referência do ADC se usa uma tensão inferior 3,3V, derivada da própria bateria. Construiu-se então um divisor de tensão para este efeito.

A amostragem do sinal da glicose é realizada a cada 5ms e são descartados os primeiros 50 valores após a seleção do ADC.

São amostrados 50 pontos do ADC associado à bateria, a 200Hz, e desses pontos são descartados os primeiros e os últimos 15, calculando-se a média resultante com os restantes pontos. A medição da temperatura é feita de forma idêntica e apenas é seguida do cálculo do valor de temperatura segundo a função de transferência presente no *datasheet*.

### 3.5 Funcionalidades

Todas as configurações do *firmware*, juntamente com a sua organização permitem, no seu funcionamento normal a geração de dois valores, a concentração de glicose e o valor da temperatura ambiente.

Após essa geração é verificado por *firmware* se o dispositivo está emparelhado; caso esteja emparelhado envia os dados, caso contrário volta a verificar o emparelhamento ao fim de 5 segundos e repete este processo 4 vezes. Se não se emparelhar, o aparelho inicia o procedimento de *sleep* desligando os periféricos e entrando no *sleep mode*. Se não receber uma amostra de sangue ao fim de 30 segundos do início do registo também entra no modo *sleep*.

O *push button* oferece três funcionalidades principais. Ligar o sistema se este estiver no modo *sleep*, desligar o sistema se for premido por mais de 5 segundos e reiniciar o sistema (não no sentido de fazer um reset no microcontrolador) mas na mudança de *flags* para voltar ao momento inicial de espera de amostra.

Os pontos do sinal de glicose adquiridos são enviados na saída da USART e foi assim que foram guardados nos testes do protótipo, com recurso à solução de conversão de comunicação série para protocolo usb usando o software gratuito Terminate para apresentar os pontos. Esses pontos foram armazenados em ficheiros '.txt' para posteriormente serem processados em Matlab e as aquisições consideradas aceitáveis estão apresentadas no capítulo VII.

O envio de pontos por USART manteve-se assim implementado, estes dados são enviados pelo módulo BLE, mas como não têm os caracteres marcadores, são descartados pela aplicação Android descrita na secção seguinte.

## 4. Software:

O código desenvolvido em Android Studio para smartphones Android tinha duas funções principais, ser simples para qualquer utilizador e fazer o emparelhamento de forma automática. Ambos os objetivos foram conseguidos.

A aplicação tem apenas um botão de atualização (GET VALUES), que muda as frases que aparecem no ecrã inicial, para os valores que se encontram no registo de receção caso tenha havido uma medição. A informação guardada num atributo tem de possuir um conjunto de caracteres específico para ser considerada uma mensagem válida e só depois é processada e apresentada.

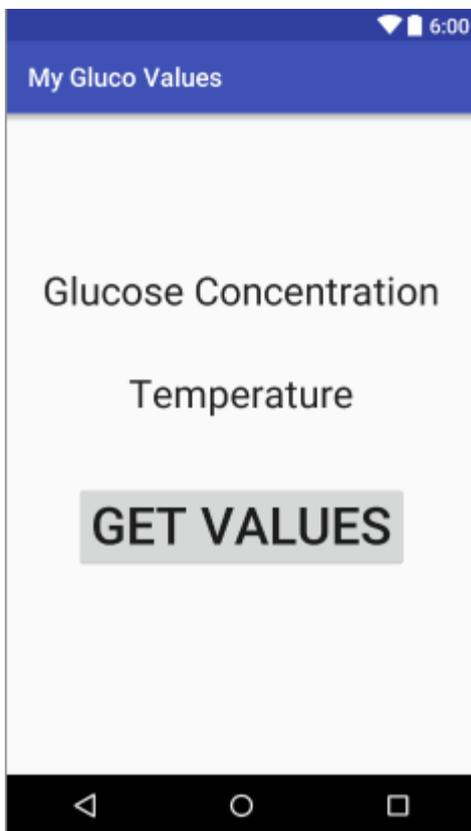


Figura 51 - Layout de abertura da aplicação Android.



Figura 52 - Testes Preliminares da aplicação Android desenvolvida

Para o emparelhamento foi criada uma função *connect* BLE, que implementa uma rotina Try/Connect, associada a um *timer*. Portanto se a aplicação estiver a correr esta vai estar sempre a tentar ligar-se ao aparelho, ao fim de um tempo de espera. Para a

ligação desta aplicação ocorrer apenas em dispositivos iguais ao desenvolvido, usam-se critérios de seleção no scan dos Bluetooth presentes.

A pesquisa incide num conjunto de 3 condições: o endereço específico do módulo Bluetooth usado, o seu UUID, o nome desse módulo e uma *password* de 5 dígitos (números). Segundo esta arquitetura, estas características têm de ser definidas pelo fabricante do dispositivo desenvolvido.

Para o desenvolvimento desta aplicação foi usado um guia para a API 18, presente nas versões de android 4.3. Foram analisadas as classes disponíveis, adaptaram-se para a rotina de ligação automática [91]. Esta rotina garante também que a ligação é mantida, sendo interrompida com a saída da aplicação e/ou por *firmware* do microcontrolador antes de entrar no modo *sleep*, cortando a alimentação do módulo com o MOSFET.



## VI. Testes ao Sistema

---

Neste capítulo são apresentados os testes que foram realizados no fim do desenvolvimento estar concluído. Alguns testes foram sendo feitos à medida que se desenvolveram as diversas etapas.

Após o desenvolvimento do *firmware* e do *software*, passou-se aos testes realizados ao sistema.

### 1 Consumos

Para os testes de consumos, foi ligado um amperímetro de bancada em série com a massa. O valor máximo medido foi de 42,573mA e correspondeu ao momento em que o sistema estava com o *Bluetooth* emparelhado a enviar os pontos da curva cronoamperimétrica, tendo todos os *timers* em funcionamento e o LED Azul associado a um pino do módulo BLE ligado.

