

Luís Eduardo Davoglio Estradioto

**Gerador de estímulos elétricos para pesquisas
em neurofisiologia**

Porto Alegre

2020

Luís Eduardo Davoglio Estradioto

Gerador de estímulos elétricos para pesquisas em neurofisiologia

Projeto de diplomação apresentado ao Departamento de Engenharia Elétrica da Escola de Engenharia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para graduação em Engenharia Elétrica

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Departamento de Engenharia Elétrica

Graduação

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Brunnet

Coorientador: Prof. Dr. Ivan Muller

Porto Alegre

2020

Agradecimentos

Agradeço aos professores Dr. Leonardo Brunnet, Dr. Ivan Muller, Dra. Maria Elisa Calcagnotto e Dr. Rafael Pezzi pelo suporte, apoio material e direcionamento do projeto.

Sou grato também ao Mauro Fin, do Setor de Eletrônica da UFRGS, pelo apoio no desenvolvimento do hardware e empréstimo de alguns dos equipamentos e componentes necessários para desenvolver esse trabalho.

Agradeço também ao Centro de Tecnologia Acadêmica da UFRGS pela oportunidade de iniciar esse projeto assim como por toda infraestrutura e acolhimento ao longo dos anos do curso de graduação.

Por fim, agradeço a minha família pelo carinho, compreensão e apoio incondicionais que permitiram meu desenvolvimento pessoal, profissional e acadêmico.

“Querem nos fazer crer que o pilar moral de compartilhar tem mais a ver com saquear um navio do que acender uma vela com outra.”
(Alexandre Oliva)

Resumo

A neurofisiologia é uma área de estudo que cresceu muito nas últimas décadas. Alguns estudos nessa área buscam entender como os tecidos neuronais estabelecem seu processo de aprendizagem. Um método para esse tipo de estudo científico é a microestimulação, na qual pulsos controlados de corrente elétrica são aplicados aos tecidos neuronais e são observadas as respostas fisiológicas geradas por esse processo. Para realizar a microestimulação, é necessário um equipamento que gere estímulos elétricos controlados específicos para essa aplicação. No entanto, esse tipo de equipamento tem alto custo e difícil acesso, inviabilizando esses estudos em universidades brasileiras. Assim, o projeto buscou desenvolver um equipamento adequado para microestimulação com hardware e softwares abertos e livres. O sistema é composto de software de interface gráfica, microcontrolador e um circuito eletrônico para controle dos estímulos. As especificações de projeto foram definidas a partir de revisão bibliográfica e consulta com pesquisadores da área. Foi possível obter um equipamento capaz de gerar diversos protocolos de estímulos com resolução temporal mínima de $0,5\mu s$, corrente de saída ajustável entre $1\mu A$ e $110mA$ e compliância de $\pm 12,5V$, atendendo os requisitos de projeto e garantindo uma solução com bom custo benefício para pesquisas da área.

Palavras-chaves: Microestimulação. Estímulos elétricos. Neurofisiologia. Tecnologia aberta.

Abstract

Neurophysiology is an area of study growing substantially in recent decades. Considerable effort concentrates on understanding how neuronal tissues establish the learning process. A method for these studies is microstimulation, which consists of applying electrical current controlled pulses to tissues and observe the physiological responses generated by them. To perform microstimulation, we need equipment that generates electrical stimuli specific to this application. However, this type of equipment has a high cost and difficult access, making it unfeasible to do these studies in Brazilian universities. Thus, this project sought to develop appropriate microstimulation equipment based on a system with graphical interface software, microcontroller, and an electronic circuit for stimulus control. The project specifications were defined based on the bibliographic review and consultation with researchers in the area. It was possible to obtain equipment capable of generating several stimulus protocols with a minimum temporal resolution of $0.5\mu s$, adjustable output current between $1\mu A$ and $110mA$, and compliance of $\pm 12.5V$, meeting the project requirements and ensuring a cost-effective solution for researches in the area.

