

Projeto de um Sistema de Registro de Sinais
de Neurônios *in vitro* em Matriz de
Microeletrodos

Francisco Fambrini
19/Dezembro/2013

Dissertação de Mestrado em Ciência da
Computação

Projeto de um Sistema de Registro de Sinais de Neurônios *in vitro* em Matriz de Microeletrodos

Dissertação de Mestrado apresentada à Banca Examinadora no curso de Mestrado em Ciência da Computação da Faculdade Campo Limpo Paulista.

Campo Limpo Paulista, 19 de Dezembro de 2013.

Francisco Fambrini

Prof. Dr. José Hiroki Saito (Orientador)

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Câmara Brasileira do Livro, São Paulo, Brasil

Fambrini, Francisco

Projeto de um sistema de registro de sinais de neurônios *in vitro* em matriz de microeletrodos / Francisco Fambrini. Campo Limpo Paulista, SP: FACCAMP, 2014.

Orientador: Prof^o. Dr. José Hiroki Saito

Dissertação (mestrado) – Faculdade Campo Limpo Paulista – FACCAMP.

1. Matriz de microeletrodos. 2. Sinais neuronais. 3. Processamento de sinais. 4. Interface cérebro-máquina. I. Saito, José Hiroki. II. Faculdade Campo Limpo Paulista. III. Título.

CDD-005.43

Faculdade Campo Limpo Paulista
Programa de Mestrado em Ciência da Computação

"Projeto de um Sistema de Registro de Sinais de Neurônios in vitro em Matriz de Microeletrodos"

FRANCISCO FAMBRINI

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência da Computação da Faculdade Campo Limpo Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência da Computação.

Membros da Banca:



Prof. Dr. José Hiroki Saito
(Orientador - FACCAMP)



Profa. Dra. Maria do Carmo Nicoletti
(FACCAMP)



Prof. Dr. Emerson Carlos Pedrino
(UFSCar)

Campo Limpo Paulista -SP

Dezembro/2013

Agradecimentos

Agradeço a Deus, primeiramente, pela grande oportunidade de cursar este mestrado e pelas tantas coisas boas que me concedeu.

Ao prof. Dr. José Hiroki Saito, pessoa de grande conhecimento e caráter inigualável: uma rara união de competência profissional, humildade e um coração de ouro, tudo numa única pessoa. Prof. Saito, obrigado de coração por toda a orientação e toda a ajuda que só um verdadeiro mestre e amigo poderia me fornecer !

Aos professores da FACCAMP, em especial ao prof. Dr. Osvaldo Luiz de Oliveira , coordenador do curso, pelo apoio em tudo o que eu solicitei;

Aos colegas de curso, todos, sem exceção: esquecer de algum deles seria uma enorme injustiça. Muitos me deram grande apoio e ajuda;

Ao amigo e sócio José Maurício Muniz Leme, parceiro de uma vida;

Ao amigo Marco Antônio Nardy, pelas idéias sempre criativas e pelo apoio em tudo;

A Texas Instruments, na pessoa do engenheiro Raul Mattos, pelo fornecimento de componentes e chips sem nenhum custo;

A Microchip, através do sua empresa representante no Brasil, a ARTIMAR, na pessoa do engenheiro André Rabner, por fornecer amostras de DSPs gratuitamente para este trabalho;

A FESB (Fundação de Ensino Superior de Bragança Paulista), na pessoa da Profa. Célia Badari, pelo apoio profissional que sempre me deu no cargo de professor do INTEP (Instituto Técnico Profissionalizante de Bragança Paulista);

A UNISAL- Universidade Salesiana de Campinas, na pessoa do prof. Celso Braga e do prof. Diogo Gará Caetano, pelo apoio amplo e irrestrito que sempre me deram como professor nesta instituição;

Ao grande amigo Airton Gaidys, da Piclist, grupo de discussão na Internet sobre Eletrônica e Sistemas Embarcados, pelo material doado e pelo grande apoio;

A todos os demais membros da PicList, pelas incontáveis horas de discussões técnicas;

E, claro, aos meus pais, a quem eu devo muito e nunca poderei pagar o amor infinito que me deram.

Resumo

Matriz de microeletrodos (Microelectrode Array, MEA) foi desenvolvida há mais de 40 anos. Trata-se de um dispositivo de múltiplos microeletrodos, construído com a mesma tecnologia em nanoescala dos circuitos integrados que permite detectar variações do potencial elétrico local das células neuronais ao seu redor. Um exemplo desse sistema, a MEA padrão, utiliza um arranjo planar de 60 microeletrodos com 30 μm de diâmetro e 200 μm de espaçamento em substrato de vidro, sendo que cada microeletrodo pode ser usado tanto para sensoriamento como estímulo elétrico. As medidas elétricas obtidas em MEA são extracelulares, bem como os estímulos elétricos aplicados. Como os sinais eletrofisiológicos captados pelos microeletrodos são da ordem de microvolts, esses sinais devem ser amplificados cerca de 1200 vezes por um sistema amplificador de duas fases, com técnicas especiais que evitam a amplificação de ruídos. Neste trabalho descreve-se o desenvolvimento de um projeto completo para registro de dados a partir da MEA padrão, incluindo soquete elétrico, pré-amplificadores, filtro, amplificadores, conversão analógico/digital e transmissão para o computador. Apesar do projeto ter sido desenvolvido para um sistema de 60 canais, um para cada microeletrodo da MEA padrão, foi implementado um protótipo de 2 canais para a realização dos testes de amplificação e de transmissão serial de sinais digitalizados para o computador. Os testes foram realizados com o uso de um simulador elétrico de MEA, que gera sinais no nível de amplitude compatível com os sinais eletrofisiológicos captados pela MEA, também projetado e construído, denominado Simulador de MEA, Sim-MEA. Os resultados obtidos evidenciam a viabilidade do projeto, com a amplificação de sinais ao nível desejado. Este trabalho contribui para a difusão do uso das MEAs, que são muito úteis para o estudo da dinâmica das redes neuronais e para testes de produtos farmacológicos.

Palavras-chave: matriz de microeletrodos, filtros, amplificadores de sinais, sinais elétricos fisiológicos, MEA, neurônio.

Abstract

More than 40 years ago the Multi-electrode array (MEA) was developed. This is a planar device with microelectrodes, which has allowed to detect local electrical potential field changes of neuron cells in its neighborhood. Neurons may grow in vitro and its electrophysiological signals can still be measured, by the Micro-Electrode-Array, built with nanoscale technology similar to the integrated circuits. As an example, the standard MEA uses a flat arrangement of 60 microelectrodes of 30 micrometers diameter and 200 micrometers distance in glass substrate, and each microelectrode may be used as both sensing and electric stimulation. The electrical measures obtained through the MEAs are extracellular, as well as the applied impulses. The electrophysiological signals measured by the microelectrodes are in microvolt, so these signals should be amplified around 1200 times by a two phase amplification system, with special techniques that avoid the amplification of noise. This work describes the development of a complete project for data registration using standard MEA, including electric socket, pre-amplifiers, filters, amplifiers, analog-to-digital converters, and data transmission to the computer. Although the development of a complete 60 channel project, one channel for each microelectrode of the standard MEA, a prototype of the two channels was implemented for the amplification and analog-to-digital conversion and serial signal transmission to the computer. The tests were realized using an electric simulator of MEA, which generates a signal level compatible with the electrophysiological signals generated by MEAs, also designed and implemented, denoted MEA Simulator, Sim-MEA. The obtained results show the feasibility of the designed system, with the amplified signal at the desired level. This work contributes to disseminate the use of MEAs, which are useful in neural network dynamic studies, and on pharmacological product tests.

keywords: *Multi-electrode-array, headstage amplifier, filters, electrophysiological signal, MEA, neuron.*

Glossário

A/D	Analog to Digital
ADC	Analog to Digital Converter
AI	Amplificador de Instrumentação
AO	Amplificador Operacional
BCI	Brain Computer Interface
BW	Band Width
CMMR	Common Mode Modular Rejection
CMR	Common Mode Rejection
DAQ	Data Acquisition
DFT	Discrete Fourier Transform
DR	Dynamic Range
ECG	Eletrocardiograma
EEG	Eletroencefalograma
EMI	Eletromagnetic Interference
FDI	Firmware Design Innovation
FET	Field Effect Transistor
FFT	Fast Fourier Transform
FlexMEA	MEA Flexível
GND	Ground (terra elétrico)
IBI	Inter Burst Interval
ISI	Inter Spike Interval
LPT	Line Printer Terminal
MCS	Multi Channel System
MEA	Multi-Electrode Array, Microelectrode Array
MUX	Multiplexador
PAD	Contato elétrico que se localiza na borda de uma placa de circuito impresso
PGA	Programmable Gain Amplifier
RC	Resistor e Capacitor
RE	Ressonância Estocástica
REF	Eletrodo de Referência, terra, o mesmo que GND
RFI	Radio Frequency Interference
SAR	Successive Approximation Register
Sim-MEA	Simulador de MEA
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SNR	Signal Noise Ratio
SPICE	Simulated Program with Integrated Circuits Emphasis
SR	Slew Rate

Sumário

<u>Capítulo 1 - Introdução</u>	14
1.1 <u>Motivação</u>	14
1.2 <u>Objetivos: Principal e Subjacentes</u>	16
1.3 <u>Principais Contribuições</u>	17
1.4 <u>Organização do Trabalho</u>	17
<u>Capítulo 2 - Fundamentos sobre Neurônios, Sistema Nervoso e MEA</u>	19
2.1 <u>Revisão sobre Neurônios e Sistema Nervoso</u>	19
2.2 <u>Histórico do Desenvolvimento das MEAs</u>	21
2.3 <u>Eficiência, Produção e Consumo de Energia do Tecido Nervoso</u>	24
2.4 <u>Spikes e Bursts</u>	25
2.5 <u>Gravações e Estímulos na MEA</u>	28
2.6 <u>MEA - Características, Limitações e Principais Tipos</u>	29
2.7 <u>Exemplo de Usos de MEA</u>	32
<u>Capítulo 3 - Aspectos sobre Hardware Utilizado em MEA</u>	32
3.1 <u>Breve Histórico</u>	34
3.2 <u>Equipamentos usados para registros de sinais elétricos de MEA</u>	35
3.2.1 <u>Soquete Elétrico</u>	37
3.2.2 <u>Amplificador de Sinais</u>	38
3.2.4 <u>Software para Aquisição de Dados</u>	41
3.3 <u>Gerador de Estímulos Elétricos para Potencial Evocado</u>	43
<u>Capítulo 4 -Visão Global do Projeto</u>	45
4.1 <u>Visão Global do Sistema Proposto</u>	45
4.1.1 <u>Módulos Implementados do SRSN</u>	48
<u>Capítulo 5 - Projeto e Implementação do Soquete da MEA e Simulação e Construção do Pré-Amplificador e Filtros</u>	50

<u>5.1 Soquete Elétrico da MEA padrão</u>	50
<u>5.1.1 Levantamento das Dimensões Físicas da MEA padrão</u>	51
<u>5.1.2 Simulação Computacional e Projeto do Soquete</u>	51
<u>5.2 - Pré-amplificador</u>	52
<u>5.3 Simulação dos Circuitos</u>	53
<u>5.4 Filtros</u>	55
<u>5.5 Implementação dos Filtros</u>	56
<u>5.6 Simulação do Pré-amplificador (<i>headstage</i>)</u>	58

Capítulo 6 - Subsistema de Amplificação, Conversão AD e Transmissão de Sinais 61

<u>6.1 Amplificadores</u>	61
<u>6.2 Conversor AD para 60 canais</u>	62
<u>6.3 Conversor AD Implementado</u>	66
<u>6.4 Teorema da Amostragem de Nyquist–Shannon</u>	69
<u>6.5 Aliasing</u>	70
<u>6.6 Influência do MUX</u>	71
<u>6.7 Conversor Serial - USB</u>	72

Capítulo 7 - Software de Registro de Sinais de Neurônios in vitro em MEA..... 73

<u>7.1 Comunicação Serial USB</u>	73
<u>7.2 Transformada Rápida de Fourier (FFT)</u>	74
<u>7.3 Filtro <i>Notch</i></u>	75
<u>7.4 O Software <i>Processing</i></u>	77
<u>7.5 Código em <i>Processing</i></u>	77

Capítulo 8 - Resultados Experimentais 80

<u>8.1 Testes Elétricos do Soquete</u>	80
<u>8.2 Projeto e Construção do Simulador, Gerador de Sinais, Sim-MEA</u>	82
<u>8.3 Teste dos Pré-amplificadores Usando Sim-MEA</u>	85

8.4 Teste do Subsistema DAQ Interligado ao Computador	91
8.5 Observações Finais	93
Capítulo 9 - Conclusões e Trabalhos Futuros.....	94
9.1 Conclusões.....	94
9.2 Trabalhos Futuros.....	94
9.3 Considerações Finais	97
Referências Bibliográficas.....	98
APÊNDICE A : Construção dos Protótipos das Partes do SRSN	104
A.1 Protótipo do Soquete Elétrico.....	104
A.2 Protótipo do Gerador de Sinais Sim-MEA	105
A.3 Pré-amplificador e Filtros.....	107
APÊNDICE B : Amplificação por Ressonância Estocástica (RE).....	113
APÊNDICE C :.....	115
C.1 Vantagens dos Filtros para a Redução de Ruído Térmico em Amplificadores	115
C.2 Outras Fontes de Ruído em Amplificadores.....	118
C.3 Medidas de Ruído.....	118
APÊNDICE D: Códigos-fonte	120
D.1 - Listagem do Código-fonte do Firmware Implementado no Microcontrolador PIC12F683 do Gerador de sinais Sim-MEA.	120
D.2 - Código-fonte do Firmware Implementado no Microcontrolador PIC18F4620 do Sistema de Aquisição de Dados (Conversor A/D e MUX).....	122
D.3 - Primeiro Script Escrito em MATLAB para Testar a Aquisição de Dados.....	124
D.4 - Código-Fonte do Programa Escrito em MATLAB para Aquisição e Amostragem dos Dados.	124
APÊNDICE E: Artigo Submetido à Conferência Internacional ISIE 2013, Comprovante de Submissão e Aceitação	127
APÊNDICE F: Manual de Instalação - MeaBench.....	139

Lista de Figuras

<u>1.1: Esquema de neurônio e células da glia - obtido de (www.anatpat.unicamp.br)</u>	17
<u>2.1: Diagrama ilustrativo de um neurônio. Imagem obtida de (Purves, 2010)</u>	20
<u>2.2: O limiar do <i>spike</i> é calculado como um múltiplo do desvio padrão da atividade basal</u>	26
<u>2.3: Registro de um único canal é mostrado (à esquerda), com ampliação (200m) do trecho apontado pela seta (à direita). Figura obtida de (Wagenaar, 2005)</u>	27
<u>2.4: Esquema mostrando ISI(intervalo entre spikes) e IBI(intervalo entre bursts). Figura obtida de (Wagenaar, 2005)</u>	28
<u>2.5: Esquema mostrando estimulação e registro de atividade elétrica em fatias de tecido com MEA (Potter, 2001)</u>	29
<u>2.6: MEA padrão e a região central onde se localiam os microeletrodos</u>	30
<u>2.7: MEA fina (thin), imagem obtida de (Systems, 2013)</u>	30
<u>2.8: MEA256, obtida de (Systems, 2013)</u>	31
<u>2.9: Registros elétricos feitos em 6 eletrodos em fatia de hipotálamo de rato. Na figura central, cada ponto marcado com A, B, C, D, E e F é um microeletrodo. Figura obtida de (Whitson et al., 2006)</u>	32
<u>3.1: Laboratório de MEA completo. Imagem de (Taketani e Baudry, 2006)</u>	37
<u>3.2: Soquete elétrico para MEA padrão. Imagem obtida de (Systems, 2013)</u>	39
<u>3.3: Soquete passivo fabricado para MED64 (à esquerda). Controle do aquecedor para esse soquete (à direita).</u> .38	
<u>3.4:Janela de controle do ganho do PGA no <i>software</i> (Systems, 2013)</u>	41
<u>3.5: Microamplificador modelo μPA16. O microamplificador é inserido internamente no conector à esquerda. Obtida de MicroChannel Systems (Systems, 2013)</u>	40
<u>3.6: Soquete, amplificador e placa A/D de MED64 System (Med64, 2013)</u>	40
<u>3.7: Tela do <i>software</i> MC Rack, obtida de MultiChannel Systems (Systems,2013)</u>	43
<u>3.8: Janela do <i>software</i> MED64 Mobius, obtida de (MED64, 2013)</u>	44
<u>3.9: Janela do <i>software</i> MeaBench, obtida de (Wagenaar, 2005)</u>	45

<u>3.10: Posição e numeração de cada um dos eletrodos na MEA padrão, correspondendo a cada janela da Fig. 3.9 (Systems, 2013).</u>	45
<u>3.11: Foto do protótipo do RAC System, gerador de estímulos proposto por (Wagenaar, 2004).</u>	46
<u>4.1: Diagrama de blocos completo para o Sistema de Registro de Sinais de Neurônios em MEA (SRSN).</u>	48
<u>4.2: Sinal típico num canal da MEA padrão que é aplicado à entrada do pré-amplificador (Wagenaar, 2001).</u>	48
<u>4.3: Figura 4.1 com a identificação dos módulos implementados (em amarelo).</u>	51
<u>5.1: Diagrama de blocos dos pré-Amplificadores e filtros.</u>	49
<u>5.2: Dimensões físicas da MEA padrão. Imagem de (Systems, 2013).</u>	53
<u>5.3: Desenho do primeiro protótipo do soquete elétrico para MEA padrão.</u>	54
<u>5.4: Amplificador de Instrumentação Texas INA333® (Texas, 2013).</u>	54
<u>5.5: Circuito inicialmente simulado no TINA para avaliar níveis de ruído.</u>	56
<u>5.6: Densidade de ruído na saída do pré-amplificador, obtida com simulador TINA.</u>	56
<u>5.7: Filtro Passa-Altas com frequência de corte de 0,16 Hz implementado.</u>	59
<u>5.8: Filtro ativo Butterworth passa-baixas de 2ª ordem implementado.</u>	60
<u>5.9: Esquema eletrônico completo do circuito de filtro que foi simulado e implementado.</u>	61
<u>5.10: Janela do <i>software</i> simulador de circuitos em modelo spice TINA-TI.</u>	61
<u>5.11: Resultado da simulação da tensão e corrente de ruído para o pré-amplificador proposto.</u>	60
<u>6.1: Diagrama de blocos do subsistema de Amplificação, Conversão AD e Transmissão de Sinais (DAQ).</u>	63
<u>6.2: Esquema de um único estágio de amplificador. São necessários 32 estágios em cada placa da Figura 6.4.</u> ...64	64
<u>6.3: Simulação de um único estágio do amplificador presente nas entradas do MUX.</u>	65
<u>6.4: Conjunto de Amplificadores projetados com o circuito TLC 2274 (Texas Instruments), cuja implementação completa se encontram no Apêndice A.</u>	65
<u>6.5: Diagrama de blocos de um único canal do MUX contido internamente no DSPIC33FJ256GP710.</u>	66
<u>6.6: Esquema eletrônico do conversor AD com DSPIC33FJ256GP710 projetado.</u>	67
<u>6.7: <i>Lay-out</i> da placa de circuito impresso do conversor AD com 32 entradas</u>	65
<u>6.8: Foto da placa de circuito impresso do conversor AD com 32 entradas implementado.</u>	68

<u>6.9: Disposição dos pinos do microcontrolador PIC18F4620 que foi implementado.</u>	69
<u>6.10: Conversor AD e MUX implementados a partir do PIC18F4620, apenas 2 canais foram construídos.</u>	70
<u>6.11: Conversor AD implementado, juntamente com o pré-amplificador e filtros, à esquerda.</u>	71
<u>6.12: Ilustração do fenômeno de <i>aliasing</i> que pode ocorrer nos Conversores A/D.</u>	70
<u>6.13: Filtro <i>Anti-Aliasing</i>, função de transferência e curva de atenuação.</u>	73
<u>6.14: Conversor USB que foi previsto na placa de circuito impresso da Figura 7.4.</u>	74
<u>7.1: <i>Script</i> de comunicação USB, Código 7.1, rodando em MATLAB e amostrando um sinal senoidal.</u>	76
<u>7.2: FFT aplicada sobre o sinal amostrado, mostrando a presença do sinal de 60 Hz.</u>	77
<u>7.3: Curva de atenuação obtida a partir de um Filtro <i>Notch</i> para $F_c=60\text{Hz}$ (Horowitz, 1989).</u>	78
<u>7.4: Imagem gerada pelo <i>script</i> descrito em Código 7.4, <i>plotando</i> dados recebidos (relativos a uma onda quadrada) na tela do PC.</u>	81
<u>8.1: MEA padrão acoplada ao protótipo do soquete elétrico construído.</u>	83
<u>8.2: Diagrama de blocos do Gerador de Sinais Sim-MEA interligado ao soquete e ao sistema SRNS.</u>	84
<u>8.3: Onda senoidal sintetizada pelo PWM a partir de pontos discretizados na Tabela.</u>	85
<u>8.4: Filtro RC passa-baixas de segunda ordem usado como integrador</u>	84
<u>8.5: Esquema eletrônico completo do Sim-MEA.</u>	87
<u>8.6: Esquerda, soquete em versão final (1) parte inferior, (2) parte superior; direita (3) MEA padrão e (4) Sim-MEA.</u>	88
<u>8.7: Sim-MEA em testes com o osciloscópio, montado no soquete.</u>	88
<u>8.8: Nível de ruído em função do ganho de tensão para o pré-amplificador.</u>	89
<u>8.9: Nível de ruído na saída do amplificador, com as entradas em aberto.</u>	90
<u>8.10: Forma de onda dente-de-serra na saída do pré-amplificador.</u>	90
<u>8.11: Forma de onda senoidal de frequência 1000 Hz na saída do pré-amplificador.</u>	91
<u>8.12: Saída do pré-amplificador quando é aplicada uma onda quadrada na entrada.</u>	90
<u>8.13: (1) Soquete, (2) Sim-MEA, (3) pré-amplificador e (4) fonte de alimentação.</u>	90
<u>8.14: <i>Plotagem</i> simultânea de 2 canais distintos via <i>script</i> MATLAB (Código 8.4).</u>	91

Lista de Figuras dos Apêndices

<u>A.1: Soquete para MEA padrão</u>	104
<u>A.2: Soquete elétrico acoplado à MEA padrão</u>	105
<u>A.3: Protótipo inicial do gerador Sim-MEA mostrando ao osciloscópio as formas de onda sintetizadas pelo <i>firmware</i> do microcontrolador</u>	106
<u>A.4: <i>Lay-out</i> da Placa de circuito impresso do Sim-MEA</u>	106
<u>A.5: Esquema elétrico completo e aspecto final da placa de circuito impresso do Sim-MEA montada sob o soquete</u>	107
<u>A.6: Esquema elétrico do pré-amplificador e filtros</u>	108
<u>A.7: Esquema dos 32 canais do Amplificador de entrada da Placa de Aquisição de Dados</u>	109
<u>A.8: Esquema Completo da Placa de Aquisição de Dados, para 32 canais: são mostrados os MUX (multiplexadores) e o Conversor A/D, todos internos ao chip DSPIC33FJ256GP710</u>	110
<u>A.9: Conversor USB utilizado na Placa de Aquisição de Dados (Prolific, 013)</u>	111
<u>A.10: <i>Lay-out</i> da Placa de Aquisição de Dados para 32 canais, já incorporando os circuitos mostrados pelas Figuras A.7, A.8 e A.9</u>	111
<u>C.1 : Curva de ganho em malha aberta OPA637 e OPA627 (Texas,2013)</u>	116

Capítulo 1 - Introdução

Em 1980, Pine e colaboradores relataram os primeiros trabalhos sobre gravações de sinais eletrofisiológicos proveniente de culturas de neurônios dissociados, extraídos de gânglio cervical superior de ratos recém-nascidos (Pine, 1980). Neurônio dissociado é aquele separado da fatia de tecido nervoso extraído do cérebro de algum animal.

Os neurônios são células nervosas que histomorfologicamente são formadas por um corpo (pericário), onde se localiza o núcleo. Do corpo partem prolongamentos celulares denominados dendritos e um prolongamento citoplasmático chamado axônio, cuja extremidade denomina-se telodendro (Junqueira e Carneiro, 2004). Os neurônios, juntamente com as células glia (ou neuroglia) formam o tecido nervoso. As células da glia são formadas pelos astrócitos protoplasmáticos e fibrosos, pelos oligodendrócitos e pelas micróglias. Cabe aos neurônios o papel de produzir e propagar os sinais elétricos através do transporte de íons em suas membranas.

O papel da glia é de fornecer sustentação mecânica e nutrição aos neurônios. Os neurônios são amitóticos (não se reproduzem) mas nas células da glia ocorre a mitose (Junqueira e Carneiro, 2004). Nos mamíferos e aves, o sistema nervoso central (SNC) é formado pelo cérebro, cerebelo e medula espinhal e o sistema nervoso periférico (SNP) é formado por nervos, gânglios e terminações nervosas.

Os neurônios são notáveis por sua capacidade de propagar sinais elétricos denominados potenciais de ação sobre grandes distâncias através de sequências de disparo (spikes) em padrões definidos no tempo (Dayan e L. F. Abbott, 2001). Pine e colaboradores relataram a atividade neural intracelular e extracelular, provando que a matriz de microeletrodos (Microelectrode Array, MEA) é um dispositivo essencial para monitorar respostas neurais (Pine, 1980).

Após o trabalho de Pine, diversos outros grupos criaram suas próprias matrizes de microeletrodos, usando-as com diversos tipos de culturas de células neurais (Wageenar, 2005). As redes neuronais cultivadas *in vitro* sobre a MEA podem desenvolver padrões complexos de atividade espontânea, gerando potenciais de ação sem estímulo externo, mas podem também apresentar respostas a estímulos aplicados nos elementos sensores, processando informações como no cérebro dos animais.

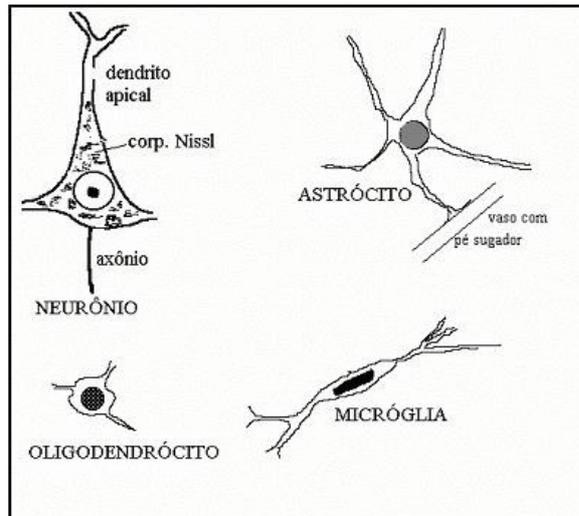


Figura 1.1: Esquema de neurônio e células da glia - obtido de (www.anatpat.unicamp.br)

Sinapse é a região de contato entre a extremidade do axônio de um neurônio e a superfície de outras células. Os neurônios, quando cultivados *in vitro* sobre a MEA, formam sinapses espontaneamente e as redes neuronais podem exibir algum tipo de atividade (Stett et al., 2003). Em culturas de neurônios fora do organismo do animal, as células possuem um tempo de vida limitado, raramente superior a 50 dias. A cultura sobre a MEA exige esterilização (aplica-se antibióticos para evitar infecção das células nervosas por bactérias e fungos), colocação de nutrientes através de uma solução de perfusão, controle do pH, da temperatura e da osmolaridade (Rodriguez, 2012). Dessa forma, a manutenção biológica do tecido ou neurônios dissociados em cultura sobre a MEA é difícil e transitória.

Este trabalho teve por foco o estudo, desenvolvimento e implementação de técnicas voltadas para melhorar a discriminação entre sinal e ruído, bem como a taxa de aquisição dos equipamentos utilizados para amplificação, registro e gravação dos sinais produzidos com o uso das MEAs.

O trabalho realizado contribui dessa forma para o desenvolvimento de tecnologias de registros de sinais para a neurobiologia, com ferramental fornecido pela Ciência de Computação e Engenharia Eletrônica.

1.1 Motivação

O instrumental envolvido no estudo de MEA é de custo elevado, não é produzido no Brasil e é de difícil obtenção em função das tarifas de importação que elevam ainda mais tais custos. Como

exemplo de fabricante, citamos *Multichannel Systems* na Alemanha (Systems, 2013) que tem uma extensa linha de equipamentos para registro de dados em MEA.

A importância da MEA no estudo dos conjuntos de células nervosas que crescem como culturas em laboratório está em anotar os registros da atividade espontânea e evocada, em forma de potenciais de ação dos neurônios (Potter, 2001), com grandes potenciais aplicações especialmente pela indústria farmacêutica.

A MEA é também precursora do neuroimplante, para finalidades médicas de substituir membros humanos perdidos (braços, pernas) por equivalentes robóticos, sendo necessário o estudo prévio dos sinais elétricos produzidos pelo neurônios.

A relevância do trabalho realizado e descrito nesta dissertação é relativo ao desenvolvimento de um sistema completo de aquisição de dados para registros de sinais elétricos de cultura de neurônios *in vitro*, bem como para um adequado tratamento dos problemas inerentes à implementação dos circuitos eletrônicos envolvidos e apresentação dos resultados dos ensaios efetuados em protótipos de modelos físicos.

Outro exemplo de aplicação para o sistema cuja construção é descrita neste trabalho é na implementação de Interfaces BCI (*Brain-Computer Interface*). Com os amplificadores descritos neste trabalho é possível também monitorar sinais de EEG, o que além de possibilitar o diagnóstico médico de diversas patologias relacionadas ao funcionamento do cérebro, permite também controlar dispositivos diversos a partir de ondas cerebrais.

1.2 *Objetivos: Principal e Subjacentes*

Esta dissertação de mestrado teve como objetivo principal a modelagem e projeto de um Sistema de Registro de Sinais de Neurônios (SRSN) em MEA, isto é, um sistema completo de aquisição e registro de dados de atividades elétricas espontâneas e evocadas de neurônios *in vitro* em MEA, incluindo toda a eletrônica e o software necessário.

Como objetivos subjacentes deste trabalho, destacam-se o desenvolvimento de:

- (1) Soquete específico para MEA padrão fabricada pela *Multichannel Systems*- Alemanha (Systems, 2013);
- (2) Pré-amplificador e filtros para o estágio de pré-amplificação após a captação dos sinais pelos terminais do soquete;

- (3) Amplificador e conversor analógico/digital;
- (4) Subsistema de transmissão de sinais para o computador via interface serial USB;
- (5) Para o teste inicial do sistema projetado, projeto e construção de um simulador de MEA, que consiste num gerador de sinais com a mesma configuração de contatos da MEA, chamado Sim-MEA.

1.3 Principais Contribuições

Normalmente, os sistemas de registro de sinais biológicos de neurônios *in vitro*, utilizados em laboratórios nacionais e internacionais, são produtos comerciais como os produzidos pela Multi-Channel Systems (Systems, 2013). Uma das principais contribuições deste trabalho é o desenvolvimento de projeto alternativo para o registro de sinais biológicos, levando-se em consideração a possibilidade de ajuste para as características de relação sinal/ruído e taxa de aquisição, em conformidade com os sinais produzidos pelas MEAs. Devido a flexibilidade de ajuste de características, esse mesmo projeto pode ser aproveitado para outros sistemas semelhantes como de EEG (Eletroencefalograma) ou ECG (Eletrocardiograma), com pequenas mudanças.

1.4 Organização do Trabalho

Esta dissertação está dividida em 9 capítulos, referências bibliográficas e 7 apêndices, cujos capítulos abordam:

- 1) Motivação sobre a pesquisa realizada;
- 2) Fundamentos sobre sistemas nervosos, neurônios e MEA: trata de conceitos biológicos, de neurofisiologia e dos tipos de matrizes de multieletrodos disponíveis para estudos.
- 3) Revisão bibliográfica sobre hardware: soquetes, amplificador, gerador de sinais e sistemas de conversão analógico/digital são discutidos e também é apresentada neste capítulo uma resenha dos produtos comercialmente disponíveis.
- 4) Apresenta uma descrição global do projeto implementado e apresentado nesta dissertação.
- 5) Descreve o projeto do soquete do MEA, simulação e construção dos pré-amplificadores (*headstage*) e filtros;

- 6) Descreve o projeto, simulação e construção sistema de aquisição de dados, detalhando os multiplexadores, conversores A/D e conversor USB;
- 7) Descreve os códigos-fontes, simulações e testes do *software* de aquisição de dados, escritos em MATLAB e em Processing e também descreve o projeto do simulador SIM-MEA;
- 8) Resultados experimentais obtidos: apresenta os testes elétricos efetuados no soquete elétrico, pré-amplificador (*headstage*) e filtros, com as medidas de ruídos; teste dos amplificadores, conversor analógico/digital, bem como o desempenho de diversas versões do *software* de aquisição de dados, e, finalmente
- 9) a conclusão final do trabalho na qual são revisitadas as conclusões pontuais relativas às atividades realizadas ao longo do trabalho.

Finalizando o texto, constam as referências bibliográficas e os apêndices, cujo conteúdo é resumido a seguir:

- 1) O apêndice A refere-se ao detalhamento da construção de protótipos das partes do SRSN, e do simulador de MEA, Sim-MEA, incluindo os diagramas esquemáticos e ilustrações fotográficas;
- 2) O apêndice B, diz respeito à Ressonância Estocástica (RE), incluído com a finalidade de divulgar um assunto potencialmente explorável;
- 3) O apêndice C descreve os ruídos em amplificadores, as origens, e o papel dos filtros para a redução dos mesmos;
- 4) No apêndice D são disponibilizados todos os códigos-fontes para os interessados na verificação dos detalhes de programação em diversos estágios do protótipo e simulador;
- 5) O apêndice E refere-se ao artigo submetido à Conferência International ISIE 2013 e comprovante de aceitação; e
- 6) O apêndice F foi incluído com o intuito de esclarecer alguns detalhes de manipulação do *software* MeaBench (MeaBench, 2013).

Capítulo 2 - Fundamentos sobre Neurônios, Sistema Nervoso e MEA

Este capítulo está dividido em nove seções. Na Seção 2.1 é feita uma breve revisão sobre neurônios e sistema nervoso. Na Seção 2.2 é apresentado um histórico resumido sobre o desenvolvimento da MEA ao longo dos últimos 40 anos. Na Seção 2.3 o conceito de *spike* é explicado e na seção 2.4 o conceito de bursts é introduzido. Na Seção 2.5 são abordados tanto a gravação quanto a estimulação elétrica usando MEA. A Seção 2.6 detalha os diferentes tipos de MEA. Seção 2.7 relaciona algumas das principais vantagens no uso da MEA e a Seção 2.8 contrapõe as desvantagens. Finalmente, na Seção 2.9 é apresentada uma importante aplicação prática em farmacologia, relacionada na literatura.

2.1 Revisão sobre Neurônios e Sistema Nervoso

O neurônio é a célula responsável pela condução do impulso nervoso, que é um impulso elétrico. É a unidade básica do cérebro e do sistema nervoso sendo que o ser humano possui cerca de 100 bilhões dessas células. É constituído pelas seguintes partes: corpo celular ou núcleo, axônio e dendritos. O axônio é um prolongamento do corpo celular e transmite o impulso nervoso vindo do corpo celular (ou núcleo) e os dendritos são prolongamentos numerosos e curtos do corpo celular, que recebem as mensagens vindas do axônio de outros neurônios.

Sinapses são pontos de encontro entre as extremidades de neurônios vizinhos. A sinapse é constituída pela membrana pré-sináptica, fenda sináptica e membrana pós-sináptica (Purves, 2010). Fenda sináptica é o espaço entre o dendrito de um neurônio e o axônio de outro. Os sinais são transportados através das sinapses com a interferência de substâncias químicas chamadas neurotransmissores, dentre os quais destacam-se serotonina, dopamina, acetilcolina, glutamato, aspartato, noradrenalina e endorfinas.

Quando o neurônio está em repouso apresenta uma tensão elétrica (diferença de potencial, ddp) entre o seu citoplasma e o líquido extracelular, criada devido ao acúmulo de íons potássio (K^+) e sódio (Na^+), que ocorre pela ação de mecanismos celulares denominados "bombas" os quais criam uma

diferença de concentração. Esta diferença de concentração é controlada por canais de K^+ e de Na^+ , gerando uma tensão negativa (em torno -58 mV no interior de neurônios humanos), que pode variar entre espécies. Esse estado de polarização do neurônio dura até que um potencial de ação abre os canais de K^+ e de Na^+ , alterando a concentração dos íons. Esta modificação gera um potencial positivo dentro do neurônio, chegando aos $+40$ mV ou mais (dependendo do neurônio). Este desequilíbrio gera um efeito cascata, que é o potencial de ação. Usualmente o potencial de ação inicia no começo do axônio, dura em torno de 1 ms e se propaga até as fendas sinápticas, gerando a descarga de neurotransmissores (Purves, 2010). Esses neurotransmissores atuam na fenda sináptica de modo a possibilitar a abertura ou fechamento de canais iônicos. Após ter ocorrido o potencial de ação, imediatamente os canais de K^+ e de Na^+ começam a restabelecer o equilíbrio anterior.

O neurônio necessita de um intervalo de tempo da ordem de 1 ms para reconstituir seu estado pré-descarga, e durante este tempo ele não consegue efetuar outro potencial de ação. Este período de latência chama-se período refratário. Logo em seguida, o neurônio adquire sua capacidade para efetuar outro potencial de ação, estabelecendo um ciclo (Purves, 2010).

A Figura 2.1 mostra o esquema de um neurônio. Nesse diagrama, o corpo celular, ou núcleo, é visto na parte esquerda, envolvido pelas ramificações assinaladas como dendritos; o axônio é assinalado ao lado do corpo celular e se estende até a extremidade direita; ao redor do axônio são vistas outras células como de *Schwann*, também conhecidas como bainha de mielina, separadas por nós denotados como nodos de *Ranvier*.

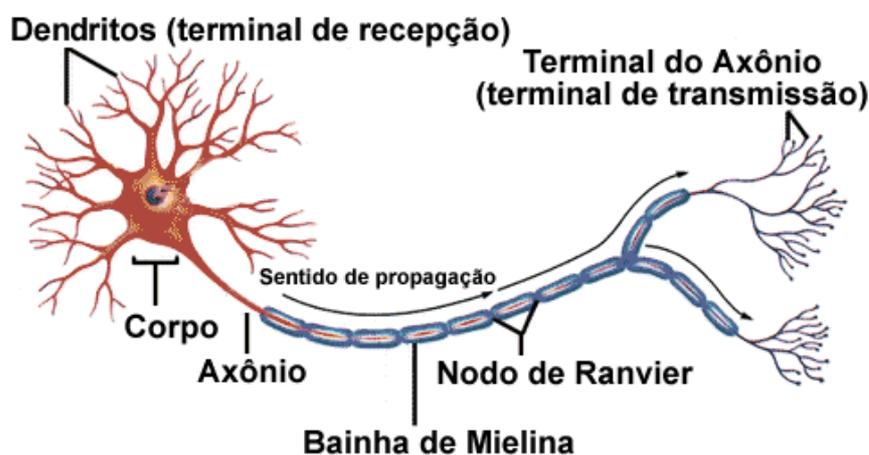


Figura 2.1: Diagrama ilustrativo de um neurônio. Imagem obtida de (Purves, 2010).

Além dos neurônios, o tecido nervoso é composto também pela glia (ou neuroglia). Os gliócitos são células não-neuronais que proporcionam suporte e nutrição aos neurônios. Durante muito tempo se acreditou que, embora as células da glia apareçam em quantidade nove vezes maior do que os neurônios, serviam apenas para alimentar os neurônios e mantê-los no seu lugar. Hoje acredita-se que as células da glia são capazes de modificar os sinais nas fendas sinápticas entre os neurônios, fornecem nutriente e oxigênio para eles, isolam um neurônio do outro, destroem germes invasores e removem células mortas. As células da glia mantêm a homeostase do tecido nervoso, formam mielina e participam na transmissão de sinais no sistema nervoso, podendo influenciar o local da formação das sinapses. Podem ser essenciais para o aprendizado e para a construção da memória, além de importantes na recuperação de lesões neurológicas (Junqueira e Carneiro, 2004).

Os neurônios adultos normalmente não se reproduzem. Um tumor no cérebro, por exemplo, é um tumor de células da glia, pois estas podem se reproduzir. Neurônios não formam, de modo geral, câncer no cérebro (Junqueira e Carneiro, 2004), exceto os raros casos de neuroblastomas (Guyton e Hall, 2006). As células da glia são basicamente de 4 tipos: micróglia, astrócitos, oligodendrócitos e glioblastos. As micróglias são macrófagos especializados, capazes de fagocitose, que protegem os neurônios. São as menores de todas as células gliais e correspondem a 15% de todas células do tecido nervoso. Da micróglia fazem parte as células ependimárias e as células de Schwann. Os outros tipos de glias são classificados como macróglias e podem ser: astrócitos, oligodendrócitos e os glioblastos, cada uma com funções específicas (Guyton e Hall, 2006).

A célula nervosa cuja terminação do axônio se conecta ao corpo ou ao dendrito de outro neurônio é chamada neurônio pré-sináptico. Um único neurônio pode fazer algumas unidades ou até centenas de milhares de conexões (Guyton e Hall, 2006). O neurônio afetado denomina-se neurônio pós-sináptico (Kandel E.R.; Schwartz, 2000). Atividade basal é a atividade elétrica que ocorre no tecido nervoso quando o organismo se encontra em repouso e corresponde ao ruído biológico em repouso (Junqueira et al., 2004).

2.2 Histórico do Desenvolvimento das MEAs

Matriz de microeletrodos (ou multieletrodos), MEA, é um substrato de vidro, plano, sobre o qual são desenhadas as trilhas de um circuito elétrico, usando as mesmas técnicas usadas para fabricar

circuitos integrados em eletrônica. Geralmente, a técnica empregada para a transferência do desenho para o vidro é a litografia de raios X (Seabra, 1997). Esse circuito elétrico é composto de uma matriz com várias “ilhas” (ou eletrodos) feitas em ouro e revestidas com platina preta. Cada um desses pequenos eletrodos costuma ter um diâmetro em torno de 30 μm e uma separação da ordem de 200 μm entre eletrodos adjacentes, que varia conforme o modelo de MEA. O uso do revestimento de platina preta tem por finalidade reduzir a impedância elétrica da conexão com o meio de cultura (Blum, 2007). O substrato no qual é construída a MEA é normalmente transparente (vidro), adequado para ser visto e fotografado em microscópios invertidos, de fluorescência, confocal ou de varredura dupla (Potter e De Marse, 2001).

Em 1972, Thomas publicou o primeiro artigo descrevendo o uso da MEA para registrar os sinais elétricos obtidos de cultura de células (Thomas, 1972). A MEA desenvolvida por Thomas tinha apenas duas colunas com 15 eletrodos, cada um com 7 μm de diâmetro, espaçados de 100 μm entre si. Esta foi usada com cultura de neurônios de gânglios da espinha dorsal de frangos recém-nascidos. Tais experimentos, inicialmente, não foram bem sucedidos e o insucesso foi atribuído ao fato de tais neurônios terem sido cultivados sobre uma camada de glia (Taketani e Baudry, 2006). Como se sabe hoje, a glia, embora seja o tecido que fornece suporte mecânico e nutre os neurônios, prejudica a propagação do sinal elétrico, agindo como isolante (Junqueira e Carneiro, 2004). Removendo a camada de glia, Thomas e colaboradores conseguiram registrar sinais elétricos de amplitude que variava entre 20 e 1000 microvolts, a partir de culturas de células de miócitos (células que constituem os músculos). O registro do sinal elétrico de um neurônio isolado ainda não foi possível na época.