Ora assumindo que uma medição normal dura, em média, 30 segundos, uma presunção conservadora, uma vez que todos os ciclos de medição realizados demoravam no máximo metade e que o doente realiza 3 medições diárias. Sabendo que a bateria escolhida tem uma capacidade de 800mAh chega-se à seguinte equação:

$$\frac{800\text{mAh}}{\left(\frac{30\text{s}}{3600}\right) \times 3 \times 42,573\text{mA}} = 751,7 \text{ horas}$$

Com a bateria selecionada, este sistema permite um mês de operação (cerca de 31 dias) sem recarga.

### 2 Sensor de temperatura

Foram realizados testes simples para avaliar a calibração e o funcionamento do sensor de temperatura. A temperatura ambiente no gabinete de Conceção e Desenvolvimento da Exatronic é controlada e por isso as temperaturas quase não mudaram nos vários dias em que o teste foi feito. Para esta avaliação compararam-se os valores obtidos e enviados para desktop com a versão final de *firmware* e foi construída a tabela seguinte:

Tabela 13 - Comparação entre valores medidos com o sensor incluído na placa de controlo e obtidos com uma câmara termográfica.

Valor médio do Sensor (°C)	Valores da câmara termográfica (°C)	Erro relativo (%)
26	26,4	1,5
27	26,6	1,5
26	26,3	1,1
26	26,2	0,8
26	26,4	1,5
26	26,2	0,8
26	26,0	0,0
26	26,1	0,4

Da análise da tabela é fácil verificar que os desvios existentes são mínimos, que o sensor cumpre com a especificação da precisão esperada de  $\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Os resultados do sensor não são apresentados com mais algarismos para além do menos significativo.

Esta análise é insuficiente para uma caracterização de um produto final, porque a gama de temperaturas medidas é inferior à precisão do sensor, mas dado o valor apenas indicativo desta medição no dispositivo achou-se que não seria necessário fazer mais testes.

### 3 Calibração final

Nesta secção apenas serão apresentados todos resultados que foram obtidos com a última versão de firmware. Apenas foram usados para a calibração os resultados considerados aceitáveis, uma vez que em muitos casos verificaram-se a formação de bolhas de ar na saída das pipetas, quando já tinha entrado parte da amostra, mas ainda faltava uma parte.

Para obter uma boa calibração são necessários pelo menos 500 pontos dentro das condições de trabalho do dispositivo. As limitações de máximas e mínimas são impostas pelo próprio sensor. O formato do sensor e a montagem experimental com provetas de plástico não foram os mais indicados. Surgiram muitas medições, que apesar de realizadas com sucesso ao nível da instrumentação eletrónica, não podiam ser consideradas para a calibração, porque era visível no processo usado, que a amostra não era depositada corretamente, fruto da limitação mecânica existente.

A partir dos gráficos plotados foram extraídos alguns pontos de interesse representados na tabela abaixo. As variáveis X, Y e Z representam, respectivamente: 75 milissegundos, 100 milissegundos e 150 milissegundos.

Tabela 14 - Pontos de interesse homólogos retirados das curvas cronoamperimétricas.

Concentração	Pontos					
	max	max+x	min	min+x	min+y	min+z
10	736	712	469	511	514	515
10	740	712	466	511	514	515
40	711	711	479	513	516	517
40	739	712	473	512	515	516
40	737	712	476	513	515	516
65	805	726	256	481	495	500
65	797	726	259	482	496	501
65	794	726	267	483	496	501
90*	823	732	136	469	487	494
90*	818	732	195	469	487	494
90*	827	733	191	468	486	493
90*	824	733	190	468	486	493
105*	754	716	381	500	507	510
105	860	737	255	462	480	489
105*	827	736	180	462	483	490
105*	833	736	151	461	481	490
125*	797	763	200	385	419	430
125	807	728	265	483	496	501
125	792	725	286	486	497	502
150	833	736	151	461	481	490
150*	783	721	343	493	502	506
150*	779	720	360	495	504	507
150*	778	720	274	495	504	507
200*	886	758	89	428	459	473
200	845	756	142	436	466	477
200	856	758	127	433	464	476
400*	896	771	80	423	456	471
400	902	775	91	420	454	469
400	914	776	81	416	451	467
600	912	798	87	388	435	455
600*	872	802	251	355	428	450
600*	726	726	240	464	484	491

Os pontos assinalados com um \* foram assim assinalados para não serem considerados na execução experimental por ocorrerem uma série problemas na sua aquisição.

Foram realizados gráficos com a média dos pontos para cada concentração e foi escolhida a reta de ajuste que apresentava o maior  $R^2$  (coeficiente de determinação, o quadrado do coeficiente de correlação linear) para ser inserida no firmware e ser usado para os cálculos o ponto homólogo em causa, isto é, seguinte ao máximo absoluto num intervalo de tempo definido.

Nas figuras abaixo estão representados os 4 ajustes realizados.

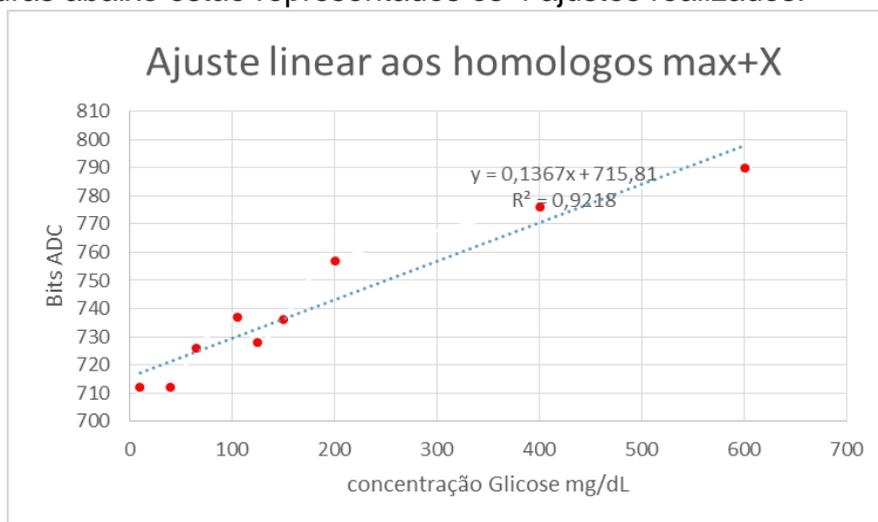


Figura 53 - Gráfico do ajuste da média de pontos para cada solução, após seleção das medições consideradas válidas

Este ajuste não era esperado ser o de um dispositivo final, ainda há muito a ter em conta e são necessários muito mais pontos para ter uma calibração sólida a uma temperatura de referência.