Keywords: Microstimulation. Electrical Stimulation. Neurophysiology. Open-source technology.

Lista de ilustrações

Figura 1 – Neurônio motor.	14
Figura 2 – Ilustração de uma sinapse.	14
Figura 3 – Principais tipos de estimulação e seus resultados.	16
Figura 4 – Protocolo HFS.	17
Figura 5 – Protocolo Theta Burst Stimulation (TBS).	18
Figura 6 – Protocolo Primed Burst Stimulation (PBS).	18
Figura 7 – Protocolo Basal.	19
Figura 8 – Diagrama de blocos básico de um estimulador.	20
Figura 9 – Exemplo de SIU quasi-isolada.	21
Figura 10 – Exemplo de SIU isolada por transformador.	22
Figura 11 – Exemplo de SIU utilizando conversores CC-CC.	23
Figura 12 – Exemplo de SIU utilizando conversores CC-CC e modo de corrente constante.	24
Figura 13 – Funcionamento do Stimduino.	24
Figura 14 – Exemplo de <i>Howland Current Pump</i>	25
Figura 15 – Proposta de <i>Howland Current Pump</i> unipolar.	26
Figura 16 – Exemplo de VCCS com alta <i>compliance</i> e precisão.	27
Figura 17 – Exemplos de montagens de sistema para microestimulação.	29
Figura 18 – Partes do projeto.	35
Figura 19 – Interface gráfica desenvolvida.	36
Figura 20 – Interface gráfica com marcações de recursos e funcionalidades.	36
Figura 21 – Fluxograma de funcionamento do software de Arduino.	39
Figura 22 – Estrutura de entradas e saídas do software.	40
Figura 23 – Diagrama de blocos do hardware gerador de pulsos de corrente.	41
Figura 24 – Diagrama esquemático do circuito de ajuste de pulsos.	41
Figura 25 – Diagrama esquemático do circuito de VCCS.	43
Figura 26 – Diagrama esquemático do circuito indicador de <i>compliance</i>	44
Figura 27 – Diagrama esquemático da fonte de alimentação linear.	45
Figura 28 – Protocolo Basal Unipolar.	45
Figura 29 – Protocolo Basal Bipolar.	46
Figura 30 – Protocolo TBS Unipolar.	46
Figura 31 – Protocolo TBS Bipolar.	47
Figura 32 – Protocolos HFS e LFS.	47
Figura 33 – Diagrama esquemático do circuito de ajuste de pulsos simulado.	52
Figura 34 – Resultado da simulação do circuito de ajuste de pulsos.	53
Figura 35 – Simulação do circuito de ajuste de pulsos com $5\mu s$	54