Em 1977, sem conhecer o trabalho anterior do grupo de pesquisadores liderados por Thomas, Guenter Gross e sua equipe desenvolveram um novo modelo de MEA, com 36 eletrodos distanciados de 100 ou 200 μm entre si e com diâmetro de 10 μm (Gross, 1977). Novas técnicas foram usadas para produzir essa MEA como, por exemplo, o uso de pulsos de laser ultravioleta para desbastar a área dos eletrodos e isolamento usando polímeros termoajustáveis (Taketani e Baudry, 2006). Com tais melhoramentos, foi possível gravar sinais de redes de neurônios com amplitude da ordem de 3 mV (Gross, 2011).

Em 1980, Jerome Pine e colaboradores conseguiram registrar pela primeira vez o sinal elétrico de um único neurônio dissociado (Pine, 1980). Foi usada uma MEA com duas linhas de 16 eletrodos de ouro cada, banhados a platina e isolados com dióxido de silício. Pine e colaboradores deixaram crescer neurônios de gânglio cervical superior de ratos durante 3 semanas na cultura, sobre um substrato de fibra de colágeno com 3 a 5 μm de espessura. Tais neurônios formaram uma rica rede de interconexão

com os eletrodos. Dessa forma, Pine e colaboradores conseguiram registrar sinais com amplitude média de 50 μV com relação sinal-ruído que variava entre 5:1 e 15:1. Foi da equipe de Pine a primeira experiência em aplicar estímulos elétricos na MEA e registrar a resposta ao potencial evocado (Pine, 1980).

Em 1981, Jobling e colaboradores desenvolveram uma MEA de 9 eletrodos na qual cada eletrodo era o *gate* (porta) de um transistor de efeito de campo (Field Effect Transistor – FET) feito sobre um chip de silício. A vantagem do uso de transistores FET na MEA é que tais dispositivos permitem o controle de corrente entre dreno e fonte através da tensão aplicada no *gate* e com isso tornaram o sinal a ser registrado muito mais intenso, melhorando assim a relação sinal-ruído (Jobling et al., 1981). Jobling registrou sinais de cortes de fatias de hipocampo, enquanto estimulava a fatia com um eletrodo convencional (Whitson, 2006).

Em 1986, Wheeler and Novak desenvolveram outro modelo de MEA passiva (isto é, sem transístores) de 32 eletrodos, numa matriz de 8x4 e levaram adiante vários importantes experimentos adicionando picrotoxina na cultura e relatando os efeitos inibitórios da substância (Wheeler and Novak, 1986). Picrotoxina é um forte estimulante usado para reverter os efeitos de uma intoxicação por tranquilizantes como, por exemplo, barbitúricos. Pela primeira vez, foi relatado o uso da MEA para testes em farmacologia.

Em 1989, Meister e colaboradores usaram a MEA desenvolvida por Pine para estudar atividade elétrica de cultura de células de retina de salamandra quando iluminada (Meister et al., 1989, 1994). Observaram assim um interessante padrão de emissão de *spikes* quando tais células eram iluminadas. Os experimentos foram repetidos com células de retina de furão (*Mustela putorius furo*, animal doméstico da família dos marsupiais) e de gatos recém-nascidos.

Em 1995 os laboratórios NTT do Japão desenvolveram MEAs de 64 eletrodos para experimentos com culturas de neurônios corticais dissociados (Taketani e Baudry, 2006) e um dispositivo foi desenvolvido com a finalidade de manter a cultura viva por várias semanas, de tal maneira que o desenvolvimento da cultura e as topologias das redes de neurônios formadas pudessem ser fotografadas usando microscópio adequado ao longo do tempo (Soussou et al., 2006).

Em 1996 o fabricante Multi Channel Systems (MCS) de Reutlingen na Alemanha (Systems, 2013), tornou comercialmente disponível o MEA60 System, um sistema completo para aquisição de dados em matrizes multieletrodo, além de uma extensa linha de MEAs em vários modelos que, hoje, estão disponíveis a preços razoavelmente elevados. Seguiram-se a ele outros fabricantes, tais como

Ayanda Biosystems AS (Suíça), Qwane Biosciences AS, Alpha MED Scientific Inc. (Japão); entretanto, MCS detém até hoje a maior fatia do mercado de produtos para essa linha de pesquisa.

No ano de 1999 Maher e colaboradores desenvolveram um neuro-chip com a finalidade de produzir estímulos sobre um único neurônio e medir a resposta dos demais neurônios participantes da rede. A versão inicial era uma matriz de 4x4 sobre uma pastilha de silício (Maher et al., 1999).

Atualmente (2013) um laboratório de pesquisas em MEA está sendo implantado na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS), na Faculdade de Física, coordenado pelo Prof. Dr. Ricardo Meurer Papaléo, merecendo destaque o trabalho da pesquisadora Carolina de Barros Vidor. Neste trabalho, a caracterização da MEA foi realizada através da obtenção de imagens por microscopia óptica e por microscopia eletrônica de varredura, além de análise qualitativa de composição química através de espectroscopia de raios x por energia dispersiva. A implementação de procedimentos de medida exigiu a construção de um interfaceamento eletrônico entre a MEA e o sistema de aquisição de dados. Esse interfaceamento se mostrou eficiente para a realização de um teste preliminar de utilização da MEA. O teste foi realizado a partir da estimulação elétrica de células mesenquimais em cultura retiradas de medula óssea humana, após a aplicação de um protocolo de neurodiferenciação (Vidor, 2012).

Destacam-se também os trabalhos efetuados no ano de 2013 na Universidade Federal de Uberlândia (UFU) pela equipe do prof. Dr. João Batista Destro Filho e da professora Dra. Celina Lotufo, no laboratório de estudos da Dor, com o cultivo de neurônios de ganglios dorsais de ratos Wistar (Destro, 2013).

2.3 Eficiência, Produção e Consumo de Energia do Tecido Nervoso

Um ser humano adulto produz e consome, em atividade normal, aproximadamente 120 W de potência (120 joules/segundo). Se o coração é responsável pelo gasto de cerca de 10% da energia consumida, então o coração consome cerca de 12 W (Guyton, 2006). A produção de energia do corpo humano é bastante eficiente: cerca de 1,5 W/kg. Comparando essa taxa com a taxa de produção do Sol: a estrela produz cerca de 4×10^{26} W. Mas a massa do Sol é de 2×10^{30} kg, o que resulta em uma produção de apenas 0,0002 W/kg. A relação Energia/Massa é muito menor na estrela do que no corpo humano, o que evidencia a extrema eficiência termodinâmica dos organismos dos mamíferos.

O cérebro é responsável por consumir 20% da energia do corpo humano, cerca de 24 W. O córtex predomina na superfície exterior do cérebro. A área de superfície do cérebro possui cerca de 1.500 cm² a 2.000 cm², que é aproximadamente de duas páginas de um jornal. Para fazer essa área caber dentro do crânio, o córtex é dobrado, formando pregas (giros) e sulcos. Vários grandes sulcos dividem o córtex em diferentes lobos: o lobo frontal, o lobo parietal, o lobo occipital e o lobo temporal (Guyton, 2006). Se o cérebro consome 24 W de potência e possui área de superfície média de 0,2 m² então, a taxa de consumo energético médio do tecido nervoso é dada pela equação (1):

$$E = \frac{24}{2000} = 0,012 (W / cm^2) \quad (1)$$

Considerando que o diâmetro de cada eletrodo da MEA padrão é de 30 μm , a área do eletrodo é da ordem de $7 \times 10^{-6} cm^2$, então, substituindo essa área na equação (1), conclui-se que a energia consumida e gerada por área de tecido nervoso submetida a ação de cada eletrodo é de apenas aproximadamente 84 nW. São estes os níveis médios de energia elétrica com que o amplificador de sinais desenvolvido nesta dissertação deve trabalhar.

2.4 Spikes e Bursts

Spikes são picos de atividade elétrica de neurônios e grupos de neurônios. Um sinal elétrico gravado a partir da MEA possui picos e outra parte sem atividade elétrica denominada ruído biológico. Os *softwares* de aquisição e registro de dados calculam o desvio padrão do ruído biológico da atividade basal do tecido nervoso. Para detectar um *spike* é preciso estabelecer um limiar que é calculado como sendo um múltiplo do desvio padrão, conforme ilustrado graficamente na Figura 2.2.

É dessa forma que os *softwares* de computador, que fazem o registro da atividade elétrica detectada via MEA, identificam *spikes* (Rodriguez, 2012).

Um *burst* é uma sequência de 5 a 10 *spikes* cuja duração é calculada como sendo a soma de todos os intervalos entre *spikes* contidos no mesmo. Como cada *burst* é caracterizado por um certo número de *spikes*, os softwares de registro de dados permitem definir um número mínimo de *spikes* que caracterizam um *burst*. Decorre da definição que *spikes* de um mesmo *burst* encontram-se muito próximos entre si.

Tais *softwares* permitem também definir espaçamento temporal mínimo para considerar se um determinado *spike* pertence ao *burst* ou não. Esse intervalo de separação entre os *bursts* também pode ser definido pelo usuário nos softwares de registro. Intervalos entre *bursts* têm duração mínima de 100 ms tipicamente, podendo variar segundo o tipo de cultura de neurônios (Rodriguez, 2012).

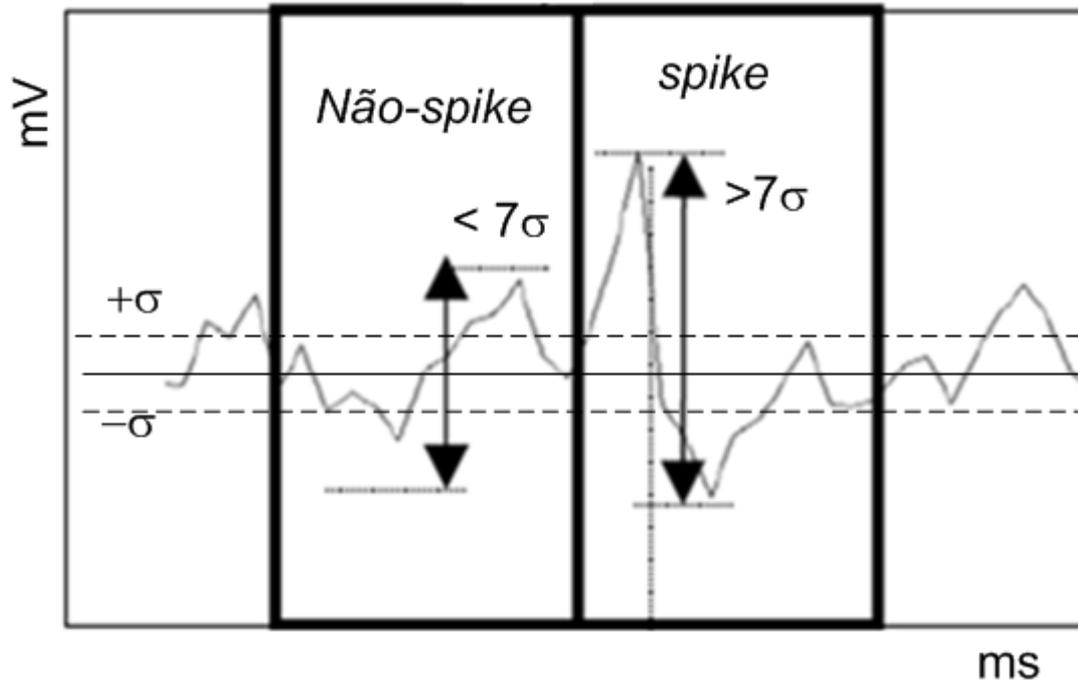


Figura 2.2: O limiar do *spike* é calculado como um múltiplo do desvio padrão da atividade basal.

São parâmetros importantes para o estudo dos sinais registrados em MEA (Martinóia, 2004):

Quanto aos *spikes*:

- Número total de *spikes*;
- Quantidade de *spikes* que formam *bursts*;
- Porcentagem de *spikes* aleatórios;
- Frequência média de *spikes* em um *burst* (*spikes*/segundo);

Quanto aos *bursts*:

- Taxa média de *bursts* (*bursts*/minuto);
- Número total de *bursts*;

- c) Média de *spikes* por *bursts*;
- d) Duração dos *bursts* (ms);
- e) Intervalo entre *bursts* (segundos).

A Figura 2.3 mostra uma janela correspondente a um único canal do sinal registrado em MEA padrão, na qual os *spikes* estão marcados com um "+". Os *softwares* devem ser capazes de projetar trechos da janela em "zoom" (ampliação) para permitir um melhor estudo dos intervalos e amplitudes dos *spikes*, como mostrado na parte destacada à direita da Figura 2.3.

A detecção dos *spikes* (reconhecimento destes em meio ao registros) é de suma importância para a análise dos dados. Dessa forma, o janelamento deve ser pequeno o suficiente para pegar toda a extensão de um *spike*. A detecção errada de *spikes* leva a dados inválidos ao final da análise. Na figura 2.4 definimos:

- a) ISI, Intervalo entre *spikes* consecutivos;
- b) IBI, Intervalo entre dois *bursts* consecutivos.

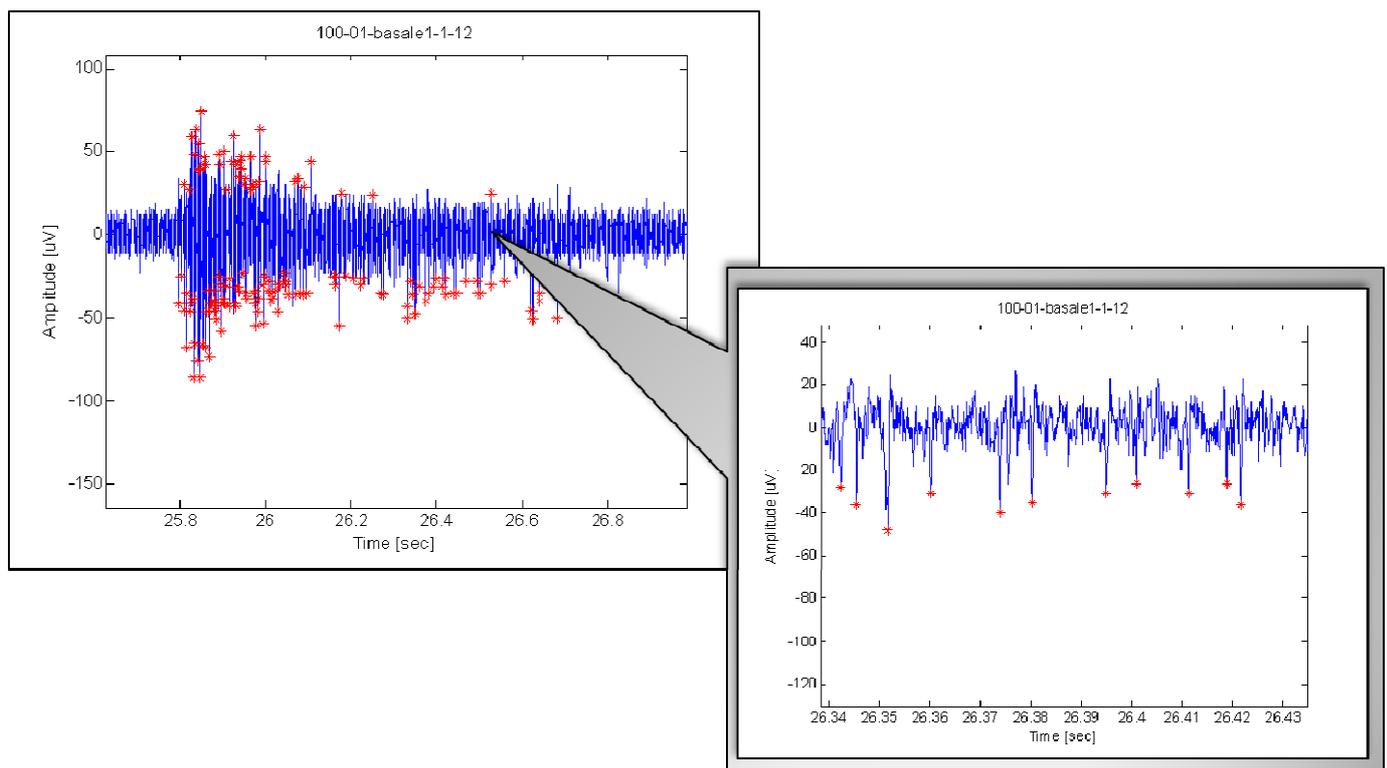


Figura 2.3: Registro de um único canal é mostrado (à esq.), com ampliação (zoom) do trecho apontado pela seta, à direita. Figura obtida de (Wagenaar, 2005).

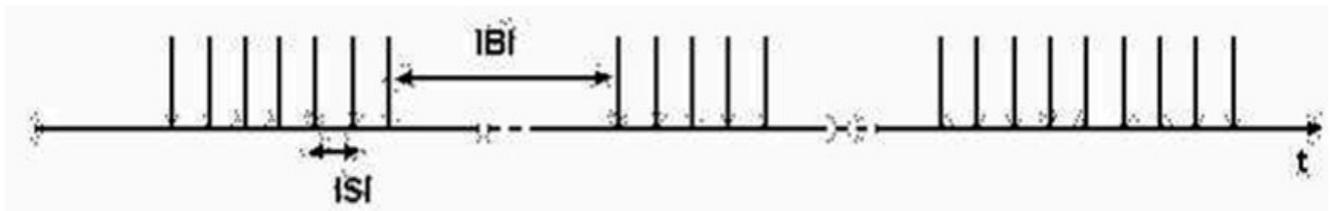


Figura 2.4: Esquema mostrando ISI (Intervalo entre *spikes*) e IBI (Intervalo entre *bursts*). Figura obtida de (Wagenaar, 2005).

Os *softwares* de aquisição e registro de dados devem ser capazes de identificar e medir ISI e IBI nos sinais registrados. A investigação do comportamento de *spikes* tem por foco a informação contida nestes, bem como no atraso entre dois *spikes* consecutivos. Também existe informação relevante no intervalo de tempo entre os *bursts*. Em circuitos eletrônicos digitais, a informação pode ser processada de modo similar ao que ocorre nos tecidos nervosos biológicos, usando-se uma técnica denominada PWM (Pulse Width Modulation) ou Modulação por Largura de Pulsos. Variando o intervalo de tempo entre os pulsos, o PWM carrega informações que podem ser transformadas para o domínio analógico. Neurônios disparando *spikes* assemelham-se a geradores PWM em eletrônica.

2.5 Gravações e Estímulos na MEA

A MEA atua como uma interface bioeletrônica do mundo biológico com o eletrônico e vice-versa. As células neurais em tecidos (fatias) ou dissociadas são colocadas sobre um circuito elétrico (Rutten, 2001). Os eletrodos da MEA são também usados para estimulação elétrica extracelular *in vitro*, aplicando pulsos controlados de tensão ou corrente nos eletrodos. Pode-se medir e registrar, através do computador, a resposta ao estímulo elétrico evocado ou, então, o sinal elétrico espontâneo gerado pelas células. A distribuição espacial da tensão elétrica sobre uma camada de tecido condutor acima da superfície dos eletrodos da MEA é registrada em relação ao eletrodo de referência localizado na solução de perfusão, conforme mostra a Figura 2.5.

É importante citar que os microeletrodos possuem tamanho reduzido (diâmetro máximo de 30 μ m) e cada microeletrodo pode medir, efetivamente, sinais de um único neurônio ou, no máximo, alguns neurônios. Os axônios sozinhos não conseguem cobrir significativamente a área de um eletrodo; uma boa parte do corpo celular do neurônio, portanto, precisa estar em contato com a superfície do microeletrodo. Na verdade, não é necessário que os eletrodos efetivamente se liguem aos neurônios, mas sim que estejam bem próximos a estes, pois o acoplamento é capacitivo (Blum, 2007) bastando

uma certa proximidade para que uma baixa impedância seja gerada, uma vez que a capacitância é inversamente proporcional à distância.

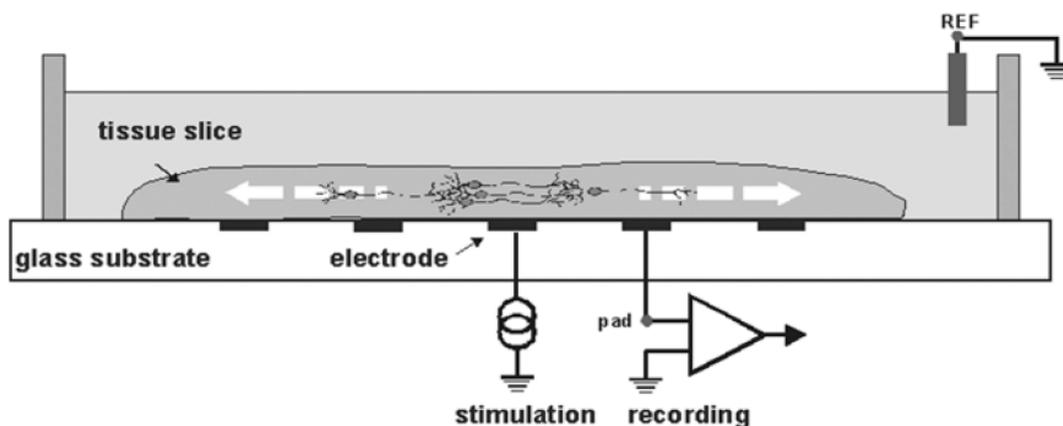


Figura 2.5: Esquema mostrando estimulação e registro da atividade elétrica em fatias de tecido com MEA (Potter, 2001).

A atividade originada pelo tecido pode ser gravada com alta resolução espacial (com um grande número de eletrodos dispostos em uma pequena área) e temporal (gravações são efetuadas com pequenos intervalos de tempo entre si), o que gera uma enorme quantidade de dados e exige grandes espaços de armazenamento em computador (Stett et al., 2003). Uma quantidade significativa de microeletrodos pode permanecer inativa na cultura, dependendo da forma como ela se desenvolve (Ziegler, 2000). Por outro lado, um único eletrodo pode gravar sinais oriundos de vários neurônios e tais sinais precisam ser identificados e classificados (Rodriguez, 2012). O objetivo genérico de gravações usando microeletrodos é identificar as interações entre os neurônios e sua modulação, em resposta a algum estímulo. Alguns pesquisadores procuram a função de transferência da rede de neurônios, tentando buscar um modelo que se aproxima de um circuito elétrico puro (Martinóia, 2004).

2.6 MEA - Características, Limitações e Principais Tipos

MEA Padrão: A MEA denominada de padrão, fabricada pela Multi Channel System, possui 60 eletrodos em um *layout* de uma matriz 8×8 sem os microeletrodos nos vértices, como mostrado na figura 2.6. Tais microeletrodos podem ser redondos (de titânio) e o material isolante que cobre as trilhas condutoras é de nitrito de silício. Esse tipo de MEA é utilizado em múltiplas aplicações de registro de sinais eletrofisiológicos: cultura de neurônios dissociados ou fatias de tecido localizados diretamente sobre os eletrodos. Os microeletrodos ficam concentrados no centro, na região delimitada pela circunferência em vermelho, do reservatório de vidro, e tem uma disposição conforme mostrado em destaque na metade direita da Figura 2.6.

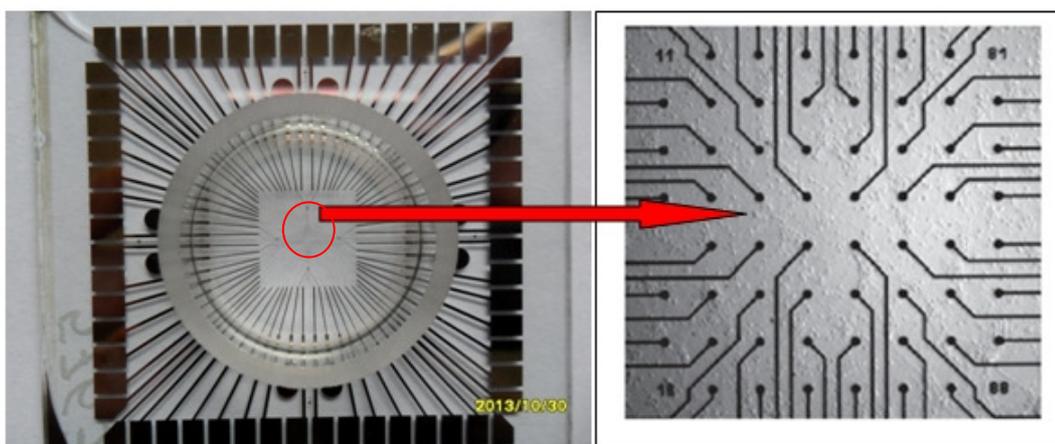


Figura 2.6: MEA padrão e a região central onde se localizam os microeletrodos.

MEA Fina: Enquanto o substrato de vidro da MEA padrão tem uma espessura de 1 mm, a MEA fina possui um substrato com uma espessura de 180 μm e permite que a cultura seja observada por microscópios invertidos. Serve para combinar registro de atividades elétricas com imagens das redes neuronais cultivadas. Microscópios invertidos possuem lentes objetivas com abertura focal muito pequena, o que os torna apropriados para fotografar a imagem da cultura de células na MEA (Figura 2.7).

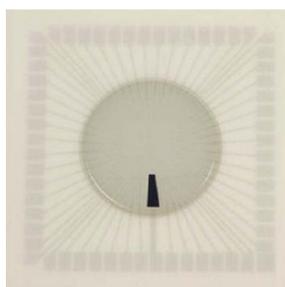


Figura 2.7: MEA Fina (*thin*), imagem obtida de (Systems, 2013).

MEA de Alta Densidade: A MEA de alta densidade (Figura 2.8) possui uma quantidade muito maior de eletrodos, 256 eletrodos numa matriz 16 \times 16. O distanciamento entre eletrodos adjacentes também é menor (exemplo, 100 μm). Possui maior precisão para medir atrasos de tempo na propagação dos pulsos nas sinapses ou na velocidade de condução, porém exige equipamentos com muito mais canais de amplificadores para efetuar o registro.

MEA Flexível (FlexMEA): Gravações multi-canais *in vivo* exigem uma abordagem diferente. MEA Flexível foi desenvolvida por Multi Channel Systems e está sendo usada, por exemplo, para

gravar eletrocorticogramas de superfície do córtex de ratos e para estimular eletricamente a mesma região (Molina-Luna e al., 2009).

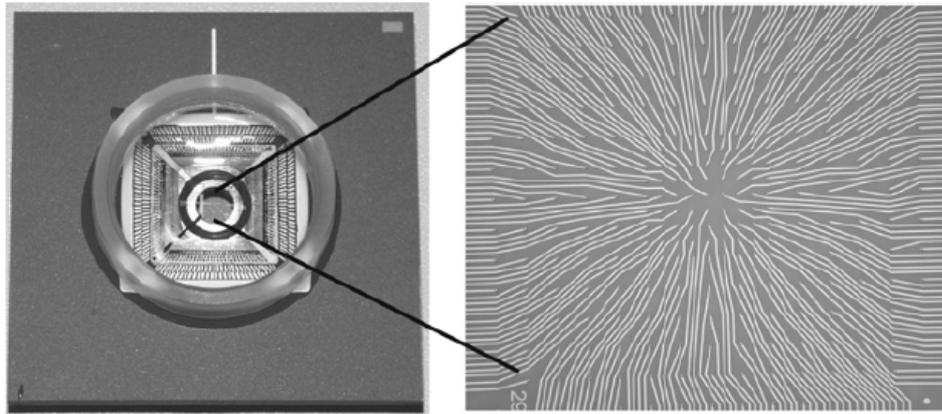


Figura 2.8: MEA256, obtida de (Systems, 2013).

A seguir são enumeradas algumas características de MEAs, para o registro de sinais eletrofisiológicos:

- a) Permite experiências em neuroregeneração;
- b) Permite estudar a biologia do desenvolvimento do tecido nervoso;
- c) Possibilita estudar o ritmo circadiano (Klisch e al., 2009);
- d) Permite o registro de potenciais de ação prolongados, microencefalogramas e microretinogramas;
- e) Permite a investigação da ação de drogas em farmacologia, em experimentos *in vitro*, simplesmente aplicando-se drogas sobre a cultura de neurônios em MEA e observando as mudanças na atividade elétrica.

Algumas limitações das MEAs para o registro de atividade elétrica extracelular são as seguintes:

- a) Pequenas amplitudes de gravações quando comparada com a instrumentação convencional, como por exemplo, equipamentos de EEG (eletroencefalograma) e ECG (eletrocardiograma);
- b) Os eletrodos não podem ser removidos nem mudados de local, porque estão inseridos de modo fixo na placa de vidro.

- c) A durabilidade da cultura é limitada a algumas poucas semanas: exige cuidados com relação à nutrição e colocação de antibióticos para evitar infecções que destroem rapidamente o tecido vivo.

2.7 Exemplo de Usos de MEA

Um dos mais importantes usos atuais da MEA é na indústria farmacêutica. Experimentos ligados a testes de segurança de medicamentos são feitos *in vitro* usando-se MEA. Em neuroendocrinologia, MEA é usada para fazer estudos sobre a obesidade. Um estudo deste tipo é descrito resumidamente a seguir.

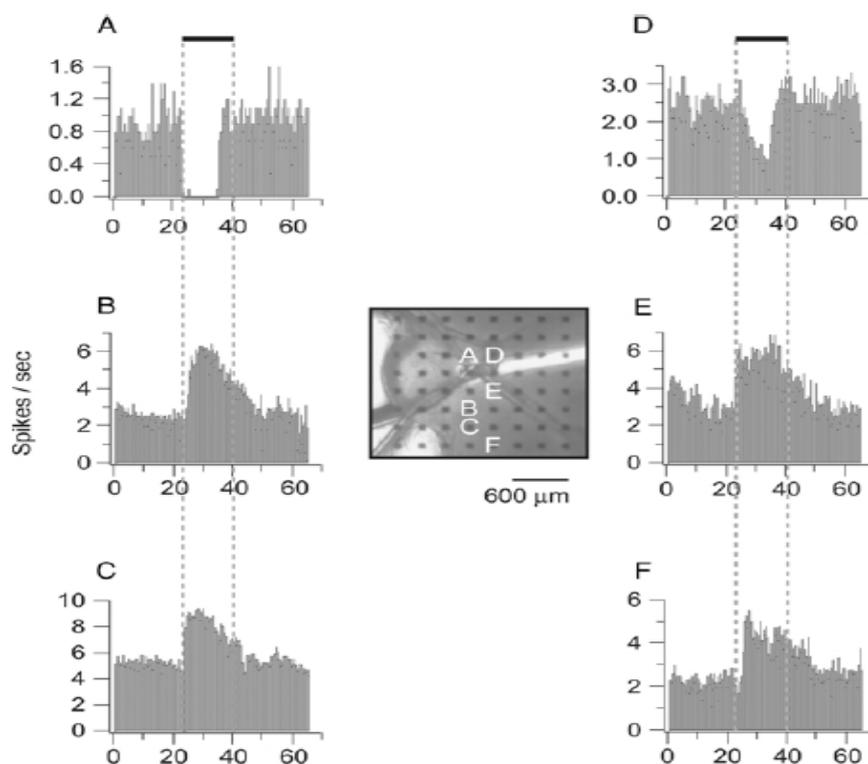


Figura 2.9: Registros elétricos feito em 6 eletrodos em fatia de hipotálamo de rato. Na Figura central cada ponto marcado com A, B, C, D, E e F é um microeletrodo. Figura obtida de (Whitson et al., 2006).

Sabe-se que o hipotálamo é um dos principais centros do cérebro que regulam a fome (Guyton e Hall, 2006). No centro da Figura 2.9 é mostrada uma fatia de hipotálamo de rato colocada em MEA de 64 eletrodos em matriz 8x8. Vários registros de sinais elétricos foram feitos simultaneamente a partir de locais diferentes na fatia (isso explica a necessidade de se usar vários eletrodos ao invés de um único). Depois de gravar uma taxa estável de disparos para cada eletrodo, 0,1 micro-Mol de Ghrelin (um

hormônio produzido pela parede do estômago e pelo hipotálamo, que estimula o apetite) foi adicionado à fatia de tecido. No intervalo entre 24 e 40 s, alguns eletrodos registraram um aumento na taxa de disparo e outros diminuíram sua taxa de disparo em função da aplicação do hormônio. Após a fatia ser lavada (para remover o hormônio) a taxa de disparo novamente se estabiliza. Observa-se que os eletrodos que registraram aumento no número de spikes entre 24 e 40 s são os eletrodos que se encontram nas regiões B, C, E e F, justamente onde os hormônios foram aplicados. Os eletrodos localizados nas regiões A e D, mais distantes do ponto de aplicação do hormônio, tiveram significativa redução do número de spikes/segundo. Fica dessa forma evidenciada a importância da MEA como um biosensor para testes *in vitro* de drogas com ação sobre o sistema nervoso.

Capítulo 3 - Aspectos sobre Hardware Utilizado em MEA

Neste capítulo é apresentada uma revisão bibliográfica sobre o equipamento usado para registro de sinais elétricos em MEA. Na Seção 3.1 é feita uma pequena introdução histórica sobre o registro de sinais elétricos em animais, passando pelas descobertas do ECG e EEG. Na Seção 3.2 é descrito especificamente o equipamento usado em laboratório de eletrofisiologia de MEA, detalhando cada item. Na Seção 3.3 é apresentado o gerador de estímulos em MEA.

3.1 *Breve Histórico*

A descoberta da atividade elétrica no corpo humano e dos animais remonta a 1765, quando o médico italiano Luigi Galvani, professor de anatomia da Universidade de Bolonha, descobriu que músculos e células nervosas eram capazes de produzir eletricidade, que ficou conhecida então como eletricidade galvânica. Mais tarde, Galvani demonstrou que essa eletricidade é originária de reações químicas no interior das células. Galvani trabalhou com músculos de rãs dissecadas (Guyton, 2006).

A história do eletrocardiograma (ECG) remonta ao século XIX. Acredita-se que o primeiro registro de eletrocardiograma em humanos tenha sido realizado em 1872, por Alexander Muirhead (1848-1920), engenheiro elétrico escocês especializado em telégrafo sem fio, em colaboração com o fisiologista britânico John Burdon Sanderson. A seguir, Augustus Waller dedicou-se ao estudo da atividade elétrica do coração, em Londres. Mas o grande avanço veio quando Willem Einthoven (1860-1927), médico e fisiologista holandês, inventou um sistema mais sensível e prático para registrar a atividade elétrica cardíaca. Em 1895, Einthoven distinguiu 5 deflexões no traçado de ECG, denominando-as por letras (P, Q, R, S, T) que foram consagradas e são utilizadas até hoje. Por sua criação do mecanismo do eletrocardiograma Einthoven recebeu o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 1924 (Kandel et al., 2000).

Em 1929, o psiquiatra alemão Hans Berger descobriu que o cérebro humano gerava um padrão de atividade elétrica capaz de ser registrada por meio de um amplificador eletrônico sensível, num

método por ele denominado eletroencefalograma (EEG). Em 1957, Gray Walter aperfeiçoou o EEG através de vários eletrodos pequenos, conseguindo assim identificar as várias ondas de funcionamento cerebral. Os equipamentos inicialmente usavam válvulas termo-iônicas como elementos amplificadores e registravam os sinais elétricos em rolos de papel ou, então, em tubos de raios catódicos semelhantes aos osciloscópios de telas de fósforo verde (Demott, W. D.,1960).

3.2 Equipamentos Usados para Registros de Sinais Elétricos de MEA

Um amplificador para sinais de MEA é muito semelhante a um amplificador para EEG ou ECG, porém necessita ter maior ganho porque, em geral, os sinais produzidos *in vitro* tem menor amplitude do que aqueles captados *in vivo* (Potter, 2001). A Figura 3.1 ilustra um laboratório para o registro e estimulação de sinais elétricos em MEA rodando um experimento que usa o *software* DS-MED para avaliar a ação de medicamentos sobre MEA.

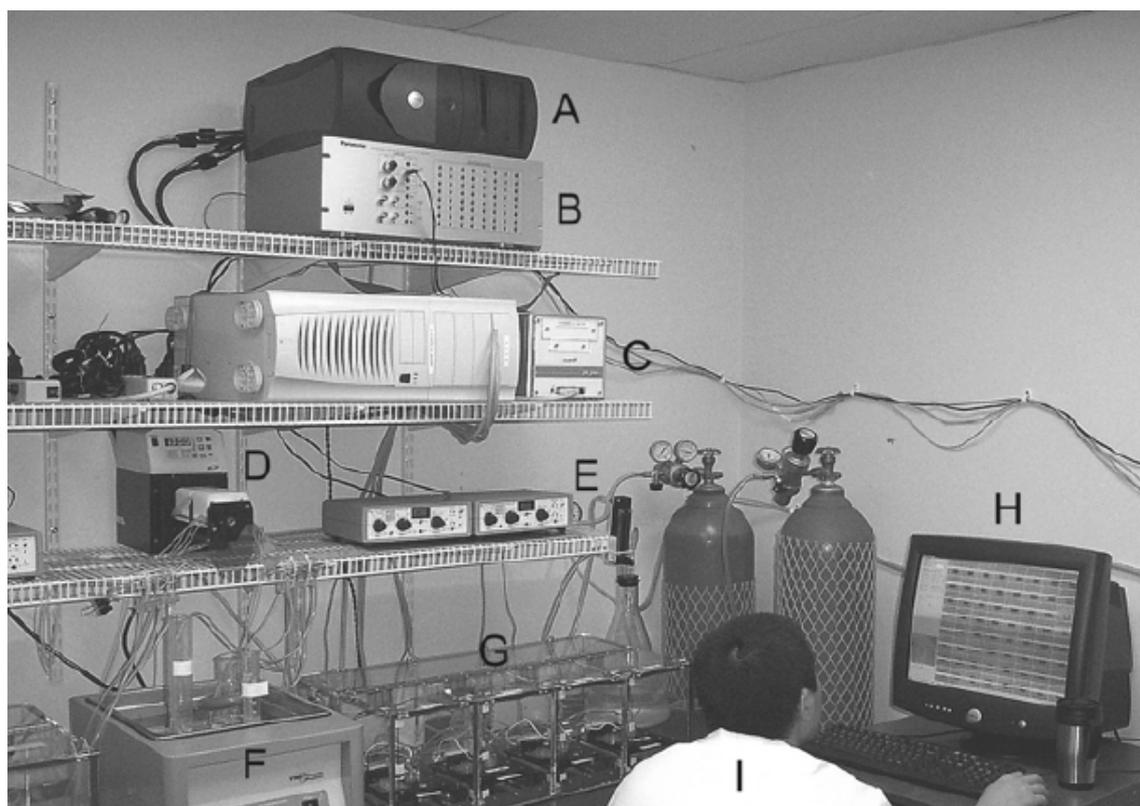


Figura 3.1: Laboratório de MEA completo. Imagem de (Taketani e Baudry, 2006).

Na Figura 3.1 as letras de A até H identificam os seguintes componentes:

- A- Computador PC no qual o *software* de registro de dados está sendo executado para controle e monitoramento do experimento;
- B- Amplificador de sinais da MEA, modelo MED64 (MED64, 2013);
- C- Hardware padrão para multiplexação, que permite executar até quatro experimentos simultaneamente;
- D- Bomba de perfusão com até quatro saídas, para aplicar nutrientes e antibióticos nas MEAs;
- E- Controladores de temperatura que mantêm as incubadoras aquecidas (as culturas precisam ser mantidas a 37° C);
- F- Banho de água para lavagem das MEAs, contendo fluido cerebrospinal artificial (ACSF);
- G- Incubadora padrão, capaz de manter até quatro MEAs simultaneamente em testes;
- H- Vídeo monitor do computador descrito em A.

Os blocos básicos que podem ser incluídos para o registro de sinais em MEA são:

- Soquete que estabelece a conexão elétrica entre a MEA e o amplificador;
- Amplificador de sinais;
- Conversor analógico/digital integrado à placa de aquisição de dados, contendo o multiplexador;
- Computador PC com grande espaço para armazenamento de dados;
- Software específico para aquisição de dados;

Opcionalmente, podem ser incluídos:

- Gerador de Sinais com a mesma conformação da MEA (MEA Signal Generator), que serve para testar todo o sistema sem necessidade de se fazer a cultura de células;
- Estimulador elétrico para produzir estímulos elétricos na MEA e registrar assim a resposta ao potencial evocado.

Cada um desses dispositivos será apresentado no que segue.

3.2.1 Soquete Elétrico

O soquete tem a função de possibilitar a conexão elétrica entre os terminais da MEA e o amplificador. Não é um dispositivo simples. A resistência elétrica de seus contatos deve ser a mais baixa possível, para reduzir o ruído. Além disso, os contatos do soquete devem resistir ao desgaste e à oxidação, problema comum em ambientes úmidos (como os laboratórios) e submetidos a soluções salinas de perfusão que nutrem os tecidos ou culturas na MEA.

Alguns modelos de soquete contém, internamente, resistências de aquecimento, com a finalidade de manter a cultura na MEA aquecida à temperatura de 37°C. Existem também soquetes que incorporam internamente um estágio pré-amplificador para cada um dos canais. Esse soquete é chamado “ativo” em contraposição ao soquete dito “passivo” que não possui amplificação interna. A vantagem do soquete ativo é aumentar o nível de sinal captado nas células e a desvantagem é que, com a umidade do laboratório, seus circuitos eletrônicos de amplificação podem apresentar defeitos. A Figura 3.2 ilustra um soquete elétrico (1) produzido e comercializado pela MCS (Systems, 2013) juntamente com um simulador de MEA ao centro (2).

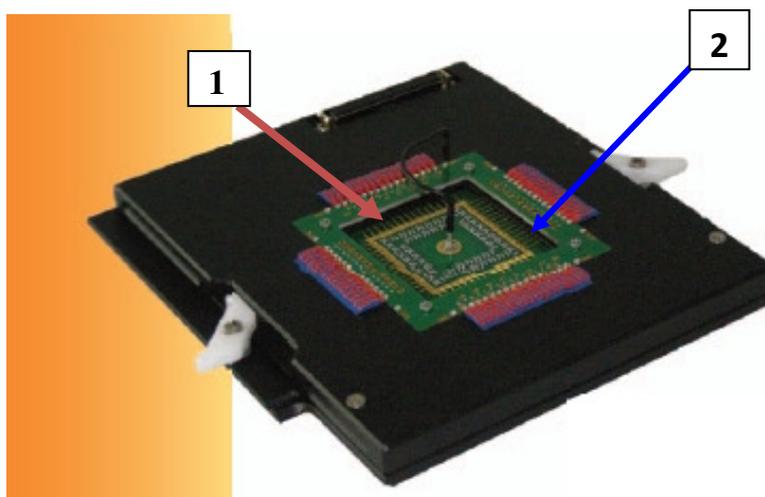


Figura 3.2: Soquete elétrico para MEA padrão. Imagem obtida de (Systems, 2013).

Outro soquete, passivo, com resistência interna de aquecimento e controle para o aquecedor, fabricado para um sistema de MEA fornecido pela Alpha MED Scientific Inc. no Japão, é mostrado na Figura 3.3 (MED64).



Figura 3.3: Soquete passivo fabricado pela MED64(à esquerda). Controle do aquecedor para o soquete (à direita).

3.2.2 Amplificador de Sinais

O amplificador de sinais é o equipamento que exige a eletrônica mais refinada se comparado ao restante do equipamento. Muitos canais são necessários (60, 64, 128 ou 256 dependendo do sistema) e um nível de ruído elétrico baixíssimo é fundamental. Níveis de ruído tão baixos quanto $5 \mu\text{V}/\sqrt{\text{Hz}}$ são necessários à entrada do amplificador, a cada canal. Vários fabricantes oferecem soluções prontas de bom desempenho, sendo que alguns amplificadores estão integrados ao próprio soquete. É o caso da linha MEA1060 da MCS (Systems, 2013). Essa linha de produtos incorpora ao soquete ativo dispositivos com as seguintes características:

- Dimensões: $165\text{mm} \times 165\text{mm} \times 20\text{mm}$ (29 mm com o soquete);
- Ganho de Tensão: 1200 vezes;
- Banda passante: 1 Hz – 3 kHz;
- Contatos banhados a ouro substituíveis;
- Acesso direto a cada eletrodo para estimulação; e
- Elemento de aquecimento interno, com sensor de temperatura.