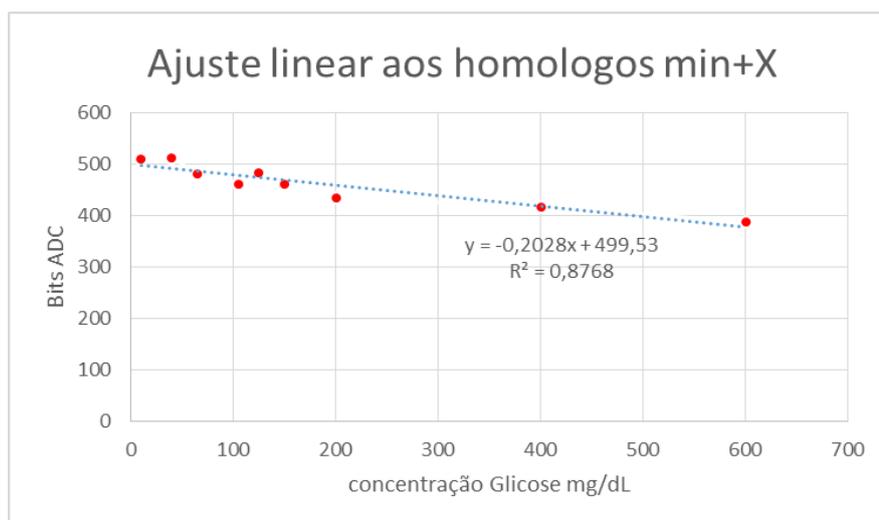


Figura 54 - Gráfico do ajuste da média de pontos para cada solução, após seleção das medições consideradas válidas.

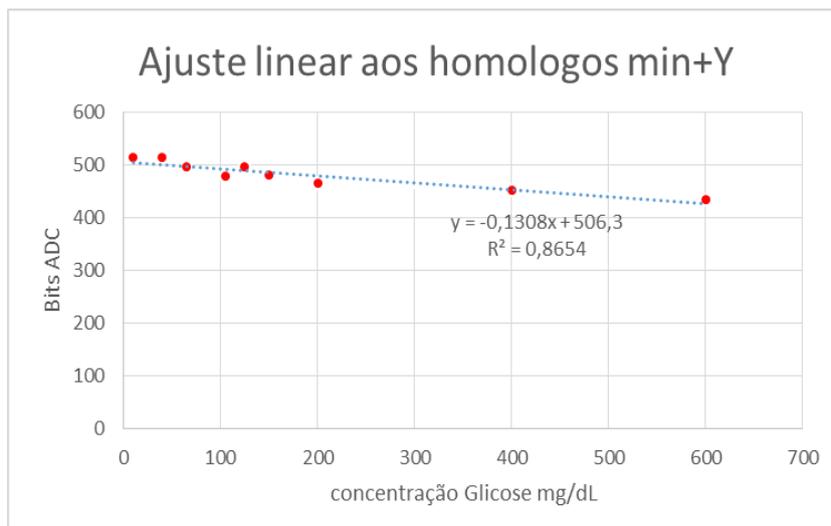


Figura 55 - Gráfico do ajuste da média de pontos para cada solução, após seleção das medições consideradas válidas.

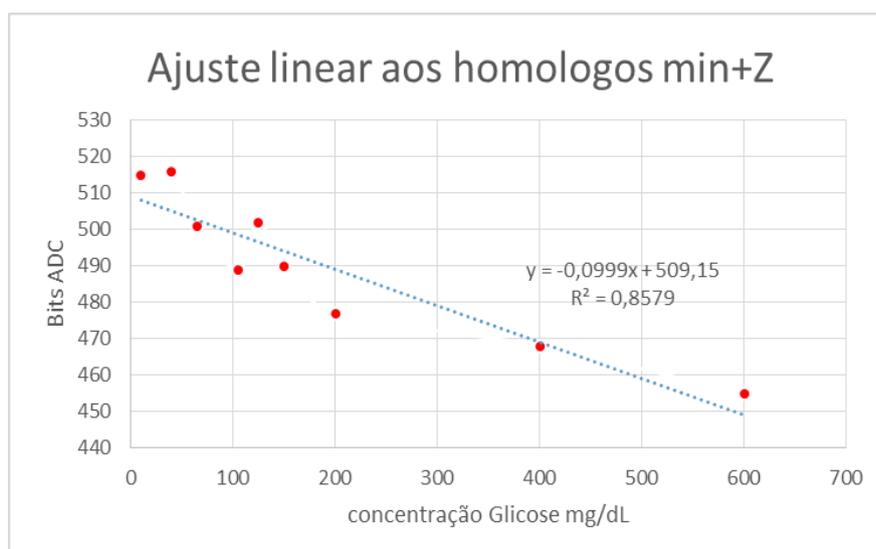


Figura 56 -Gráfico do ajuste da média de pontos homólogos para cada solução, após seleção das medições consideradas válidas.

Infelizmente não foi possível adquirir mais pontos porque as tiras para este projeto eram compradas sem participação e não havia interesse, nesta fase, em realizar uma melhor calibração, uma vez que era sabido do estudo de mercado e do estado da Arte, que os produtos concorrentes apresentam algoritmos corretores para os fatores interferentes mais conhecidos, que não podiam ser estudados devidamente com os meios disponíveis.