Figura 36 – Diagrama esquemático do circuito de VCCS simulado.	55
Figura 37 – Simulação com $f_{in}=10\text{kHz}$, $R_L=100\Omega$, $R_{11}=100\Omega$ e $V_{in} = \pm 5V$	56
Figura 38 – Simulação com $f_{in}=10\text{kHz}$, $R_L=100\Omega$, $R_{11}=10\text{k}\Omega$ e $V_{in} = \pm 5V$	57
Figura 39 – Simulação com $f_{in}=50\text{kHz}$, $R_L=100\Omega$, $R_{11}=100\Omega$ e $V_{in} = \pm 5V$	57
Figura 40 – Simulação com $f_{in}=50\text{kHz}$, $R_L=100\Omega$, $R_{11}=100\text{k}\Omega$ e $V_{in} = \pm 1V$	58
Figura 41 – Simulação com $f_{in}=10\text{kHz}$, $R_L=1000\Omega$, $R_{11}=100\Omega$ e $V_{in} = \pm 5V$	59
Figura 42 – Simulação com $f_{in}=100\text{kHz}$, $R_L=100\Omega$, $R_{11}=1\text{k}\Omega$ e $V_{in} = \pm 1V$	60
Figura 43 – Simulação de Monte Carlo para VCCS.	61
Figura 44 – Simulação considerando variação de temperatura na VCCS.	61
Figura 45 – Montagem do experimento para testes e caracterização do sistema.	63
Figura 46 – Protótipos e montagem para experimento.	64
Figura 47 – Protocolo Basal Bipolar com $TP = 1000\mu\text{s}$, $TN = 1000\mu\text{s}$, $R_L = 100\Omega$, $R_{11} = 100\Omega$ e $V_{in} = \pm 700\text{mV}$	65
Figura 48 – Protocolo Basal Bipolar com $ITI = 1\text{s}$	66
Figura 49 – Protocolo TBS bipolar com $TP = 5\text{ms}$, $TN = 5\text{ms}$, $IEI = 100\text{ms}$, $ITI = 500\text{ms}$, 4 pulsos por epoch, 8 epochs por trem.	67
Figura 50 – Protocolo TBS bipolar com $TP = 5\text{ms}$, $TN = 5\text{ms}$, $IEI = 100\text{ms}$, $ITI = 500\text{ms}$, 4 pulsos por epoch, 8 epochs por trem, visualização do intervalo entre epochs.	67
Figura 51 – Medida de <i>compliance</i> positiva da VCCS.	68
Figura 52 – Medida de <i>compliance</i> negativa da VCCS.	69
Figura 53 – Protocolo Basal Bipolar com $TP = 4\mu\text{s}$, $R_L = 100\Omega$, $R_{11} = 1\text{k}\Omega$ e $V_{in} = \pm 1V$	70
Figura 54 – Medida de tempo para <i>Slew rate</i> com transição negativa-positiva.	70
Figura 55 – Medida de amplitude para <i>Slew rate</i> com transição negativa-positiva.	71
Figura 56 – Medida de tempo para <i>Slew rate</i> com transição positiva-negativa.	71
Figura 57 – Medida de amplitude para <i>Slew rate</i> com transição positiva-negativa.	72
Figura 58 – Medida de tensão de saída para menor escala de corrente de saída e ajuste fino de V_{in} no mínimo.	73
Figura 59 – Medida de tensão de saída para menor escala de corrente de saída e ajuste fino de V_{in} no máximo.	73
Figura 60 – Placa de circuito impresso para o circuito de conversão dos pulsos de tensão em pulsos de corrente.	80
Figura 61 – Placa de circuito impresso para o circuito de fonte de tensão linear.	81
Figura 62 – Protótipo do circuito de conversão dos pulsos de tensão em pulsos de corrente.	82
Figura 63 – Protótipo da fonte de tensão linear do sistema.	83

Lista de tabelas

Tabela 1 – Cálculo de custo de projeto.	50
Tabela 2 – Parâmetros característicos do sistema obtidos pelos experimentos e especificações.	74

Lista de abreviaturas e siglas

CC BY-SA	<i>Creative Commons By Attribution-Share Alike</i>
CTA	Centro de Tecnologia Acadêmica
DAC	<i>Digital-to-Analog Converter</i>
FPGA	<i>Field-Programmable gate array</i>
GUI	<i>Graphic User Interface</i>
HFS	<i>High Frequency Stimulation</i>
LTP	<i>Long Term Potentiation</i>
MEA	<i>Multi-Electrode Array</i>
PBS	<i>Primed Burst Stimulation</i>
PWM	<i>Pulse Width Modulation</i>
SIU	<i>Stimulus Isolation Unit</i>
TBS	<i>Theta Burst Stimulation</i>
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VCCS	<i>Voltage Controlled Current Source</i>