Outra possibilidade é usar um soquete passivo, ligando-o a um amplificador através de fios blindados. Existem amplificadores que são externos ao soquete.

Amplificadores cujo ganho pode ser programado digitalmente através do computador são chamados PGA (Programmable Gain Amplifier). Em tais amplificadores, o operador pode alterar o ganho de cada canal simplesmente alterando um ajuste no *software* de registro no computador.

É muito importante citar que esse equipamento não é apenas amplificador. Internamente, cada canal do aparelho possui também filtros ativos, que têm por função restringir a banda passante, limitando a faixa de frequências que pode ser amplificada. Isso é fundamental para melhorar a relação sinal/ruído do amplificador. O PGA é um amplificador diferencial com filtro tipo-I (Systems, 2013). O ganho do PGA pode ser ajustado individualmente para cada canal, entre 10 e 5000 vezes. Existem versões de 16, 32 e 64 canais e a banda passante, ou seja a faixa de frequência de uso, vai de 1 até 5000 Hz. A Figura 3.4 mostra a janela de ajuste do ganho do PGA no *software* de controle (Systems, 2013).

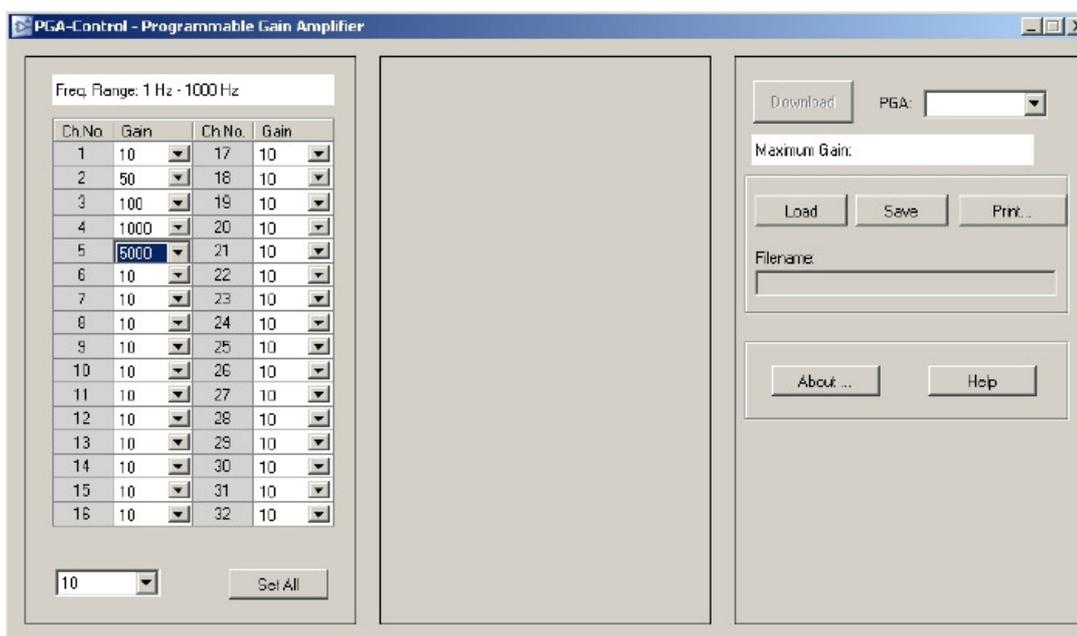


Figura 3.4: Janela de controle do ganho do PGA no *software* (Systems, 2013).

Na Figura 3.4, o ganho de cada canal pode ser ajustado individualmente, através da janela correspondente. A faixa de frequência dos amplificadores também pode ser ajustada na janela que mostra 1 Hz até 1000Hz, permitindo ajustar via *software* a banda passante do PGA. Para gravar sinais *in vivo*, em especial em conjunto com FlexMEA, existem microamplificadores que podem ser conectados à MEA flexível, e estas ao cérebro do animal vivo. A Figura 3.5 ilustra o microamplificador modelo μ PA16. O amplificador tem menos de 10 mm de comprimento e é muito menor do que o conector.



Figura3.5: Microamplificador modelo μ PA16 - o microamplificador é inserido internamente ao conector à esquerda. Obtida de MicroChannel Systems (Systems, 2013).

O fabricante Alpha MED Scientific (Japão) produz uma linha de equipamentos para aquisição de dados em MEA chamada MED64. A Figura 3.6 mostra o soquete, amplificador, sistema de aquisição de dados com conversor A/D, e o computador. Do ponto de vista de características elétricas o amplificador MED64 possui:

- Largura de banda de 0,1Hz até 10 kHz ou, sob encomenda, de acordo com as necessidades do usuário;
- Filtro passa-altas com as seguintes frequências de corte: 0.1 , 1 , 10 e 100Hz;
- Filtro passa-baixas com as seguintes frequências de corte: 1, 2.5, 5, 7.5 e 10 kHz;
- Capacidade para gerar estímulos em 2 canais simultaneamente e de modo independente; e
- Conexão com o computador através da porta USB.

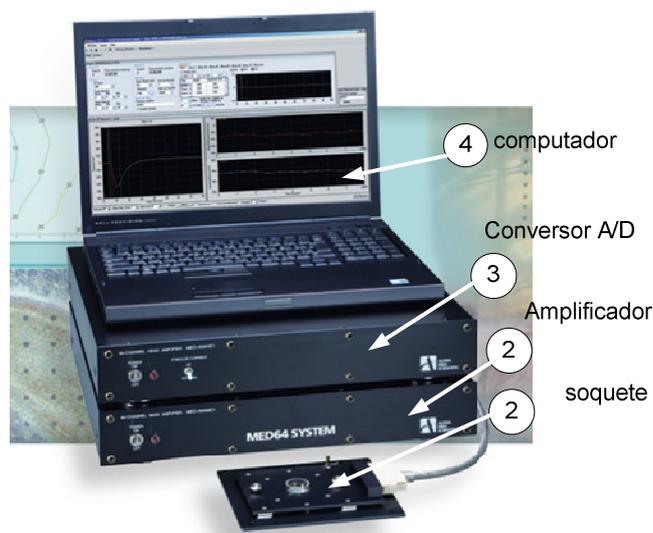


Figura 3.6: Soquete, amplificador e placa A/D de MED64 System (Med64, 2013).

Praticamente qualquer computador que atenda os requisitos mínimos dos *softwares* usados para o registro de dados pode ser empregado. Quase sempre muito espaço em disco será necessário para armazenamento de dados, acima de 1 Tb. O sistema operacional deverá ser compatível com o *software* escolhido. *Softwares* gratuitos geralmente são feitos para serem executados sob o sistema operacional Linux; em particular, uma distribuição que carrega o RT-Linux, que é um módulo de que permite operar com o *kernel* em tempo real.

3.2.3 Software para Aquisição de Dados

A MCS (Systems, 2013) recomenda o software MC Rack cuja janela é mostrada na Figura 3.7. Para o sistema MED64 é disponível o *software* para Aquisição e Registro dos Dados, denominado MED64 Mobius Software, cuja janela é mostrada na Figura 3.8. O *software* Mobius é um pacote que contém vários módulos independentes, destinados a gerar impulsos elétricos, filtrar o ruído de 60 Hz proveniente da rede elétrica e analisar *bursts* e *spikes*. Opções gratuitas (open-source) também existem.

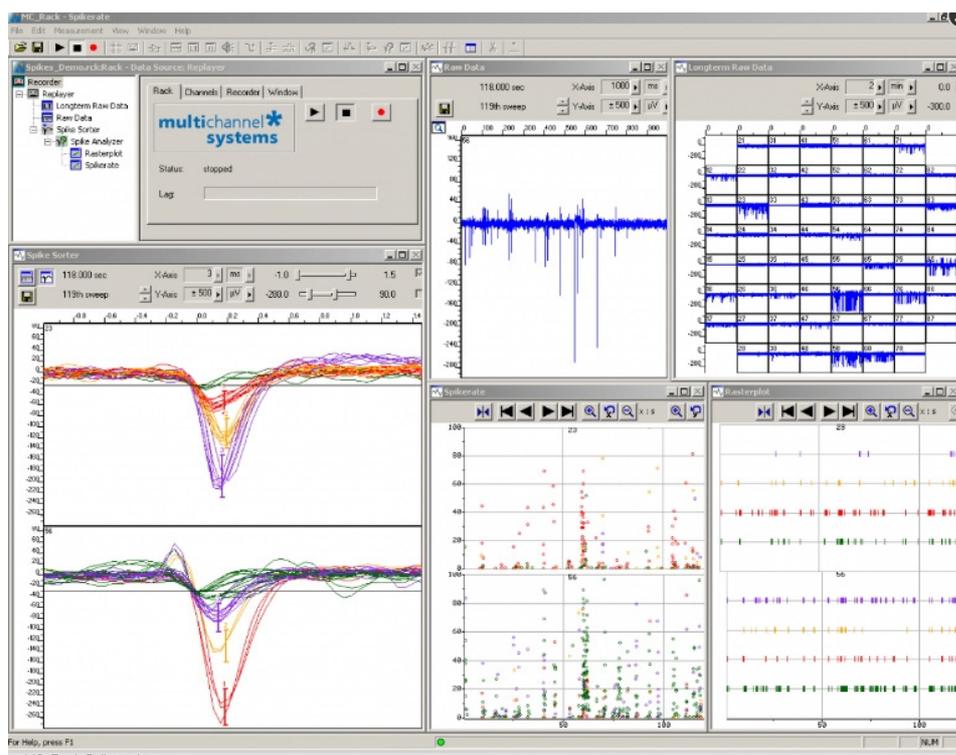


Figura 3.7: Tela do *software* MC_Rack, obtida de MultiChannel Systems (Systems,2013).

Em 2005, Potter e Wagenaar desenvolveram e disponibilizaram o *software* MeaBench, que é livre e executável no Sistema Operacional Linux (MeaBench, 2013). MeaBench inclui algoritmos para

gerar estímulos em tempo real e suprimir o amplificador durante o estímulo e para detecção de *spikes*, bem como programas para mostrar na tela a tensão a partir de 60 eletrodos e atualizá-las continuamente. Na Figura 3.9 é ilustrado o *software* MeaBench em operação, mostrando 64 janelas que registram, cada uma, o sinal elétrico registrado num canal da MEA. MeaBench é de domínio público e pode ser obtido através da referência.

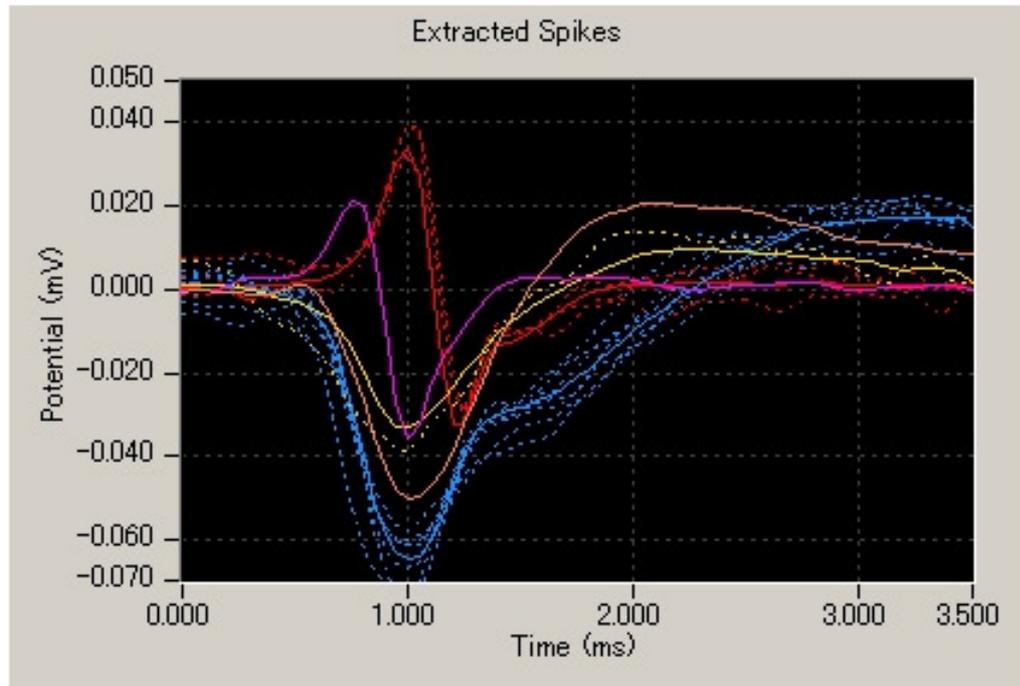


Figura 3.8: Janela do software MED64 Mobius, obtida de (MED64, 2013).

Na Figura 3.10 é mostrada a posição (padronizada) de cada eletrodo na MEA padrão, correspondente a cada uma das 64 janelas de registro de sinal elétrico mostrada na Figura 3.9. Destas 64 janelas, apenas 60 são usadas realmente, sendo que as quatro janelas dos cantos nada representam. A notação referente aos eletrodos na Figura 3.10 corresponde ao número de coluna e de linha da MEA.

Outro *software* importante desenvolvido por John Rolston, Potter e colaboradores é o Neurorigther. É também gratuito e pode ser obtido no sítio (Neurorigther, 2013).

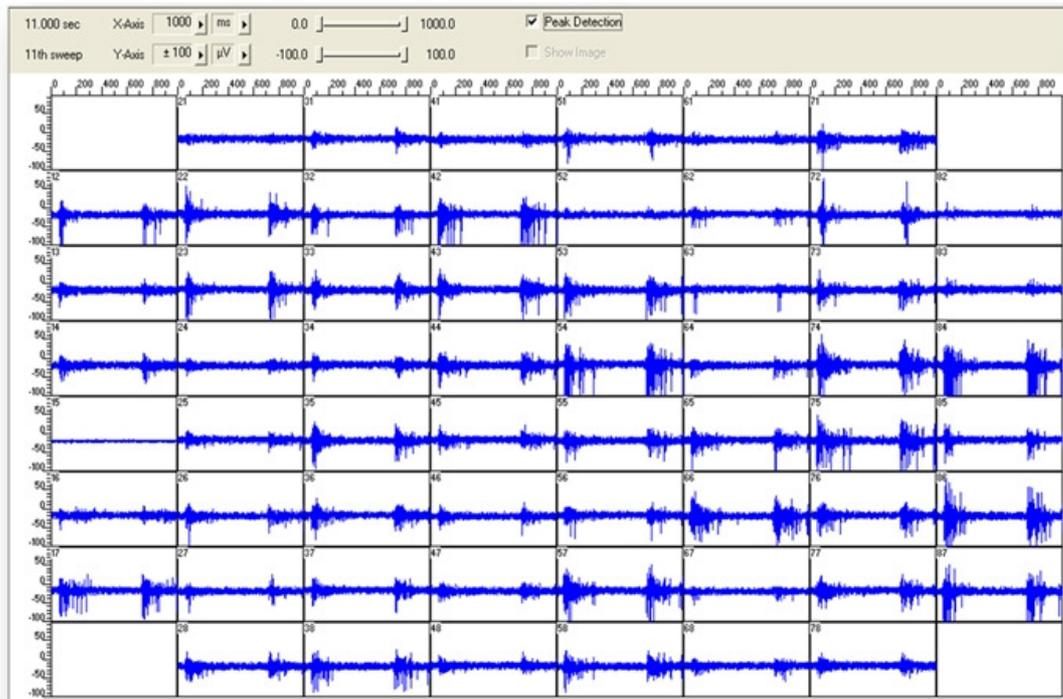


Figura 3.9: Janela do *software* MeaBench, obtida de (Wagenaar, 2005).

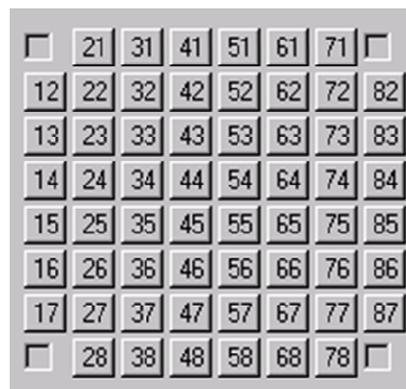


Figura 3.10: Posição e numeração de cada um dos eletrodos na MEA padrão, correspondendo a cada janela da Fig. 3.9 (Systems, 2013).

3.3 Gerador de Estímulos Elétricos para Potencial Evocado

Um equipamento opcional muito interessante para as pesquisas com MEA é o gerador de estímulos elétricos. Esse gerador fornece potenciais elétricos controlados em tensão, corrente e em duração. Tal controle é essencial, porque um pulso de amplitude muito grande (maior do que 0,5 volt)

pode provocar uma reação eletroquímica irreversível na interface eletrodo/eletrólito e invalidar a resposta da rede neuronal ou até mesmo danificar a cultura. A eficácia do estímulo depende do espalhamento efetivo da corrente injetada dentro da interface eletrodo-cultura dentro da cultura (Rodriguez, 2012).

Uma característica importante do gerador de estímulos é a de inibir o funcionamento do amplificador no momento do pulso elétrico aplicado, caso contrário o registro seria do pulso de estímulo e não da resposta da cultura ao potencial evocado. Todos os fabricantes de amplificadores para MEA produzem também geradores de estímulos.

Daniel Wagenaar e colaboradores propuseram o RAC System (Potter, 2002; Wagenaar, 2004) como uma plataforma *open-source* em *hardware* e *software* para geração de estímulos. Na Figura 3.11 é ilustrada uma foto do protótipo de Wagenaar do RAC System. Este gerador é controlado por um *software* escrito em C++ e compilado para RTLinux (FSMLABS, 2013) e pode produzir pulsos de onda quadrada com duração entre 10 μ s até 500 ms e tensões de 0 até aproximadamente 700 mV, sendo todos estes valores ajustados através de *software*. O estimulador pode aplicar estímulos em qualquer um dos 60 canais da MEA padrão (apenas 2 canais podem ser selecionados de cada vez), graças ao uso de multiplexadores do tipo MAX338 e possui razoável capacidade de inibir o amplificador no momento da aplicação do pulso. Toda documentação do *hardware* está disponível gratuitamente (MeaBench, 2013).

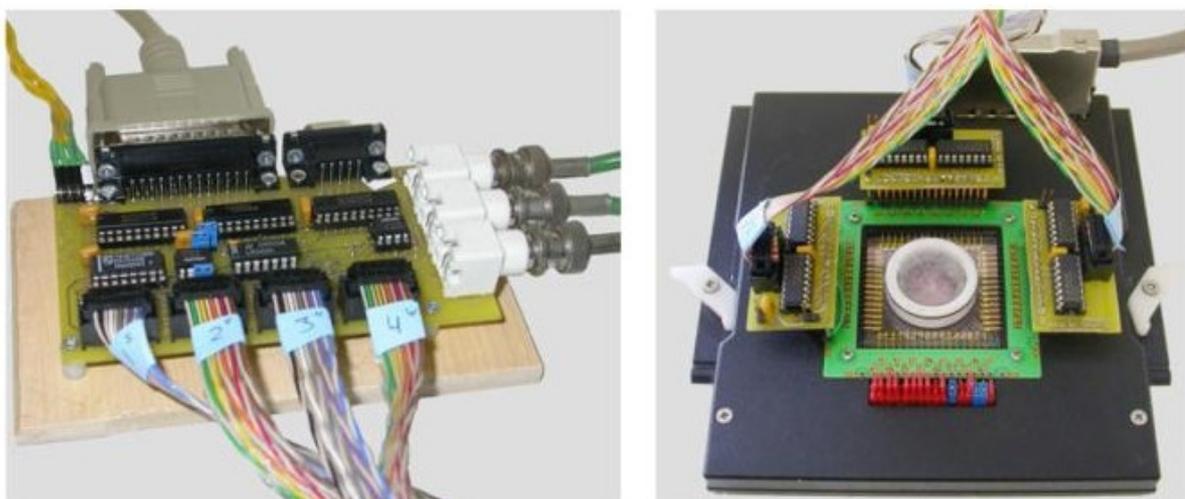


Figura 3.3: Foto do protótipo do RAC System, gerador de estímulos proposto por (Wagenaar, 2004).

Capítulo 4 - Visão Global do Projeto

Este capítulo apresenta uma visão global de todo o Sistema de Registro de Sinais de Neurônios (SRSN) em MEA, explica a função de cada bloco detalhado nos capítulos seguintes e evidencia aqueles que foram implementados.

4.1 Visão Global do Sistema Proposto

Como comentado anteriormente, este projeto teve como objetivo principal o desenvolvimento do SRSN, descrevendo a eletrônica necessária e um *software* básico para registrar os dados no computador. A Figura 4.1 mostra o diagrama de blocos para o SRSN de 60 canais com os seguintes módulos:

- (1) soquete de MEA padrão;
- (2) pré-amplificadores (60 canais);
- (3) filtros (60 canais);
- (4) amplificadores (60 canais);
- (5) MUX 1 analógico;
- (6) MUX 2 analógico;
- (7) ADC1 - conversor analógico/digital (AD);
- (8) ADC2 - conversor AD;
- (9) conversor USB;
- (10) computador; e
- (11) interface de estimulação elétrica.

A seguir cada um desses módulos será descrito:

- Soquete MEA padrão ((1) na Figura 4.1) - O Soquete MEA padrão tem por função fornecer o contato elétrico adequado entre os *pads* da MEA padrão e o circuito do pré-amplificador, com a menor resistência elétrica possível. O soquete deve também fornecer sustentação mecânica para a MEA padrão, proporcionar visualização através de microscópio quando o pesquisador deseja examinar a cultura de tecido sobre a MEA, ser resistente à oxidação em ambientes úmidos de laboratórios e permitir o fácil encaixe da MEA quando for necessário.

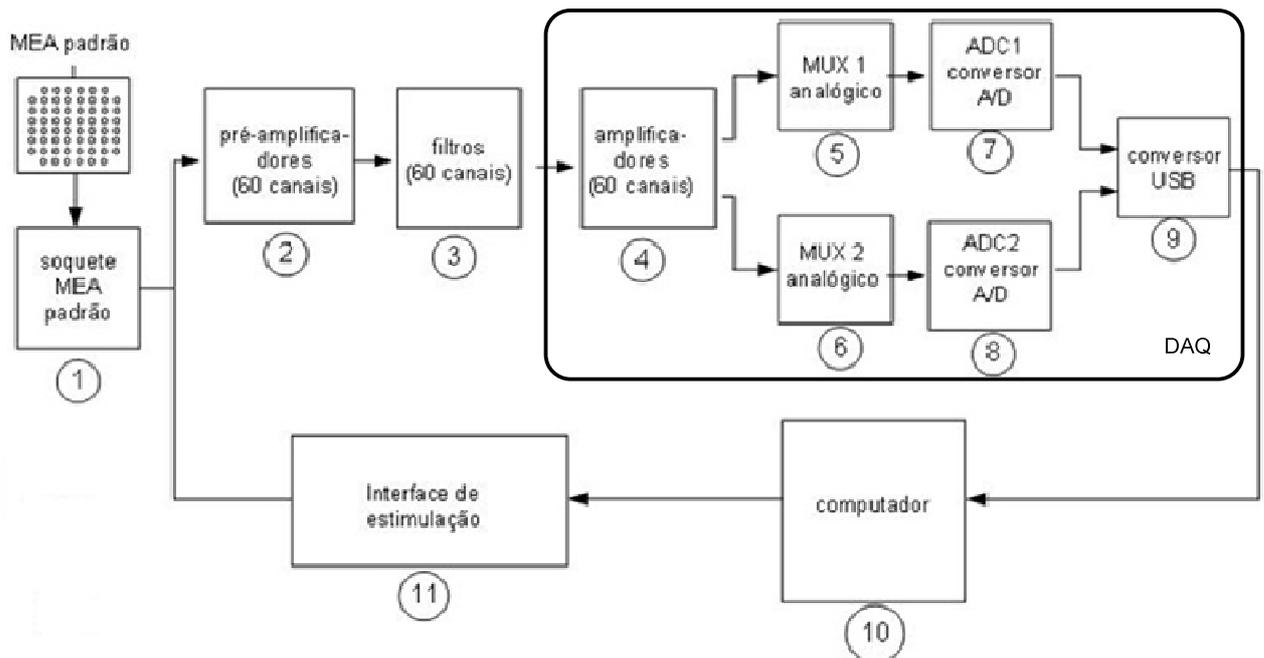


Figura 4.1: Diagrama de blocos completo para o Sistema de Registro de Sinais de Neurônios em MEA (SRSN).

- Pré-Amplificador ((2) na Figura 4.1) - O circuito do pré-amplificador deve fornecer uma amplificação inicial de 100 vezes (ganho de tensão $A_v=100$ ou 40 dB) com níveis de ruído menores do que $5\mu V/V$ em relação a cada uma de suas 60 entradas. O sinal elétrico a ser amplificado, proveniente da MEA padrão, tem o aspecto mostrado na Figura 4.2. Pode-se notar que esse sinal possui uma amplitude que varia entre 10 e 20 μV pico a pico.

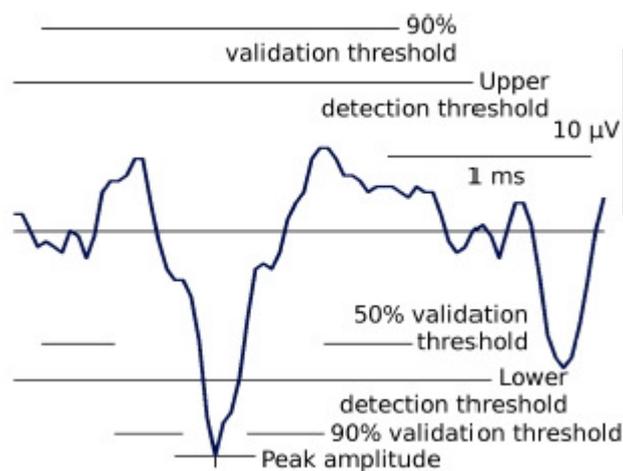


Figura 4.2: Sinal típico num canal da MEA padrão que é aplicado à entrada do pré-amplificador (Wagenaar, 2001).

- Filtros ((3) na Figura 4.1) - São necessários 60 filtros (3) passa-banda, que consistem na associação em série de filtros passa-altas e filtros passa-baixas. A função principal dos filtros é limitar a faixa de frequências que pode ser amplificada, com a finalidade de diminuir o nível de ruído e evitar fenômenos de aliasing no conversor A/D. Os filtros, juntamente com o pré-amplificador, formam o chamado *headstage*.
- Amplificadores ((4) na Figura 4.1) - Os amplificadores são circuitos destinados a amplificar o sinal em mais de 10 vezes (ganho de tensão $A_v=10$ ou 20 dB) antes de aplicar tais sinais ao conversor A/D. O ganho de tensão total do sistema, dessa forma, será de 1000 vezes (100 vezes no pré-amplificador e 10 vezes no amplificador).
- MUX1 e MUX2 ((5) e (6) na Figura 4.1) - São os circuitos dos multiplexadores, que são chaves eletrônicas, que permitem selecionar uma dentre várias entradas. Somente uma entrada é aplicada ao conversor AD a cada momento, e a troca da entrada é feita de modo eletrônico por um sistema de "varredura" no domínio do tempo. Cada MUX pode multiplexar no máximo 32 canais. Desta forma, são necessários dois multiplexadores para que atendam a 64 canais, dos quais serão usados apenas 60 canais.
- ADC1 e ADC2 ((7) e (8) na Figura 4.1) - ADC1 e ADC2 são os conversores AD responsáveis por transformar o sinal analógico que varia entre 0 e 2000 mV de amplitude pico a pico, para um número binário de 12 bits que varia entre 0 e 4095. Os conversores ADC1 e ADC2 e também os multiplexadores MUX1 e MUX2 estão contidos internamente em um único *chip*, que é o Microchip® DSPIC33FJ256GP710 (Microchip, 2013).
- Conversor USB ((9) na Figura 4.1) - O conversor USB é responsável por transmitir os números binários que foram convertidos por ADC1 e ADC2 e armazenados num *buffer* de memória, para o padrão de comunicação serial com protocolo USB usado pelos computadores PC comuns.
- Computador ((10) na Figura 4.1) - O computador pode ser qualquer equipamento *desktop* ou *notebook* que possua um bom espaço disponível em disco para armazenamento de dados. Pode executar sistema operacional Linux ou Windows, dependendo do *software* adotado para o registro de dados.

- Interface de Estimulação ((11) na Figura 4.1) - A interface de estimulação permite produzir estímulos elétricos controlados que podem ser aplicados em alguns canais da MEA padrão. Nem todos os canais podem ser estimulados simultaneamente, somente alguns a cada vez. A interface de estimulação deve também inibir as entradas correspondentes do pré-amplificador no momento do estímulo, caso contrário o sinal elétrico registrado seria o do estimulador e não o da cultura de tecido em estudo na MEA. Os sinais elétricos gerados para estímulo variam entre 10 μV e 200 μV de amplitude pico-a-pico e com duração entre 1 ms e 10 ms. Tais sinais devem ser ajustados por *software* pelo computador, o qual se comunica com a interface de estimulação através da saída serial padrão USB ou pela porta paralela LPT.

Os módulos numerados de 4 a 9 na Figura 4.1 constituem um subsistema conhecido como Sistema de Aquisição de Dados (DAQ).

4.2 Módulos Implementados do SRSN

Durante a pesquisa que resultou no trabalho descrito nesta dissertação, foram implementados e testados os seguintes módulos, identificados em amarelo na Figura 4.3, a saber:

- Soquete MEA padrão completo ((1) na Fig. 4.3);
- Pré-amplificador (2 canais) ((2) na Fig. 4.3);
- Filtros (2 canais) ((3) na Fig. 4.3);
- Amplificador (2 canais) ((4) na Fig. 4.3);
- MUX1 (2 canais) ((5) na Fig. 4.3);
- Conversor AD (2 canais) ((7) na Fig. 4.3); e
- Conversor USB ((9) na Fig. 4.3).

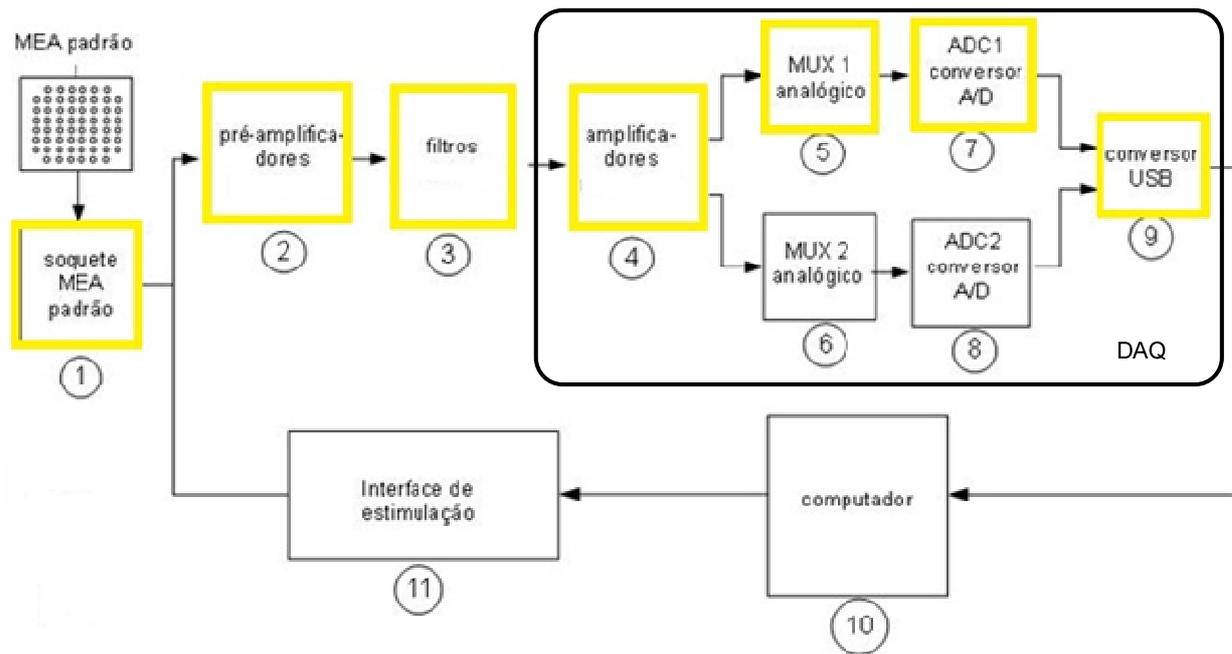


Figura 4.3: Figura 4.1 com a identificação dos módulos implementados (em amarelo).

Além desses módulos, foram também implementados os seguintes itens:

- Versão inicial do *software* escrito em MATLAB (para registro de 2 canais);
- *Lay-out* final para implementar os 60 canais do amplificador, MUX1 e MUX2, ADC1 e ADC2 e conversor USB.

Capítulo 5 - Projeto e Implementação do Soquete da MEA e Simulação e Construção do Pré-Amplificador e Filtros

Neste capítulo é descrito o desenvolvimento de 3 blocos do SRSN: soquete da MEA padrão, pré-amplificadores e filtros. Pré-amplificadores e filtros formam o denominado *headstage*. Na Figura 5.1 é mostrado um extrato da Figura 4.1, na qual comparecem esses blocos. A Figura A.6 do Apêndice mostra o esquema elétrico completo do pré-amplificador com os filtros adotado neste projeto. Todos os circuitos precisam ser replicados 60 vezes.

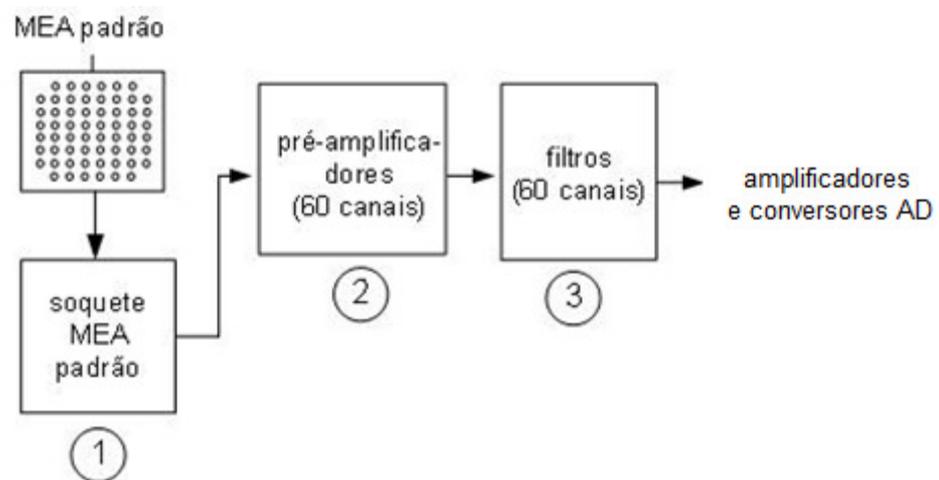


Figura 5.1: Diagrama de blocos dos pré-Amplificadores e filtros.

Na Figura 5.1, o bloco (1) representa o soquete MEA padrão. O bloco (2) representa os pré-amplificadores, que considerando o sistema SRSN completo, precisariam ser replicados 60 vezes. Neste trabalho, entretanto, foram desenvolvidos e implementados apenas dois canais (dois circuitos de pré-amplificador foram construídos e implementados). O bloco (3) representa os filtros passa-banda que também precisam ser replicados 60 vezes. Neste trabalho apenas dois filtros foram implementados.

5.1 Soquete Elétrico da MEA Padrão

Esta seção descreve a implementação do Bloco 1 (Figura 5.1), correspondente ao soquete elétrico da MEA padrão (Systems, 2013) que será adotada para o sistema como dispositivo de sensoriamento de sinais eletrofisiológicos de neurônios em fatias ou cultivados *in vitro*.

É importante mencionar que todos os sinais são medidos no soquete em relação a um terra comum - GND- (REF) que corresponde ao *pad* de número 15 do soquete. Em alguns modelos de MEA, o terminal de referência GND é inserido na solução salina de perfusão; na implementação realizada todos os sinais são medidos em relação ao contato número 15 do soquete e da MEA (Systems, 2013).

5.1.1 Levantamento da Dimensões Mecânicas da MEA padrão

Nessa primeira etapa, instrumentos, tais como micrômetros, paquímetros e um projetor de perfil foram usados com a finalidade de verificar as dimensões físicas da MEA padrão, especificadas pela Multi Channel Systems, mostradas na Figura 5.2.

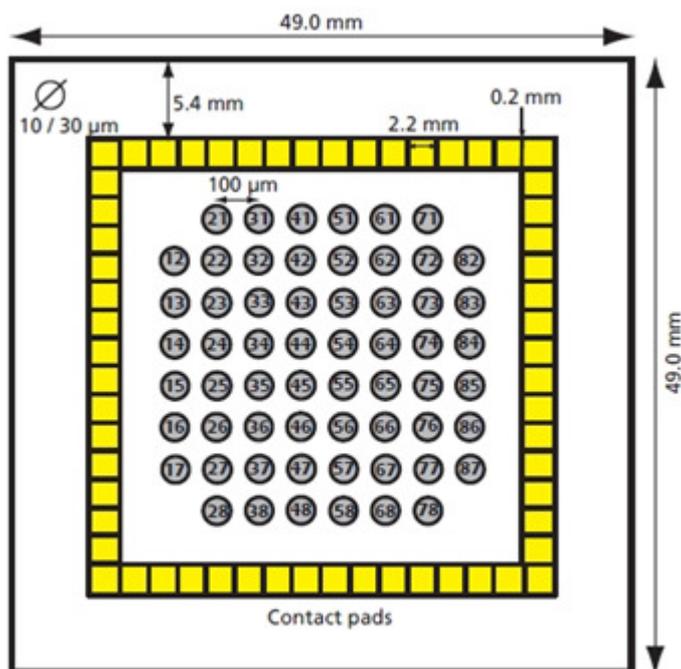


Figura 5.2: Dimensões físicas da MEA60. Imagem de (Systems, 2013).

5.1.2 Simulação Computacional e Projeto do Soquete

Nessa segunda etapa foi utilizada a ferramenta de software de projeto de placas de circuito impresso P-Cad 2006 para modelar e desenhar o soquete elétrico, capaz de fazer o adequado contato elétrico com a MEA padrão. As medidas obtidas na Etapa 1 foram usadas para essa finalidade. A partir de tais dimensões, um primeiro protótipo de soquete elétrico foi desenhado, e mostrado na Figura 5.3.

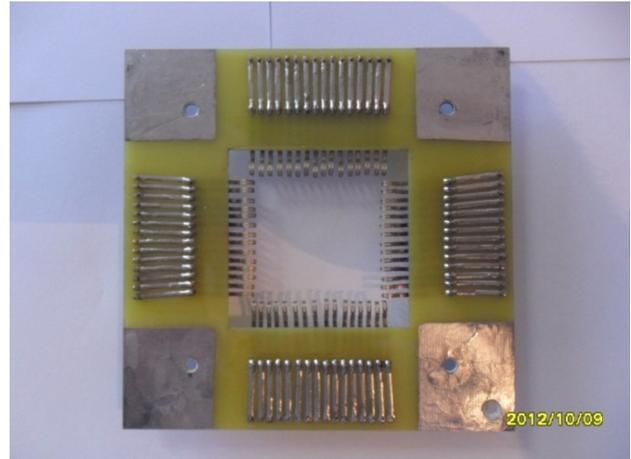
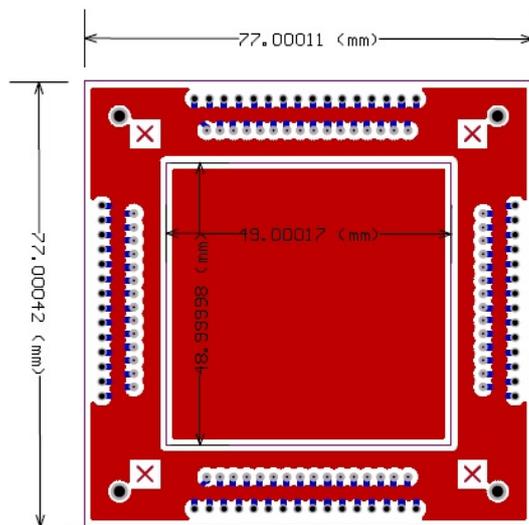


Figura 5.3: Desenho do primeiro protótipo do soquete elétrico para MEA padrão..

5.2 Pré-amplificador

O pré-amplificador escolhido foi um amplificador de instrumentação (AI) fabricado por Texas Instruments modelo INA333® cuja característica é o baixo nível de ruído e sua ótima rejeição de ruído em modo comum. Na Figura 5.4 é mostrado o diagrama interno do AI utilizado.

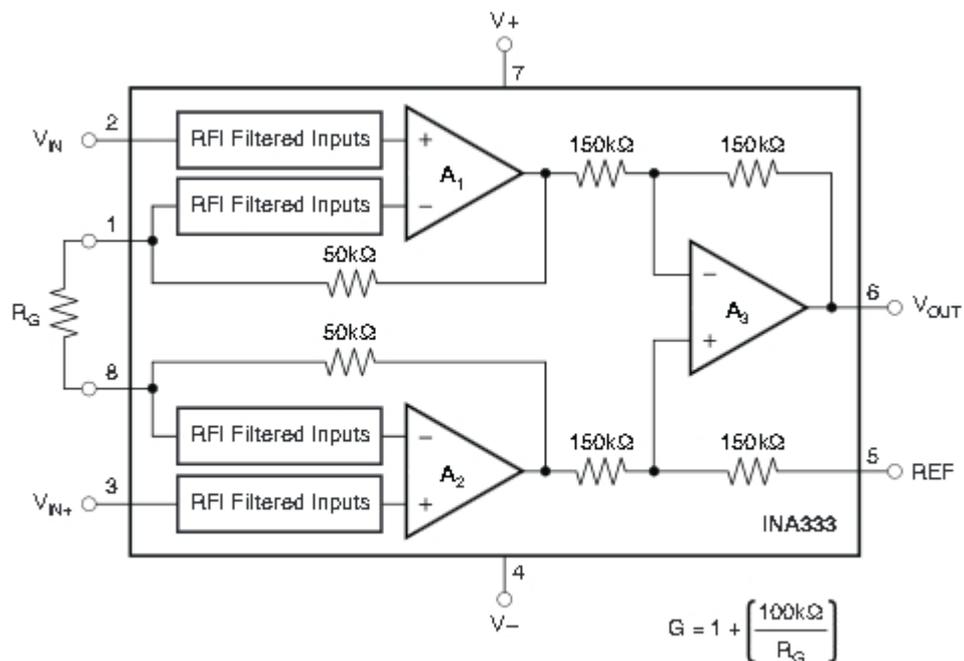


Figura 5.4: Amplificador de Instrumentação Texas INA333® (Texas, 2013).