No entanto estabeleceu-se uma metodologia simples para testar as tiras, que pode ser realizada num projeto seguinte, de evolução deste dispositivo.



## VII. Discussão

---

### 1. Conclusão

A monitorização da glicose é sem dúvida um tema muito estudado por todo o mundo com muito interesse por muitos, em todos os seus níveis. A impossibilidade de análise de todos os trabalhos, ou pelo menos de grande parte do que foi feito por outros investigadores deixaria algum pesar por não lhes dar o devido mérito. É então por isso que deixo o meu agradecimento a todos os que contribuíram com o seu trabalho para tornar este trabalho possível.

Hoje a Diabetes é um grande problema de Saúde Pública por todo o mundo. Há muitas formas de atenuar e atrasar o problema, mas todas elas são muito penosas e as consequências da doença são dramáticas, muitas vezes acentuadas pela falta de cuidado/informação dos doentes que padecem desta patologia.

Mas a Diabetes é apenas uma das doenças metabólicas que assolam as comunidades; a Hipertensão Arterial e a Dislipidémia completam os problemas metabólicos com maior incidência a nível mundial. Afetam o corpo Humano destrutivamente, fruto do moderno estilo de vida, tipicamente sedentário e da má alimentação, tanto devido aos alimentos disponíveis no mercado de inferior qualidade, como pela má confeção e combinação de pratos, também este fruto da falta de tempo, do stresse recorrente e do pouco poder de compra, especialmente em Portugal.

Este Síndrome Metabólico está associado às complicações da Diabetes, aos altos níveis de Colesterol, níveis elevados de Triglicéridos no sangue, desenvolvimento de comorbilidades, desenvolvimento de Aterosclerose, Acidentes Vasculares Cerebrais, Enfartes, Tromboses, entre outras conhecidas patologias, que infelizmente, são demasiado familiares ao conhecimento popular e a tendência pela análise estatística é de aumento da incidência e da prevalência [92, 93].

É, portanto, de uma perspectiva pessoal e futurista que entendo que a orientação dos esforços investigativos não se deve focar no aumento da exigência das metodologias do tratamento. Devem sim ser focados no desenvolvimento de fármacos que regulem os

parâmetros metabólicos, mesmo antes do aparecimento destas doenças, especialmente os que se consideram Fatores de Risco.

Deixo como exemplo o trabalho realizado, em ratos, por Haifeng et al., em 2012, onde se provou a possibilidade de “reprogramar” atividades celulares tirando partido de um fármaco já aprovado em clínica, o Guanabenz, para dessa forma restaurar a homeostasia dos valores Lipídicos e Glicosídicos do sangue, aliados ao efeito antihipertenso do fármaco [94].

O estabelecimento destes fatores de risco entre os valores conhecidos como saudáveis (homeostáticos) é a solução, a meu ver, para o futuro de uma Medicina mais preventiva e menos reativa e paliativa.

As bombas de insulina, ou Pâncreas artificiais são muito interessantes na sua génese e podem vir a ser um dia mais tarde a melhor solução para a atenuação das consequências da Diabetes, mas atualmente com todas as limitações na precisão da medição da glicose e na incapacidade de previsão de atividades/fatores importantes como a dimensão calórica das refeições, o exercício físico ou até stresse, que provocam maior consumo de glicose, a meu ver ainda não são uma alternativa.

Este projeto tinha um objetivo específico, o desenvolvimento de um protótipo de um glicómetro passível de evolução. Isto permite agora uma fase para a Exatronic ponderar entrar no mercado com um aparelho construído na base do que foi desenvolvido neste projeto.

Por outro lado, era requerida a aquisição de uma serie de competências no domínio de ferramentas, selecionadas como metas de aprendizagem deste projeto. É com satisfação que acabo o projeto com o domínio delas e sei que serão uma grande mais-valia num futuro próximo.

Foi também desenvolvida a capacidade de organização e metodologia do trabalho o que permite realizar cada tarefa com clareza.

Todos os requisitos que haviam sido propostos foram cumpridos e ainda houve espaço para acrescentar funcionalidades que serão também elas uma mais valia para a interação com o utilizador.

Deste projeto resultou um protótipo totalmente funcional, com as maiores limitações a estarem associadas ao biossensor que não era conhecido.

É de notar que o objetivo de desenvolver um glicómetro com comunicação sem fios foi devidamente cumprido, na medida em que o produto final permite a visualização dos dados via *Bluetooth Low Energy* e por se encontrar inserido numa caixa de 10,5 x 6,5 x 2,0 cm e possuir uma bateria integrada, é portátil, uma característica que não era essencial no início do projeto.

## 2. Trabalho futuro e complementos ao sistema

Sugiro como complemento para as todas as medições com aparelhos portáteis a utilização da AIDA, uma ferramenta muito útil para ajudar os diabéticos no controlo e monitorização da sua doença. Este programa informático é um simulador disponível para *download* gratuito em <http://www.2aida.net/> e permite a simulação dos perfis de glicose e insulina para aprendizagem e demonstração da sua relação e comportamentos. O utilizador, com esta ferramenta e aliado ao conhecimento obtido neste tema pode programar com mais eficiência as suas medições para horários que entende mais críticos e o horário das suas refeições [95].

Proponho, para melhorar os aparelhos que já existem, que próximos trabalhos sejam realizados no sentido de desenvolver a engenharia genética da produção das enzimas. Apesar das enzimas usadas atualmente serem bastante específicas para a glicose a sua estabilidade não é boa, e a sua atividade deveria ser uniforme na gama de temperaturas ambiente (-10 a 45°C) porque o ajuste das medições à temperatura, por muitas medições que se tenham em conta para estabelecer este parâmetro de calibração, é sempre uma fonte de erros.

Os processos de imobilização enzimática ainda têm um longo caminho a percorrer, ainda não se conhece as propriedades ideais para uma boa estabilização, a química de superfícies ainda é incerta na definição de parâmetros e cada caso tem de ser estudado individualmente. E, portanto, na área dos Glicómetros amperimétricos que usam biossensores, o desenvolvimento do sensor é, a meu ver o maior desafio atualmente.