Sumário

1	INTRODUÇÃO	11
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICO-PRÁTICA	13
2.1	Princípios da neurofisiologia	13
2.2	Estimulação neuronal e protocolos	15
2.3	Dispositivos de estimulação neuronal	19
2.4	Estrutura para experimentos de microestimulação	28
3	METODOLOGIA	31
3.1	Desenvolvimento do projeto	31
3.2	Experimentos de caracterização do sistema	31
3.3	Experimentos de testes de aplicação do sistema	31
3.4	Documentação e acesso à tecnologia livre	32
4	DESENVOLVIMENTO DO PROJETO	34
4.1	Interface gráfica	35
4.2	Software para Arduino	38
4.3	Hardware gerador de pulsos de corrente	40
4.4	Protocolos de estimulação gerados pelo sistema	45
5	ESTIMATIVAS DE CUSTO DE PROJETO	49
6	SIMULAÇÕES	52
6.1	Simulação do circuito de ajuste de pulsos	52
6.2	Simulação da VCCS	54
7	EXPERIMENTOS E RESULTADOS	63
8	CONCLUSÕES	75
	REFERÊNCIAS	77
	APÊNDICE A – IMAGENS	80

1 Introdução

Sistemas neuronais são estudados em diferentes escalas para melhor compreensão de funções mentais como emoções, linguagem e raciocínio. Interações entre a escala nanométrica da bioquímica com escalas meso e macroscópicas de redes neuronais são bastante complexas e muitas questões sobre a estruturação dessas redes permanecem em aberto.

A partir disso, atualmente existem estudos sobre potenciais evocados por estímulos em redes corticais. Esses estudos fazem uso da microestimulação elétrica, que consiste em microeletrodos em contato com culturas neuronais aplicando corrente elétrica na mesma e observando seu crescimento e seus potenciais de resposta.

Já é sabido que a estrutura temporal de resposta dessas redes reflete os intervalos temporais utilizados durante o treinamento por estímulos (JOHNSON; GOEL; BUONOMANO, 2010). Assim, muitos estudos buscam compreender o que ocorre com as redes neuronais se forem estimuladas de forma controlada durante sua formação, buscando entender os mecanismos por trás da aprendizagem humana e por trás de doenças que afetam o sistema nervoso. Alguns exemplos desses estudos são apresentados por Tehovnik (1996), Hales, Rolston e Potter (2010) e Kumar (2011).

Contudo, esse tipo de estudo exige equipamentos de difícil acesso e de alto custo, com manutenção complexa e pouco versáteis a ponto de servirem para diferentes linhas de pesquisa dentro de uma universidade, como aponta Land et al. (2004). Alguns desses equipamentos de estimulação elétrica de tecidos podem ser encontrados na UFRGS, embora não tenham todas as funções necessárias para realização de uma ampla faixa de pesquisas. Além disso, muitos desses equipamentos estão danificados e sem condições de uso e reparo. Diante dessa limitação de recursos para laboratórios, esse tipo de estudo torna-se inviável. Vale lembrar que são dispositivos que devem garantir a segurança do usuário e só são utilizados em estudos com tecidos neuronais *in vitro*.

A partir do diálogo com pesquisadores envolvidos nesse tipo de trabalho dentro da universidade (Prof^o Leonardo Brunnet, do Instituto de Física, e prof^a Maria Elisa Calcagnotto, do Departamento de Bioquímica), foi possível compreender os requisitos necessários para que o equipamento atenda suas demandas. Primeiramente, é necessário que esse dispositivo gerador de estímulos elétricos possua interface amigável e seja de custo acessível para aquisição dos laboratórios. Ademais, é necessário que o mesmo permita a variação de diferentes parâmetros dos estímulos elétricos aplicados nos tecidos neuronais, garantindo sua versatilidade.