Este AI possui internamente filtros contra interferências de frequências de rádio (RFI) em cada uma de suas 4 entradas. O *chip* pode ser usado com fontes de alimentação simples (não-simétricas: *single supply*) e pode ser alimentado com tensões tão baixas quanto 2,5 volts e; tem seu ganho de tensão determinado através da escolha de um único resistor externo, que é o resistor identificado por R_G na Figura 5.4. O ganho do AI é calculado pela equação (3):

$$G = 1 + \frac{100K}{R_G} \quad (3).$$

No protótipo implementado, baseado no INA333®, foi colocado um *trim-pot* multivoltas de precisão (resistor ajustável) na posição R_G que foi ajustado para o valor de 1,1 KΩ, possibilitando assim um ganho de tensão igual a 100 vezes (ou 40 dB) para este pré-amplificador. Entretanto, é possível variar o ganho do pré-amplificador simplesmente ajustando-se o *trim-pot* para outro valor na faixa compreendida entre 1 e 100 KΩ, o que possibilita um ajuste na faixa de 2 até 101 vezes. Neste projeto escolheu-se uma fonte de alimentação simétrica de valor +2,5 volts e -2,5 volts para alimentar o AI, conforme simulado. Tal fonte é implementada através do uso de reguladores de tensão LM317 externos à placa do pré-amplificador.

5.3 Simulação dos Circuitos

Spice (*Simulated Program with Integrated Circuits Emphasis*, ou Programa de Simulação com Ênfase em Circuitos Integrados) é uma implementação de *software*, baseada em modelos matemáticos, que simulam diversos componentes eletrônicos (resistores, capacitores, diodos, transistores e circuitos integrados). Para essa finalidade, quatro *softwares* simuladores, todos gratuitos (ou sua versão demonstração) foram testados:

- a) TINA-TI, simulador de circuitos fornecido por Texas Instruments (TINA, 2013).
- b) LT-SPICE, simulador de circuitos provido por Linear Technology, em (LTSPICE, 2013).
- c) FILTERLAB, simulador de filtros ativos provido por Microchip em (FILTERLAB, 2013).
- d) ISIS, simulador que pertence ao pacote PROTEUS, produzido por (LABCENTER, 2013).

Os modelos Spice para cada componente são fornecidos pelos respectivos fabricantes para uso em suas ferramentas, gratuitamente. O pré-amplificador, foco deste trabalho, foi simulado usando-se os modelos fornecidos gratuitamente por (Texas, 2013) os quais são disponibilizados *on-line* para o simulador TINA-TI (Tina, 2013), também gratuito.

A primeira simulação teve por objetivo verificar os níveis de ruído do amplificador e foi usado o circuito mostrado na Figura 5.5. A partir do circuito mostrado na Figura 5.5 obteve-se no simulador o gráfico mostrado na Figura 5.6. No gráfico, o eixo das abcissas representa a frequência do sinal senoidal aplicado na entrada pela fonte de tensão VG1 e o eixo das ordenadas representa o nível de ruído presente na saída VM1 do pré-amplificador, medido na unidade $\frac{V}{\sqrt{Hz}}$; pode-se observar a um ganho de 100 vezes, um nível de ruído global de $\frac{4\mu V}{V}$, compatível com as especificações de MCS (System, 2013).

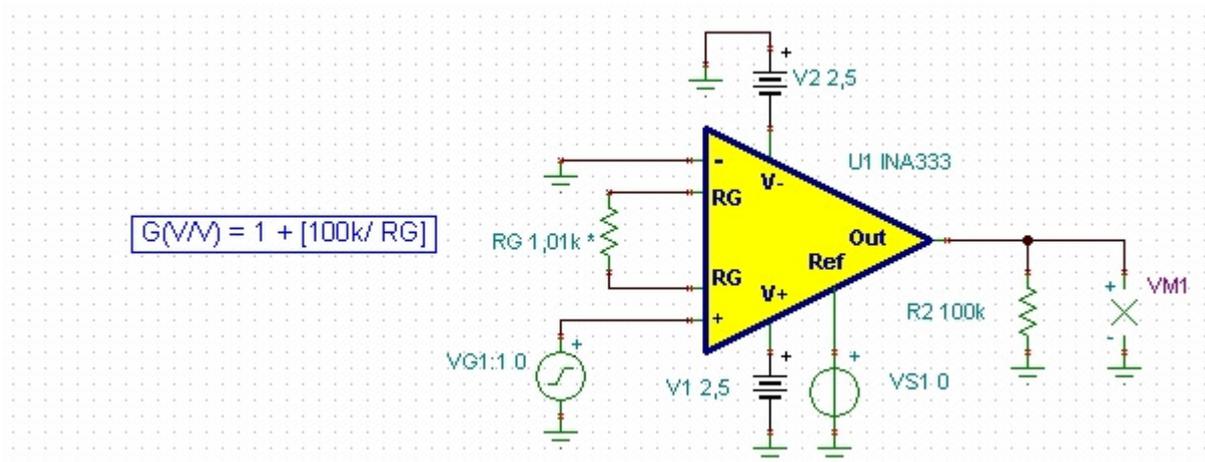


Figura 5.5: Circuito inicialmente simulado no TINA para avaliar níveis de ruído.

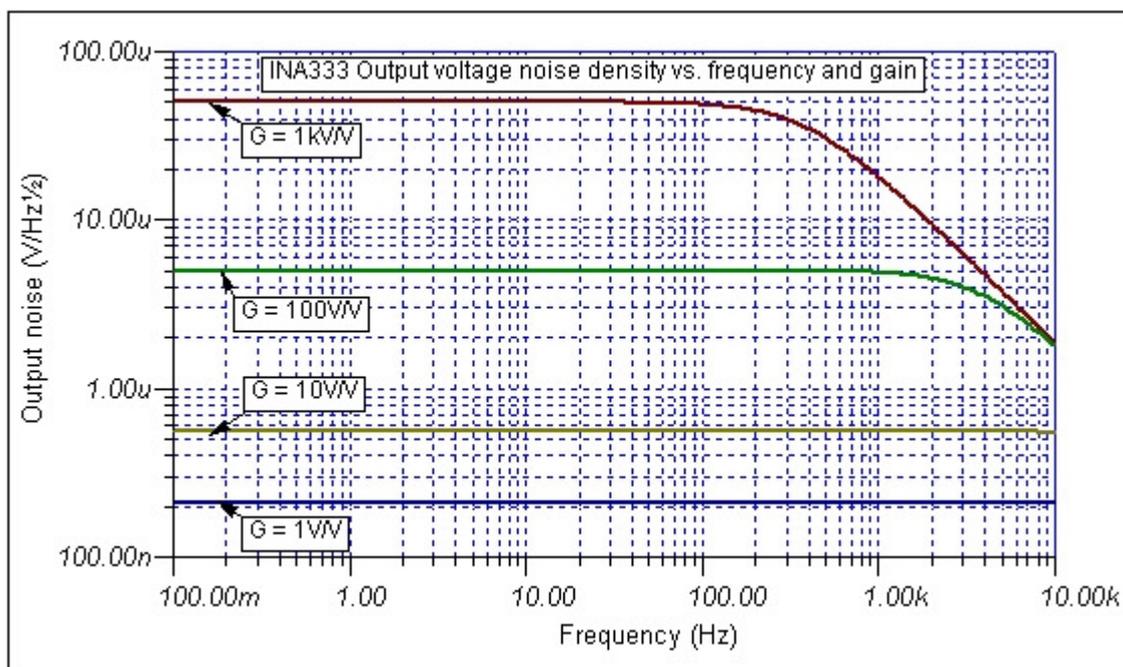


Figura 5.6: Densidade de ruído na saída do pré-amplificador, obtida com simulador TINA.

O ruído tem causas extrínsecas (EMI, RFI – *Eletromagnetic Interference e Radio Frequency Interference*) e intrínsecas. O ruído intrínseco é, principalmente, de origem térmica, produzido pelo movimento aleatório de cargas elétricas, e pode ser estimado pela expressão de Johnson-Nyquist (Desai, Rolston and Potter, 2010), dada pela equação (4):

$$E_n = \sqrt{4kT_k R \Delta F} \quad (4)$$

a qual:

T temperatura (kelvin)

R resistência que provoca o ruído (ohms)

ΔF intervalo de frequência (hertz)

K constante de Boltzmann ($1,381 \times 10^{-23}$ joule/kelvin)

E_n é a tensão média quadrática do ruído (valor RMS) em circuito aberto sobre um resistor R.

5.4 Filtros

Um filtro é definido como qualquer quadripolo linear, concentrado e invariante no tempo, capaz de produzir uma resposta específica para uma dada excitação na sua entrada. A necessidade de se intercalar filtros entre a saída do amplificador *headstage* e a entrada da conversor AD decorre diretamente da relação de Johnson-Nyquist: é preciso limitar a banda passante com a finalidade de melhorar a relação sinal/ruído do amplificador.

O papel dos filtros na redução dos níveis globais de ruído é descrito como se segue. Restringindo-se a banda passante ΔF , é possível reduzir o nível de ruído intrínseco do amplificador, daí a importância do filtro passa-banda, que é composto por um filtro passa-altas associado em série com um passa-baixas. A equação (4) mostra a importância de se obter baixos valores de resistência de contato no soquete da MEA, uma vez que quanto maior for a resistência, maior será o nível de ruído térmico. Além do ganho de tensão para o estágio não-inversor, é importante citar os ganhos de tensão em dB (decibéis) e o ganho de potência na mesma unidade, dados pelas equações (5) e (6), respectivamente.

$$G_{v_{dB}} = 20 \log \frac{V_{out}}{V_{in}} \quad (5)$$

$$G_{P_{dB}} = 10 \log \frac{P_{out}}{P_{in}} \quad (6)$$

Essas variáveis (ganhos de tensão e de potência) foram medidas no protótipo e comparadas com a literatura (Boylestad e Nashesky, 2004) e com as simulações realizadas. Para reduzir a captação de EMI e RFI é interessante que o *headstage* seja montado na mesma blindagem do soquete, junto à MEA. Dessa forma, evita-se que fios longos sejam levados da MEA aos filtros passa-faixas, propagando sinais elétricos de alta impedância e baixa intensidade. A montagem do amplificador *headstage* junto ao soquete é, entretanto, dificultada pelas condições de trabalho da maioria dos laboratórios, que acabam submetendo o soquete e a MEA à umidade e vazamento de líquidos, que podem danificar o amplificador. Dessa forma, muitos projetos comerciais optam por localizar o *headstage* em separado do soquete (assim denominado soquete passivo, sem amplificação) em contraposição aos soquetes que incorporam amplificador internamente (soquete ativo), como anteriormente comentado. Com a finalidade de restringir a banda passante do amplificador e conseqüentemente reduzir o ruído térmico, um filtro passa-altas ativo é inserido em série com um filtro passa-baixas também ativo, formando um filtro passa-banda.

5.5 Implementação dos Filtros

A expressão frequência de corte (F_c) ou frequência de meia potência, corresponde à frequência abaixo ou acima da qual a potência na saída (circuito eletrônico, linha de transmissão, amplificador ou filtro eletrônico) é reduzida à metade da potência aplicada na entrada do mesmo sistema. Em termos de tensão (ou amplitude) isto corresponde a uma redução a 70,7% do valor de entrada.

O primeiro filtro projetado é do tipo passa-altas passivo de um único pólo, com frequência de corte calculada em 0,16Hz. Todos os sinais com frequência inferior a 0,16Hz são atenuados na razão de -6 dB por oitava. Na Figura 5.7 é mostrado o esquema do filtro passa-altas simulado e implementado. O *trim-pot* de 20K Ω permite ajustar o ganho de tensão do filtro em valores que vão de 6 até 101 vezes, o que permite compensar as atenuações provocadas pelos resistores no sinal de interesse. Para este circuito, a frequência de corte pode ser calculada pela equação (7),

$$F_c = \frac{1}{2\pi RC} \quad (7)$$

na qual R é o valor do resistor em ohms e C é o valor da capacitância dado em farads. Para o circuito implementado, os valores escolhidos foram R=1M Ω e C=1 μ F, que correspondem aos componentes C3 e R7 mostrados na Figura 5.7.

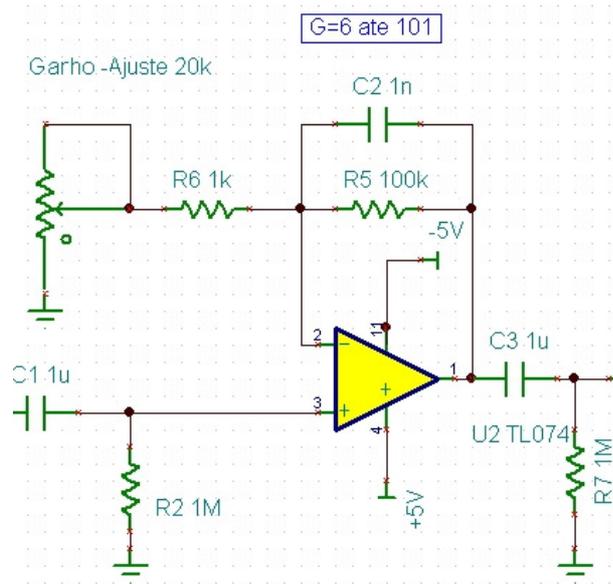


Figura 5.7: Filtro Passa-Altas com frequência de corte de 0,16 Hz implementado.

O Filtro passa-baixas escolhido para ser usado no amplificador MEA é do tipo Butterworth de 2ª ordem (Figura 5.8) e foi desenvolvido de modo a ter uma resposta em frequência a mais constante possível na banda passante. Os filtros Butterworth de 2ª ordem exibem uma atenuação de -40 dB por década (Horowitz, 1989) e, se comparado com um filtro Chebyshev do tipo I/tipo II ou com um filtro elíptico, possui uma queda relativamente mais lenta e, portanto, irá requerer uma ordem maior para implementar uma determinada especificação de banda rejeitada. O filtro Butterworth, entretanto, apresentará uma resposta em fase mais linear na banda passante do que os filtros Chebyshev do tipo I/ tipo II ou elípticos (Boylestad e Nashesky, 2004). Para o filtro da Figura 5.8, a magnitude da resposta em frequência é dada pela equação (8).

$$H(j\omega) = \left| \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{\omega}{\omega_c}\right)^2}} \right| \quad (8)$$

Na equação (8), H é o módulo função de transferência, função definida no conjunto dos números complexos; j é a unidade imaginária; ω é a frequência angular do sinal em radianos por segundo; e ω_c é a frequência de corte.

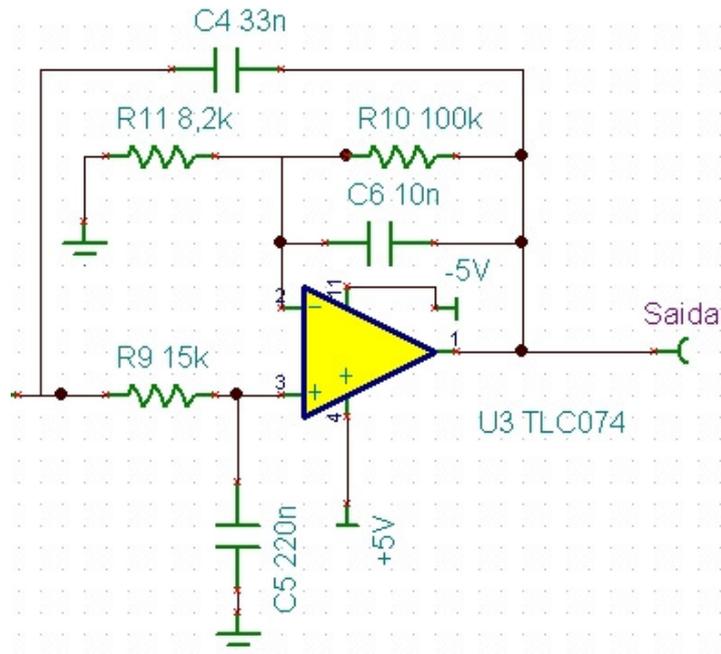


Figura 5.8: Filtro ativo Butterworth passa-baixas de 2ª ordem implementado.

Para este circuito mostrado na Figura 5.8, a frequência de corte é dada pela equação 9 (Boylestad, 2003):

$$F_c = \frac{1}{2\pi\sqrt{C_5 C_4 R_8 R_9}} \quad (9)$$

Para os valores de resistores e capacitores mostrados na Figura 5.8, a frequência de corte deste filtro é igual 159 Hz. Na Seção 5.6, Figura 5.9, é mostrado o esquema eletrônico completo do circuito de filtro passa-banda, mostrando o filtro passa-altas de primeira ordem na entrada seguido do passa-baixas de terceira ordem.

5.6 Simulação do Pré-amplificador (*headstage*)

Para simular computacionalmente o funcionamento do pré-amplificador e dos filtros (*headstage*), foi utilizado o *software* TINA-TI, disponibilizado gratuitamente pela Texas Instruments (TINA, 2013). A Figura 5.10 ilustra uma janela do TINA-TI durante simulação do modelo Spice gerado para o circuito amplificador desenvolvido neste trabalho. Na Figura A.6 do Apêndice A consta o esquema elétrico completo do pré-amplificador *headstage* com os filtros adotado neste projeto. Usando-se o *software* TINA-TI foi feita a simulação da tensão e corrente de ruído para o circuito integrado INA333 em função da frequência. O resultado da simulação é mostrado na Figura 5.11.

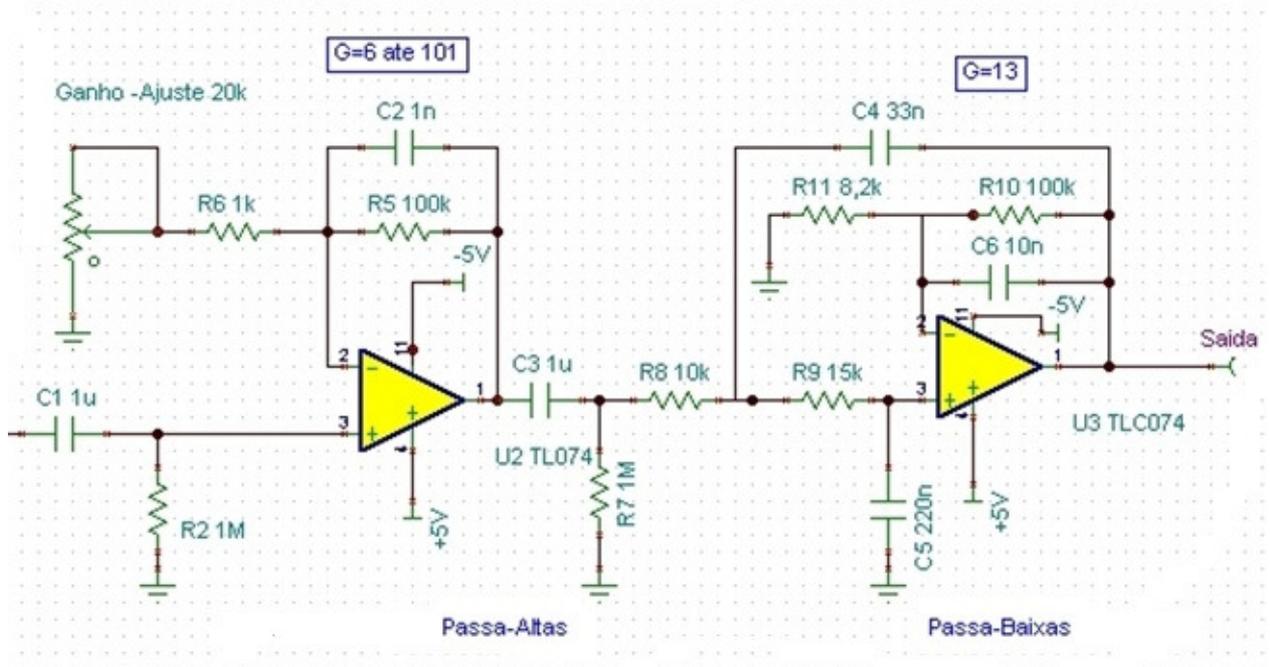


Figura 5.9: Esquema eletrônico completo do circuito de filtro que foi simulado e implementado.

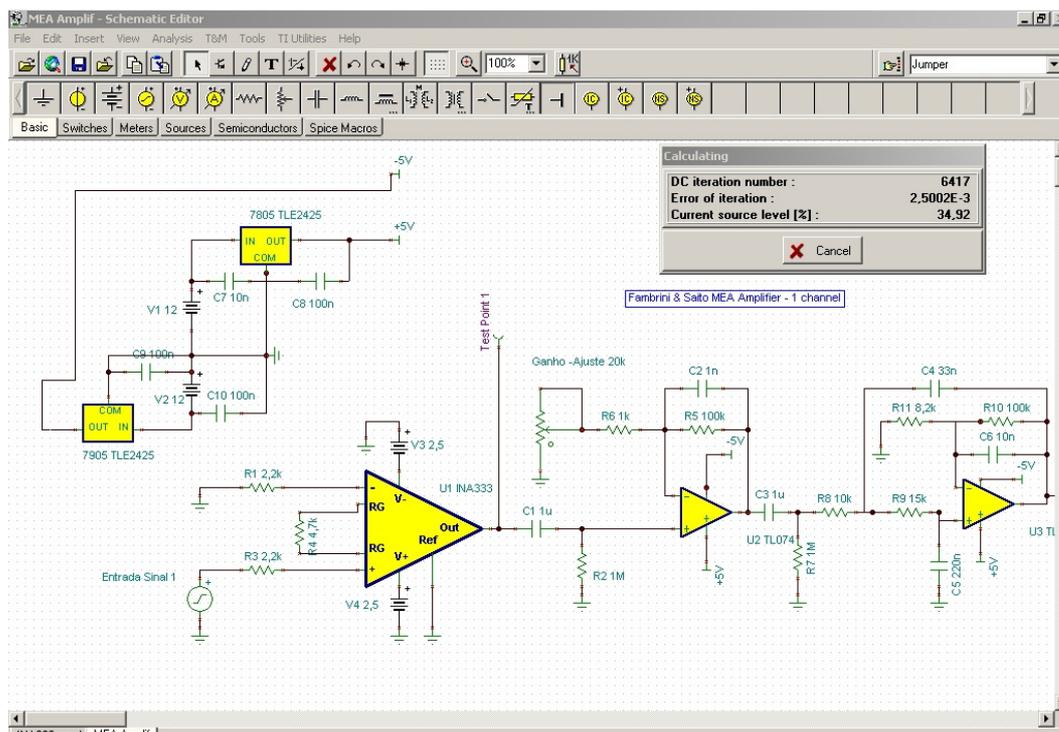


Figura 5.10: Janela do *software* simulador de circuitos em modelo spice TINA-TI.

Na Figura 11, nota-se o diagrama de ruído em corrente (current-noise) e em tensão (voltage-noise) para o pré-amplificador proposto. O ruído em corrente, decresce até 500 Hz, aproximadamente,

acima da qual permanece constante. O ruído em tensão decresce até a frequência de 20 Hz, acima da qual permanece praticamente constante.

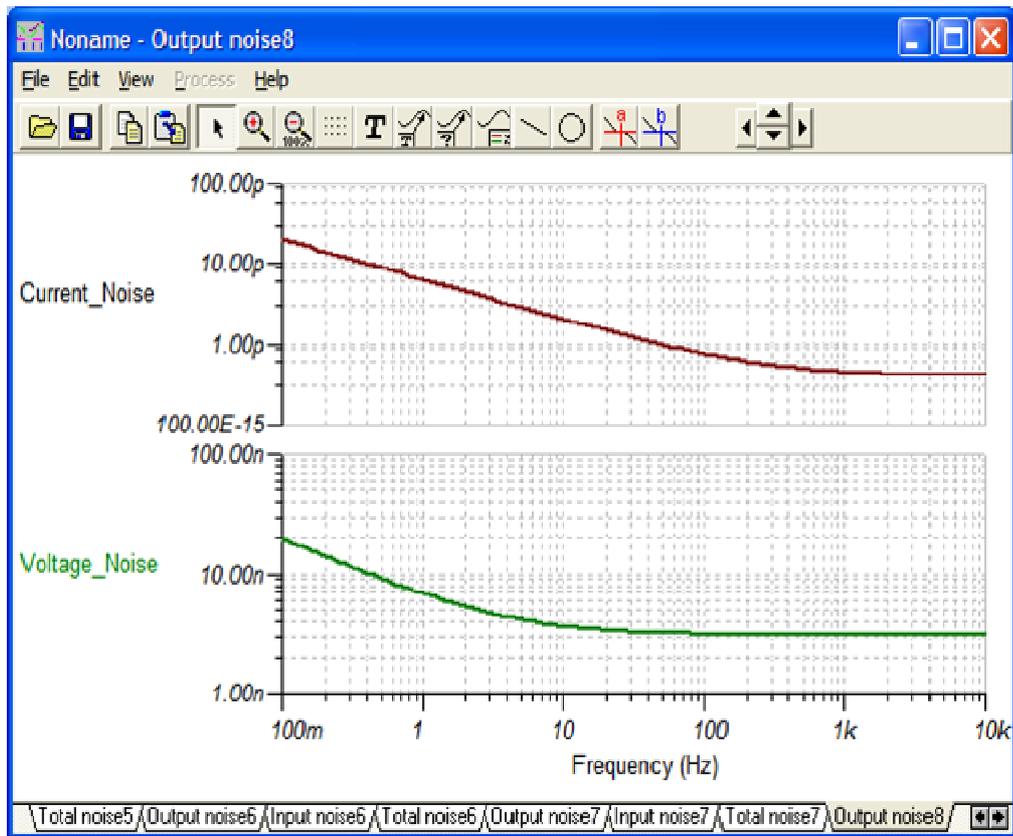


Figura 5.11: Resultado da simulação da tensão e corrente de ruído para o pré-amplificador proposto.

Capítulo 6 - Subsistema de Amplificação, Conversão AD e Transmissão de Sinais

Neste capítulo será descrito o subsistema de Amplificação, Conversão analógico/digital (AD) e Transmissão de Sinais serializado para o computador, geralmente referenciado como Sistema de Aquisição de Dados (Data Acquisition System, DAQ).

A Figura 6.1 é um extrato da Figura 4.1 que mostra o diagrama de blocos das partes referentes ao subsistema DAQ.

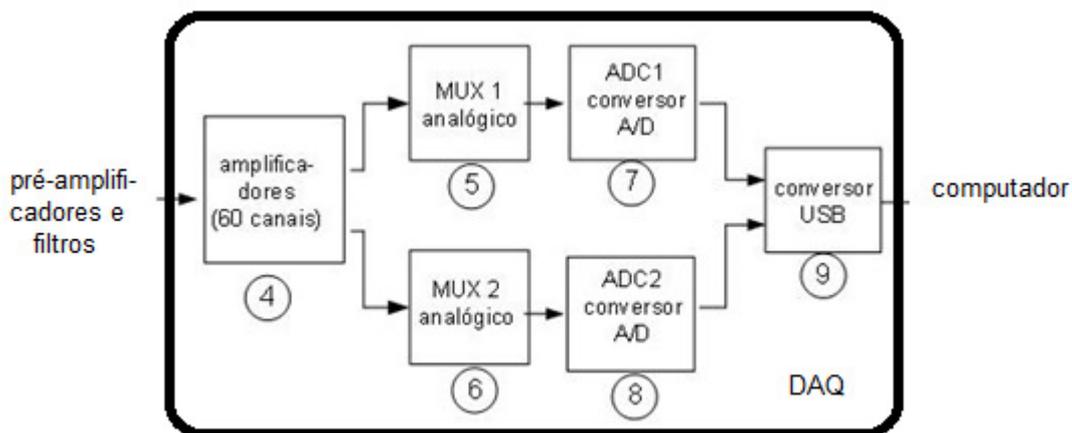


Figura 6.1: Diagrama de blocos do subsistema de Amplificação, Conversão AD e Transmissão de Sinais (DAQ).

Os blocos 5 e 6 representam dois multiplexadores (MUX) independentes, cada um capaz de multiplexar até 32 entradas no domínio do tempo. Os blocos 7 e 8 representam dois conversores AD e o bloco 9 é o conversor USART (Universal Serial Assynchronous Transceiver) que envia e recebe sinais pela porta USB do computador. Todos estes blocos serão montados na placa mostrada nas Figura 6.4 e Figura 6.5.

6.1 Amplificadores

Os amplificadores (dos sinais providos dos pré-amplificadores e filtros) possuem ganho de tensão igual a 10 vezes (20 dB) e servem, também, como um *buffer* (isolador) entre os circuitos dos filtros e a entrada para os multiplexadores (MUX) e resposta plena de frequência até o valor da

frequência de corte dos filtros *anti-aliasing*. Tais amplificadores estão representados pelo bloco número 4 da Figura 6.1.

Na Figura 6.2 é mostrado o diagrama de um único estágio amplificador. Trata-se da topologia não-inversora clássica, cujo ganho de tensão é dado pela equação (11) onde $R_1=90K\Omega$ e $R_2=10K\Omega$.

$$G = 1 + \frac{R_1}{R_2} \quad (11)$$

A simulação do estágio amplificador mostra que o ganho de tensão é compatível com o esperado. Os níveis de ruído são menos relevantes neste estágio, porque o ganho é baixo, apenas 10 vezes, portanto não foram feitas simulações sobre densidade de ruído para o amplificador. O circuito da Figura 6.2 foi simulado e na Figura 6.3 é mostrada a tela do computador com o resultado da simulação.

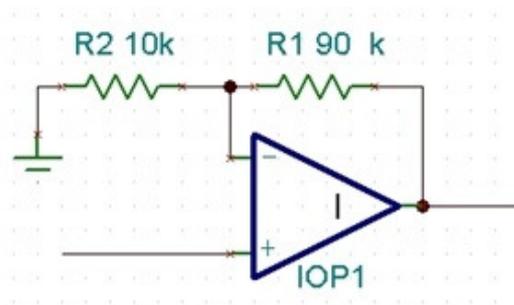


Figura 6.2: Esquema de um único estágio de amplificador. São necessários 32 estágios em cada placa da Figura 6.4.

Na Figura 6.4 é mostrado o esquema eletrônico dos blocos amplificadores. Estes amplificadores são AO contidos internamente nos *chips* TLC2274 que são amplificadores operacionais quádruplos fabricados pela empresa Texas Instruments (Texas, 2013). Cada *chip* contém internamente 4 amplificadores de baixo nível de ruído, sendo necessários 8 *chips*, para um conjunto de 32 amplificadores. Para a implementação de um sistema SRSN de 60 canais são necessários dois desses conjuntos de amplificadores, ou seja, 16 *chips* no total, ficando 4 amplificadores sobressalentes.

6.2 Conversor AD para 60 canais

O principal componente do subsistema DAQ é o conversor AD, que costuma estar disponível dentro de um circuito integrado especificamente fabricado para esta função. Uma possível escolha para este estágio é utilizar o chip DSPIC33FJ256GP710 do fabricante Microchip®.

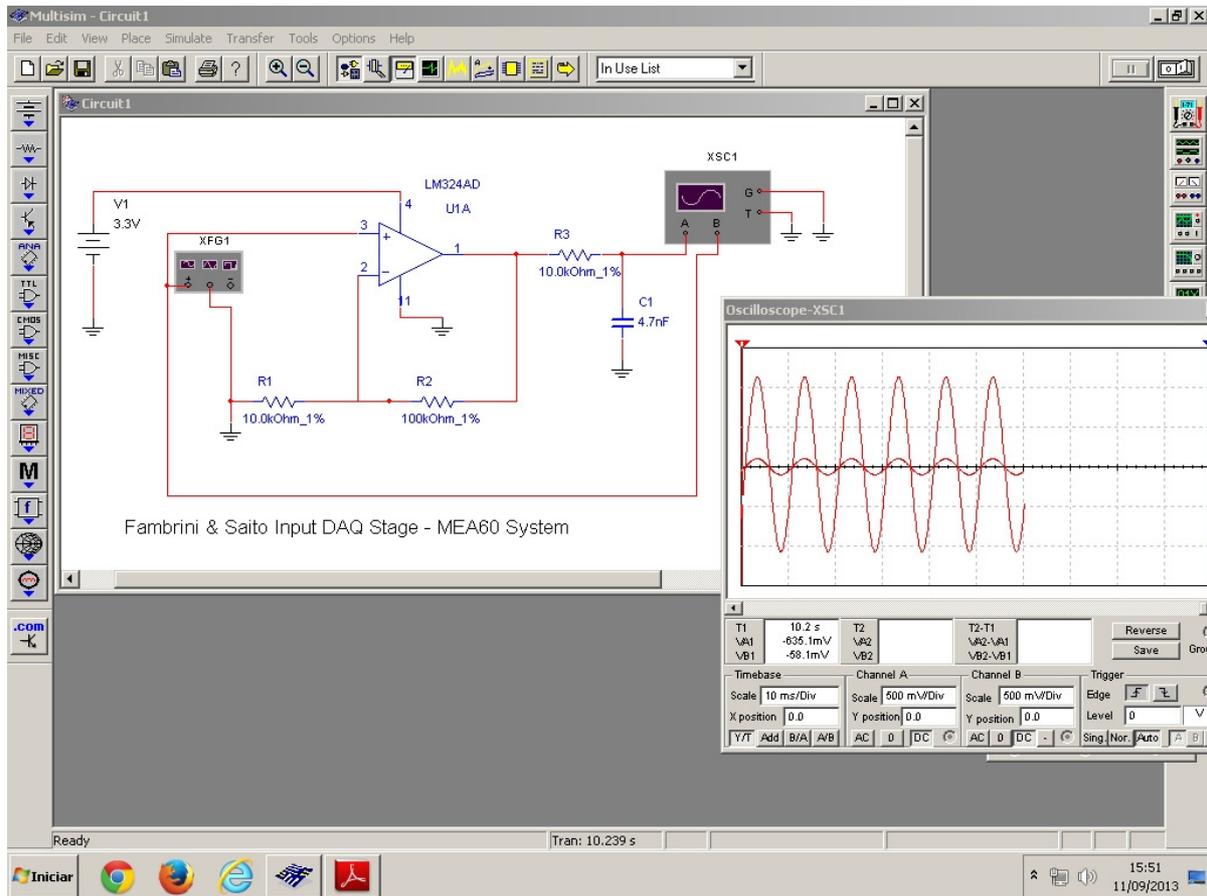


Figura 6.3: Simulação de um único estágio do amplificador presente nas entradas do MUX.

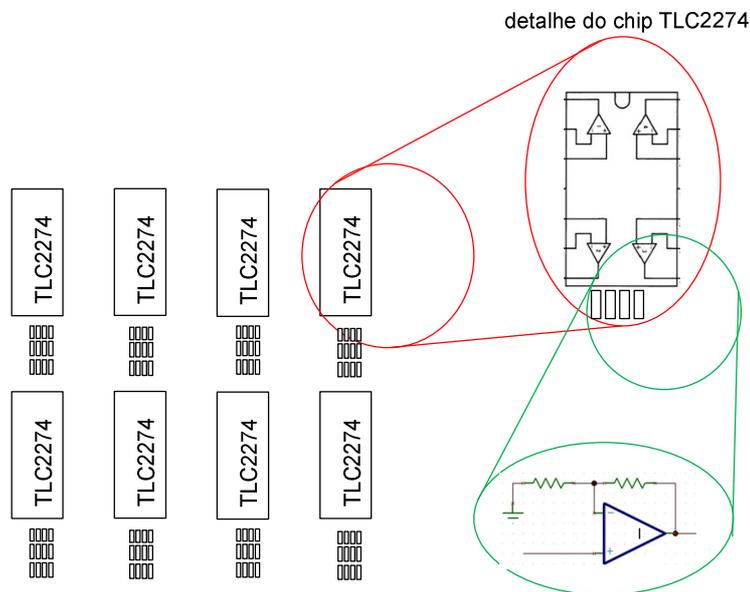


Figura 6.4: Conjunto de Amplificadores projetados com o circuito TLC 2274 (Texas Instruments), cuja implementação completa se encontra no Apêndice A.

O DSPIC33FJ256GP710 é um controlador digital de sinais com um MUX de 32 entradas e dois conversores AD internos capazes de multiplexar até 16 entradas cada um deles. A taxa de amostragem (*sample rate*) pode chegar a 1,1 Msps (1,1 milhões de amostras por segundo) divididas entre os 32 canais (Microchip, 2013). Além disso, possui *hardware* interno dedicado a DMA (Direct Memory Access) o que aumenta a velocidade de armazenamento e transferência dos dados, permitindo guardar dados na memória sem a interferência do processador, o que torna mais rápido o processo. A resolução dos conversores A/D é de 16 bits ou de 12 bits, podendo tal resolução ser escolhida através do *firmware*.

O *chip* possui ainda memória de programa do tipo *flash* EEPROM (Electrically Erasable Programmable Read Only Memory), o que dispensa o uso de uma memória externa e uma memória RAM de 512 Kb para armazenar os registros antes destes serem enviados ao computador PC. Para implementar os necessários 60 canais serão necessários 2 circuitos integrados DSPIC33FJ256GP710. Esta implementação não será apresentada nesta dissertação, entretanto, o esquema eletrônico completo desta implementação é mostrado na Figura A.8 no Apêndice A.

Na Figura 6.5 é mostrado o diagrama de blocos de um único canal contido internamente no circuito integrado DSPIC33FJ256GP710. O diagrama de blocos completo do *chip* pode ser consultado em (Microchip, 2013). A tensão de referência do conversor AD (V_{REF}) é importante para definir a estabilidade e a resolução deste conversor. O *chip* em questão possui conversores AD de 16 bits. Ajustando-se $V_{REF}=3,3V$, tem-se um resolução dada pela equação (10).

$$Re_{s_{16}} = \frac{V_{REF}}{2^n} = \frac{3,3}{2^{16}} = 50\mu V \quad (10)$$

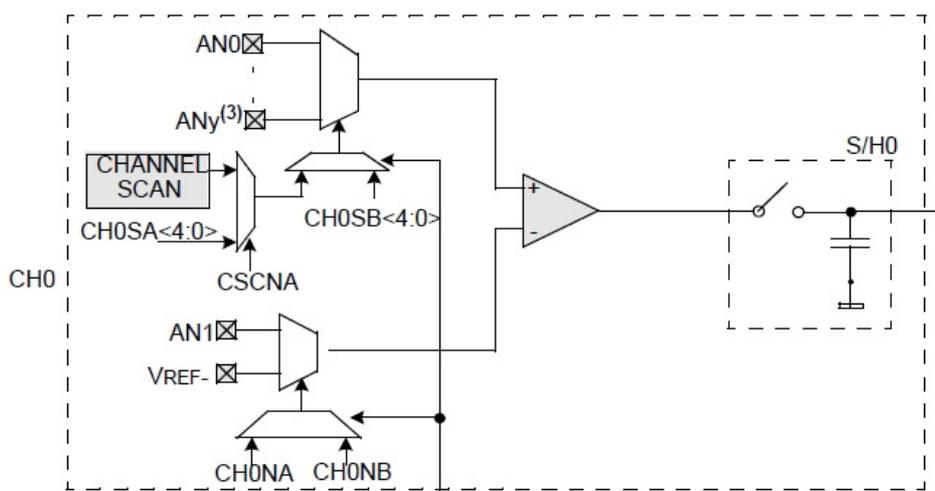
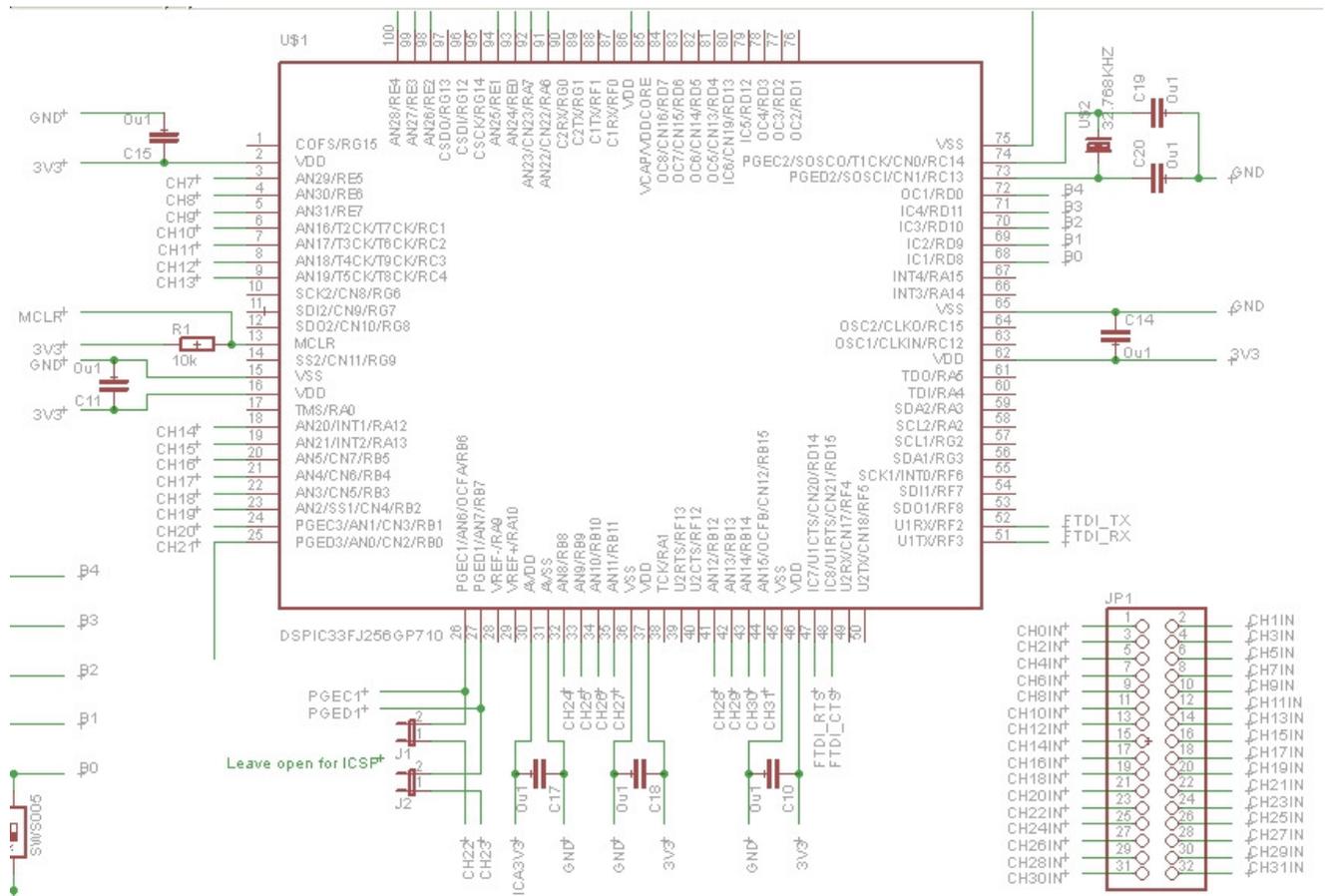


Figura 6.5: Diagrama de blocos de um único canal do MUX contido internamente no DSPIC33FJ256GP710.

Na Figura 6.6 é mostrado o esquema eletrônico do conversor AD projetado.



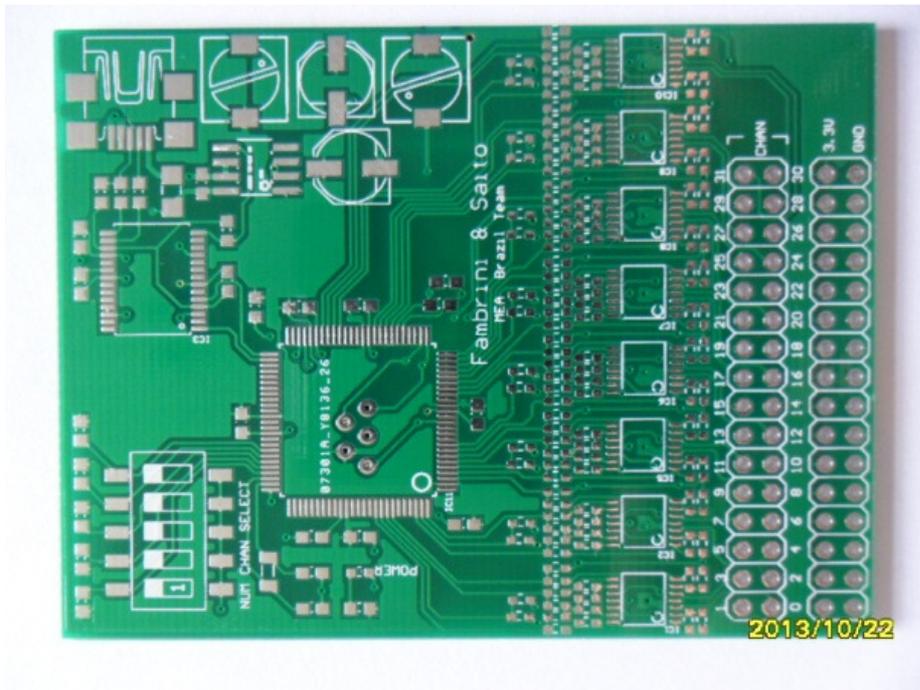


Figura 6.8: Foto da placa de circuito impresso do conversor AD com 32 entradas implementado.