A nível do protótipo desenvolvido é essencial que seja realizada uma caixa que envolva a placa de condicionamento e que nessa caixa se indique claramente o modelo da tira a inserir. Seria também interessante desenvolver uma parceria para a produção

de um conector específico para a tira, a solução desenvolvida é uma adaptação que por vezes traz problemas na aquisição do sinal por não fixar a tira de teste.

Para uma boa validação do produto final, deve ser garantido que o dispositivo cumpra com os valores limite estabelecidos em Ensaio de Esterilidade para análise do crescimento microbiano, Ensaio LAL para teores de endotoxinas bacterianas e que esteja em conformidade com a norma IEC60601 referente à compatibilidade eletromagnética de dispositivos médicos.

Sugiro também a incorporação de uma memória externa para armazenamento de medições, que por qualquer motivo não possam ser enviadas por Bluetooth.

Por último, uma possível tarefa a desenvolver seria associar os dados recolhidos na aplicação android a um *log in* e integrá-los numa base de dados. Isto poderia permitir no futuro que o endocrinologista poderia aceder aos dados pessoais mediante autorização do seu doente e sem ser necessária uma consulta, poderiam ser enviadas recomendações para ajuste de dieta ou de quantidade de medicação.

### **3. Apreciação final**

Quando decidi realizar este projeto achava sinceramente que não iria conseguir cumprir com tudo o que era pedido, sabia que era a área que menos domino, dentro das que aprendi na UC. Por isso, por ter uma vontade de sair da zona de conforto e ampliar o meu conhecimento arrisquei e decidi desenvolver este projeto.

O facto de parte do projeto ter sido realizado no ambiente empresarial da Exatronic permitiu-me ver a aplicação do conhecimento numa perspectiva diferente da que conhecia.

O desenvolvimento foi um desafio muito grande por ser um projeto com um prazo muito superior em relação a projetos previamente realizados, e em cada competência que tive de adquirir, mas cresci a nível pessoal e profissional.

Faço, portanto, um balanço positivo de todo o trabalho realizado e estou muito satisfeito com tudo o que fiz e aprendi no decurso do projeto.





## VIII. Referências Bibliográficas

---

- [1] Exa4Life, “<http://exa4life.com>,” 2010. [Online].
- [2] “<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>,” [Online]. [Acedido em 6 1 2016].
- [3] D. I. PORDATA, “Óbitos por algumas causas de morte (%) em Portugal,” PORDATA, 28 04 2016. [Online]. Available: [http://www.pordata.pt/Portugal/%C3%93bitos+por+algumas+causas+de+morte+\(percentagem\)-758](http://www.pordata.pt/Portugal/%C3%93bitos+por+algumas+causas+de+morte+(percentagem)-758). [Acedido em 07 09 2016].
- [4] S. P. d. Diabetologia, “Diabetes Factos e Números - Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes,” 2014.
- [5] D. G. d. S.-. G. d. Portugal, “PORTUGAL - Idade Maior em Números,” 2014.
- [6] A. G. Aggidis, J. D. Newman e G. A. Aggidis, “Investigating pipeline and state of the art Blood,” *Biosensors and Bioelectronic - Author’s Accepted Manuscript*, 2015.
- [7] R. Weitgasser, B. Gappmayer e M. Pichler, “Newer Potable Glucose Meters - Analytical Improvement Compared with previous Generation Devices,” *Clinical Chemistry*, pp. 1821-2825, 1999.
- [8] R. Bergenstal e et.al., “Recommendations for Standardizing Glucose Reporting and Analysis to Optimize Clinical Decision Making in Diabetes: The Ambulatory Glucose Profile (AGP),” *Diabetes Technology & Therapeutics*, vol. 15, pp. 198-211, 2013.
- [9] “Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus,” *Diabetes Care*, vol. 33, 2010.
- [10] I. D. Federation, *Diabetes Atlas Seventh Edition*, 2015.

- [11] A. R. Domingues e N. Aguiar, “Fundamentos Fisiológicos da Engenharia Biomédica,” *Apontamentos Teóricos*, 2005.
- [12] J. W. & Sons, *International Textbook of Diabetes Mellitus*, Fourth Edition, Ralph A. DeFronzo, Ele Ferrannini, Paul Zimmet, K. George M.M. Albert, 2015.
- [13] J. L. Jameson, “Endocrinology,” em *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 2010.
- [14] D. G. Gardner e D. Shoback, *Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology* - ninth edition, The McGraw-Hill Companies, Inc, 2011.
- [15] G. H. Goossens, “The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance,” *Physiology & Behavior*, vol. 94, pp. 206-218, 2008.
- [16] J. Hagvik, “Glucose Measurement: Time for a Gold Standard,” *Journal of Diabetes Science and Technology*, vol. 1, nº 2, pp. 169-172, 2007.
- [17] T. Münzel, C. Sinning, F. Post, A. Warnholtz e E. Schulz, “Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial,” *Annals of Medicine*, vol. 40, pp. 180-196, 2008.
- [18] Marti e a. et, “Endothelial Dysfunction, Arterial Stiffness, and Heart Failure,” *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 60, nº 16, p. 1455–69, 2012.
- [19] R. Ross, “Atherosclerosis - an inflammatory disease,” *The New England Journal of Medicine*, vol. 340, nº 2, pp. 115-126, 1999.
- [20] S. F. T. Amaral, “A Diabetes Mellitus e a Amputação: Medidas Preventivas,” *Tese de Mestrado em Medicina*, 2014.
- [21] R. BORJA-SANTOS, “<https://www.publico.pt/sociedade/noticia/ma-alimentacao-e-o-factor-que-rouba-mais-anos-de-vida-saudavel-aos-portugueses-1701295>,” Público, 07 07 2015. [Online]. [Acedido em 15 02 2016].