Deve ser garantida uma capacidade de estimulação através de pelo menos quatro

canais simultâneos e com ajuste fino desses estímulos, permitindo que as respostas fisiológicas dos trabalhos desenvolvidos sejam evocadas de forma mensurável. Além disso, é preciso assegurar que a estimulação possa ser feita com corrente bipolar, ou seja, o sentido da corrente pode ser variado sem que seja necessário alterar a polaridade dos microeletrodos de forma mecânica. Essas especificações viabilizam o dispositivo para ser utilizado em uma grande faixa de estudos científicos que fazem uso de neuroblastomas em processo de crescimento. Os efeitos desses estímulos devem poder ser observados pelas respostas de grupos neuronais nesses tecidos através de registros intracelulares utilizando a técnica de *patch clamp*.

Dessa forma, para sustentar uma variedade maior de trabalhos dentro da área de neurofisiologia nas universidades brasileiras, esse projeto busca desenvolver um equipamento que atenda as necessidades apresentadas pelos pesquisadores. O estimulador neuronal deve possuir 4 canais reguláveis e com capacidade de estímulo bipolar, possuindo corpo independente e interface gráfica de interação com o usuário. Deve produzir diferentes tipos de estimulação (padrões e formas temporais) e ter capacidade de variar os parâmetros e durações desses estímulos.

Por fim, seguindo os princípios do Centro de Tecnologia Acadêmica da UFRGS (PEZZI et al., 2017), laboratório que deu origem ao projeto, deve ser um equipamento com documentação, software e hardware livres e acessíveis. De forma a garantir que a tecnologia possa ser acessada de maneira transparente, toda documentação está disponível em plataforma online GIT do laboratório.

2 Fundamentação Teórico-Prática

Nesse capítulo, são apresentados os conceitos fundamentais para o entendimento do projeto. Busca-se a compreensão tanto de conceitos teóricos de neurofisiologia e de microestimulação quanto de formas práticas de implementação de sistemas de estimulação neuronal.

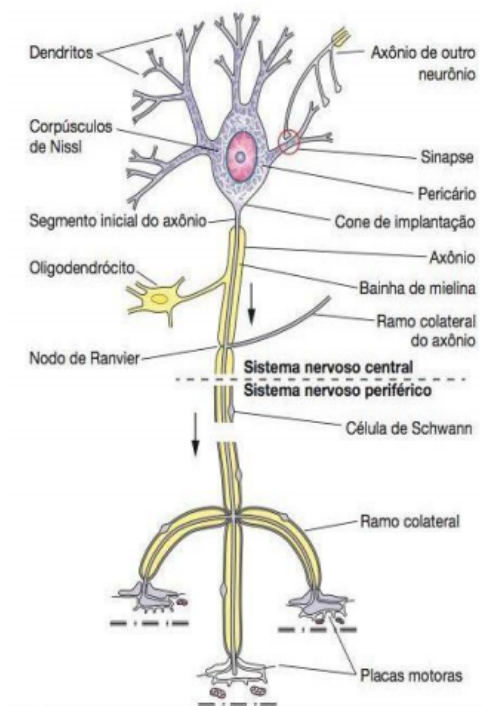
2.1 Princípios da neurofisiologia

Os tecidos neuronais são agrupamentos de células trabalhando em conjunto, gerando assim sistemas dinâmicos que recebem e transmitem impulsos elétricos. Muitas das funções e comportamentos desses tecidos ainda são desconhecidos e são considerados desafios científicos. Compreender os mecanismos por trás das sensações e aprendizagem são alguns exemplos de objetivos dessa área.

Primeiramente, é necessário compreender um pouco sobre os sistemas nervosos. O sistema nervoso é basicamente constituído por duas classes de células: os neurônios e as células da glia, também conhecidas como neuroglias ou glias (KANDEL, 2013). A glia é responsável por cercar os neurônios e mantê-los em seu lugar, além de fornecer nutrientes, oxigênio e suporte imunológico aos neurônios.

Os neurônios, por sua vez, são células responsáveis pelo transporte de sinal e compostos por três partes: pericário/corpo celular/soma, dendritos e axônios, de acordo com a Figura 1.