6.3 Conversor AD Implementado

A Seção 6.2 descreveu o projeto de um conversor AD de 32 canais, cuja implementação em duplicata resulta em um subsistema de 60 canais do sistema. Neste trabalho de pesquisa, porém, devido ao objetivo inicial ser o de testar apenas dois canais do MEA, foi implementado e testado um conversor AD alternativo, de apenas dois canais. Para isto, foi utilizado o microcontrolador Microchip PIC18F4620® que possui internamente 13 entradas multiplexadas para um conversor AD de 10 bits, das quais foram utilizadas apenas 2 entradas nesta implementação.

Na Figura 6.9 é mostrada a disposição dos pinos do microcontrolador PIC18F4620 usado nesta implementação com a finalidade de se validar o conceito. O código-fonte para aquisição de dados é mostrado no Apêndice D.2. Para este microcontrolador foi escolhida a frequência de amostragem interna, determinada a partir do oscilador de clock, com o *throughput* de 100 Ksps (100 mil amostras por segundo). Neste caso, a resolução do conversor AD é de 10 bits e a fonte de tensão de referência é de 5 volts, então a resolução será dada pela equação (12).

$$\text{Re } s_{10} = \frac{V_{REF}}{2^n} = \frac{5,0}{2^{10}} = 4,88mV \quad (12)$$

Considerando um ganho de tensão igual a 1000 da parte dos pré-amplificadores e amplificadores, o menor valor de tensão que pode ser medido a partir da MEA é $5\mu V$. Os canais implementados foram os pinos 2 e 3 do microcontrolador, denominados RA0 e RA1 na Figura 6.9.

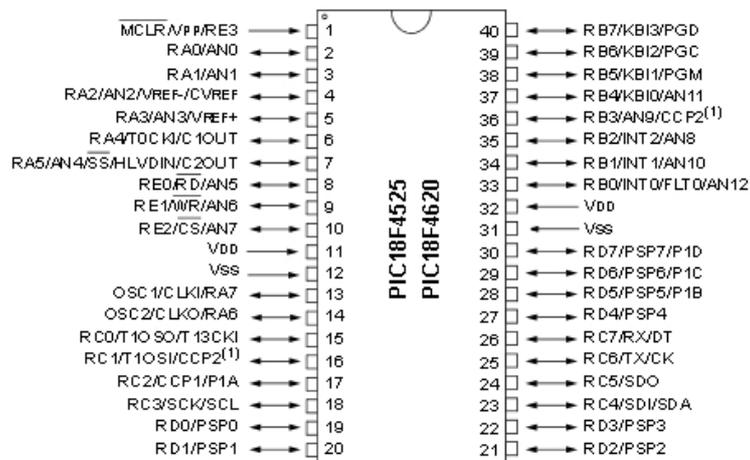


Figura 6.9: Disposição dos pinos do microcontrolador PIC18F4620 utilizado.

O trecho do *firmware* responsável pela leitura do conversor AD está descrito em Código 6.1.

```

SETUP_ADC(ADC_CLOCK_INTERNAL | VSS_VDD);

set_adc_channel (0);

delay_us(2);

READ_ADC(ADC_START_AND_READ);

M = read_adc();

printf ("D%s\r\n",M);

```

Código 6.1 Leitura do conversor AD.

No algoritmo descrito em Código 6.1, inicialmente, a fonte interna de *clock* para o conversor AD é selecionada. O canal 0 (pino 2 -RA0- do microcontrolador) é escolhido como pino de entrada para leitura de tensões analógicas, a conversão é iniciada e o resultado, que é um número no intervalo [0, 1023] é armazenado na variável M. A seguir, o valor contido na variável M é transferido para a interface de comunicação USB através da instrução *printf*, precedida pelo caractere D (em maiúsculo). Esse caractere D maiúsculo foi escolhido como caractere de sincronismo entre o *software* que é executado no computador PC e o *firmware*. Qualquer outro caractere poderia ser usado. Ao receber o caractere D, o software executado no computador reconhece que o caractere a seguir é um dado a ser plotado no gráfico, correspondendo a um valor de tensão lido pelo conversor AD do microcontrolador PIC18F4620. Esta rotina é executada permanentemente, em laço de repetição.

O conversor AD é capaz de efetuar até 100 mil conversões por segundo. Entretanto, as demais instruções consomem algum tempo de processamento. A instrução *printf* por exemplo, demora cerca 100 μ s. O tempo total de execução da rotina de aquisição de dados é da ordem de 110 μ s. Assim, a máxima taxa teórica de amostragem seria $\frac{1}{110\mu s}$ ou 9091 amostras por segundo. Isso coloca a frequência de amostragem no valor de 9 kHz.

De acordo com o Teorema da Amostragem, a máxima frequência teórica que pode ser amostrada seria igual a 4,5kHz. Mas existe também o problema da velocidade do *software* que é executado no computador. De fato, *scripts* em MATLAB são de execução bastante lenta conforme discutido no Capítulo 7. Utilizando-se MATLAB a maior frequência que é possível amostrar é igual a 100 Hz. Usando-se um código escrito em Processing, foi possível amostrar sinais de até 3 kHz. Essas são limitações desta implementação com microcontrolador. A Figura 6.10 mostra o esquema eletrônico do conversor A/D de apenas 2 canais que foi implementado com o microcontrolador PIC18F4620. Um *display* LCD de 16 colunas e 2 linhas alfanumérico foi também acrescentado.

Como conversor USB, foi usado um cabo USB externo conectado aos pinos RC6 e RC7 do microcontrolador (pinos Tx e Rx respectivamente). O sistema todo foi montado dentro de um pequeno gabinete de alumínio e todo o sistema foi alimentado com um bateria de 12 volts e 7 A.h. O pré-amplificador e o filtro foram ligados externamente. Todo o conjunto é mostrado na Figura 6.11.

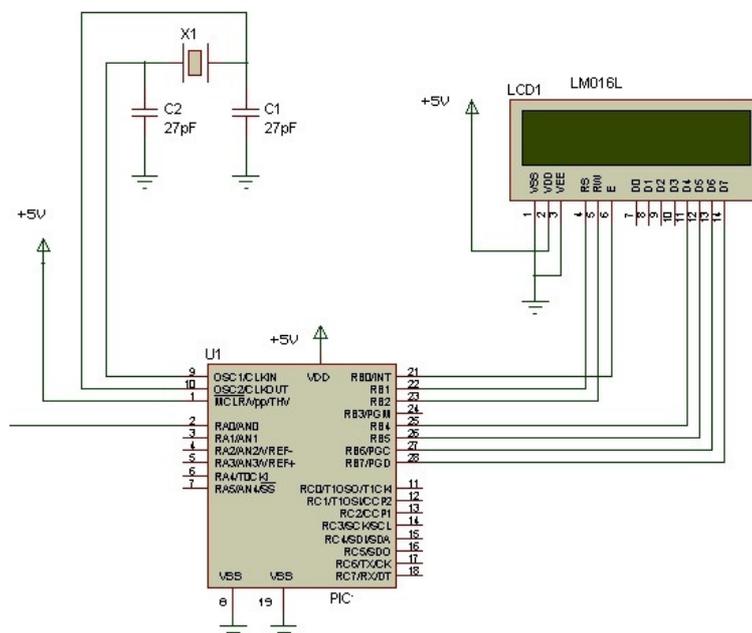


Figura 6.10: Conversor AD e MUX implementados a partir do PIC18F4620, apenas 2 canais foram construídos.



Figura 6.11: Conversor AD implementado, juntamente com o pré-amplificador e filtros, à esquerda.

6.4 Teorema da Amostragem de Nyquist–Shannon

Um sinal ou função é limitado em banda se não contém energia em frequências maiores do que o limite de banda B . O Teorema da Amostragem (ou Teorema de Nyquist-Shannon) assegura que amostras discretas uniformemente espaçadas no tempo são uma representação completa do sinal, se sua largura de banda é menor do que a metade da taxa de amostragem. A condição suficiente para uma exata reconstrução, a partir das amostras em uma taxa de amostragem uniforme (em amostras por unidade de tempo), é que a frequência de amostragem seja maior do que duas vezes o limite de banda B como estabelece a equação (13).

$$F_{Amostr} \geq 2B \quad (13)$$

Na equação (13), B representa a largura de banda que se deseja amostrar (diferença entre a maior frequência e a menor frequência a ser lida). De modo geral, nos equipamentos para amostragem de sinais em MEA, tal largura situa-se em torno de 5 kHz em cada um dos canais (Systems, 2013). Em equipamentos destinados a EEG (eletroencefalograma) tal largura de banda é consideravelmente menor, em torno de 100 Hz. O conversor AD é limitado em frequência: existe uma frequência máxima que pode ser registrada. Para evitar que frequências harmônicas de valor mais alto do que o limite máximo, que o conversor AD é capaz de ler, apareçam em suas entradas, utiliza-se na entrada do conversor AD um filtro passa-baixas, denominado filtro *anti-aliasing*.

6.5 Aliasing

Aliasing é o fenômeno que provoca sinais de frequências diferentes se tornarem indistinguíveis quando amostrados por meio de um conversor AD. A Figura 6.12 mostra graficamente o fenômeno de *aliasing*.

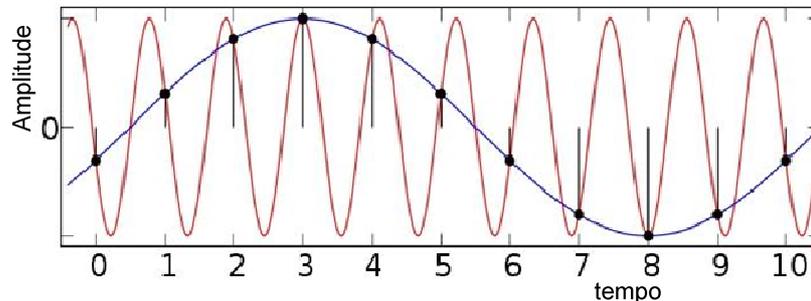


Figura 6.12: Ilustração do fenômeno de *aliasing* que pode ocorrer nos conversores A/D.

O sinal de maior frequência, representado na Figura 6.12 pela linha em vermelho, pode surgir na entrada de um conversor AD. Para o conversor AD, este sinal de frequência maior não pode ser diferenciado do sinal de menor frequência (em azul) devido ao fato de que os conversores AD trabalham com a discretização no tempo, amostrando apenas os pontos. Os pontos registrados pelo conversor AD são os mesmos em ambos os sinais. Dessa forma, existe a necessidade de bloquear sinais de frequências mais altas do que um determinado valor (calculado pela equação (19)). Para isso utiliza-se um filtro *anti-aliasing*, que é um filtro passa-baixas ligado na entrada dos conversores AD. O erro provocado pelo sinal *aliasing* é também denominado "erro de sub-amostragem".

A Figura 6.13 mostra um típico filtro *anti-aliasing* que necessariamente precisa ser implementado em *hardware* em cada uma das 60 entradas multiplexadas do subsistema DAQ. Como já mencionado, consta apenas de um filtro RC passivo de primeira ordem que possui atenuação igual a -20 dB por década (ou, equivalentemente, -6 dB por oitava), entretanto deve ser repetido 60 vezes.

Especificamente, no estágio do conversor AD, além do *aliasing*, podem surgir outros tipos de sinais que não existiam na entrada original. Alguns desses ruídos e erros que podem aparecer especificamente nos conversores AD são:

- Ruído ou erro de quantização (E_{qRMS});
- Ruído do *jitter* de abertura do "sample and hold" (E_{jRMS}); e
- Ruído analógico (E_{aRMS}).

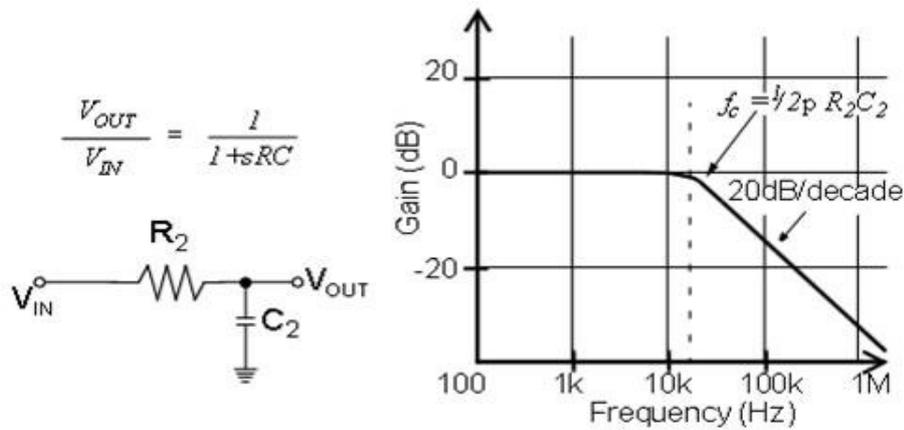


Figura 6.13: Filtro *Anti-Aliasing*, função de transferência e curva de atenuação.

Cada parcela contribui para o ruído total através de uma soma vetorial a qual é dada pela equação (14).

$$E_{RMS} = \sqrt{E_{qRMS}^2 + E_{jRMS}^2 + E_{aRMS}^2} \quad (14)$$

6.6 Influência do MUX

O MUX (multiplexador) é um estágio obrigatório na entrada de um único conversor AD com 60 canais de aquisição de dados. Uma outra opção seria usar 60 conversores AD independentes e interligados através de um rápido barramento de comunicação SPI (SPI - Serial Peripheral Interface - é um protocolo de dados seriais síncronos utilizado em microcontroladores para comunicação entre o microcontrolador e um ou mais periféricos).

Nesse caso, entretanto, caberia ao microcontrolador (mestre da rede) efetuar a multiplexação dos 60 sinais, via *software*. Isso seria uma opção mais lenta do que fazer uma multiplexação por *hardware*, além de muito mais cara: os conversores AD tem custo muito maior que simples entradas de MUX. Dessa forma optou-se por usar poucos conversores AD: um único conversor AD com 16 entradas multiplexadas no domínio do tempo. A cada instante, tem-se apenas um canal, dentre os 60 disponíveis, sendo lido. A comutação do canal é feita através das chaves digitais contidas dentro do MUX. Isto também limita a velocidade de aquisição dos dados, pois a taxa de aquisição (*sample rate*) máxima de cada conversor AD precisa ser dividida por 16 ou por 32 conforme o *chip* escolhido. Considerando-se o conversor AD interno contido no *chip* DSPIC33FJ256GP710 (Microchip, 2013) e uma taxa de amostragem igual a 1,1 Msps (1100000 amostras por segundo), e dividindo-se esta taxa por 32 teremos uma taxa de amostragem igual a 34375 amostras por segundo em cada canal. Isso corresponde a uma

Capítulo 7 - *Software* de Registro de Sinais de Neurônios *in vitro* em MEA

Neste capítulo é apresentada uma versão preliminar do desenvolvimento do *software* de registro de sinais de neurônios *in vitro* em MEA. Esse *software* foi utilizado para validar a implementação do sistema SRSN, com 2 canais de registro. Como descrito no Capítulo 1 (Seção 1.4), foi desenvolvido como parte do trabalho de pesquisa um *software* específico para manipulação dos sinais provenientes do subsistema DAQ. No desenvolvimento de tal *software*, duas ferramentas de desenvolvimento foram utilizadas: MATLAB e Processing (Processing, 2013).

7.1 Comunicação Serial USB

Para acessar a porta USB de um computador PC e transferir os sinais provenientes do subsistema DAQ, uma interface serial USB foi adicionada à saída desse subsistema. O trecho de código, denominado Código 7.1, foi escrito em MATLAB para ser processado no computador PC e possibilitar tal comunicação.

```
N=1000; % fixa o tamanho em 1000 amostras
s = serial('COM5','BaudRate',460800,'DataBits',8,'Parity','none','FlowControl','none');
fopen(s);
seq = 1:N;
y = zeros(1,N);
for i=1:N
    fprintf(s, '%s', 'a');
    y(i) = str2num( fscanf(s, '%s') );
end
fclose(s);
plot(seq,y); % plota o gráfico com as informações da porta USB
xlabel('registro');
ylabel('Tensao (mV)');
```

Código 7.1 *Script* em MATLAB de comunicação entre subsistema DAQ e o Computador.

A função `s=serial('COM5','BaudRate',460800,'DataBits',8,'Parity','none','FlowControl','none')` permite configurar a porta serial COM5 como sendo a porta USB na qual o subsistema DAQ é conectado, além de configurar: a velocidade de comunicação (*baudrate*), paridade e controle de fluxo, e todos os parâmetros típicos da comunicação. Este *script* permite abrir a porta de comunicação USB do computador PC e registrar, em gráfico, 1000 amostras provenientes do subsistema DAQ. A quantidade de amostras é ajustável pelo usuário. O resultado da aplicação do *script*, descrito em Código 7.1, pode ser visto na Figura 7.1, quando um sinal senoidal de frequência igual a 100 Hz foi aplicado à entrada de um conversor AD de apenas dois canais, com apenas 100 amostras.

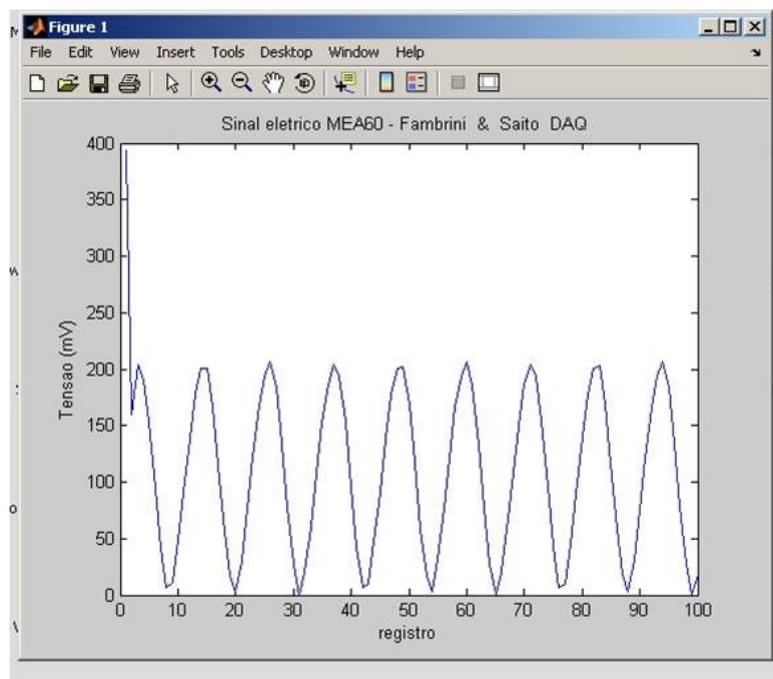


Figura 7.1: *Script* de comunicação USB, Código 7.1, rodando em MATLAB e amostrando um sinal senoidal.

A maior frequência que foi possível amostrar em tempo real usando o Código 7.1 foi igual a 100 Hz. Isto se deve, principalmente, à velocidade de execução dos *scripts* ".m", que é lenta.

7.2 Transformada Rápida de Fourier (FFT)

Com a finalidade de monitorar a ocorrência do ruído de 60 Hz captado da rede de energia, ainda sem adição de qualquer filtro para esta frequência, um segundo *script* (descrito em Código 7.2) é executado e apresenta uma figura (Figura 7.2), que mostra o conteúdo espectral (no domínio da

frequência) do sinal amostrado pelo conversor AD, aplicando FFT (*Fast Fourier Transform*) sobre o sinal.

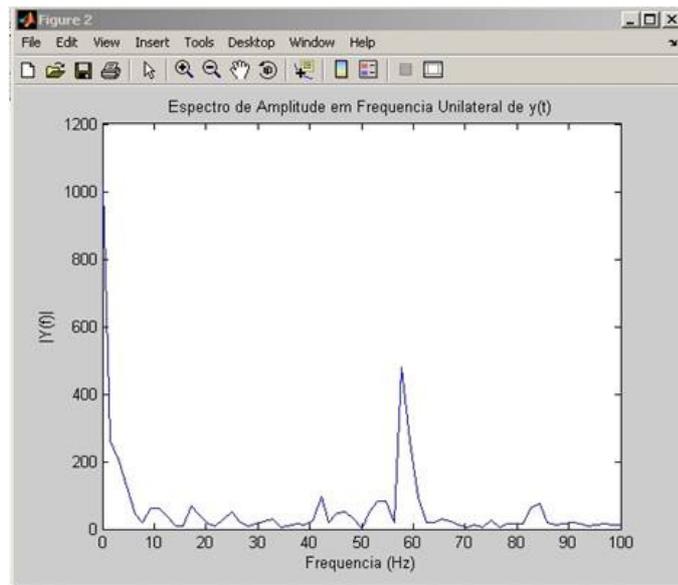


Figura 7.2: FFT aplicada sobre o sinal amostrado, mostrando a presença do ruído de 60 Hz.

```
figure(2)
L=length(y);
NFFT = 2^nextpow2(L);
Y = fft(y,NFFT)/L;
f = Fs/2*linspace(0,1,NFFT/2+1);
plot(f,2*abs(Y(1:NFFT/2+1)))
title('Espectro de Amplitude em Frequencia Unilateral de y(t)')
xlabel('Frequencia (Hz)')
ylabel('|Y(f)|')
```

Código 7.2 *Script* responsável pelo FFT.

A instrução $Y = \text{fft}(x)$ retorna a transformada discreta de Fourier (DFT) do vetor x , calculado com um algoritmo de transformada rápida de Fourier (FFT). Se a entrada é uma matriz X , $Y = \text{fft}(X)$ retorna a transformada de Fourier de cada coluna da matriz.

7.3 Filtro Notch

Para filtrar o ruído de 60 Hz proveniente da rede elétrica usa-se o filtro *Notch*. O filtro *Notch* é um filtro rejeita-banda com uma banda de rejeição muito estreita. Este tipo de filtro deixa passar todas as frequências, exceto a que se encontra na banda de rejeição, a frequência central, neste caso 60 Hz. A interferência proveniente da rede elétrica está sempre presente no processo de medição de sinais bioelétricos, mesmo que por vezes com amplitudes extremamente baixas tornando-se quase

imperceptível. Em experiências de laboratório ou análises clínicas, torna-se difícil e caro isolar dispositivos de medição dos campos elétricos produzidos pela rede de energia elétrica. No registro destes sinais, é uma prática comum a aplicação de um filtro *Notch* para rejeitar a frequência 50/60 Hz de modo a reduzir este tipo de interferência (dependendo do país, a frequência da rede elétrica é 50 Hz, mas no Brasil o padrão é 60 Hz). Neste trabalho optou-se por implementar um filtro *Notch* por *software*. A Figura 7.3 mostra a curva característica da atenuação do sinal obtida com o uso de um Filtro *Notch*.

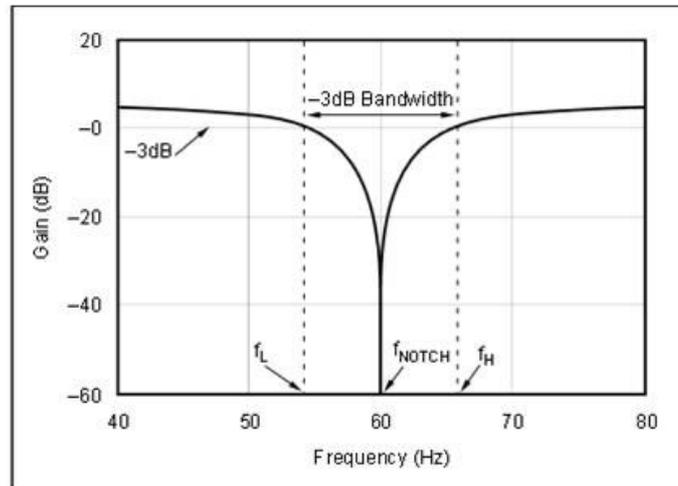


Figura 7.3: Curva de atenuação obtida a partir de um Filtro *Notch* para $F_c=60\text{Hz}$ (Horowitz, 1989).

Tal filtragem pode ser feita usando-se filtros *Notch* por *hardware*, mas isso complicaria muito mais o circuito, aumentando o tamanho da placa de circuito impresso, elevando o custo e a quantidade de componentes. Filtros analógicos são construídos utilizando-se indutores, resistores, capacitores e amplificadores operacionais. Em contrapartida, filtros digitais podem ser implementados apenas por *software* ou em FPGAs, usando-se, por exemplo, linguagem Verilog ou VHDL. Alternativamente, algumas linhas de código escritas em linguagem C podem ser incluídas no programa do microcontrolador ou DSP do subsistema DAQ para fazer essa filtragem, o que permite economizar muitos componentes eletrônicos, ao invés de se construir 60 filtros *Notch* com componentes eletrônicos.

É possível economizar *hardware* implementando-se um filtro *Notch* por *software* de modo muito simples no MATLAB, como mostra o Código 7.3.

```
% Filtra em 60 Hz - notch filter (MATLAB)
Wo = 60/(Fs/2); BW = Wo/35;
[b,a] = iirnotch(Wo,BW);
y = filter(b,a,m);
```

Código 7.3 Implementação em MATLAB do Filtro *Notch*.

A variável que armazena os valores a serem plotados no eixo y é "m". A e B determinam a largura de banda do filtro. Trata-se de um filtro digital recursivo do tipo IIR (*Infinite Impulse Response*), que são filtros que possuem componentes de realimentação, produzindo um efeito mais intenso na curva de atenuação, e com isto, reduzindo a ordem do filtro. Com este código, o *software* MATLAB pode *plotar* um gráfico do sinal adquirido e discretizado pelo conversor AD, no qual se vê que a componente de frequência igual a 60 Hz proveniente da rede elétrica é atenuada de modo satisfatório.

7.4 O Software Processing

Processing é uma linguagem de programação, ambiente de desenvolvimento e comunidade online. O projeto foi iniciado em 2001 por Casey Reas e Ben Fry, ambos ex-membros do Grupo de Computação do MIT Media Lab. Um dos objetivos do *Processing* é atuar como uma ferramenta para não-programadores e não-iniciados em programação, o que torna seu aprendizado bastante simples. *Processing* tem por base as capacidades gráficas da linguagem de programação Java. Sendo baseado em JAVA, é executável em qualquer plataforma, como por exemplo GNU/Linux, MacOS X e Windows, em qualquer de suas versões. Algumas características da linguagem *Processing* são:

- a) Grátis para baixar, abrir e executar os códigos-fonte;
- b) Programas interativos com saída 2D, 3D ou PDF; e
- c) Integração com OpenGL para produzir gráficos 3D acelerados.

A linguagem Processing mostra-se interessante para esta aplicação pelo seu elevado desempenho em produzir gráficos na tela do PC em tempo real, por fazer uso dos recursos avançados de aceleração gráfica como o OpenGL e também por ser de uso e distribuição gratuita.

7.5 Código em Processing

O código descrito em Código 7.4, escrito na linguagem *Processing*, abre a porta serial e permite *plotar* um gráfico na tela do PC, a partir dos dados recebidos via porta serial.

```

import processing.serial.*;
Serial port;           // Cria um objeto a partir da classe Serial
int val;              // Recebe os dados a partir da porta serial
int[ ] values;

void setup() {
  size(640, 480);
  // Abre a porta serial na qual está conectada a placa de Aquisição de dados com velocidade de 9600 bps.
  port = new Serial(this, Serial.list()[0], 9600);
  values = new int[width];
  smooth();
}
int getY(int val) {
  return (int)(val / 1023.0f * height) - 1;
}

void draw()
{
  while (port.available() >= 3) {
    if (port.read() == 0xff) {
      val = (port.read() << 8) | (port.read());
    }
  }
  for (int i=0; i<width-1; i++)
    values[i] = values[i+1];
  values[width-1] = val;
  background(0);
  stroke(255);
  for (int x=1; x<width; x++) {
    line(width-x, height-1-getY(values[x-1]),
         width-1-x, height-1-getY(values[x]));
  }
}
}

```

Código 7.4 Código para *plotagem* de dados recebidos via porta serial.

O resultado do processamento do sinal usando Código 7.4 é mostrado na Figura 7.4, ao aplicar uma onda quadrada na entrada de um dos canais do conversor AD.

Usando o Código 7.4 foi possível *plotar* gráficos em tempo real na tela do PC com frequências de entrada de até 3000 Hz (3000 amostras por segundo). Comparando ao desempenho do MATLAB o resultado é bastante animador: o melhor *script* em MATLAB que foi feito neste trabalho consegue plotar gráficos com no máximo 100 amostras por segundo. Usando-se MATLAB, a maior frequência que foi possível amostrar em tempo real foi igual a 100 Hz. Usando-se Processing, conseguiu-se visualizar sinais de até 3 kHz, tudo considerando-se um único canal.

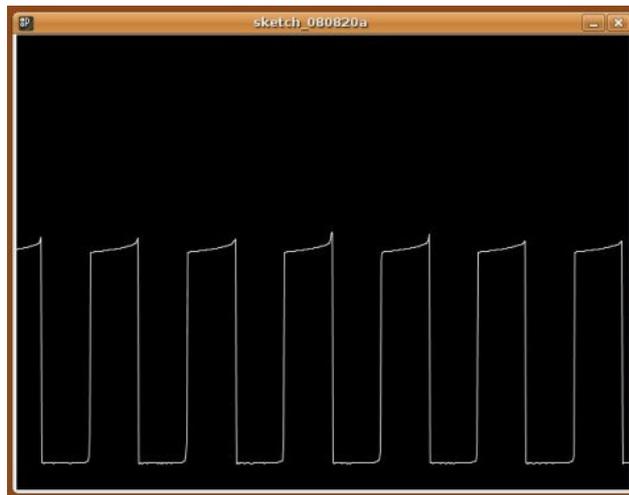


Figura 7.4: Imagem gerada pelo *script* descrito em Código 7.4, *plotando* dados recebidos (relativos a uma onda quadrada) na tela do PC.

Capítulo 8 - Resultados Experimentais

Neste capítulo são apresentados os resultados experimentais relativos a todas as implementações realizadas. Inicialmente serão descritos os testes realizados para a validação do soquete de MEA projetado e construído. Em seguida, para o teste do sistema como um todo, sem a cultura de neurônios, será descrito o simulador de MEA, Sim-MEA projetado e construído. Com o uso do Sim-MEA é testado o pré-amplificador projetado e construído para os 2 canais. Em seguida o teste do sistema de aquisição de dados para envio dos dados dos canais ao computador é mostrado.

8.1 Testes Elétricos do Soquete

Nessa etapa, um protótipo de soquete foi construído e conectado à MEA. A qualidade das conexões elétricas foi aferida, usando os seguintes métodos:

- a) Adição de solução de cloreto de sódio (líquido iônico condutivo), na cavidade de cultivo de cultura da MEA, para medir a condutividade elétrica entre eletrodos;
- b) Verificação da ausência de curto-circuitos entre contatos adjacentes da MEA, sob efeito da adição de solução, do item anterior, usando-se um multímetro; e
- c) Medida da impedância dos contatos elétricos, usando-se gerador de sinais Sim-MEA descrito neste capítulo (Seção 8.2).

A Figura 8.1 mostra o aspecto final do primeiro protótipo do soquete construído e acoplado à MEA padrão, cujos terminais estão sendo verificados por um multímetro. Para testar a qualidade das conexões elétricas uma solução salina de cloreto de sódio (NaCl) com concentração de 3,5% (igual à concentração da água do mar) foi adicionada à cavidade da MEA padrão e a resistência elétrica entre contatos adjacentes foi anotada, medida com multímetro analógico da marca SUNWA modelo 110B. Os valores das resistências elétricas medidas nos terminais do soquete, correspondente à PADs adjacentes é mostrado na Tabela 1.

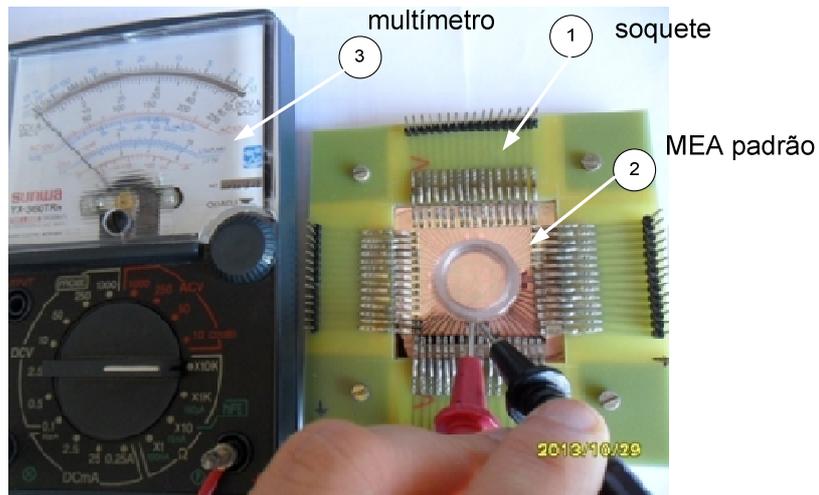


Figura 8.1: MEA padrão acoplada ao protótipo do soquete elétrico construído, cujos terminais são medidos por um multímetro.

Pinos soquete	Resistência (Ω)	Pinos soquete	Resistência (Ω)
1 e 2	337	31 e 32	259
3 e 4	272	33 e 34	271
5 e 6	416	35 e 36	227
6 e 8	458	37 e 38	234
9 e 10	348	39 e 40	356
11 e 12	322	41 e 42	342
13 e 14	289	43 e 44	219
15 e 16	402	45 e 46	345
17 e 18	350	47 e 48	319
19 e 20	467	49 e 50	305
21 e 22	264	51 e 52	202
23 e 24	252	53 e 54	367
25 e 26	168	55 e 56	223
27 e 28	224	57 e 58	276
29 e 30	470	59 e 60	251

Tabela 8.1 : Avaliação da resistência elétrica medida nos pinos do soquete, ao aplicar solução aquosa de NaCl 3,5% na cavidade de cultura da MEA padrão.

Verificou-se um valor médio igual a 285Ω de resistência elétrica entre terminais (*pads*) adjacentes, resistência semelhante à obtida ao medir diretamente a solução salina, o que evidencia baixa resistência elétrica nos terminais do soquete, conforme desejado.

8.2 Projeto e Construção do Simulador, Gerador de Sinais, Sim-MEA

Com a finalidade de propiciar um melhor teste do soquete elétrico, foi desenhado e implementado um circuito eletrônico em placa de circuito impresso com *pads* nas mesmas posições de MEA padrão, capaz de gerar sinais elétricos e simular uma MEA com cultura biológica, de modo eletrônico. Na Figura 8.2 é mostrado o diagrama de blocos do Sim-MEA onde (1) representa o PWM (modulador de largura de pulsos) interno ao microcontrolador PIC12F683®, o bloco (2) representa o integrador construído a partir de um filtro RC passivo com resistores e capacitores e o bloco (3) representa um divisor de tensão com resistores, cuja finalidade é reduzir a amplitude do sinal gerado nos *pads* do Sim-MEA.

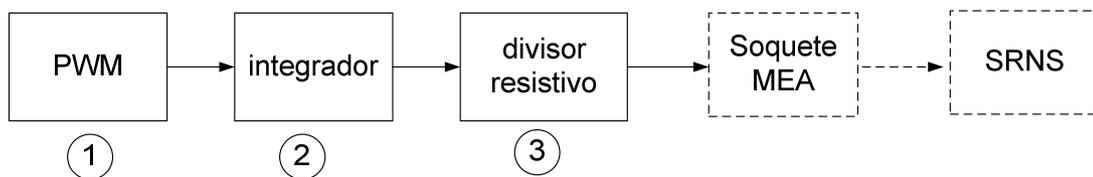


Figura 8.2: Diagrama de blocos do Gerador de Sinais Sim-MEA interligado ao soquete e ao sistema SRNS.

Os sinais elétricos são produzidos por um microcontrolador PIC12F683, do fabricante Microchip®. O *software* sintetiza algumas formas de onda para testes do amplificador e do módulo de aquisição de dados, devendo disponibilizar tais sinais nos conectores (*pads*) ao redor da placa. O *firmware* do microcontrolador foi escrito em linguagem C e compilado usando-se CCS *pcwh picc compiler* em versão demonstrativa, disponível gratuitamente em (CCS, 2013). Ao se pressionar uma chave na placa a onda produzida nos *pads* muda de forma, de acordo com uma tabela gravada na memória do microcontrolador, que é lida através de um ponteiro em C, o qual altera o valor de saída do PWM interno ao *chip*.

O módulo PWM do microcontrolador tem sua saída aplicada a um circuito integrador RC de segunda ordem, que transforma o sinal do PWM em níveis de tensão analógicos. Uma tabela na memória do *chip* armazena os níveis correspondentes à um sinal senoidal, conforme mostra a Figura 8.3. O trecho de código em Código 8.1 faz a varredura das tabelas, usando um ponteiro que é incrementado sempre que ocorre *overflow* do Timer2.

```

while(!PIR1.TMR2IF);    // espera overflow do timer2
CCPR1L = pwmval;        // armazena o valor do pwm no registrador
PIR1.TMR2IF = 0;        // limpa o flag de interrupção do Timer2
pwmstep++;               // incrementa o indexador da variável de posição do vetor
if(pwmstep >= 50) pwmstep = 0; // seno tem 50 pontos por ciclos
pwmval = sine[pwmstep]; // coloca o novo valor da tabela no PWM.

```

Código 8.1 Script de varredura de tabelas para a geração de forma de onda do sinal.

O trecho do *software* que efetua a síntese de forma de onda senoidal e representa a tabela é mostrado em Código 8.2.

```

// Gera a função SENO com 50 pontos por ciclo
byte const Tabela1[50] = { 52,57,62,66,70,74,77,80,82,84,
                           85,86,86,86,85,83,81,78,75,72,
                           69,65,61,56,52,48,44,39,35,31,
                           28,25,22,19,17,15,14,14,14,15,
                           16,18,20,23,26,30,34,38,43,48 };

```

Código 8.2 Script de uma forma de onda senoidal em tabela.

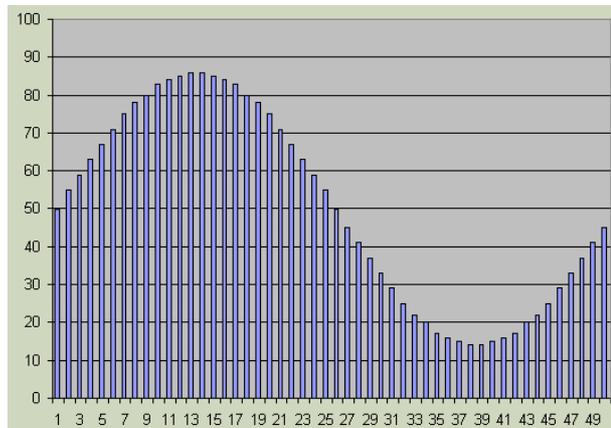


Figura 8.3: Onda senoidal sintetizada pelo PWM a partir de pontos discretizados na tabela.

Com a finalidade de alterar a forma de onda produzida na saída do simulador Sim-MEA, outras tabelas podem ser implementadas. Como exemplo, a tabela em Código 8.3 imita um sinal típico gerado por uma população de neurônios biológicos reais, em uma fatia de hipocampo de rato Wistar.

```
//--- Hippocampal Slice Population Spike -----
byte const Tabela2[50] = {      86,86,86,86,86,86,86,86,86,86,
                                0,0,80,85,90,100,72,160,170,163,
                                155,140,92,130,142,145,140,138,136,132,
                                131,130,129,127,
                                0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0 };
```

Código 8.3 Script de uma forma de onda típica de uma população de células em fatia de hipocampo de rato Wistar.

O integrador escolhido foi um circuito RC passa-baixas de segunda ordem, calculado levando-se em conta a frequência original do PWM, que é igual a 1 kHz (1 atualização a cada 20 us). Para um circuito RC passa-baixas de segunda ordem, a frequência de corte é dada pela equação (15).

$$F_c = \frac{1}{2\pi\sqrt{C_2 C_1 R_2 R_1}} \quad (15)$$

Na equação (15), C_1 e C_2 são os valores dos dois capacitores e R_1 e R_2 , dos dois resistores, mostrados na Figura 8.4.

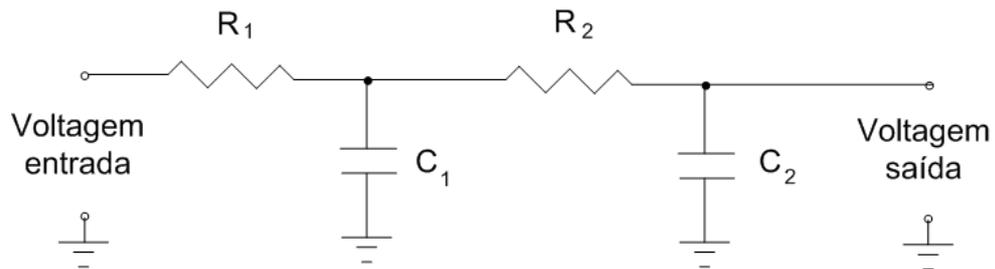


Figura 8.4: Filtro RC passa-baixas de segunda ordem, usado como integrador.

Um integrador é um filtro passa-baixas operando em uma frequência f muito maior que sua frequência de corte, ou seja, $f \gg F_c$. Levando-se em conta esse fato, escolheram-se valores adequados para os resistores e capacitores do filtro, de modo a minimizar o *ripple* na senóide produzida. A alimentação do circuito ficou por conta de uma bateria CR2032 montada na própria placa. Um botão de pressão, se pressionado, muda a tabela, trazendo um novo vetor com novos valores, produzindo outras formas de onda na saída. Com a finalidade de verificar se existe curto-circuito entre terminais vizinhos no soquete da MEA, cada “*pad*” recebe o sinal gerado com amplitude diferente: alternadamente, um *pad* recebe sinal com 100 μV de amplitude e seu vizinho, o mesmo sinal, porém com amplitude igual a 50 μV , e assim sucessivamente.

O sistema proposto é bastante prático pois permite facilmente alterar, via *software* (*firmware* do microcontrolador), a forma de onda gerada. O sinal gerado apresenta amplitudes diferentes em *pads* adjacentes da placa de circuito impresso. As amplitudes escolhidas são 100 μ V e 50 μ V pico-a-pico, respectivamente. Essas diferentes amplitudes são obtidas na saída do circuito do Sim-MEA através do uso de um divisor de tensão composto por 3 resistores associados em série. Isso permite facilmente detectar a presença de curto-circuitos acidentais nos terminais do soquete.

O simulador e gerador de sinais Sim-MEA é uma importante ferramenta para testar o funcionamento não somente do soquete, mas de todo o SRSN, que dispensa, em princípio, a necessidade de usar uma cultura *in vitro* para o teste. Na Figura 8.5 é mostrado o esquema eletrônico do Sim-MEA, destacando o PWM, circuito integrador e o divisor resistivo.