- [22] D. C. C. T. Research, "Lifetime benefits and costs of Intensive therapy as practiced in the diabetes control and complications Trial," *JAMA*, vol. 276, p. 1409–1415, 1996.
- [23] G. Van Den Berghe, P. Wouters, F. Weekers, C. Verwaest, F. Bruyninckx, M. Schetz, D. Vlasselaers, P. Fernande, P. Lauwers e R. Bouillon, "Intensive Insulin Therapy in Critically ill Patients," *The New England Journal of Medicine*, vol. 345, pp. 1359-1367, 2001.
- [24] D. Vilar-Compte, I. Á. d. Iturbe, A. Martín-Onraet, M. Pérez-Amador, C. Sánchez-Hernández e P. Volkow, "Hyperglycemia as a risk factor for surgical site infections in patients undergoing mastectomy," *American Journal of Infection Control*, vol. 36, p. 192–198, 2008.
- [25] A. Pitkin e M. Rice, "Challenges to Glycemic Measurement in Perioperative and Critically ill Patient: A Review," *Journal of Diabetes Science and Technology*, vol. 3, nº 6, pp. 1270-1281, 2009.
- [26] R. Poddar, J. Thomas Andrews, P. Shukla e P. Sen, "Non-invasive Glucose Monitoring Techniques: A review and current trends," p. 39, 2008.
- [27] H. F. Pidcoke, C. E. Wade, E. A. Mann, J. Salinas, B. M. Cohee, J. B. Holcomb e S. E. Wolf, "Anemia Causes Hypoglycemia in ICU Patients Due to Error in Single-Channel Glucometers: Methods of Reducing Patient Risk," *National Institute of Health*, vol. 38, nº 2, pp. 471-476, 2010.
- [28] S. Schreiner, J. D. Bronzino e D. R. Peterson, *Medical Instruments And Devices - Principles and Practices*, CRC Press, 2015.
- [29] A. Bard e L. Faulkner, "Eletrochemical Methods," *New York: John Wiley & Sons*, pp. 103-143, 1980.
- [30] J. Wang, "Eletrochemical Glucose Biosensors," *Chemical Reviews*, vol. 108, pp. 814-825, 2008.

- [31] T. G. Schleis, "Interference of Maltose, Icodextrin, Galactose, or Xylose with Some Blood Glucose Monitoring Systems," *PHARMACOTHERAPY*, vol. 7, n° 9, pp. 1313-1321, 2007.
- [32] FDA,  
"http://www.fda.gov/MedicalDevices/Safety/AlertsandNotices/PublicHealthNotifications/ucm176992.htm," 13 08 2009. [Online]. [Acedido em 3 2 2016].
- [33] J. P. Frias, C. G. Lim, J. M. Ellison e C. M. Montandon, "Review of Adverse Events Associated With False Glucose Readings Measured by GDH/PQQ-Based Glucose Test Strips in the Presence of Interfering Sugars," *Diabetes Care*, vol. 33, n° 4, pp. 728-729, 2010.
- [34] J. Hönes, P. Müller e N. Surridge, "The Technology Behind Glucose Meters: Test Strips," *DIABETES TECHNOLOGY & THERAPEUTICS*, vol. 10, 2008.
- [35] B. H. Ginsberg, "Factors Affecting Blood Glucose Monitoring: Sources of Errors in Measurement," *Journal of Diabetes Science and Technology*, vol. 3, n° 4, pp. 903-913, 2009.
- [36] G. Kristensen, N. Christensen, G. Thue e S. Sandberg, "Between-Lot Variation in External Quality Assessment of Glucose: Clinical Importance and Effect on Participant Performane Evaluation," *Cinical Chemistry*, pp. 1632-1636, 2005.
- [37] "http://www.diabetes.co.uk/blood-glucose-meters/iso-accuracy-standards.html," [Online]. [Acedido em 16 02 2016].
- [38] R. Bamberg, K. Schulman, M. Mackenzie, J. Moore e S. Olchesky, "Effect of Adverse Storage Conditions on Performance of Glucometer Test Strips," *Clinical Laboratory Science*, vol. 18, n° 4, 2005.
- [39] M. Teodorczyk, M. Cardosi e S. Setford, "Hematocrit Compensation in Electrochemical Blood Monitoring Systems," *Journal of Diabetes Science and Technology*, vol. 6, n° 3, pp. 648-655, 2012.

- [40] S. Rustagi e P. Kumar, "Biosensor and It's Application in Food Industry," *Advances in Bioresearch* , vol. 4, n° 2, pp. 168-170, 2013.
- [41] A. P. F. Turner, "Biosensors: sense and sensibility," *Chemical Society Reviews*, vol. 42, n° 8, p. 3175–3648, 2013.
- [42] P. L. Sobreira, V. C. Wanderley, A. C. Barros, V. Medeiros, M. Lima e J. Filho, "Mathematics Algorithms to Calculate Glycemic Concentrations Found by Amperometric Biosensor," *VI International Conference on Engineering and Computer Education*, pp. 205-209, 2009.
- [43] "<https://www.ySI.com/applications/more-applications/clinical-research-diagnostics>," [Online]. [Acedido em 18 02 2016].
- [44] "Evaluation of the Current Precision Point-of-Care Blood Glucose Test Strip," *Clinical Studies*, 2008.
- [45] Specificationsheet, "YSI 2300 STAT PLUS Proven Technology for Glucose and Lactate".
- [46] Specificationsheet, "YSI 2700 SELECT Biochemistry Analyser".
- [47] Specificationsheet, "YSI 2900 Series Biochemistry Analyzers".
- [48] N. .. Oliver, C. Toumazou, A. E. G. Cass e D. G. Johnston, "Glucose sensors: a review of current and emerging technology," *Diabetic Medicine*, vol. 26, pp. 197-210, 2008.
- [49] S. M. L. Pradyot Nandi, "Recent trends in microdialysis sampling integrated with conventional and microanalytical systems for monitoring biological events: A review," *Analytica Chimica Acta*, vol. 651, p. 1–14, 2009.
- [50] D. C. Klonoff, "A Review of Continuous Glucose Monitoring Technology," *Diabetes Technology & Therapeutics*, vol. 7, n° 5, pp. 770-775, 2005.
- [51] Y.-C. Hsieh e J. D. Zahn, "Glucose recovery in a microfluidic microdialysis biochip," *Sensors and Actuators* , vol. 107, pp. 649-656, 2005.