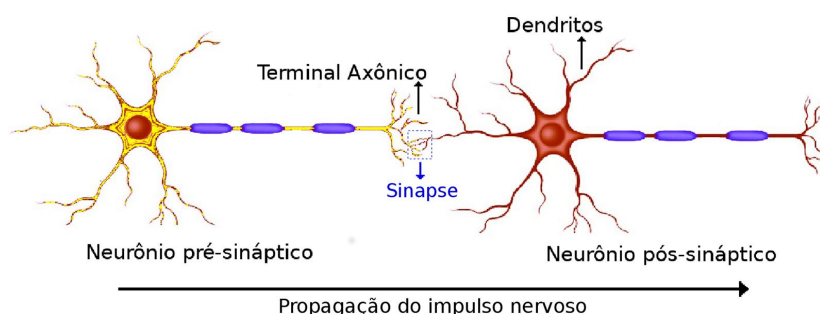
Figura 1 – Neurônio motor.



Fonte - Junqueira e Carneiro (2008)

Dependendo de suas funções, esses neurônios podem ser classificados como motores, sensoriais e interneurônios. Os interneurônios são aqueles que estabelecem conexões com outros neurônios, formando circuitos complexos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). As conexões e transporte de informação ocorrem a partir das sinapses, que são excitações de um neurônio até outro a partir de processos químicos ou elétricos. A Figura 2 ilustra esse processo.

Figura 2 – Ilustração de uma sinapse.



Fonte - Borges et al. (2015)

Como se pode observar, os neurônios pré e pós sinápticos se acoplam numa região onde ocorre a sinapse. É possível reparar no sentido de propagação do sinal elétrico, que

vai do terminal axônico do neurônio pré-sináptico (neurônio que realiza o estímulo) até o dendrito do neurônio pós-sináptico (neurônio que sofre o estímulo) (BORGES et al., 2015). O sinal sináptico é transmitido para populações de neurônios, compartilhando informação entre as redes neurais. Essas populações de neurônios podem acabar tendo respostas médias potenciadas, ou seja, neurônios de uma população podem sofrer mudanças plásticas durante algum treinamento que fazem com que se aumente o número de receptores ou das áreas de sinapse. Isso garante que um tecido tenha capacidade de aprendizagem e suas células possam agir de maneira conjunta e rápida. Essas melhorias sinápticas permitem que as células se tornem mais excitáveis pois, após o aprendizado, mesmo um estímulo mais fraco é capaz de acionar uma população de células durante um longo tempo. Essa é a chamada Potenciação de Longa Duração (*Long Term Potentiation, LTP*) e serve como um registro de que as células efetivamente aprenderam.

Assim, de acordo com Bliss e Collingridge (1993), a LTP é o fortalecimento de ligações sinápticas entre células nervosas que se comunicam quando estimuladas periodicamente. A LTP ocorre como uma forma de plasticidade sináptica, tendo papel fundamental na formação de memória e aprendizado. Através da avaliação dessas potenciações se pode concluir quando está havendo aprendizado em populações neuronais tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Uma forma básica de aprendizado é, por exemplo, perceber a passagem de tempo, que é uma habilidade inerente dos circuitos corticais e pode ser desenvolvida localmente (IVRY; SCHLERF, 2008).

2.2 Estimulação neuronal e protocolos

Fritsch & Hitzig descobriram em 1870 que estímulos elétricos aplicados em superfícies do córtex cerebral resultam em movimentos discretos e reprodutíveis, sendo um marco na história da neurociência. A partir disso, foram iniciados os trabalhos em estimulação dos tecidos neuronais de forma a compreender seu funcionamento. A microestimulação é um tipo particular de estimulação neuronal em que são utilizados microeletrodos que injetam corrente elétrica nos tecidos de maneira controlada. Os tecidos nervosos utilizados para avaliação de aprendizagem por meio da microestimulação são diversos, sendo comuns os tecidos extraídos de ratos e as culturas de células de neuroblastomas provenientes de ratos e humanos (KRAUTHKAMER; BEKKEN; HOROWITZ, 1991).