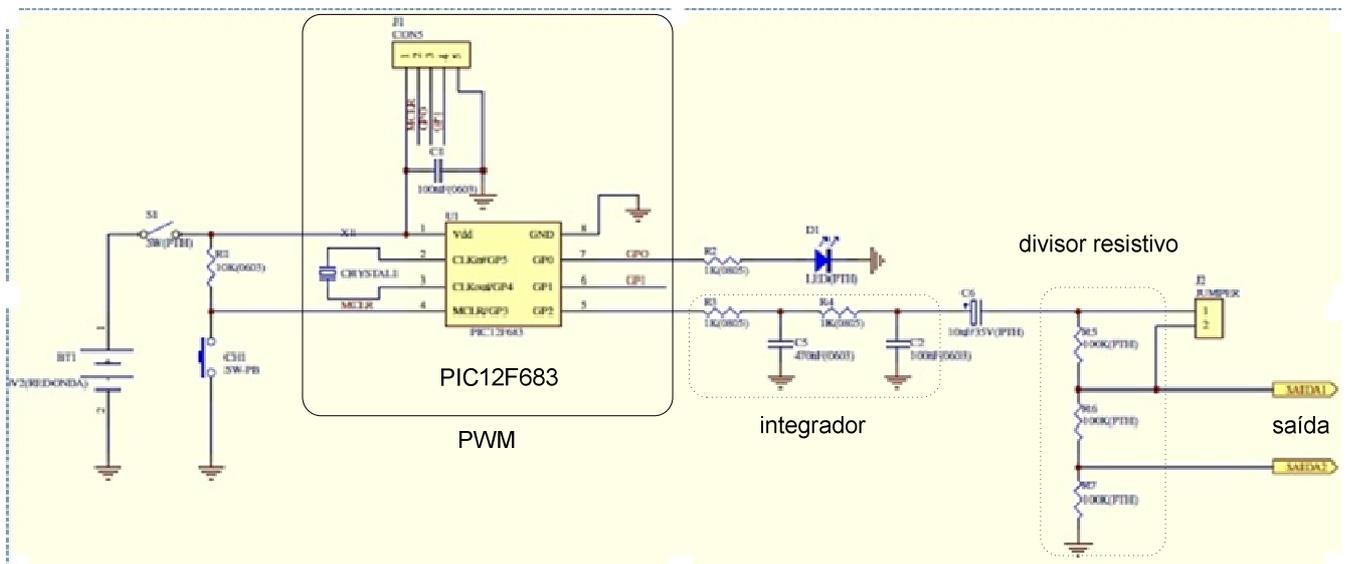


Figura 8.5: Esquema eletrônico completo do Sim-MEA.

8.3 Teste dos Pré-amplificadores Usando Sim-MEA

Nesta seção é realizado o teste dos pré-amplificadores usando o gerador de sinais Sim-MEA, descrito na seção anterior, instalado no soquete de MEA padrão desenvolvido e construído, monitorando as ondas produzidas em osciloscópio.

Na Figura 8.6 é mostrada a versão final do soquete ao lado do Simulador Sim-MEA, já implementados e na Figura 8.7 o Sim-MEA é montado no soquete, gerando sinal lido pelo osciloscópio.

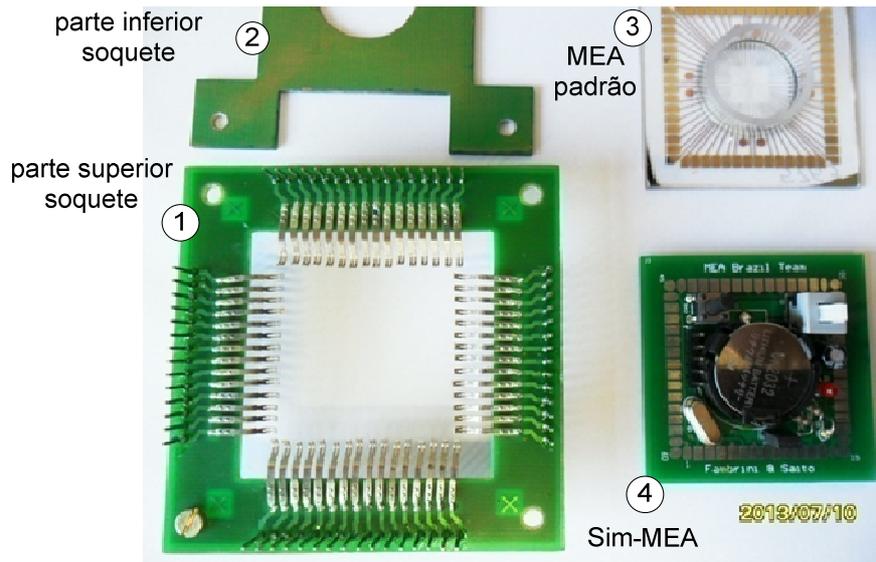


Figura 8.6: Esquerda, soquete em versão final (1) parte inferior, (2) parte superior; direita (3) MEA padrão, e (4) Sim-MEA.

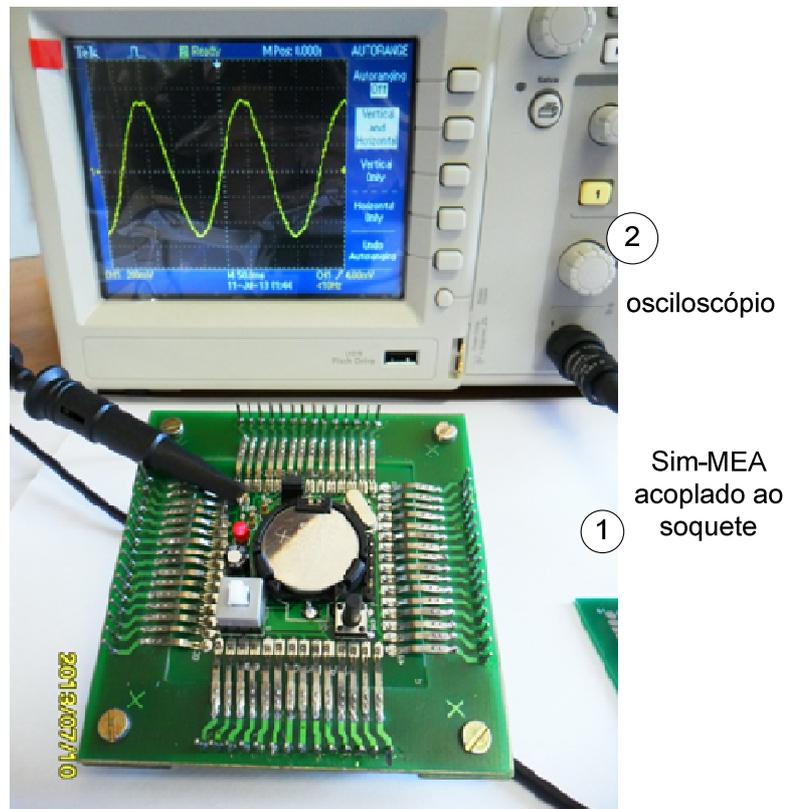


Figura 8.7: Sim-MEA em teste com o osciloscópio, montado no soquete.

O protótipo do pré-amplificador *headstage* foi montado em laboratório, seu ganho e seu nível de ruído elétrico foram medidos usando-se um osciloscópio. Apenas dois canais foram montados e

testados, conforme mencionado anteriormente. Verificou-se, como esperado, que o ruído aumenta à medida que se aumenta a frequência do sinal aplicado em sua entrada e à medida que o ganho aumenta. O nível de ruído aumenta suavemente de 0 a 50 mV, quando o ganho de voltagem varia de 200 a 1200, em passo de 200. Após o ganho em voltagem de 1200, o nível de ruído aumenta numa taxa mais íngreme, atingindo o nível de 200 mV para o ganho de voltagem de 2400.

O ganho foi ajustado para diversos valores, variando-se o valor de um potenciômetro multi-voltas de precisão. A Figura 8.8 mostra, no eixo vertical, a variação do nível de ruído pico-a-pico (*noise pk-pk*) em mV, presente na saída do pré-amplificador *headstage*, em função do ganho de voltagem (*Voltage Gain*), no eixo horizontal.

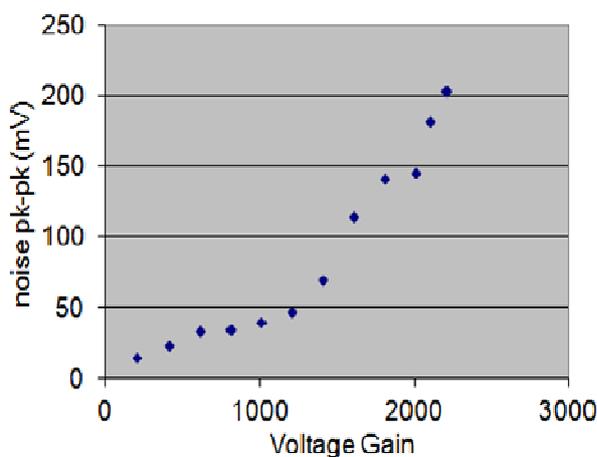


Figura 8.8: Nível de ruído em função do ganho de tensão para o pré-amplificador.

Para a obtenção do gráfico, um potenciômetro de valor 1,5 M foi montado no lugar do resistor , tornando o ganho do amplificador variável. Diversos valores de ganhos foram ajustados neste potenciômetro, um a um, e diversas medidas de nível de ruído gaussiano (ruído de média zero e desvio padrão constante) foram tomadas com o uso do osciloscópio à saída do *headstage*. Foram anotados os valores de ganhos introduzidos e as respectivas amplitudes de ruído pico-a-pico.

O diagrama elétrico completo deste pré-Amplificador *headstage* é mostrado na Seção Apêndice A.10, para um único canal.

As Figuras 8.9, 8.10, 8.11 e 8.12 reproduzem várias telas com o sinal amostrado pelo osciloscópio. O sinal foi medido na saída do pré-amplificador com osciloscópio Tektronix modelo TDS1001-C. Com o ganho total do amplificador ajustado para 1000 vezes e sendo alimentado com duas baterias de 3 volts associadas em série, tensão de alimentação simétrica de 3+3 volts contínua após os circuitos integrados reguladores de tensão. O sinal de entrada foi gerado pelo Sim-MEA com amplitude

calculada para $100\ \mu\text{V}$ através dos valores dos resistores montados na placa de circuito impresso e a temperatura ambiente em torno de 25°C . Um único canal foi amostrado.

Na Figura 8.9 é mostrado o nível de ruído presente na saída do amplificador com as entradas desligadas (sem nenhum sinal presente na entrada). Um nível de ruído residual e igual a $16,8\ \text{mV}$ pico-a-pico foi registrado com as entradas em aberto.

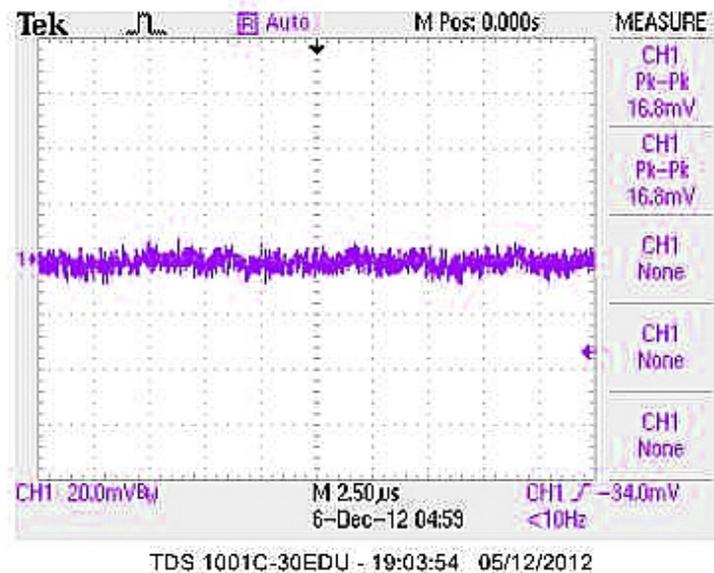


Figura 8.9: Nível de ruído na saída do amplificador, com as entradas em aberto.

Na Figura 8.10 é mostrada a saída do pré-amplificador, quando uma forma de onda dente-de-serra, $10\ \text{Hz}$, amplitude $100\ \mu\text{V}$ pico-a-pico, é aplicada. A amplitude da saída é de $108\ \text{mV}$ pico-a-pico, que resulta no ganho 1080 . Nota-se também, na Figura 8.10, a presença do ruído sobre o sinal.

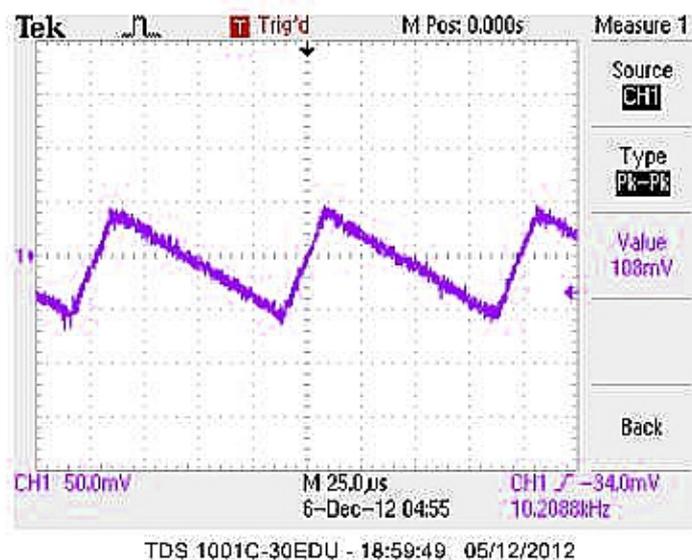


Figura 8.10: Forma de onda dente-de-serra na saída do pré-amplificador.

Na Figura 8.11 é mostrada a saída do pré-amplificador, quando uma forma de onda senoidal de frequência 1 kHz aplicada à entrada, também com amplitude de entrada de 100 μ V pico-a-pico. Agora, esta mesma forma de onda aparece na saída com amplitude menor, 65 mV pico-a-pico devido à atenuação do filtro passa-baixas presente no circuito do amplificador. À medida que a frequência do sinal aplicado na entrada aumenta, sua amplitude na saída do amplificador é menor, pela ação do filtro. O filtro é incapaz de atenuar completamente o sinal, uma vez que sua atenuação é igual a -60 dB por década conforme discutido no Capítulo 5.

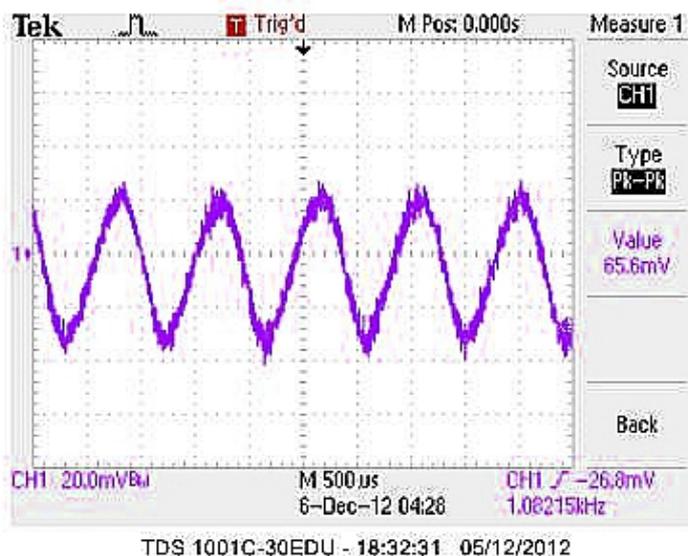


Figura 8.11: Forma de onda senoidal de frequência 1000 Hz na saída do pré-amplificador.

Na Figura 8.12 é mostrada a saída do pre-amplificador, quando uma onda quadrada é aplicada na entrada, com frequência igual a 33 Hz. Neste caso também ocorre redução do ganho: o sinal na saída tem amplitude de 68 mV pico-a-pico sendo que o sinal de entrada tem amplitude calculada para 100 μ V. Essa redução pode ser explicada também pela ação do filtro. Ondas quadradas são ricas em frequências harmônicas de valores muito mais altos do que a frequência fundamental de 33 Hz. Pela ação dos filtros passa-baixas do *headstage*, tais harmônicas são atenuadas, reduzindo-se a amplitude global do sinal (Galhardo e Pinho, 2009). Na mesma Figura 8.12, pode-se perceber a presença do ruído do tipo "popcorn" que ocorre nas transições de fase e é bastante visível neste formato de onda. A rigor, o nível de ruído de um amplificador deveria ser medido com analisador de espectro e a unidade usual de medida de ruído deveria ser $V/\sqrt{\text{Hz}}$, a qual leva em conta a frequência do sinal de entrada, mas se dispunha apenas de um osciloscópio. As medidas de ruído não levaram em conta variações na

frequência do sinal e nem o ruído intrínseco do osciloscópio utilizado. Todas as medidas foram feitas com o conjunto formado pelo Sim-MEA inserido no soquete elétrico e pré-amplificador *headstage*, conforme mostra a Figura 8.13.

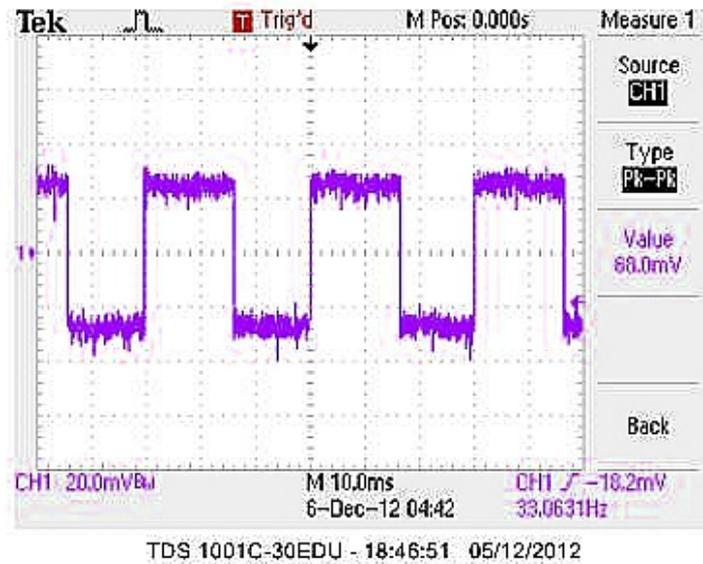


Figura 8.12: Saída do pré-amplificador, quando é aplicada uma onda quadrada na entrada.

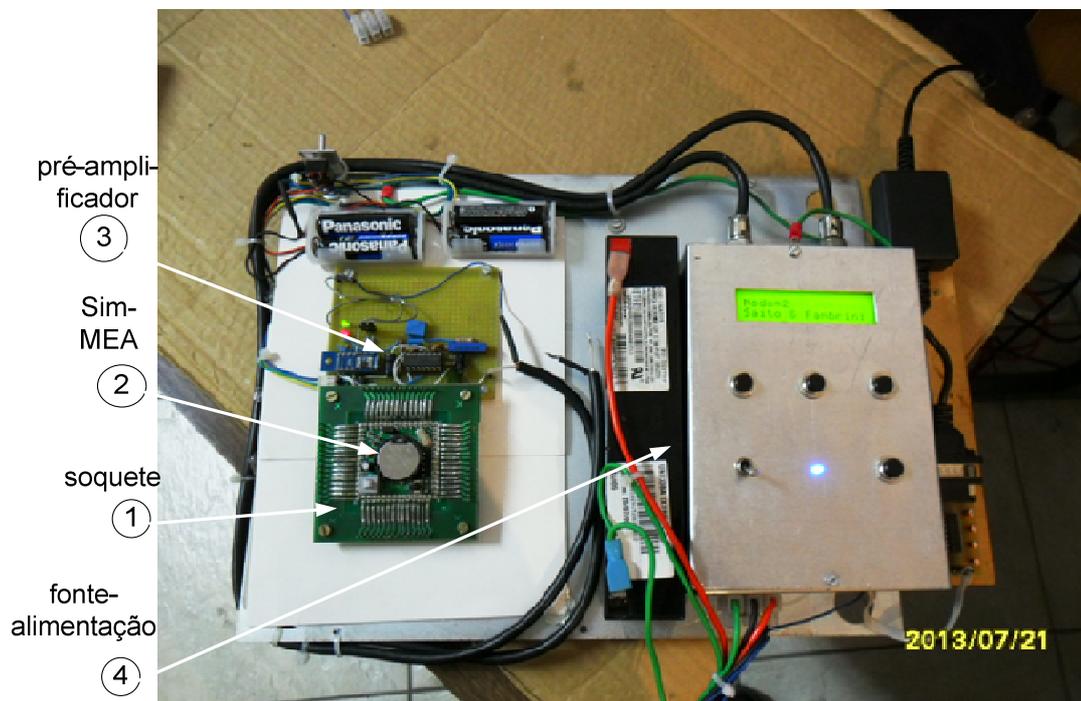


Figura 8.13: (1) Soquete, (2) Sim-MEA, (3) pré-amplificador, (4) fonte de alimentação.

8.4 Teste do Subsistema DAQ Interligado ao Computador

O protótipo do subsistema DAQ foi testado aplicando-se um sinal senoidal, de amplitude e frequência conhecidas em cada uma de suas entradas e verificando-se se o sinal é corretamente registrado na tela do computador. A descrição seguinte mostra o resultado do teste do sistema SRSN inserindo no soquete o Sim-MEA, para o registro de sinais, pré-amplificação, filtragem, amplificação, conversão AD e envio dos sinais para o computador através de interface USB.

Em continuidade à descrição do *software* de registro de sinais, do Capítulo 7, um terceiro *script* (Código 8.4), com capacidade de plotar 2 canais simultaneamente e em tempo real, foi escrito e testado. Os dados adquiridos a partir de duas entradas multiplexadas de um conversor AD são aplicados simultaneamente à entrada USB, lidas pelo *software* MATLAB e *plotados* ao mesmo tempo como mostra a Figura 8.14.

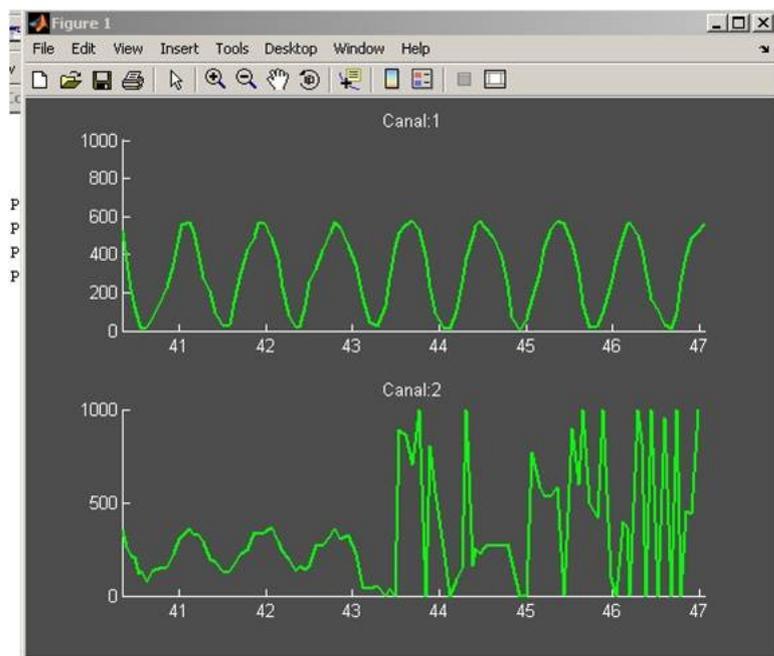


Figura 8.14: *Plotagem* simultânea de 2 canais distintos via *script* MATLAB (Código 8.4).

```

% res = dataFromResult('P,100,0,500,0');
fprintf(s2,'a');
if s2.BytesAvailable
res = dataFromResult(fscanf(s2));
if i>1
tijd(i) = toc;
tijd(i)= tijd(i) + tijd(i-1);
end
tic
A(i,:) = res;
b=0;
for j=PLOTSSENSORS
b=b+1;
subplot(length(PLOTSSENSORS),1,b);
if i>timespan
plot(tijd(i-timespan+1:i),A(i-timespan+1:i,j),'g','lineWidth',2);
xlim([tijd(i-timespan+1) tijd(i)]);
else
plot(tijd,A(:,j),'g','lineWidth',2);
end
ylim([ymin ymax]);
box off
title(SENSORNAMES{j});
end
i=i+1;
pause(0.02);
end

```

Código 8.4 *Script* Matlab para plotagem simultânea de dois canais.

A função "*res = dataFromResult(fscanf(s2))*" aguarda os dados chegarem pela porta serial USB e armazenam tais dados na variável "res". Cada vez que surge um novo dado na porta serial do PC, a função "*dataFromResult()*" é chamada. Trecho de código desta função é mostrado em Código 8.5.

```

%% converts the result to a numeric row(kabraeck)
function [ data ] = dataFromResult( result )
remain = result;
index=1;
tokens=[ ];
while (~isempty(remain))
[token,remain] = strtok(remain, ',');
if (index>1)
tokens(index-1)=strread(token);
end
index=index+1;
end
data = tokens;
end

```

Código 8.5 Função de atendimento à porta serial.

Os dados referentes aos canais 1 e 2 são enviados sempre aos pares, separados por vírgula. O primeiro dado é referente ao canal 1 e o segundo ao canal 2 e assim sucessivamente. O *script* mostrado no Código 8.5 pode ser ampliado de modo a receber sinais de mais canais e *plotar* mais gráficos simultaneamente. O MATLAB é, entretanto, um programa de execução relativamente lenta, insuficiente para plotar os dados registrados em tempo real. Para contornar este problema, outras linguagens de programação, mais rápidas, devem ser utilizadas.

8.5 Observações Finais

Neste Capítulo foram apresentados os resultados experimentais obtidos ao longo de todo o trabalho, relativos à todas as implementações realizadas. Foram descritos os testes para a validação do soquete de MEA projetado e construído. Foi descrita a construção de um simulador de cultura de neurônios Sim-MEA. Com o uso do Sim-MEA foram testados os dois canais de pré-amplificadores e o teste do subsistema DAQ foi realizado para uma versão preliminar, juntamente com uma versão preliminar do *software* de registro de sinais de neurônios.

Capítulo 9 - Conclusões e Trabalhos Futuros

Na primeira seção deste capítulo são apresentadas as conclusões sobre o trabalho de mestrado desenvolvido e na segunda, algumas ideias de trabalhos futuros são propostas.

9.1 Conclusões

Os resultados experimentais, embora parciais (apenas 2 canais foram efetivamente implementados e testados), funcionam adequadamente para o registro de sinais eletrofisiológicos obtidos com o uso de MEAs, da ordem de alguns microvolts, com os níveis de ruído, conforme descrito no capítulo anterior.

O *Software* de Registro de Sinais de Neurônios *in vitro* em MEA precisa ser aperfeiçoado pois ainda encontra-se em fase inicial de desenvolvimento, porém mostra resultados promissores. O pré-amplificador, filtro, amplificador, MUX e conversor AD mostram-se efetivos com níveis de amplificação adequados, em torno de 1000 vezes e banda passante que pode ser ajustada, se necessário, substituindo alguns valores de componentes, como o ganho, que pode ser ajustado através de um potenciômetro, para cada canal. Testes reais em matriz de multieletrodos precisam ainda ser feitos para se obter a validação do sistema em campo, porém os testes efetuados com o protótipo, utilizando-se o Sim-MEA, mostram resultados satisfatórios e efetivos.

9.2 Trabalhos Futuros

A seguir são apresentadas 7 possíveis atividades a serem ainda priorizadas, para a continuação da pesquisa realizada e descrita nesta dissertação.

Construção do Sistema com 60 Canais

Como um dos trabalhos futuros consta a conclusão da construção de um sistema SRSN completo de 60 canais. Para isso, é necessário construir duas placas de conversão AD com 32 canais cada uma, desenhar e construir 60 pré-amplificadores com os respectivos 60 filtros e alojar o sistema completo em

um gabinete metálico para proporcionar a necessária blindagem eletromagnética, bastando replicar os esquemas elétricos que já estão prontos e testados.

Uma placa de circuito impresso denominada "*daughter board*" também deverá ser desenhada e implementada. Esta placa deverá receber como conexão diretamente o soquete elétrico (se encaixando sob o soquete) e deverá conter os 60 canais do pré-amplificador *headstage* descrito no Capítulo 5 deste trabalho, evitando assim o uso de 60 fios, que seriam volumosos e poderiam propiciar aumento nos níveis de ruído.

Validação do Sistema em Cultura Biológica

A partir do sistema completo, é necessário validá-lo tanto com o uso do Sim-MEA quanto em pesquisas envolvendo neurônios *in vitro* em MEA. É proposta como uma meta futura realizar testes de validação do protótipo usando neurônios de ratos Wistar, na UFU (Universidade Federal de Uberlândia) e, para esta finalidade, já foram contatados professores locais, que dispõem do ambiente laboratorial necessário.

Construção do Gerador de Estímulos Elétricos para Potencial Evocado

Um equipamento opcional muito interessante para as pesquisas com MEA é o gerador de estímulos elétricos. Esse gerador fornece potenciais elétricos controlados em tensão, corrente e em duração. Como comentado anteriormente, tal controle é essencial, porque um pulso de amplitude muito grande (maior do que 0,5V) pode provocar uma reação eletroquímica irreversível na interface eletrodo/eletrólito e invalidar a resposta da rede neuronal ou até mesmo danificar a cultura. A eficácia do estímulo depende do espalhamento efetivo da corrente injetada dentro da interface eletrodo-cultura dentro da cultura. Uma característica importante do gerador de estímulos é a de inibir o funcionamento do amplificador no momento do pulso elétrico aplicado, caso contrário o registro seria do pulso de estímulo e não da resposta da cultura ao potencial evocado. Propõe-se construir também um gerador capaz de produzir estímulos elétricos na MEA de modo controlado, desenvolvendo-se todo o *hardware* e o *software*, com inovações.

Amplificador usando Ressonância Estocástica

Uma outra proposta para trabalhos futuros é testar outros conceitos de amplificação de sinais elétricos em MEA. Em particular, construir um protótipo de amplificador baseado em ressonância estocástica, conforme explicado no Apêndice B desta dissertação, e que presentemente, pode ser qualificada como um conceito inovador.

Registro de Sinais de EEG

O mesmo equipamento desenvolvido e descrito nesta dissertação deve servir como dispositivo de registro de sinais de EEG (eletroencefalograma), bastando para isso substituir o soquete elétrico e a MEA por eletrodos adequados para esta finalidade e implantar tais eletrodos de modo não-invasivo sobre o crânio de mamíferos vivos, inclusive o homem, com a devida aprovação do Comitê de Ética para esse tipo de pesquisa. Um dos trabalhos propostos para o futuro seria, com a colaboração de profissionais da área, realizar coletas de sinais de EEG. Para essa finalidade, já foram contatados professores da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto.

Interfaces Cérebro-Máquina (BCI)

Com sinais colhidos com razoável qualidade, na atividade de registro de sinais de EEG, será possível, através do uso de algoritmos matemáticos computacionais tais como regressão linear, filtros de Wiener, filtros de Kalman e outros, interpretar comandos vindos diretamente do cérebro. Teoricamente, o mesmo equipamento descrito nesta dissertação, poderia ser redirecionado para o desenvolvimento de uma Interface Cérebro-Máquina (BCI, Brain Computer Interface).

Estudos de Sinais para Neuroimplantes

Um tipo de MEA é também precursor do neuroimplante, para finalidades médicas de substituir membros humanos perdidos (braços, pernas, etc) por equivalentes robóticos, sendo necessário o estudo

prévio dos sinais elétricos produzidos pelo neurônios. O desenvolvimento de tecnologia brasileira para tais registros torna-se necessário e desejável, não somente para o Brasil, como também para diversos países que não podem contar com recursos amplos para pesquisas. Presentemente, estudos de neuroimplantes vem sendo feitos na Universidade Duke e em outras Universidades nos Estados Unidos e na Europa, através da MEA invasiva (*in vivo*). Com este equipamento, pode-se também desenvolver estudos similares no Brasil.

9.3 *Considerações Finais*

Através da utilização do presente sistema de aquisição de sinais eletrofisiológicos é possível entender melhor os sinais elétricos gerados espontaneamente e evocadamente pelos neurônios, sua relação com a topologia das redes neurais formadas, relacionando sinais elétricos registrados e imagens colhidas a partir de microscópio como também aperfeiçoar a eletrônica subjacente às ferramentas de estímulo e registro. Não existe até o presente momento nenhum Sistema de Registro de Sinais de Neurônios em MEA projetado no Brasil. Com o presente trabalho é disponibilizado para a comunidade científica um projeto *open-source* desse sistema, que pode ser usado em MEA *in vitro* e *in vivo* (invasiva), como também para registro de sinais de EEG, servindo inclusive de base para o desenvolvimento de Interfaces Cérebro-Computador.

Referências Bibliográficas

ADS1299 [Online]. Disponível: www.ti.com/product/ads1299#modalWin. Acessado em 15 de Fevereiro de 2013.

Blum, R. A. 2007. An Electronic System for extracellular neural stimulation and recording, Tese de Doutorado. Georgia Institute of Technology.

Bohorquez J.L., Chandrakasan A.P., Dawson, J.L., 2006. Frequency-Domain Analysis of Super-Regenerative Amplifiers; Microwave Theory and Techniques, IEEE Transactions, vol.57, pp. 2882 - 2894.

Boylestad, Robert and Nashelsky, Louis, 2004. Dispositivos Eletrônicos e Teoria de Circuitos, 8ª Ed. Prentice Hall, Brasil.

Braun, H. A, et al., 1994. Oscillation and noise determine signal transduction in shark multimodal sensory cells, Nature n. 367, pp. 270-273.

Bulsara, A. R. and Moss, F. E., 1991: IEEE International Joint Conference on Neural Networks, vol 1. pp. 420-425.

Butterworth S. 1930. On the Theory of Filter Amplifiers. Wireless Engineer, vol.7, pp. 536-541.

CCS [Online]. PCWH PIC C Compiler. Software demo disponível em www.ccsinfo.com. Acessado em 15 de Fevereiro de 2013.

Dayan, P. and Abbott, L.F., 2001. Theoretical Neuroscience: Computational and Mathematical Modeling of Neural Systems. The MIT Press, U.S.A..

Demott, Donald W. 1960. An Inexpensive, Multi-Channel, Electrophysiological Recording System, University of Rochester, Rochester, N.V., U.S.A.

Desai S. A, Rolston J. D., Guo L., and Potter S. M., 2010. Improving Impedance of Implantable Microwire Multi-Electrode Arrays by Ultrasonic Electroplating of Durable Platinum Black, Front Neuroengineering. Front Neuroengineering Journal, vol.3, pp. 3-5.

Filterlab [Online]. Software disponível gratuitamente em www.microchip.com/stellent/. Acessado em 15 de Fevereiro de 2013.

FSMLABS [Online]. Software 'Open' version 3.1. Disponível: www.fsmlabs.com. Acessado em 15 de

Fevereiro de 2013.

Galhardo M.A.B and Pinho J. T., 2013. Mutual influence between harmonics and nonlinear loads, *IEEE Latin America Transactions*, vol.11, pp. 206-210.

Gollisch, T., Meister, M., 2010. Eye Smarter than Scientists Believed: Neural Computations in Circuits of the Retina, *Neuron*, 65, pp. 150-164.

Gross, G. W. 2011, Multielectrode arrays, *Scholarpedia*, 6, pp. 5749-5742.

Gross, G. W., Reiske, E., Kreuzberg, G.W., Mayer, A, 1977. A new fixed-array multimicroelectrode system designed for long-term recording of extracellular single unit activity in-vitro, *Neuroscience Letter*, vol. 6, pp. 101-105.

Gruiter, A.F.,1993. Amplificadores Operacionais, Fundamentos e Aplicações, 5a. edição. Editora McGraw-Hill, São Paulo.

Guyton, A. C. e Hall, J. E., 2006. Tratado de Fisiologia Médica. Elsevier/Medicina Nacionais, São Paulo.

Horowitz, Paul and Hill, Winfield, 1989. The Art of Electronics, Cambridge University Press, Inglaterra.

Israel, D. A., Barry, W. H., Edell, D. J. and R. M., 1984. An array of microeletrodes to stimulate and record from cardiac cells in culture. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*, 247, pp. 669-674.

Jimbo, N. K., Keiichi T., Takashi T., and Hugh Robinson. P.C., 2003. A System for MEA- Based Multisite Stimulation, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol.50, pp. 241-248.

Jobling, T. J., 1980. An Active Microelectrode Array to Detect Extracellular Nervous Activity, Editora University of Southampton, U.S.A.

Junqueira L.C.; Carneiro, J., 2004. *Histologia Básica*, 10ª ed., Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Kandel E. R.; Schwartz, J. H.; Jessel, T., 2000. *Fundamentos da neurociência e do comportamento*. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Klisch, C., Inyushkin, A., Mordel, J., Karnas, D., Pévet, P., Meissl, H., 2009. Orexin A modulates neuronal activity of the rodent suprachiasmatic nucleus in vitro, *European Journal of Neuroscience*, 30, pp. 65-75.

- Labcenter [Online]. Disponível: <http://www.labcenter.com/index.cfm>. Acessado: 15 de Fevereiro 2013.
- Lopes, Marinho Antunes, 2010. Ressonância Estocástica em Redes Neurais. Dissertação de Mestrado, Universidade de Aveiro, Portugal.
- LTspice [Online]. Disponível: <http://www.linear.com/designtools/software/>. Acessado em 15 de Fevereiro de 2013.
- Maher M. P., J. Pine, J. Wright, Y.-C. Tai, 1999. The neurochip: a new multielectrode device for stimulating and recording from cultured neurons, *J. Neurosci. Methods* vol. 87, pp. 45–56.
- Martinoia S., Massobrio P., Bove M., Massobrio G. 2004. Cultured neurons coupled to microelectrode arrays: circuit models, simulations and experimental data , *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 51, pp. 859–864.
- Massobrio P., G. and Martinoia S. 2004. Multi-program approach for simulating recorded extracellular signals generated by neurons coupled to microelectrode arrays. Department of Biophysical and Electronic Engineering (DIBE), University of Genova, *Neurocomputing*, vol. 70, pp. 2467-2476.
- MeaBench [Online]. Disponível: <http://www.its.caltech.edu/~pinelab/wagenaar/meabench.html>. Acessado em 15 de Fevereiro de 2013.
- MC Rack [Online]. Disponível: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2570177/>. Acessado em 15 de Fevereiro de 2013.
- MCS, 2013. [Online]. Disponível: <http://www.multichannelsystems.com/>. Acessado em 15 de Outubro de 2013.
- Med64 [Online]. Alpha MED. Disponível: www.med64.com. Acessado em 15 de Fevereiro de 2013.
- Meister, M., Pine, J., Baylor, D. A., 1989. Multielectrode recording from the vertebrate retina, *Invest. Ophthalmol. Vis.*, 30 (suppl.), pp. 68.
- Meister, M., Pine, J., Baylor, D. A. 1994. Multi-neural signals from the retina acquisition and analysis, *Neurosci. Meth.*, 51, pp. 95-106.
- Meister, M., Wong, R. O., Baylor, D. A., Schatz, C. J., 1991. Synchronous bursts of action potentials in ganglion cells of the developing mammalian retina, *Science*, 252, pp. 939-943.
- Melloni L, Molina C, Pena M, Torres D, Singer W, Rodriguez E, 2007. Synchronization of neural activity across cortical areas correlates with conscious perception, *Journal of Neurosci.*, pp. 2858–2865.

- Microchip, 2013. [Online]. Disponível:
<http://ww1.microchip.com/downloads/en/DeviceDoc/70286C.pdf>. Acessado em 15 de Outubro de 2013.
- Molina-Luna K, Pekanovic A, Röhrich S, Hertler B, Schubring-Giese M, Rioult-Pedott, Luft A. 2009. Dopamine in Motor Cortex Is Necessary for Skill Learning and Synaptic Plasticity, PLoS ONE e7082.doi: 10.1371/journal.pone.0007082.
- Moss F, Ward LM, Sannita WG, 2004. Stochastic resonance and sensory information processing: a tutorial and review of application,. Clinical Neurophysiology, vol. 115, pp. 267–81.
- Moyes C., Mengxiang J [Online]. Disponível:
http://people.ece.cornell.edu/land/courses/ece4760/FinalProjects/s2012/cwm55/cwm55_mj294/index.html. Acessado em Fevereiro de 2013.
- Neurorigther [Online].Software disponível em <https://sites.google.com/site/neurorigther/>. Acessado em 15 de Fevereiro de 2013.
- Nicolelis, Miguel, 2011. Muito Além do Nosso Eu, Ed. Companhia das Letras, 3ª edição, Brasil.
- Ott, H. W., 1988. Noise Reduction Techniques in Electronic Systems, Wiley Editions, Inglaterra.
- Pine, J.,1980. Recording action potentials from cultured neurons with extracellular microcircuit electrodes, Journal of Neuroscience Methodology, n. 2, pp. 19-31.
- Potter, S. M. and DeMarse, T. B., 2001. A new approach to neural cell culture for long-term studies, Journal of Neuroscience Methods, 110 (1-2): pp. 17-24.
- Processing [Online]. Disponível em <http://processing.org/>. Acessado em 5 de Outubro de 2013.
- Prolific, 2013 [Online]. Disponível: http://www.prolific.com.tw/UserFiles/files/ds_pl2303HXD_v1_4_4.pdf [Acessado em 5 de Outubro de 2013].
- Purves, D. et al., 2010. Neurociências. Editora Artmed, 4ª ed., Porto Alegre.
- Rodriguez, M. Z. 2012. Análise evolutivo e modelado da dinâmica de interação de cultura de neurônios de tecido cortical *in vitro* numa matriz de microeletrodos. Dissertação de Mestrado, UFSCar.
- Rolston, J.D, Gross R. E. and Potter S. M. 2003. A low-cost multielectrode system for data acquisition enabling real-time closed-loop processing with rapid recovery from stimulation artifacts. IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 53(4), pp. 194-199.

Rutten W., Mouveroux J.M., Buitenweg J., H., Heida C., Ruardij T., Marani E., Lakke, E. , 2001. Neuroelectronic interfacing with cultured multielectrode arrays toward a cultured probe. Proceedings of the IEEE, vol.89, n.7, pp. 1013-1029.

Saito J. H., Mari, J. F., Pedrino E., Destro F. J. B., Nicoletti M. C., 2013. Simulated Activation Patterns of Biological Neurons Cultured onto a Multi-Electrode Array Based on a Modified Izhikevich's Model. Fundamenta Informaticae XXI (1), vol. 124, pp. 111-132.

Seabra, C. A. 1997. Estudo de Resistes Amplificados Quimicamente e Sililação em Litografia por Feixe de Elétrons. Dissertação de Mestrado, Escola Politécnica, USP, São Paulo.

Soussou W., Holmieh G., Han M., Ahuja, A., Song D., Hsiao M. C., Wang, Z, Tanguay, A.R. e Berger, T. W. 2006. Mapping Spatio-Temporal Electrophysiological Activity in Hippocampal Slices with Conformal Planar Multi-Electrode Arrays. In Taketani, M. and Baudry, M. editors, Springer USA, Advances in Network Electrophysiology, pp. 127-152.

Stett, A., Egert, U., Guenter, E., Hofmann, F. Meyer, T., Nisch, W. and Maemmerle, H., 2003. Biological application of microelectrode arrays in drug discovery and basic research. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 377, pp. 486-495.

Systems, 2013. [Online]. Innovations in Electrophysiology, *Multi Channel Systems*. Disponível: www.multichannelsystems.com. Acessado em 15 de Fevereiro de 2013.

Taketani M., Baudry M., 2003. Advances in Network Electrophysiology, Editora Springer, USA.

Thomas, C. A., Springer, P. A., Loeb, G. W., Berwald-Netter, Y., Okun, L. M., 1972. A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells, Experimental Cell Research, vol. 74, pp. 61-66.