- [52] M. Müller, "Microdialysis," *BMJ*, vol. 324, n° 588, 2002.
- [53] J. D. Zahn, D. Trebotich e D. Liepmann, "Microfabricated Microdialysis Microneedles for Continuous Medical Monitoring," *1<sup>st</sup> Annual International IEEE-EMBS Special Topic Conference on Microtechnologies in Medicine & Biology*, pp. 375-380, 2000.
- [54] M. Sakakida, K. Nishida e M. Shichiri, "Ferrocene-mediated needle-type glucose sensor covered with newly designed biocompatible membrane," *Sensors and Actuators B*, pp. 13-14, 1993.
- [55] D. S. Bindra, Y. Zhang e G. S. Wilson, "Design and in Vitro Studies of a Needle-Type Glucose Sensor for Subcutaneous Monitoring," *Anal. Chem*, vol. 63, pp. 1692-1696, 1991.
- [56] V. Matuleviciene e et.al., "A Clinical Trial of the Accuracy and Treatment Experience of the Dexcom G4 Sensor (Dexcom G4 System) and Enlite Sensor (Guardian REAL-Time System) Tested Simultaneously in Ambulatory Patients with Type 1 Diabetes," *DIABETES TECHNOLOGY & THERAPEUTICS*, vol. 16, pp. 759-767, 2014.
- [57] T. Bailey, T. Bailey, M. P. Christiansen, L. J. Klaff e S. Alva, "The Performance and Usability of a Factory-Calibrated Flash Glucose Monitoring System," *DIABETES TECHNOLOGY & THERAPEUTICS*, vol. 17, pp. 787-794, 2015.
- [58] D. T. J. D. Zahn e D. Liepmann, "Microfabricated Microdialysis Microneedles for Continuous Medical Monitoring," *Annual International IEEE-EMBS Special Topic Conference on Microtechnologies in Medicine & Biology*, pp. 375-380, 2000.
- [59] P. M. Wang, M. Cornwell e M. R. Prausnitz, "Minimally Invasive Extraction of Dermal Interstitial Fluid for Glucose Monitoring Using Microneedles," *DIABETES TECHNOLOGY & THERAPEUTICS*, vol. 7, pp. 131-141, 2005.
- [60] M. Invernale, B. Tang, R. York, L. Le e D. A. D. Hou, "Microneedle Electrodes Toward an Amperometric Glucose-Sensing Smart Patch," *Advanced Healthcare Materials*, 2013.

- [61] S. Gebhart e et.al, "Glucose Sensing in Transdermal Body Fluid Collected Under Continuous Vacuum Pressure Via Micropores in the Stratum Corneum," *Diabetes Technology & Therapeutics*, vol. 3, pp. 81-90, 2001.
- [62] P. Santi e R. H. Guy, "Reverse iontophoresis - Parameters determining electroosmotic flow: I. pH and ionic strength," *Journal of Controlled Release*, vol. 38, pp. 159-165, 1996.
- [63] G. Rao, P. Glikfeld e R. Guy, "Reverse Iontophoresis: Development of a Non-Invasive Approach for Glucose Monitoring," *Pharmaceutical Research*, vol. 10, nº 12, 1993.
- [64] R. O. Potts, J. A. Tamada e M. J. Tierney, "Glucose monitoring by reverse iontophoresis," *Diabetes Metab Res Rev*, vol. 18, p. S49–S53, 2002.
- [65] M. J. Tierney, J. A. Tamada e R. O. Potts, "Clinical Evaluation of the GlucoWatch Biographer: A Continual, Non-Invasive Glucose Monitor for Patients with Diabetes".
- [66] L. Isaacs, "<http://www.diabetesmonitor.com/glucose-meters/what-happened-to-the-glucowatch.htm>," [Online]. [Acedido em 24 02 2016].
- [67] D. R. i. C. N. (. S. Group, "Accuracy of the GlucoWatch G2 Biographer and the Continuous Glucose Monitoring System During Hypoglycemia.," *Diabetes Care*, vol. 27, nº 3, p. 722–726, 2004.
- [68] M. H. Jensen, T. F. Christensen, L. Tarnow, Z. Mahmoudi, M. D. Johansen e O. K. Hejlesen, "Professional Continuous Glucose Monitoring in Subjects with Type 1 Diabetes: Retrospective Hypoglycemia Detection," *Journal of Diabetes Science and Technology*, vol. 7, nº 1, pp. 135-143, 2013.
- [69] K. Sairam e C. H. Renumadhavi, "A Review on Non-Invasive Blood Glucometer Based on Photoacoustic Method," *International Journal for Innovative Research in Science & Technology*, vol. 1, nº 9, pp. 5-9, 2015.