TINA [Online]. Disponível: <http://www.ti.com/tool/tina-ti>. Acessado em 15 de Fevereiro de 2013.

Vidor C.B., 2012. Teste e caracterização de uma matriz multieletrodo para registro de sinais eletrofisiológicos in vitro; Revista da Graduação, Faculdade de Física, PUC-RS, 2012.

Wagenaar D. A. and Potter S. M, 2002. Real-time multi-channel stimulus artifact suppression by local curve fitting, J. Neurosci. Methods, n. 120, pp. 113-120.

Wagenaar D. A., Pine J., and Potter S. M., 2004. Effective parameters for stimulation of dissociated cultures using multi-electrode arrays, J. Neurosci. Methods, n. 120, pp. 122-128.

Wagenaar, D. A. and Potter S. M, 2005. A versatile all-channel stimulator for electrode arrays, with real-time control, J. Neural Eng. 1, pp. 39-44.

Wagenaar, D.; DeMarse, T.B.; Potter, Steve M., 2005. MeaBench: A toolset for multi-electrode data acquisition and on-line analysis, Proceedings of the 2nd International IEEE EMBS Conference on Neural Engineering, Arlington, Virginia, March 16-19.

Wheeler, B. C., Novak, J. L., 1986. Current source density estimation using microelectrode array data from the hippocampal slice preparation, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 33, pp. 1204-1212.

Whitson, J., Kubota, D., Shimono, K., Jia, Y. e Taketani, M. , 2006. Multi-electrode arrays: Enhancing traditional methods and enabling network physiology, *J. Neurosci. Methods*, Vol. 7, pp. 52-58.

Zangerolame, F. M., 2009. Monitoramento analógico e digital de sinais elétricos cerebrais. Dissertação de Mestrado, CEFET-RJ, Rio de Janeiro.

Ziegler, C. 2000. Cell-based biosensors. *Fresenius J. Anal. Chem.*, n. 366, pp. 552-559.

APÊNDICE A : Construção dos protótipos das partes do SRSN

Este apêndice relata o estado atual da construção dos protótipos das várias partes que compõem o Sistema de Registro de Sinais de Neurônios (SRSN).

A.1 Protótipo do Soquete Elétrico

A Figura A.1 mostra o desenho do soquete para MEA padrão com as dimensões mecânicas. O soquete consta de duas peças construídas em placas de circuito impresso de fibra de vidro cobreada em face simples e recortadas usando-se fresadora CNC.

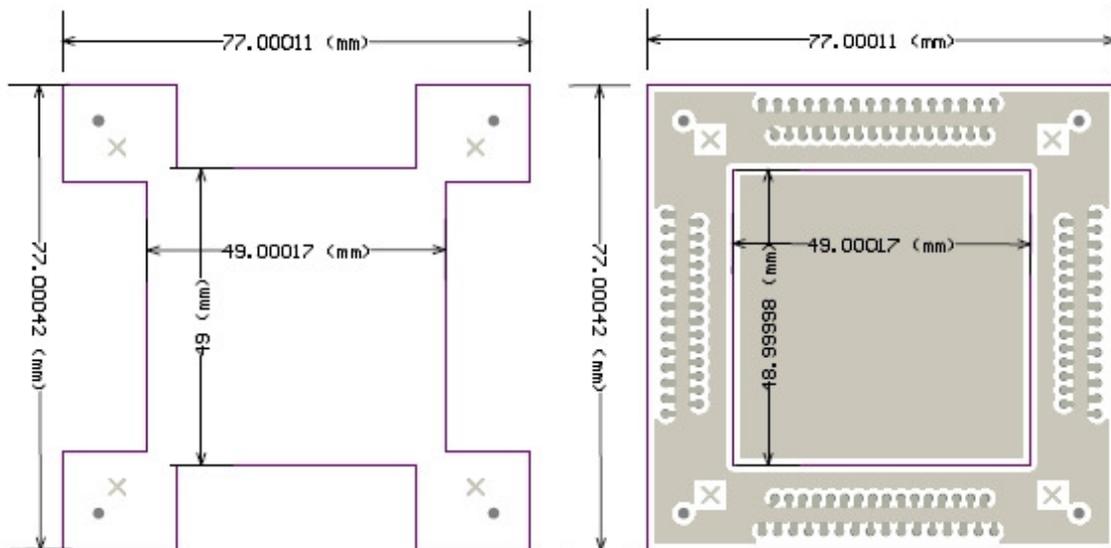


Figura A. 1: Soquete para MEA padrão.

A Figura A.2 mostra o aspecto final do soquete elétrico, em sua versão para produção industrial, já ligado à MEA padrão e ao protótipo contendo dois canais do amplificador headstage.



Figura A. 2: Soquete elétrico acoplado à MEA padrão. À esquerda, protótipo de dois canais do amplificador *headstage*.

A.2 *Protótipo do Gerador de Sinais Sim-MEA*

Para a implementação do gerador de sinais Sim-MEA foi utilizado um microcontrolador PIC12F683 (Microchip®) programado em linguagem C (compilador *pcwh* (CCS, 2013)). As formas de onda geradas são sintetizadas através do firmware do microcontrolador, usando-se o PWM (*pulse width modulator*) interno do chip como conversor digital/analógico. A Figura A.3 mostra as diversas formas de onda geradas pelo Sim-MEA e na Figura A.4 mostra-se o *lay-out* da PCB e o aspecto final da placa de circuito impresso que tem o mesmo formato da MEA padrão. A Figura A.5 mostra o esquema elétrico completo do simulador Sim-MEA.

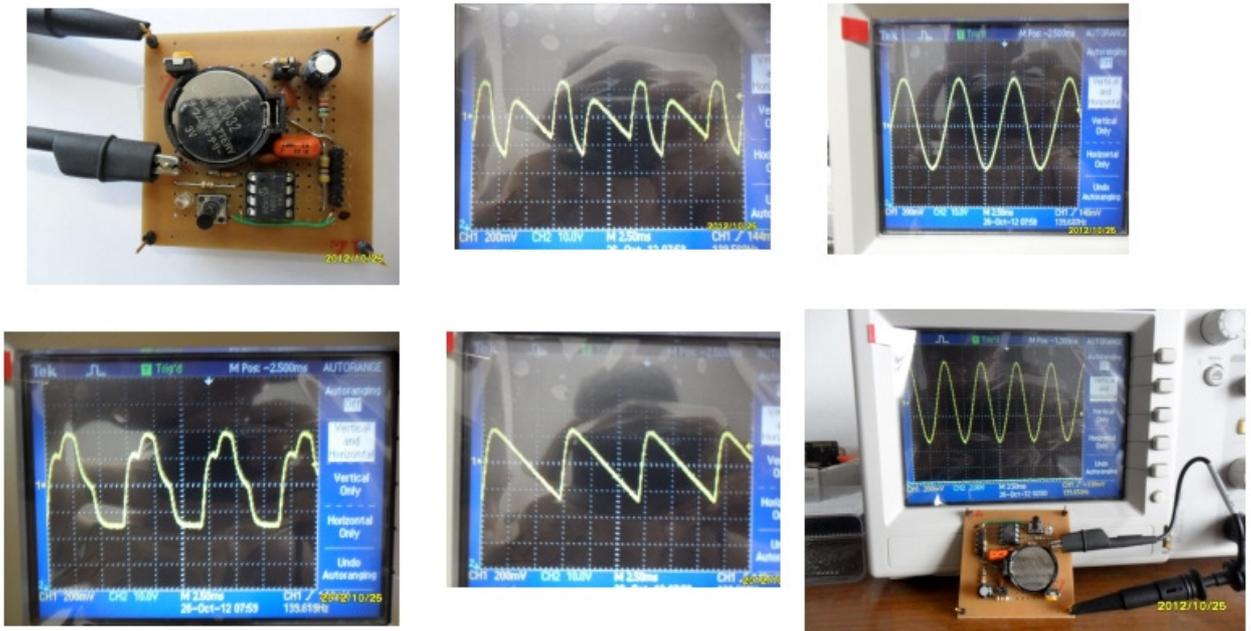


Figura A. 3: Protótipo inicial do gerador Sim-MEA mostrando ao osciloscópio as formas de onda sintetizadas pelo *firmware* do microcontrolador.

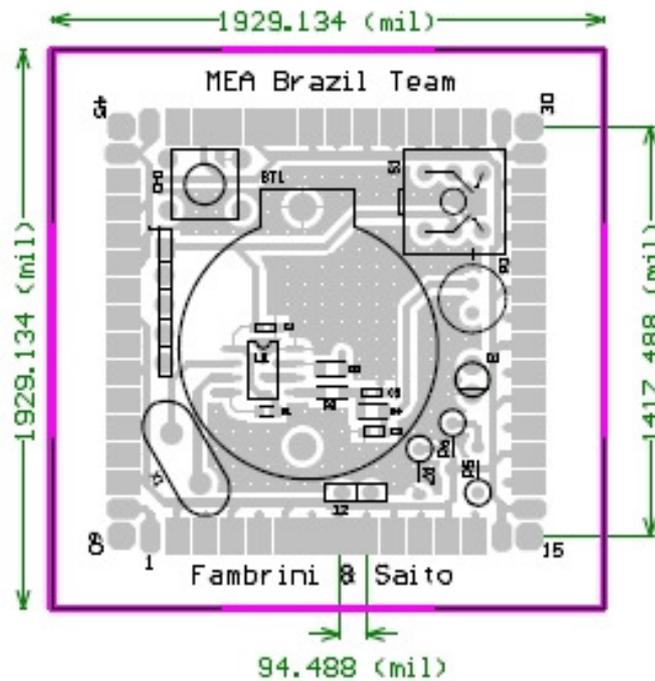


Figura A. 4: Lay-out da Placa de circuito impresso do Sim-MEA.

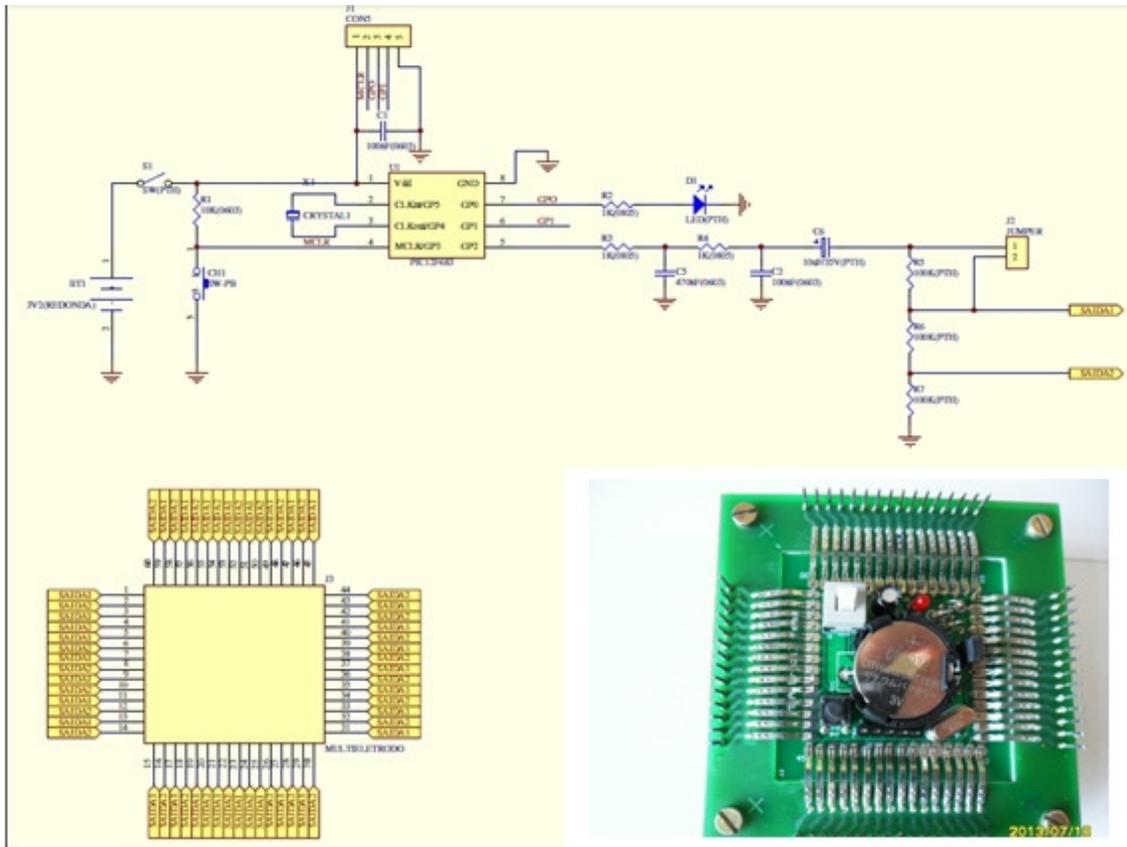


Figura A.5: Esquema elétrico completo e aspecto final da placa de circuito impresso do Sim-MEA montada sob o soquete.

A.3 Pré-amplificador e Filtros

Um protótipo inicial do amplificador para MEA foi construído. Dois canais (dos 60 que seriam necessários) foram implementados, para medidas de ganho e de níveis de ruído. A figura A.6 mostra o esquema elétrico completo do Pré-Amplificador headstage com os filtros.

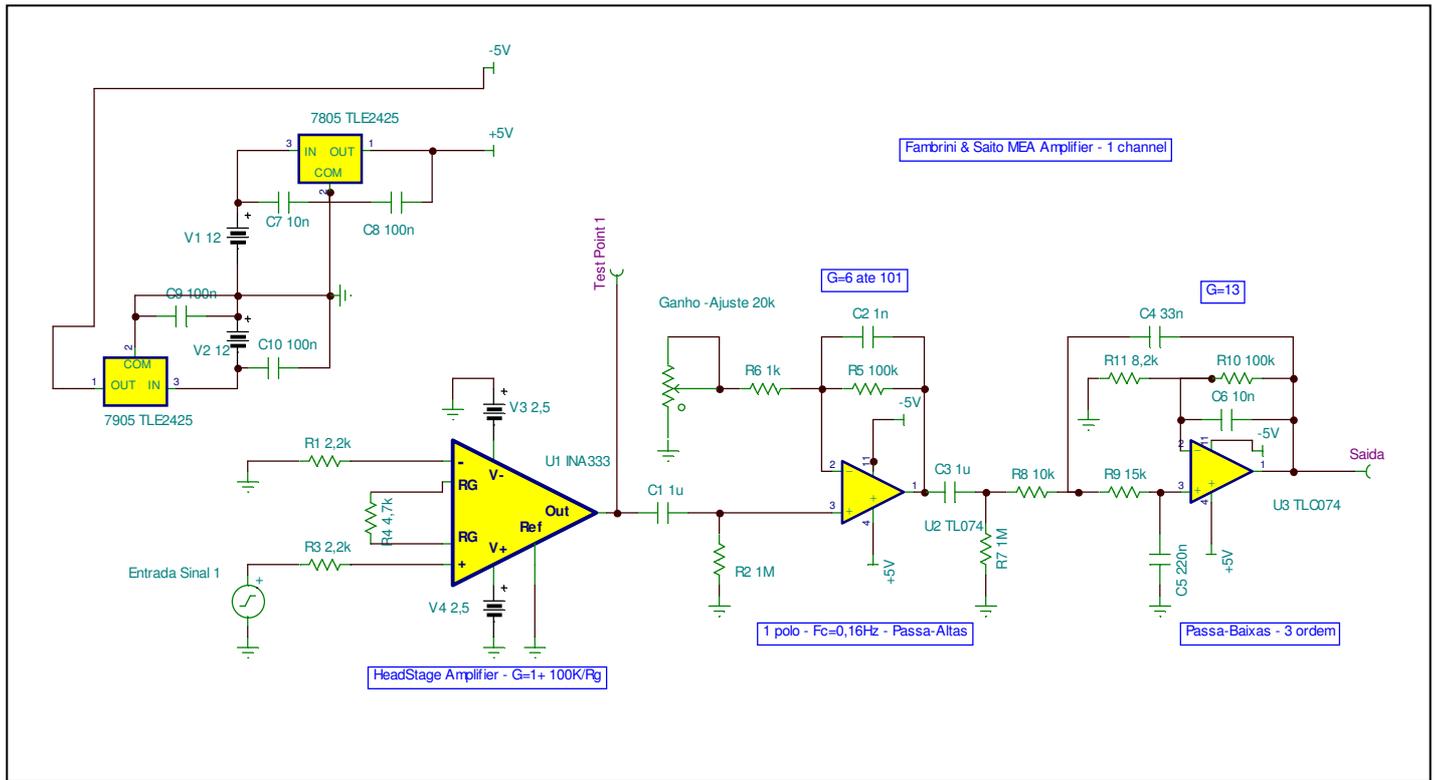


Figura A. 6: Esquema elétrico do pré-amplificador e filtros.

Na Figura A.7 são mostrados os estágios de entrada para 32 canais da Placa de Aquisição de dados. Na Figura A.8 é mostrado o Esquema Elétrico da Placa de Aquisição de Dados proposta neste trabalho, usando o chip DSPIC33FJ256GP710. Para montagem de 60 canais, é necessário duplicar os esquemas das Figuras A.7 e A.8 (construir duas unidades iguais).

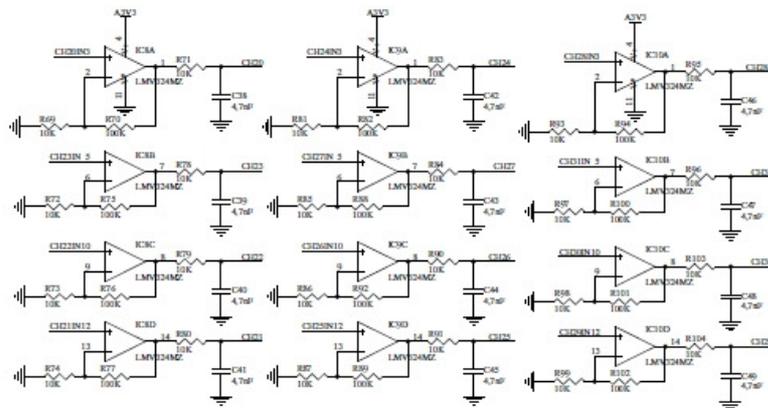
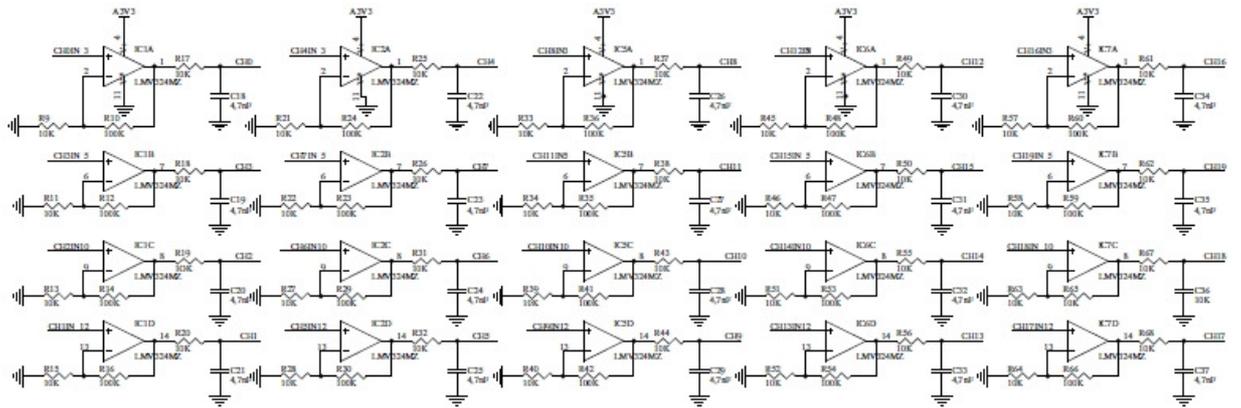


Figura A. 7: Esquema dos 32 canais do Amplificador de entrada da Placa de Aquisição de Dados.

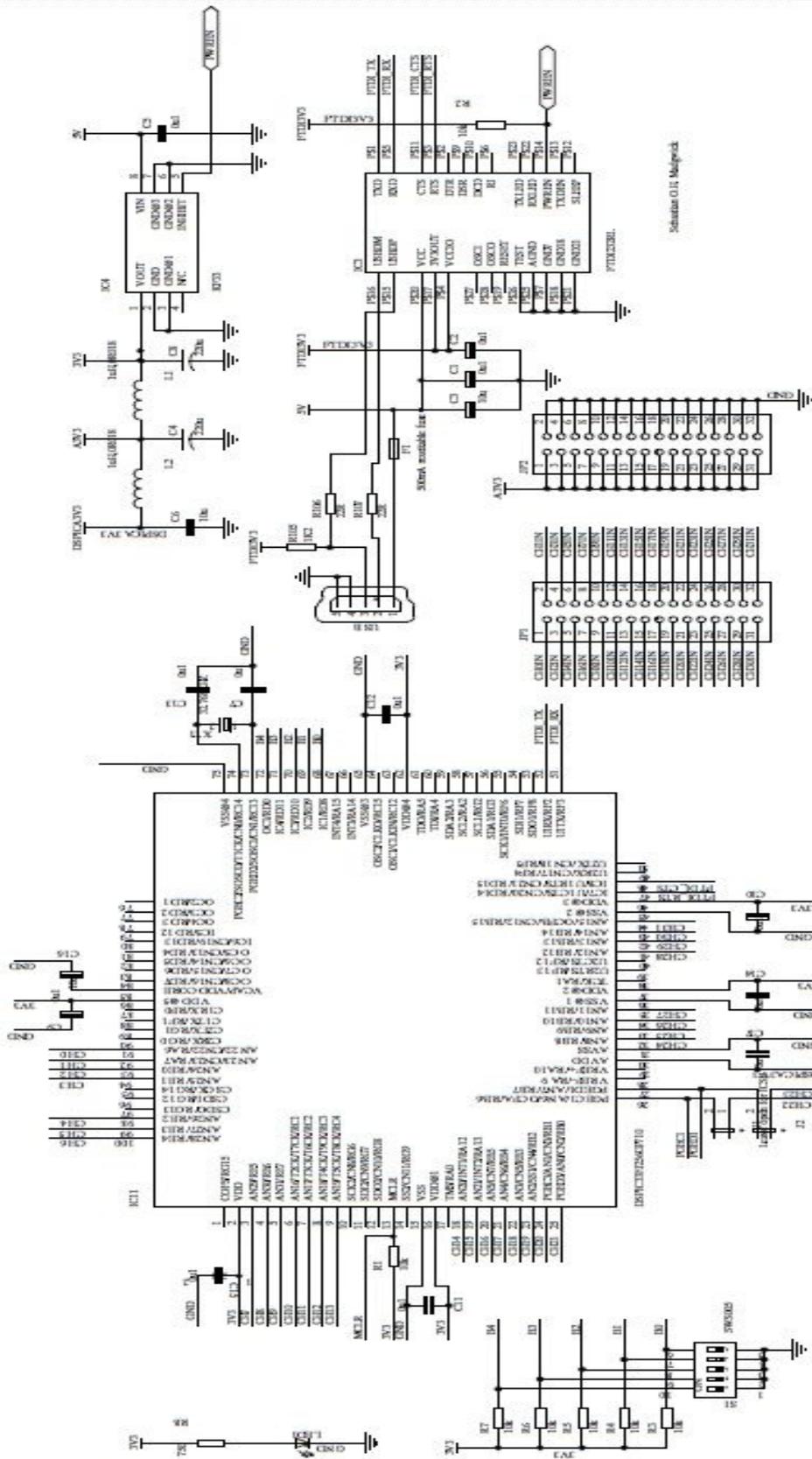


Figura A.8: Esquema Completo da Placa de Aquisição de Dados, para 32 canais: são mostrados os MUX (multiplexadores) e o Conversor A/D, todos internos ao chip DSPIC33FJ256GP710.

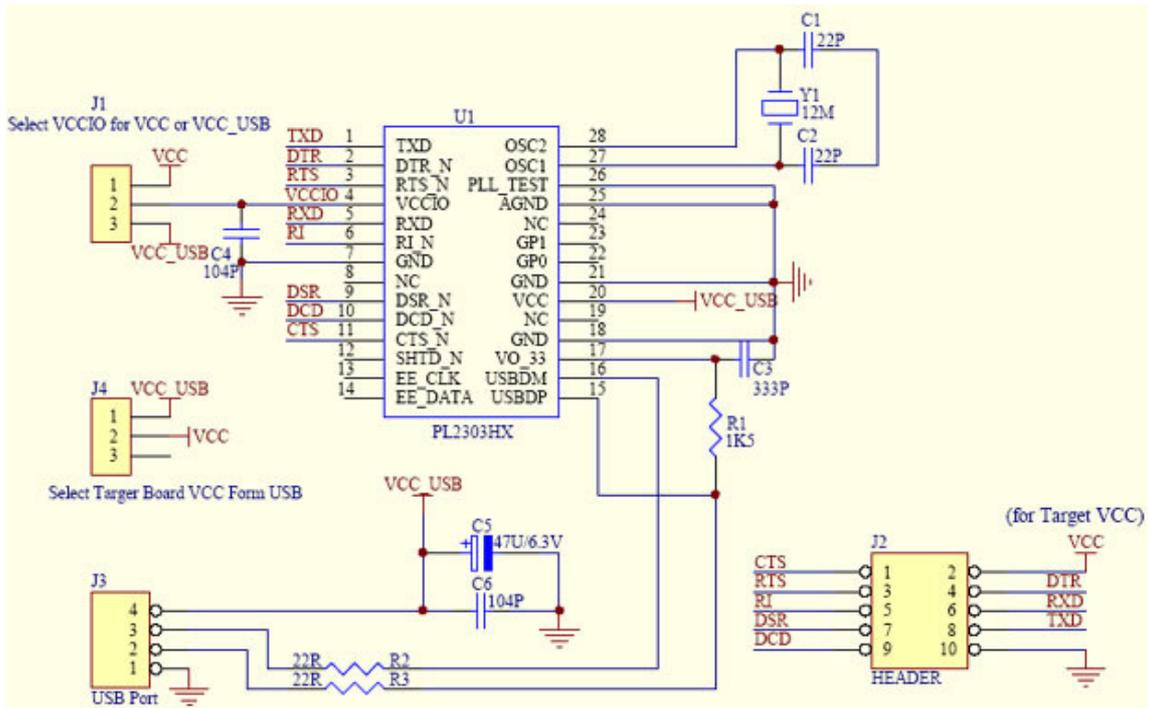


Figura A.9: Conversor USB utilizado na Placa de Aquisição de Dados (Prolific, 2013).

Na Figura A.10 é mostrado o lay-out da Placa de Aquisição de Dados para 32 canais, já incorporando os circuitos mostrados pelas Figuras A.8 e A.9.

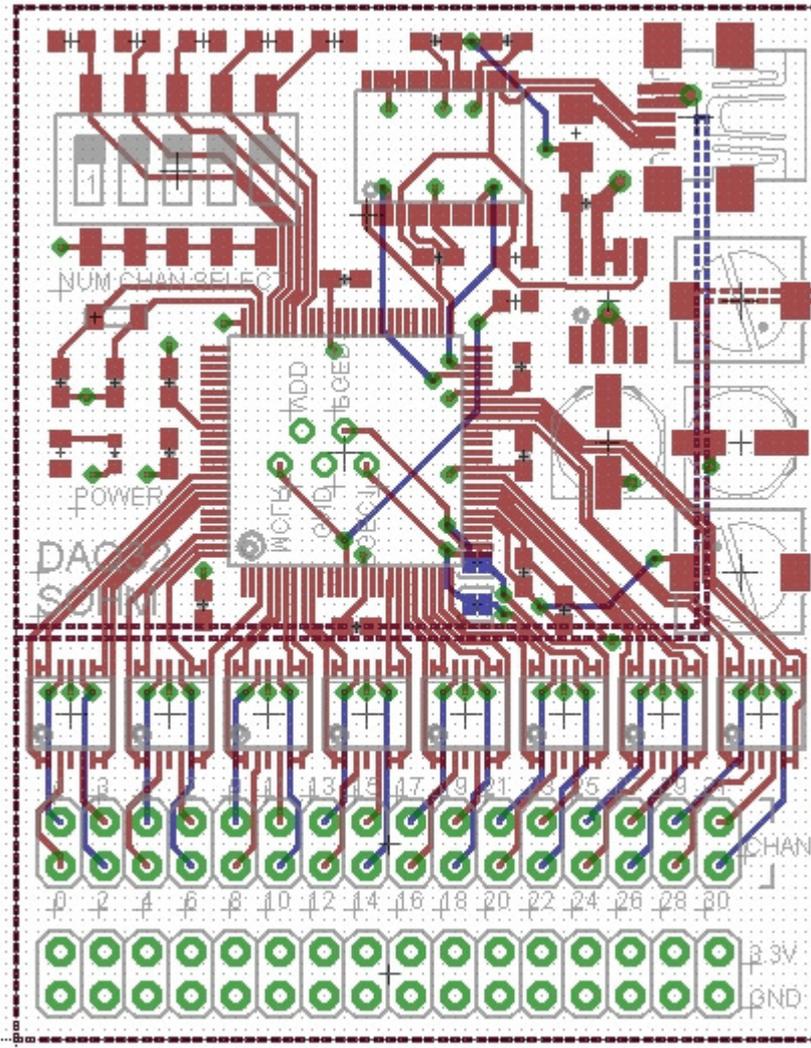


Figura A.10: *Lay-out* da Placa de Aquisição de Dados para 32 canais, já incorporando os circuitos mostrados pelas Figuras A.7, A.8 e A.9.

APÊNDICE B : Amplificação por Ressonância Estocástica (RE)

Muito embora tenha-se descrito o ruído como totalmente indesejável na amplificação e registro dos sinais das redes neuronais, alguns pesquisadores (Lopes, 2010) tem proposto e estudado um interessante fenômeno que ocorre em sistemas não-lineares, chamado Ressonância Estocástica (RE). Trata-se de um fenômeno no qual a relação sinal-ruído de um sistema não-linear tem o seu máximo para um valor não nulo de ruído.

A primeira aplicação do termo foi feita em 1980 por Robert Benzi, que propôs este mecanismo para explicar o comportamento periódico das idades do gelo. Em 1991 surgiram os primeiros artigos sobre o tema em modelos neuronais (Bulsara, 1991), sendo que sua observação efetiva foi conseguida em 1994 e descrita no artigo de Braun publicado pela revista Nature (Braun, 1994).

Existem dois tipos de RE: a Ressonância Estocástica limiar (threshold stochastic resonance) também chamada RE não-dinâmica, e Ressonância Estocástica dinâmica. A RE limiar resulta da mistura entre um limiar, um sinal (estímulo) subliminal e ruído. O sinal sozinho é indetectável e o ruído não contém nenhuma informação, mas, quando o sinal e o ruído ocorrem juntos, para uma dada razão ótima entre os dois, o limiar é atravessado probabilisticamente segundo a amplitude modulada do sinal (isto é, o limiar será mais vezes atravessado quando o nível do sinal está mais perto do limiar), o que fornece informação sobre o sinal (Lopes, 2010).

A ressonância estocástica dinâmica aparece apenas em sistemas não-lineares dinâmicos. Neste caso não é possível identificar um limiar, ocorrendo simplesmente a amplificação da resposta do sistema para um dado nível de ruído. Um exemplo de um sistema desse tipo é uma rede neuronal, na qual os neurônios oscilam em sincronismo e desse modo podem comunicar a sua informação a outros e influenciar a atividade desses, de um modo muito mais efetivo do que se tentasse fazê-lo de modo assíncrono (Lopes, 2010).

Diversos autores têm sugerido que o ruído biológico presente nas redes neuronais tem papel fundamental na transmissão e amplificação dos sinais nervosos em sistemas biológicos, tais como o cérebro de muitos animais, inclusive o homem (Moss, 2004, Melloni et al., 2004).

Uma proposta inovadora seria tentar amplificar o sinal proveniente da MEA usando-se o fenômeno de RE, misturando-se o sinal elétrico proveniente de cada canal da matriz com ruído aleatório de intensidade controlada, buscando-se o efeito de amplificação do sinal e filtrando-se o ruído posteriormente. Tal proposta não foi implementada neste trabalho, porém é uma sugestão interessante para um campo original de pesquisa. Para isso, um circuito eletrônico gerador de ruído e um misturador precisam ser pesquisados e desenvolvidos. Um trabalho inovador pode ser feito ao se desenvolver um amplificador para sinais de MEA baseado em Ressonância Estocástica.

APÊNDICE C :

C.1 Vantagens dos Filtros para a Redução de Ruído Térmico em Amplificadores

Em amplificadores para MEA o entendimento das causas do ruído, bem como das fontes emissoras, é muito importante, dada a pequena amplitude dos sinais a serem tratados e sua impedância relativamente alta. Distorção e ruído estão presentes em qualquer sistema físico real e, normalmente, contribuem para a deterioração das características deste sistema. Um amplificador deveria fornecer idealmente em sua saída uma réplica do sinal de entrada multiplicado por uma constante. No entanto sua saída contém também sinais adicionais ausentes na sua entrada, que são os ruídos e distorções gerados no processo de amplificação.

A seguir, os vários tipos de distorção e ruído e algumas das técnicas de medida serão analisadas. Ruído é um tipo de erro que não está presente no sinal original, mas aparece na saída independentemente de haver ou não sinal de entrada. Provém tanto dos circuitos internos como de fontes externas por acoplamento eletromagnético. Conforme já mencionado, o ruído tanto pode ser de natureza aleatória (randômico) como previsível (determinístico).

O ruído randômico provém essencialmente da agitação térmica dos elétrons presentes nos condutores e componentes eletrônicos (ruído térmico). Sua potência aumenta com a temperatura, sendo zero à 0 °K. A largura espectral do ruído térmico é teoricamente infinita porém, na prática, apresenta espectro limitado pela resposta em frequência dos circuitos integrados, as quais são especificadas pelos fabricantes. Além da redução de temperatura, o ruído térmico pode ser minimizado pela redução das impedâncias características e pela utilização de componentes com baixo ruído. A tensão equivalente do ruído num resistor em função da sua temperatura T (em °K) e banda passante do sistema BW (em Hz) é dada pela equação de Johnson-Nyquist, conforme já mencionado. Tipicamente, um estágio amplificador, usando AO, desprovido de qualquer estágio de filtragem, tem uma largura banda da ordem de 1 MHz (Texas). Isso traz uma ordem de grandeza dada pela equação (16):

$$\Delta F = 10^6 \text{ Hz} \quad (16)$$

e frequentemente os fabricantes de *chips* costumam representar a curva de ganho de seus amplificadores como no gráfico da Figura C.1. O gráfico da Figura C.1 mostra o

ganho em dB para os amplificadores modelos OPA637 e OPA 627 do fabricante Texas Instruments (Texas, 2013) quando os amplificadores são montados em configuração de malha aberta (sem realimentação) em função da frequência do sinal aplicado em sua entrada. Isso coloca os amplificadores em condição de ganho maior possível (open-loop gain).

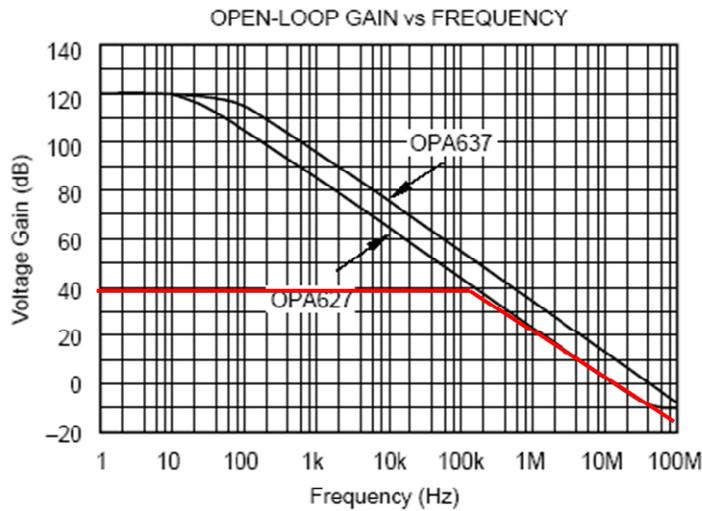


Figura C.1 : Curva de ganho em malha aberta OPA637 e OPA627 (Texas, 2013).

Analisando-se o gráfico da Figura C.1 pode-se concluir que o ganho dos amplificadores diminui à medida que aumenta a frequência do sinal aplicado em sua entrada. Ainda, a partir do gráfico, a curva em vermelho representa o ganho em malha fechada para um ganho de tensão igual a 40 dB, o que equivale a 100 vezes. De acordo com a equação (17), conhecida como equação de Johnson-Nyquist, o ruído térmico tem sua amplitude dada em volts:

$$E_n = \sqrt{4kT_k R \Delta F} \quad (17)$$

na qual:

é a amplitude do ruído térmico para um único resistor R, dada em volts;

k é a constante de Boltzmann;

R é o valor do resistor que produz o ruído, em ohms;

T_k é a temperatura medida em graus kelvin;

ΔF é a banda passante de frequência (ou largura de banda) medida em hertz.

Para reduzir o ruído, uma alternativa de engenharia seria baixar a temperatura dos circuitos amplificadores. Sistemas de resfriamento, entretanto, consomem grande potência elétrica (ventiladores, bombeamento de líquidos refrigerantes, etc) e no máximo conseguiriam uma redução da ordem de potência 10 (a não ser que se utilizasse hélio ou nitrogênio líquido, opções excessivamente dispendiosas). Tal redução, da ordem de 10 elevada à primeira potência, ao ser aplicada sobre o radical, produz uma taxa final de redução do ruído de um fator 3 (raiz quadrada de dez). Dessa forma, claramente, uma redução na temperatura não oferece boa relação custo/benefício. A melhor alternativa é restringir a banda passante do AO.

Ao invés de utilizarmos toda a banda passante de 1 MHz do AO, restringir para a faixa de 3 Hz a 300 Hz leva a uma ordem de grandeza de 100 para o fator F conforme mostra a equação (18).

$$\Delta F \approx 10^2 \text{ Hz} \quad (18)$$

Ao aplicarmos a nova ordem de grandeza sob o radical da Equação (17), resulta um novo fator igual a 10, de modo que a equação (18) pode ser reescrita na forma da equação (19), antes da aplicação do filtro,

$$E_n = \sqrt{4kT_k R \Delta F} = C \times \sqrt{10^6} = 10^3 C \quad (19)$$

onde C é uma constante que engloba o produto das grandezas que não mudam: 4 vezes a constante de Boltzmann multiplicado pela resistência R. A única grandeza que foi alterada foi a banda passante.

Após a aplicação do Filtro Passa-Banda, resulta na expressão (20):

$$E_f = \sqrt{4kT_k R \Delta f} = C \times \sqrt{10^2} = 10C \quad (20).$$

A intensidade do ruído pode ser medida de maneira mais usual em dB, dada pela equação (21):

$$S_n = 20 \log \frac{E_f}{E_n} \quad (21)$$

na qual E_f e E_n representam os níveis de tensão de ruído na saída e na entrada do filtro, respectivamente. Conclui-se dessa forma, que a redução na potência do ruído será igual a **-60 dB**, valor que encoraja fortemente o uso dos filtros passa-bandas como a melhor alternativa para reduzir o ruído.

C.2 Outras fontes de ruído em amplificadores

Outras possíveis fontes de ruído são geralmente de origem extrínseca (externa) ao circuito eletrônico. Ruído determinístico provém de sinais espúrios tais como a rede elétrica, emissores de rádio, telefones celulares, etc. Um grande número de fontes de ruído determinístico somadas pode parecer um ruído randômico devido à complexidade do sinal resultante. Tal ruído pode ser minimizado pelo controle da interferência eletromagnética (EMI) por meio de técnicas de blindagem, filtragem e aterramento. O ruído determinístico geralmente tende a ser induzido igualmente em ambos os condutores que trazem o sinal de entrada para o amplificador, portanto o uso de um AI é mais eficiente por subtrair sinais que aparecem igualmente em ambas as entradas.

C.3 Medidas de ruído

O ruído gerado por um determinado sistema eletrônico existe mesmo que o sinal de entrada seja zero. Entretanto a amplitude do ruído medido na saída pode variar em função da amplitude e impedância do sinal conectado à sua entrada. Em geral o ruído para entrada em aberto ($R_s = \infty$) é superior ao ruído para a entrada em curto-circuito ($R_s = 0$). Medidas precisas do ruído intrínseco de um equipamento (amplificador, receptor de rádio, etc) devem especificar o tipo e a impedância da "carga" conectada à entrada. Na medida de ruído deve-se levar em conta a banda passante do sistema, devendo o medidor apresentar uma banda passante igual ou superior. As interferências eletromagnéticas presentes no ambiente de medição também afetam o nível de ruído e devem ser levadas em consideração.

A aplicação de um sinal de entrada provoca, em geral, um aumento do nível de ruído pelo aumento da temperatura dos componentes e das distorções por intermodulação. Neste caso uma medida mais realista do ruído de um sistema é feita aplicando-se um sinal padrão na entrada e medindo-se a relação entre a amplitude desse sinal na saída e o ruído presente em todo o espectro, excetuando-se a frequência do próprio sinal. O pior caso é obtido quando a amplitude do sinal de entrada é máxima.

Nessas condições esta medida é chamada de relação sinal/ruído (Signal-to-Noise Ratio-SNR) e é geralmente expressa em dB por meio da equação (22):

$$SNR = 20 \log \frac{A_{out \max}}{A_{Noise}} \quad (22)$$

na qual $A_{out \max}$ e A_{Noise} são, respectivamente, a amplitude (em tensão ou corrente) máxima de saída e o ruído em toda a faixa espectral de operação exceto na frequência do sinal de entrada. Caso as amplitudes já sejam dadas em dB, a equação (23) é utilizada.

$$SNR = A_{out \max} \text{ dB} - A_{Noise} \text{ dB} \quad (23)$$

A medida da faixa dinâmica (Dynamic Range) é às vezes confundida com a SNR, pois as duas relacionam amplitude máxima e ruído. A diferença entre elas é que a faixa dinâmica considera o nível de ruído sem sinal de entrada, que é inferior ao nível de ruído com sinal (Boylestad e Nashelsky, 2004).

APENDICE D: Códigos-fonte

D1 Listagem do código-fonte do Firmware implementado no Microcontrolador PIC12F683 do gerador de sinais Sim-MEA.

```
//-----  
// GERADOR DE SINAIS PARA MEA - MATRIZ MULTI ELETRODO  
//      Data: 29/Outubro/2012  
// Gera formas de Onda para testes em MEA padrão  
// Usado com Microcontrolador PIC12F683 - Compilador CCS PCWH  
// prof. Francisco Fambrini  
// prof. Dr. José Hiroki Saito  
//  Última rev. =      29/Outubro/2012  
//      Francisco Fambrini  
//      versão 2.0  
//-----//  
#include <12f683.h>  
#use delay(clock=8000000)  
#zero_ram  
#use rs232( baud=9600, xmit=PIN_A5, rcv=PIN_A1 )  
#fuses intrc_io, NOWDT, PUT, NOPROTECT, NOMCLR  
#use fast_io(A)  
  
//-----  
// Gera a função SENO com 50 pontos por ciclo  
byte const Tabela[50] = { 52,57,62,66,70,74,77,80,82,84,  
                        85,86,86,86,85,83,81,78,75,72,  
                        69,65,61,56,52,48,44,39,35,31,  
                        28,25,22,19,17,15,14,14,14,15,  
                        16,18,20,23,26,30,34,38,43,48  
                        };  
  
//----- Hippocampal Slice Population Spike -----  
  
byte const Tabela[50] = { 86,86,86,86,86,86,86,86,86,86,  
                        0,0,80,85,90,100,72,160,170,163,  
                        155,140,92,130,142,145,140,138,136,132,  
                        131,130,129,127,  
                        0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,  
                        };  
  
//-----  
// Variáveis e constantes  
int m=0;  
#bit t0if=0x0b.2  
int w_temp, status_temp;  
#byte status = 0x03  
//-----  
#inline  
void trata_t0(){  
    m++;  
    if (m>=50) m=0;  
    set_timer0(131);  
    t0if=0;
```

```

}
//-----
//-----
void salva_contexto(){
//salva os registradores que podem ser alterados durante a interrupção
#asm
    movwf w_temp
    swapf status,w
    movwf status_temp
#endasm
}
//-----
void restaura_contexto(){
#asm
    swapf status_temp,w
    movwf status
    swapf w_temp,f
    swapf w_temp,w
#endasm
}
//-----
//-----
#int_global
void trata_int(){
    salva_contexto();
    if (t0if) trata_t0();
    restaura_contexto( );
}
//-----
void main(){
setup_oscillator(OSC_8MHZ);
OUTPUT_A(0);
SET_TRIS_A(0b00001000);

//AJUSTE DO CONVERSADOR AD INTERNO
SETUP_ADC(ADC_CLOCK_INTERNAL);
SETUP_ADC_PORTS(sAN3);
//SETUP_ADC_PORTS(AN3_ANALOG);
SET_ADC_CHANNEL(3);

// PWM AJUSTADO PARA GERAR PULSOS A 5 KHZ
SETUP_TIMER_2 ( T2_DIV_BY_1 ,200, 1 );
SETUP_CCP1(CCP_PWM);
SET_PWM1_DUTY(0) ;

//configura o TMR0 para gerar interrupções
setup_timer_0 (rtcc_internal | rtcc_div_64);
set_timer0(131);
enable_interrupts(global | int_timer0 );

//Loop Principal
while(TRUE){
SET_PWM1_DUTY( Tabela[m] );
} //while(1)
} //main

```

D2 Código-fonte do *Firmware* implementado no Microcontrolador PIC18F4620 do Sistema de Aquisição de Dados (Conversor A/D e MUX).

```
/*-----*/
          COMUNICAÇÃO SERIAL COM PIC18F4620
          Data: 15/07/2013
          Hardware destinado ao conversor AD do MEA System
          Maior taxa de comunicação serial --> 460800
          Usar Controle de Fluxo      ---> nenhum
-----*/

#include <18f4620.h>
#define ADC=10;
#define delay (clock=20000000)
#define fuses HS, nowdt, put, nobrownout, nolvp, noprotect
#define rs232(baud=460800, xmit=PIN_C6, rcv=PIN_C7 )
#define limpa_display lcd_escreve('\f');
#include <lcd_unisal.c>
#include <abertura.h>
#define LED pin_B7
#define bt1 pin_D1
#define bt2 pin_D0
#define bt3 pin_D2
#define bt4 pin_C1
#define bt5 pin_C0
short int l=0;
char tecla;
int16 M=0;
int k=0;
int16 r=0;
void main( ){
lcd_ini( );
delay_ms(300);
apresenta();
printf ("Interface MEA System - Francisco Fambrini - Jose H. Saito\n\r ");
printf ("Comunicacao Serial OK  ");
delay_ms(500);
SETUP_ADC(ADC_CLOCK_INTERNAL | VSS_VDD );
set_adc_channel (0);
delay_us(20);
READ_ADC(ADC_START_AND_READ);
k=0;
while (!k){
if (!input(bt1)){ k=1; }
if (!input(bt2)){ k=2; }
if (!input(bt3)){ k=3; }
}
limpa_display;
lcd_pos_xy(1,1);
printf( lcd_escreve, "Modo=%u      ",k);
lcd_pos_xy(1,2);
printf( lcd_escreve, "Saito & Fambrini");
delay_ms(500);
M=0;
while(true){ l=!l;
```

```

        output_bit(led,1);
switch(k){
case 1:
M = read_adc();           // Lê a tensão no PINO RA0 (PINO 2)
tecla = getch();         // aguarda o sinal de controle de fluxo vindo do PC
if (tecla=='a') printf ("%Lu\r\n",M); // envia pela serial

if (tecla=='f') { lcd_pos_xy(1,1);
                printf (lcd_escreve,"Terminado!  ");
                }
break;
// Faz uma leitura a cada 1 segundo
// Total de 100 leituras
// Avisar o matlab através do caractere 'D' antes do numero a ser enviado
case 2:
for (r=0; r<100; r++){ lcd_pos_xy(1,2);
                    printf(lcd_escreve,"Leit.->%03Lu    ",r); //mostra no LCD
                    M = read_adc();
                    printf ("D%s\r\n",M);
                    l=!l;
                    output_bit(led,1);
                    delay_ms(990);
                    }
break;
//Faz 1000 leituras enviando o caractere 'D' no inicio de cada envio
// envia tudo como string
case 3:
for(r=0;r<1000;r++){
M = read_adc();
printf ("D%s\r\n",M);
l=!l;
output_bit(led,1);
}
break;
default: k=1;
break;
} //switch
} //while true
} //main
-----

```

D3 Primeiro *Script* escrito em MATLAB para testar a aquisição de dados.

```
N=100; %Colhe 100 amostras
s = serial('COM5','BaudRate',460800,'DataBits',8,'Parity','none','FlowControl','none');
fopen(s);
for i=1:N
    fprintf(s, '%s', 'a');
    aux=fscanf(s,'%4u');
    x = 0:1:N;
    y = aux;
    plot(x,y)
end
fclose(s);
figure(1);
xlabel('registro');
ylabel('Tensao (mV)');
title('Sinal eletrico MEA-60');
```

D4 Código-Fonte do programa escrito em MATLAB para Aquisição e Amostragem dos dados.

```
% Aquisition 4 ---- Usar nos modos 2 e 3
function [A,tijd] = plotgraf()
sensors=0;
COMPORT = 5;
if sensors==0
    NUMBER_OF_SENSORS = 4;
    SENSORCOMMAND = 'd';
    PLOTSENSORS = [1 3];
    SENSORNAMES = {'Canal:1','Dist Right','Canal:2','Dist Front-Right'};
else
    NUMBER_OF_SENSORS = 2;
    SENSORCOMMAND = 'l';
    PLOTSENSORS = [1 2];
    SENSORNAMES = {'Canal=1','Canal=2'};
end
s2 = serial(['COM' num2str(COMPORT)],'BaudRate',460800);
fopen(s2);
s2.ReadAsyncMode = 'continuous';
display('Press w or s to change the timespan of the window');
display('Press a or z to change the lowerbound of vertical axis');
display('Press e or r to change the upperbound of vertical axis');
display('Press q to quit');
i=1;
pause(0.1);
tic;
tijd(1)=0;
colordef none
h=figure('Color',[0.3 0.3 0.3]);
set(h,'KeyPressFcn',@keyHandler);
quit=0;
timespan=100; ymin = 0; ymax = 1000;
```

```

paused=0;
while ~quit
    while (paused)
        pause(0.02);
    end
    % res = dataFromResult('P,100,0,500,0');
    fprintf(s2,'a');
    if s2.BytesAvailable
        res = dataFromResult(fscanf(s2));
        if i>1
            tijd(i) = toc;
            tijd(i)= tijd(i) + tijd(i-1);
        end
        tic
        A(i,:) = res;
        b=0;
        for j=PLOTSSENSORS
            b=b+1;
            subplot(length(PLOTSSENSORS),1,b);
            if i>timespan
                plot(tijd(i-timespan+1:i),A(i-timespan+1:i,j),'g','lineWidth',2);
                xlim([tijd(i-timespan+1) tijd(i)]);
            else
                plot(tijd,A(:,j),'g','lineWidth',2);
            end
            ylim([ymin ymax]);
            box off
            title(SENSORNAMES{j});
        end
        i=i+1;
        pause(0.02);
    end
end
fclose(s2);
delete(s2);
clear s2
colordef white;
%% converts the result to a numeric row(kabraeck)
function [ data ] = dataFromResult( result )
    remain = result;
    index=1;
    tokens=[];
    while (~isempty(remain))
        [token,remain] = strtok(remain, ',');
        if (index>1)
            tokens(index-1)=stread(token);
        end
        index=index+1;
    end
    data = tokens;
end
function keyHandler(src,evnt)
    if evnt.Character == 'q'
        quit=1;
    elseif evnt.Character == 'w'
        timespan=timespan+10;
    elseif evnt.Character == 's'
        timespan=max(20,timespan-10);
    elseif evnt.Character == 'a'

```

```
    ymin=max(0,ymin-10);
elseif evnt.Character == 'z'
    ymin=min(ymax-10,ymin+10);
elseif evnt.Character == 'e'
    ymax=max(ymin+10,ymax-10);
elseif evnt.Character == 'r'
    ymax=ymax+10;
elseif evnt.Character == 'p'
    paused = ~paused;
end
end
end
```

APÊNDICE E: *Artigo submetido à Conferência ISIE 2013e*
Comprovantes de Submissão e Aceitação

Low noise headstage design of MEA microelectrode signal amplification

Francisco Fambrini
Graduate Course in Computer Science
Faculty of Campo Limpo Paulista - FACCAMP
Campo Limpo Paulista, SP, Brazil
ffambrini@gmail.com

José Hiroki Saito
Federal University of São Carlos - UFSCar
São Carlos-SP, Brazil
Graduate Course in Computer Science
Faculty of Campo Limpo Paulista - FACCAMP
Campo Limpo Paulista, SP, Brazil
saito@dc.ufscar.br

Abstract- MEA (Micro-Electrode Array) is a very useful device for extracellular signal recording of *in vitro* cultured neurons or network of neurons, It can be used for the research of the neuronal network dynamics, recording with the microelectrodes the spontaneous activity signals of the network of neurons, and the evoked physiological signals in response to electrical stimulations by the microelectrodes. The electrophysiological signals measured by the microelectrodes are in microvolt order of magnitude, so that these signals should be amplified a factor of 1000 (or 30 dB) by a two-phase amplification system, with special techniques that avoid the amplification of noise. This paper describes the design of a simplified and low noise first stage of the MEA signal amplifier, denoted headstage amplifier. The design, simulation and construction of a prototype of the headstage amplifier, using INA333® Texas Instruments Instrumentation Amplifier chip, and a pass-band filter, are described. The results show that the proposal is feasible, leading to the construction of the prototype amplification system for the whole MEA microelectrodes.

Keywords--Multi-electrode-array, headstage amplifier, filters, electrophysiological signal, MEA, neuron.

I. Introduction

Multi-Electrode Array (MEA) may be defined in a simplistic way as a planar device containing a plate, similar to a Petri dish, with electrodes embedded in the substrate, through which neural signals are obtained or delivered to the *in-vitro* cultured neurons, or network of neurons; it can be approached as an interface connecting neurons to electronic circuitry. Since its development in the 1970's [21], MEAs have been improved and widely used for neuroscience research, such as the studies of neurodynamics for understanding the brain information processing, for investigating diseases such as epilepsy and also in pharmacological research. In 1996 the MEA60 System, with a MEA of 60 electrodes, also denoted as standard MEA, was designed and manufactured by Multi Channel Systems (MCS), Reutlingen, Germany, made commercially available and, since then, has been used in a wide range of applications [20]. The system includes a 60-channel amplifier and a high-speed multi-channel data acquisition card based on the PCI-bus technology. This paper describes a proposal of a new design for the MEA signal amplifier with a

simplified and low noise headstage amplification, to be used as an alternative to the MEA60 System amplification. The rest of the paper is divided as follows. The section 2 presents the main characteristics of MEA. Section 3 describes the proposal of headstage amplifier design; followed by the section 4, by the description of the simulation of the designed circuit. Then, the section 5 presents the results; and the section 6, the comments and conclusions.

II. Microelectrode Array (MEA)

A microelectrode (or multi-electrode) array (MEA) is an electronic device used to record extracellular electrophysiological activities and, also, to electrically stimulate a group of cells. It is a very useful device to study the dynamics of cell groups, in spite of the need to deal with complex issues related to cell culture preparations, and maintenance. The device has a set of electrodes in several positioning configurations. Basically, the device is composed by a culture chamber, where the cell culture is placed and a number of microelectrodes, placed according to a specific pattern. MEA has been used to study and analyze cell cultures [10], allowing the investigation of electrical spontaneous activities of neurons, with or without the use of drugs. To analyze MEA signal neuron interactions must be taken into account and, based on spike and burst detections, the cell dynamics can be inferred and evaluated. Many cares must be taken to avoid noises during the signal recording and digitization [4][11][12][13]. MEA's development history goes back to 1972 when Thomas and collaborators published their work about using planar microelectrodes to record electrical activities in cell cultures [21]. A MEA made out of glass substrate using two lines of 15 gold electrodes, placed 100 μm distant from each other, was used to study a culture of rat dorsal root ganglion neuron cells. In 1977 Gross and co-workers proposed a MEA with 36 gold electrodes, placed within 100 or 200 μm distant from each other, each 10 μm wide [4]. The first work about dissociated neurons was reported by Jerome Pine in 1980 [17], using a MEA with two 16 electrode parallel lines, placed 250 μm apart, and 10 μm wide electrodes. Pine recorded neuron activities of cervical ganglion of rats in a 3 weeks culture, after the development of substantial interconnections. The captured signals were of 50 mV order, with 5 to 15:1 signal to noise ratio. It was also discovered that the electrodes could be used for electro-stimulations, with 0.5 V pulses of 1ms duration. In 1986, Wheeler and Novak constructed MEAs of 32 electrodes with 20 μm diameter and 200 μm distance, in an 8 \times 4 array, to record hippocampus slice activities [27]. Meister and his collaborators studied salamander retina, positioning retina ganglion cells on MEA [14][15][16][3]. These and many other works using microelectrode arrays have been motivating the use of MEAs in dissociated cell cultures, as well as in recording activities in real tissue slices. Reference [5] presents an up-to-date review on MEAs for use in neuronal cell cultures. In 1996 the MEA60 System, using a MEA of 60 electrodes, denoted as standard MEA, with its microelectrodes positioning showed in Figure 1, designed and manufactured by Multi Channel Systems (MCS), Reutlingen, Germany, was made commercially available and, since then, has been used in a wide range of applications [20]. The system includes a 60-channel amplifier and a high-speed multi-channel data acquisition card based on the PCI-bus technology. It also provides features for electrical stimulation of electrodes. The MEA60 System uses a MEA with

square record area of $700 \times 700 \mu\text{m}^2$ up to $5 \times 5 \text{ mm}^2$, with 60 electrodes positioned in 8×8 matrix, with an inter-electrode distance of 100, 200 and $500 \mu\text{m}$. Circular electrodes of Titanium Nitride (TiN) are available in 10, 20 and $30 \mu\text{m}$ diameter. The electrodes have impedance in the interval 20 to $400 \text{ k}\Omega$, depending on their diameter and on average have a lifespan of one year [18][19]. The trails connecting electrodes to the border of the MEA device can be made out of Titanium or Indium Tin Oxide (ITO) and are electrically isolated using silicon nitride.

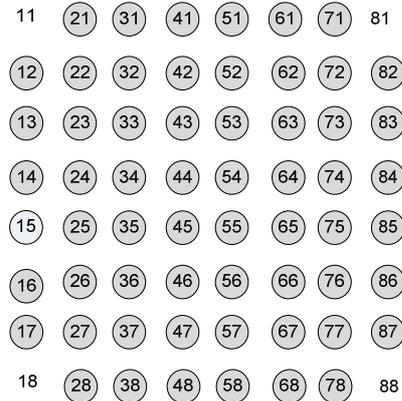
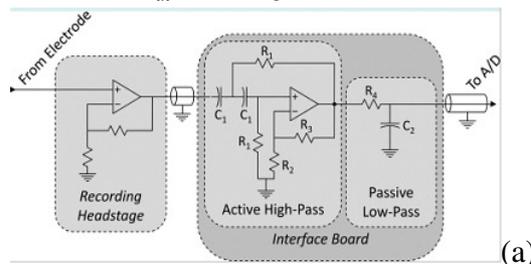


Fig.1. Standard MEA electrode positioning. There are no electrodes at positions 11, 18, 81, and 88, only printed numbers. Position 15 is used as a reference level (ground), so this position has no electrode.

III. Low noise headstage amplifier design

Since the *in vitro* cultured neuron signal is of microvolts magnitude, when captured by a MEA's microelectrode, it must be amplified around a factor of 1000 (30 dB) using more than one stage of amplifiers. Headstage amplifier, or simply headstage, is the first stage pre-amplifier of the MEA signal. The headstage is not the only electronic stage of the MEA signal amplification, but it is the most important stage, that exhibit the best signal-noise relation [25]. There are three possible configurations of operational amplifier that could be chosen to the headstage amplifier, and the data acquisition system performance depends on the best selection of this circuit topology. Wagenaar and Potter [23][24][25][26] suggests the following topology for the headstage amplifier, where the non-inverting amplifier configuration, is used (Fig.2 a), and the DC voltage gain of the operational amplifier (Fig.2 b) is given by equation (1):

$$G = \frac{V_{out}}{V_{in}} = 1 + \frac{R_2}{R_1} \quad (1)$$



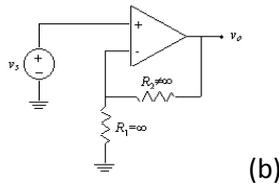


Figure-2. (a) Headstage amplifier, with high-pass and low-pass filters; (b) operational amplifier in details [25].

In this suggested topology, the microelectrode signal is amplified with reference to the common ground (GND) MEA position n. 15. The amplified signal leads to the interface board, where it is found the low-pass filter, whose function is to reduce the pass band to improve the signal-noise relation. The noise has extrinsic causes as electromagnetic interference; and intrinsic causes, as thermal noises produced by the random movement of the electrical charges, and can be estimated by the Johnson-Nyquist relation [9], equation (2) :

$$E_n = \sqrt{4kT_k R \Delta f} \quad (2)$$

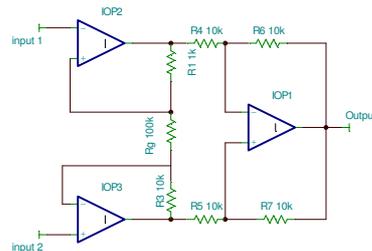
where T_k is the absolute temperature, R is the resistance, Δf is the frequency variation, k is the Boltzmann constant, and E_n is the root-mean-square voltage in open circuit over the resistor R . It is easy to see that, restricting the pass band, it is possible to reduce the intrinsic noise of the amplifier, so the importance of the pass-band filter, that is composed by high-pass filter associated in series with low-pass filter.

The equation (2) also shows the importance of the low values of the contact resistance at the MEA socket [8], because greater the resistance the greater is the thermal noise level. Besides the voltage gain of the non-inverting stage, it is important to note the voltage and power gain in dB as equations (3) and (4), respectively.

$$G_{vdB} = 20 \log \frac{V_{out}}{V_{in}} \quad (3)$$

$$G_{PdB} = 10 \log \frac{P_{out}}{P_{in}} \quad (4)$$

To reduce the electromagnetic interference it is interesting that the headstage be mounted at the same casing of the MEA socket [25]. This form avoids long wires, propagating high impedance low intensity electrical signals through the circuit. Meanwhile, the construction of the headstage amplifier together with the MEA socket is avoided because the majority of the MEA laboratories allows the liquid leaks through the socket, damaging the amplifier. By this reason, many commercial projects avoids to locate the headstage together with the MEA socket (passive socket), opposite to the amplifier incorporating sockets (active sockets). A non-inverting amplifier is stable sufficiently to be used in the headstage amplifier, but don't have the common mode rejection ratio (CMRR) so high as in an instrumentation amplifier (Fig.3).



Common Mode Rejection Ratio

CMMR is defined as in equation (5) [6][7]:

$$CMMR = \frac{\text{differential gain}}{\text{common gain}} = \frac{A_D}{A_{VC}} \quad (5)$$

The manufacturers use to provide CMMR in dB defined as in equation (6):

$$CMR = 20 \log \left(\frac{\text{differential gain}}{\text{common gain}} \right) \quad (6)$$

In fact, the selection of three instrumentation amplifier, instead of the non-inverting amplifier is the best choice [1] because of the low level noise by subtracting the common mode signal. For the instrumentation amplifier, the DC voltage gain out the saturation region is given by the equation (7)

$$V_{out} = \left(1 + \frac{2R_3}{R_g} \right) (V_1 - V_2) \quad (7)$$

where V_{out} is the output voltage of the non saturated amplifier, in function of the voltage difference of the input voltages V_1 and V_2 . Making $R_3 = R_g$, for example, the gain becomes equal to three. The common mode voltage, that arise in relation to the ground, has the same intensity added to V_1 and V_2 , and it is in this way, cancelled in the subtraction, that make the instrumentation amplifier more efficient cancelling the common mode noise [6].

Slew Rate (SR)

The slew rate (SR) is defined as the speed that the operational amplifier output responds to the input variation, with the meaning of delay rate or response time. It is measured in an unitary gain configuration, generally a voltage follower, that represents the worst condition of the amplifier [6]. The limitations of the slew rate are produced by the internal current's incapacity to charge the internal capacitance of the circuit, or even the external compensation capacitance, if it exists. To this project, the SR parameter is not important, since the frequencies and the electrical signal transitions are very low, lower than 300Hz.

Band-pass-filter

Aiming the constraint of the band pass of the amplifier and consequently improve the signal/noise ratio, an active high-pass filter is placed in series with the active low-pass filter, forming a pass-band filter. Half-power frequency is the frequency where the output power of the system is reduced to the half power of the input. In terms of the

voltage (or amplitude) this corresponds to the 70.7% reduction of the input voltage. In decibels, the cutoff frequency corresponds to the -3dB attenuation to the first order filters. The high-pass filter chosen to this headstage amplifier is the second order Butterworth filter; and the low-pass filter, the third order Butterworth, developed to have the best stable band pass filter [7]. During the development, to simulate the described filters, it was used the Filterlab 2.0 Microchip® software [2], which is an environment to design active high-pass, low-pass, and pass-band, Chebyshev, Bessel and Butterworth filters.

IV. Simulation and Results

Firstly it was designed the circuit diagram shown at Fig. 6, using INA 333® Texas Instruments amplifier integrated circuit (Fig.4) at the headstage amplifier, with the gain calculated with equation (8):

$$G = 1 + \frac{100K\Omega}{R_g} \quad (8)$$

and a high-pass second order Butterworth filter with cutoff frequency calculated in 0.16 Hz, associated with a low-pass third order Butterworth filter with cutoff frequency of 10KHz. At first, the headstage circuit was simulated using TINA® TI-V9 Texas Spice Simulator [22]. The noise density results of the designed prototype are shown at the Fig.6, varying the gain from 1 to 1000, varying the resistor R_g , and the frequency from 1 to 10 KHz, without filtering. Fig. 7 shows the response to the INA333® amplifier adjusted to the gain $G=100$, to a square wave applied to the input VG1, with 40 mV peak-to-peak amplitude. It is noted that we have, at the output, square wave of 4 V peak-to-peak amplitude.

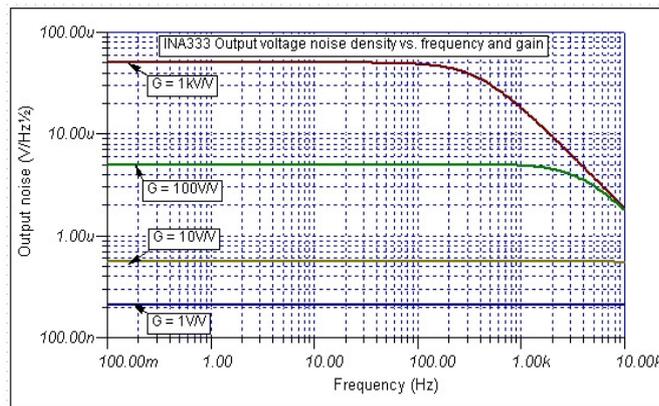


Figure 6 – Noise x frequency diagram without filtering.

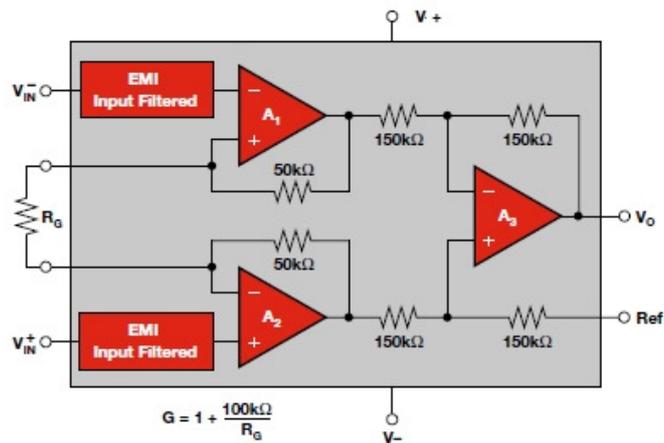


Fig. 4. INA333® functional block diagram (Texas Instruments).

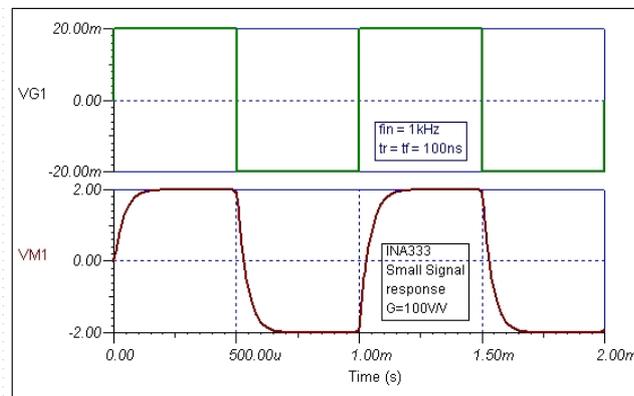


Figure 7 – Square wave response of 40 mV pk-pk with G=100 of gain.

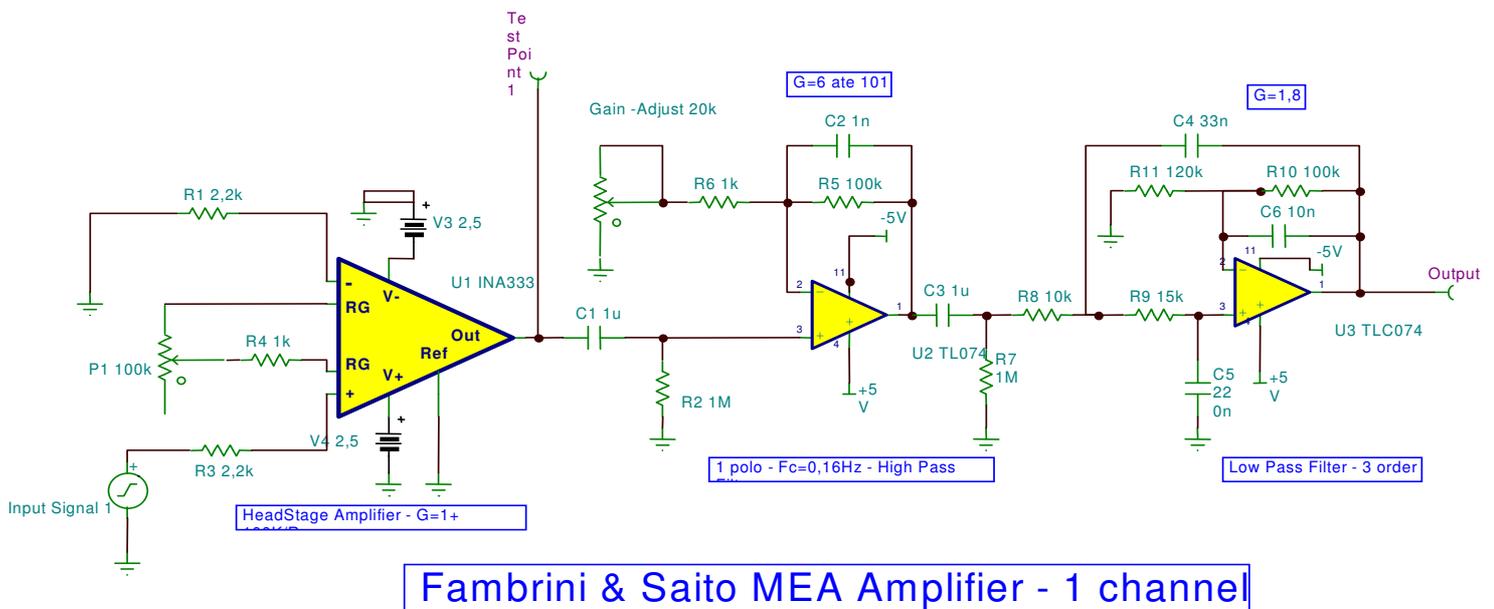


Figure 5 – Schematic diagram of the headstage amplifier of a MEA microelectrode.

V. Prototype construction and results.



Figure 8 – Headstage amplifier prototype measurement assembly.

At Fig.8, it shows a photograph of the MEA headstage amplifier prototype measurement assembly, where at the center is placed the one channel amplifier circuit. On the left side it is seen the signal generator, whose signal is reduced to the MEA microelectrode voltage level, and the oscilloscope; at the right side, the DC battery; and at the upper side the voltmeters. At Fig. 9, it shows the output signal of the filter, with short circuited input showing the residual intrinsic noise level of 16.8 mV.

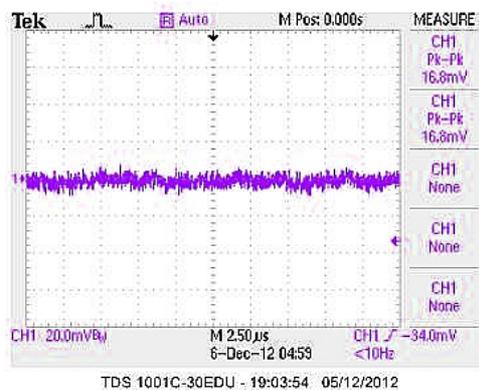


Figure 9 - residual intrinsic noise level of 16.8

Fig.10 shows a sawtooth waveform filter response of 108 mV (peak-to-peak) to an input of 200 μ V (peak-to-peak), and similarly, Fig.11 shows a sine wave filter response of 65.6 mV to an input of 100 μ V. The Fig.12 shows the graph of noise peak-to-peak at the output of the amplifier, varying the voltage gain at 100 Hz sawtooth waveform input.

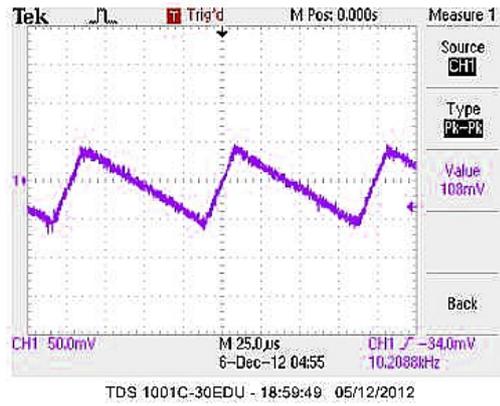


Figure 10-Peak-to-peak (108 mV), sawtooth waveform signal at the filter with 200uV peak-to-peak at the input.

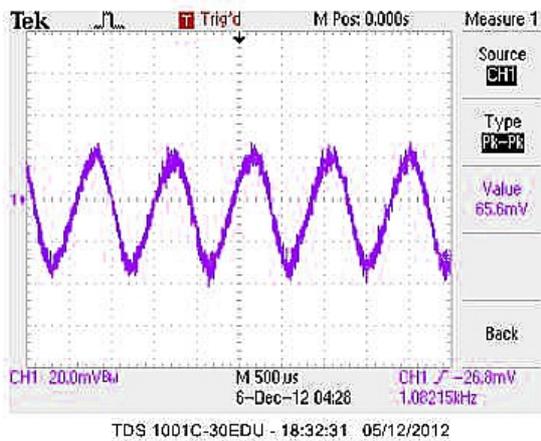


Figure 11-Peak-to-peak (65.6 mV), sinewave form signal at the filter output, with 100 uV peak-to-peak applied at the input.

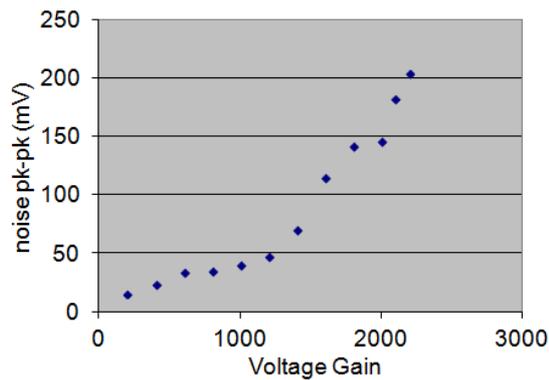


Figure 12. Peak-to-peak noise diagram varying the voltage gain.

The Fig.13 shows a photograph of the MEA socket designed by the authors of this paper together with the headstage amplifier circuit, as to be used in the test with real MEA microelectrode signals, in the next step.



Figure 13 – MEA60 socket and headstage amplifier prototype.

VI. Comments and Conclusions

Microelectrode Array (MEA) is a very useful device to measure extracellular signals of in vitro cultured neurons. A standard MEA allows to register microelectrode signals of μV magnitude, so that amplification stages are needed to record the signals to be processed by a host computer. This work describes a simplified low noise headstage amplifier proposed to be applied to the first stage of MEA microelectrode signal amplification, with the gain of approximately $G = 1000$. The headstage amplifier includes an operational amplifier, and a band-pass filter, that is designed with a sequence of high-pass and a low-pass Butterworth filters, of second and third order, respectively. The proposed headstage amplifier makes possible the construction of a very useful system for MEA in vitro culture of neurons and signal recording. The amplifier circuit was designed, simulated; and a prototype was constructed. The measured signals show very low noise level at the output to $G < 1000$; and the noise density graphic varying the voltage gain shows that the proposed amplifier is feasible. As future work we are proposing to construct a prototype with all 60 amplifiers of a standard MEA, to realize the actual recording of the MEA signals.

REFERENCES

- [1] R. Boylestad, and L. Nashelsky, *Dispositivos Eletrônicos e Teoria de Circuitos*, 8^o Ed., Prentice Hall – Brazil, 2004.
- [2] Filterlab [Online]. Microchip Filter Simulator. Available: www.microchip.com/filterlab, accessed in October 2012.
- [3] T. Gollisch, M. Meister. “Eye smarter than scientists believed: neural computations in circuits of the retina”, *Neuron*, vol. 65, no. 2, pp. 150–164, 2010.
- [4] G. W. Gross, E. Reiske, G. W. Kreutzberg, A. Mayer. “A new fixed-array multimicroelectrode system designed for long-term recording of extracellular single unit activity in-vitro”, *Neuroscience Letter*, vol. 6, pp. 101–105, 1977.
- [5] G. W. Gross, “Multielectrode arrays”, *Scholarpedia*, vol. 6, 2011.
- [6] A. F. Gruiter, “Amplificadores Operacionais, Fundamentos e Aplicações”, McGraw-Hill Ed., 1988.
- [7] P. Horowitz and W. Hill, “The Art of Electronics”, Cambridge University Press, 1989.

- [8] N. K. Jimbo, T. Keiichi, T. Takashi, and P. C. R. Hugh. "A System for MEA-Based Multisite Stimulation", *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 50, n. 2, February, 2003.
- [9] J. D. Rolston, R. E. Gross and S. M. Potter [Online]. "A low-cost multielectrode system for data acquisition enabling real-time closed-loop processing with rapid recovery from stimulation artifacts", 2003. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19668698>, accessed on December 2012.
- [10] C. Klisch, A. Inyushkin, J. Mordel, D. Karnas, P. Pévet, H. Meissl, A. "Orexin A modulates neuronal activity of the rodent suprachiasmatic nucleus in vitro", *European Journal of Neuroscience*, vol. 30, pp. 65–75, 2009.
- [11] M. P. Maher, J. Pine, J. Wright, Y.-C. Tai, "The neurochip: a new multielectrode device for stimulating and recording from cultured neurons", *J. Neurosci. Methods* 87, pp. 45–56, 1989.
- [12] S. Martinoia, P. Massobrio, M. Bove, G. Massobrio, "Cultured neurons coupled to microelectrode arrays: circuit models, simulations and experimental data", *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 51, pp. 859–864, 2004.
- [13] P. Massobrio, G. Massobrio, and S. Martinoia, "Multi-program approach for simulating recorded extracellular signals generated by neurons coupled to microelectrode arrays", Department of Biophysical and Electronic Engineering (DIBE), University of Genova, August 2005.
- [14] M. Meister, J. Pine, D. A. Baylor, "Multielectrode recording from the vertebrate retina", *Invest. Ophthalmol. Vis.*, vol.30 (suppl.), p. 68, 1989.
- [15] M. Meister, J. Pine, D. A. Baylor, "Multi-neural signals from the retina acquisition and analysis", *Neurosci. Meth.*, vol.51, pp. 95–106, 1994.
- [16] M. Meister, R. O. Wong, D. A. Baylor, C. J. Schatz, "Synchronous bursts of action potentials in ganglion cells of the developing mammalian retina", *Science*, vol. 252, pp. 939–943, 1991.
- [17] J. Pine, "Recording action potentials from cultured neurons with extracellular microcircuit electrodes", *Journal of Neuroscience Methodology*, vol. 2, pp. 19–31, 1980.
- [18] W. Rutten, J. M. Mouveroux, J. Buitenweg, Heida, Ruardij, Marani, E. Lakke, "Neuro-electronic interfacing with cultured multi electrode arrays toward a cultured probe"; *Proc. IEEE* 89, pp. 1013–1029, 2001.
- [19] S. A. Desai, J. D. Rolston, L. Guo, and S. M. Potter, "Improving Impedance of Implantable Microwire Multi-Electrode Arrays by Ultrasonic Electroplating of Durable Platinum Black", *Front Neuroengineering*, 2010;
- [20] M. C. Systems, "Innovations in Electrophysiology, *Multi Channel Systems*". Available on www.multichannelsystems.com, accessed on December 2012.
- [21] C. A. Thomas, P. A. Springer, G. W. Loeb, Y. Berwald-Netter, L. M. Okun, "A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells", *Experimental Cell Research*, vol. 74, pp. 61–66, 1972.
- [22] TINA [Online]. Texas Instruments Spice Simulator. Available: <http://www.ti.com/tool/tina-ti>, accessed on December 2012.
- [23] D. Wagenaar, ; T. B. DeMarse, ; S. M. Potter, "MeaBench: A toolset for multi-electrode data acquisition and on-line analysis", Caltech, Dept. of Physics, Pasadena, USA, 2004.
- [24] D. Wagenaar, and S. M. Potter, "Real-time multi-channel stimulus artifact suppression by local curve fitting"; *J. Neurosci. Methods* 120, pp. 113–120, 2002.
- [25] Wagenaar, D. A. and Potter, S. M. Potter, "A versatile all-channel stimulator for electrode arrays, with real-time control", *J. Neural Eng.* 1, 39–44, 2004.
- [26] Wagenaar D. A., J. Pine, and S. M. Potter, "Effective parameters for stimulation of dissociated cultures using multi-electrode arrays", *J. Neurosci. Methods* 138 (1–2), 2004.
- [27] B. C. Wheeler, J. L. Novak, "Current source density estimation using microelectrode array data from the hippocampal slice preparation", *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 33, pp.1204–1212, 1986.

Comprovante de Submissão e Aceitação do Artigo

TD-008117

Low noise headstage design of MEA microelectrode signal amplification

Francisco Fambrini, José Hiroki Saito

Dear Author,

Congratulations! It is our pleasure to inform you that the above paper has been accepted for presentation and then publication in the 2013 IEEE International Symposium on Industrial Electronics (ISIE 2013) to be held in Sunworld Dynasty Hotel Taipei, Taiwan, May 28-31, 2013. You are cordially invited to come to Taipei to present your paper. Please log into the manuscript submission website, and consider the reviewers' comments for your paper, which are intended to help you improve the paper for final publication. Please prepare the final version of your paper taking in due consideration the comments and suggestions of the reviewers. Your final version might have to be checked to ensure that the critical comments were addressed and the recommended changes were made. In addition, please note that the final version will fundamentally correspond in length and contents to the submitted version, except for parts that might be added or modified to comply with the reviewers' suggestions. It is considered unethical to shorten or otherwise alter the final version in ways that make it weaker than what has been approved by the reviewers. Please try to update the reference list with relevant recent works found in IES journals and conferences. This will help readers appreciate your work from the view of Industrial Electronics Society scopes of interest. Please note ***All papers must be re-submitted electronically in their final form*** Instructions for the final version can be found at: <http://www.isie2013.org> To help you submit an IEEE Xplore-compliant PDF file, a link to the IEEE PDF eXpress service is available on the submission page. ISIE conference policy requires that at least one of the authors of your paper must have paid the full regular registration fee for final paper upload. One full regular registration can be used for upload of at most two paper contributions and all associated attachments. Accepted papers are limited to six (6) pages. However, if your manuscript consists of more (up to eight) pages in length, each page above the limit of six pages will require a pre-payment of overlength fee of USD100. This will be automatically assessed at the time of final submission. Please review the Publication Policy at the conference website, and submit all required materials before the **March 30th** deadline: - registration for the conference - final version of paper (PDF) - A single PowerPoint slide for the Digest based on the template provided on the web site - copyright release (web based). All above items can be submitted through the conference website portal: <http://www.isie2013.org> In interactive sessions, each author will have 2-3min at the beginning of the session to introduce their work to the audience and subsequent discussion will be supported by posters. From the point of view of the conference (materials, etc.) there will be no difference of any kind between papers presented in oral or dialogue sessions. In ISIE2013 each paper will be allocated 15min for paper presentation supported by a computer (it is expected to use your own computer) plus 5min for Q&A from the audience. Authors requiring a visa to enter Taiwan must start the process for getting it as soon as possible. Please visit conference website at <http://www.isie2013.org> for more detailed information. Conference accommodation and travel information are available on the conference website. Please check the website regularly for these and other program updates. If you have any questions, please contact with conference secretariat at secretariat@cc.ee.ntu.edu.tw and visit the conference website. Congratulations again on this fine achievement! We look forward to welcoming you in May 2013 in Taipei, Taiwan! Sincerely, Antonio Luque, Program Chair, Ren C. Luo, General Chair IEEE ISIE 2013.

APÊNDICE F: Manual de Instalação – MeaBench

Preparando o Sistema Operacional

Para que o programa funcione é necessário garantir que algumas dependências estejam instaladas, sendo elas: Latex, gt 3.0 e o compilador GCC/C++

Instalando o Latex

Executar no terminal o comando abaixo:

```
sudo apt-get install texlive texlive-latex-extra texlive-lang-portuguese
```

Instalando o GCC/C++ compiler:

Executar no terminal o comando abaixo:

```
sudo aptitude install build-essential
```

Pode-se também instalar através do Synaptic e procurar por c++.

Instalando o gt 3.0

Na instalação do gt 3.0 pode haver problemas com cache limit do Ubuntu. Para contornar esse problema, caso ele exista, siga os passos abaixo:

Edite o arquivo `/etc/apt/apt.conf` ou crie caso ele não exista. Neste arquivo acrescente a seguinte linha: `APT::Cache-Limit "100000000";`

Isso vai dar um “up” no cache.

Executar no terminal o comando abaixo:

```
sudo aptitude install build-essential libqt3-mt-dev
```

Instalando o MeaBench

Agora com o sistema operacional preparado para o Meabench basta fazer o download do arquivo `meabench-1.2.5.tar.gz` e salvá-lo em algum diretório de sua preferência. Seguirei este manual levando em consideração que ele foi salvo na pasta Download. Agora execute os comando abaixo no terminal:

```
$ sudo su
[Digite a senha do usuário root]
$ cd /home/administrador/Download
$ tar xzf meabench -1.2.5.tar.gz
$ cd meabench-1.2.5
$ ./configure --prefix=/opt/MEABench --with-hardware=mcsE
$ make
$ make install
```

Todos os arquivo executáveis do programa serão colocados no diretório `/opt/MEABench/Bin`