- [70] S. F. Khalil, M. S. Mohktar e F. Ibrahim, "The Theory and Fundamentals of Bioimpedance Analysis in Clinical Status Monitoring and Diagnosis of Diseases," *Sensors*, vol. 14, pp. 10895-10928, 2014.
- [71] D. K. Kamat, D. Bagul e P. M. Patil, "Blood Glucose Measurement Using Bioimpedance Technique," *Hindawi Publishing Corporation*, 2014.
- [72] S. M. J. Kost, "Low-frequency sonophoresis A review," *Advanced Drug Delivery*, vol. 56, p. 589–601, 2004.
- [73] P. Svedman e C. Svedman, "Skin mini-erosion sampling technique: feasibility study with regard to serial glucose measurement," *Pharmaceutical Research*, vol. 15, n° 6, pp. 883-888, 1998.
- [74] D. Meadows e J. Schultz, "Design, manufacture and characterization of an optical fiber glucose affinity sensor based on an homogeneous fluorescence energy transfer assay system," *Analytica Chimica Acta*, vol. 280, pp. 21-30, 1993.
- [75] M. W. Davidson, "<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/fret/fretintro.html>," [Online]. [Acedido em 02 03 2016].
- [76] M.-S. Steiner, A. Duerkop e O. S. Wolfbeis, "Optical methods for sensing glucose," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 40, p. 4805–4839, 2011.
- [77] L. Lindenburg e M. Merkx, "Engineering Genetically Encoded FRET Sensors," *Sensors*, vol. 14, pp. 11691-11713, 2014.
- [78] M. Wojtkowski, "High-speed optical coherence tomography: basics and applications," *APPLIED OPTICS*, vol. 49, n° 16, 2010.
- [79] R. Gabbay e S. Sivarajah, "Optical Coherence Tomography-Based Continuous Noninvasive Glucose Monitoring in Patients with Diabetes," *DIABETES TECHNOLOGY & THERAPEUTICS*, vol. 10, n° 3, pp. 188-193, 2008.

- [80] K. Larin, M. Motamedi, T. Ashitkov e R. Esenaliev, "Specificity of noninvasive blood glucose sensing using," *PHYSICS IN MEDICINE AND BIOLOGY*, vol. 48, p. 1371–1390, 2003.
- [81] J. O. Howell, P. T. Kissinger, A. D. Kaufman e H.-J. Yeh, "Glucose Test Strips and Electroanalytical Chemistry in the Undergraduate Laboratory," pp. 1-19.
- [82] J. DiCristina, "Blood Glucose Meters - TUTORIAL 4659," *Maxim Integrated*, 2010.
- [83] N. Dalvi, "Glucose Meter Reference Design - AN1560," *Microchip*.
- [84] M. G. Yanez, "Glucose Meter Fundamentals and Design - AN4364," *Freescale Semiconductor*, 2013.
- [85] P. Sennequier, "Signal conditioning for electrochemical sensors - AN4348," *STMicroelectronics*.
- [86] V. V. Kumar, M. Veena, G. Suresh e S. Nandini, "Design of a Potentiostat and Glucometer for Rhoeo Discolor Leaf Extract Based Glucose Biosensor," *Journal of Innovation in Electronics and Communication Engineering*, vol. 5, nº 1, pp. 63-70, 2015.
- [87] Atmel, "8-bit AVR Microcontroller with 8kbytes In-System Programable Flash," *Specificationsheet*.
- [88] Atmel, "Specificationsheet," *AVR910: In-System Programming*.
- [89] V. M., "<http://pplware.sapo.pt/informacao/bluetooth-5-para-breve-4x-mais-veloz-e-com-o-dobro-da-cobertura/>," Pplware. [Online]. [Acedido em 10 06 2016].
- [90] "[https://tessel.gitbooks.io/t2-docs/content/Tutorials/Communication\\_Protocols.html](https://tessel.gitbooks.io/t2-docs/content/Tutorials/Communication_Protocols.html)," [Online]. [Acedido em 25 06 2016].
- [91] C. C. A. 2.5, "<https://developer.android.com/guide/topics/connectivity/bluetooth-le.html>," [Online]. [Acedido em 01 08 2016].

- [92] S. P. d. Diabetologia, "Diabetes: Factos e Números 2014 – Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes," Letra Solúvel – Publicidade e Marketing, Lda., Lisboa, 2014.
- [93] A. Lusa, "<http://www.dn.pt/portugal/interior/portugal-tem-uma-incidencia-alarmanete-de-diabetes-2440959.html>," 25 04 2012. [Online]. [Acedido em 15 02 2016].
- [94] H. Ye, G. Hamri, K. Zwicky, M. Christen e M. Folcher, "Pharmaceutically controlled," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 110, pp. 141-146, 2013.
- [95] E. Lehmann, "Research use of the AIDA [www.2aida.org](http://www.2aida.org) Diabetes Software Simulation Program: A Review - Part 1. Decision Support Testing and Neural Network Training," *Diabetes Technology & Therapeutics*, vol. 5, pp. 425-438, 2003.
- [96] B. Feldman, G. McGarraugh, A. Heller, N. Bohannon, J. Skyler, E. DeLeeuw e D. Clarke, "FreeStyle: a small-volume electrochemical glucose sensor for home blood glucose testing.," *Diabetes Technology & Therapeutics*, pp. 221-229, 2000.
- [97] T. A. Fernandes, D. K. Kurhe, A. A. Chavan e R. V. Jayaram, "Recovery and reuse of palladium from spent glucometer electrochemical test strips," *Hydrometallurgy*, p. <http://dx.doi.org/10.1016/j.hydromet.2015.09.002>, 2015.
- [98] I. B. Hirsch e M. Brownlee, "Should minimal blood glucose variability become the gold standard of glycemic control?," *Journal of Diabetes and Its Complications*, vol. 19, pp. 178-181, 2005.
- [99] J. Herrman, "<http://www.wired.com/2010/09/wireless-explainer/>," [Online]. [Acedido em 03 05 2016].
- [100] "<https://www.techopedia.com/definition/27785/industrial-scientific-and-medical-radio-band-ism-band>," [Online]. [Acedido em 2016].

- [101] “upverter,” [Online]. Available: <http://blog.upverter.com/post/102541328427/bluetooth-module>. [Acedido em 03 05 2016].
- [102] “ARGENOX,” [Online]. Available: <http://www.argenox.com/bluetooth-low-energy-ble-v4-0-development/library/a-guide-to-selecting-a-bluetooth-chipset/>. [Acedido em 03 05 2016].
- [103] Digikey, [Online]. Available: <http://www.digikey.com/product-search/en/rf-if-and-rfid/rf-transceiver-modules>. [Acedido em 03 05 2016].
- [104] “<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>,” [Online]. [Acedido em 6 1 2016].