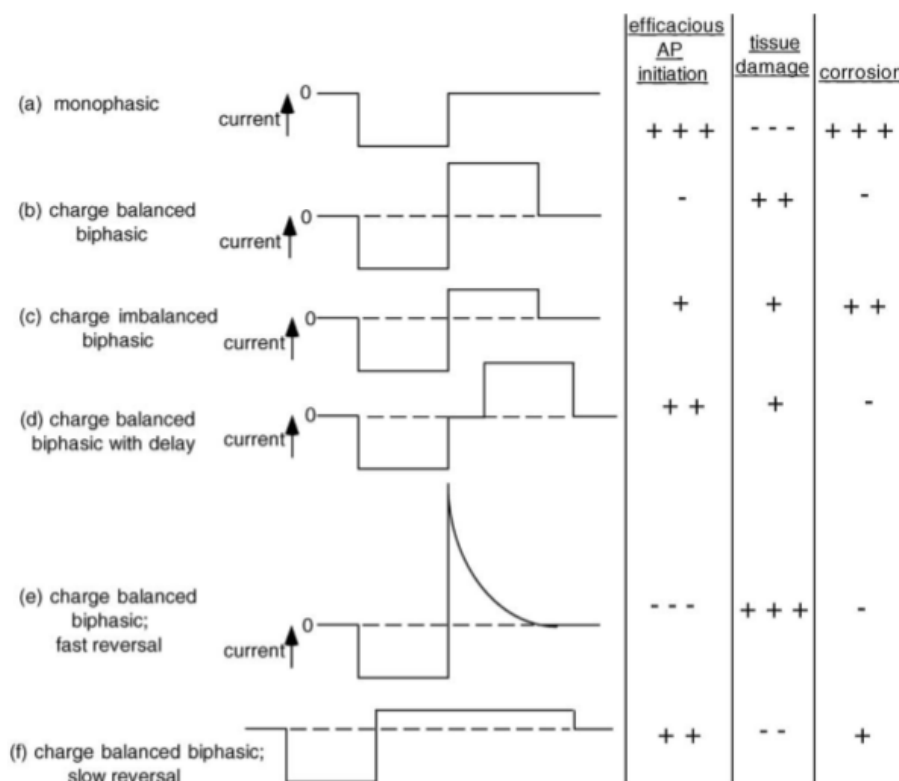
Existem protocolos de microestimulação que buscam produzir ativação confiável do tecido minimizando danos ao mesmo. Muitas pesquisas buscam, a partir da microestimulação, induzir o fenômeno de LTP em população de neurônios de forma a avaliar seu aprendizado. Os parâmetros desse processo de estimulação, como duração e polaridade dos pulsos, frequência, intervalos e amplitude de corrente, alteram sua eficácia e dependem do tipo de cultura celular a ser estudada (TEHOVNIK, 1996).

Em sistemas mais simples e com correntes unipolares, essa estimulação se dá a partir de um eletrodo de trabalho e um contra-eletrodo. O eletrodo de trabalho excita o tecido enquanto que o contra-eletrodo é responsável por completar o circuito para condução das cargas. Contudo, é comum que as cargas acabem se espalhando pelo tecido nesse modo de estimulação. Alguns autores salientam a importância dos estímulos bipolares:

It is a general principle when designing electrical stimulation systems that one should avoid onset of irreversible Faradaic processes which may potentially create damaging chemical species, and keep the injected charge at a low enough level where it may be accommodated strictly by reversible charge injection processes. (MERRILL; BIKSON; JEFFERYS, 2015, 179).

Assim, deve-se dar preferência à estimulação bifásica, a qual gera menos carga residual nos tecidos e conseqüentemente menos danos. A Figura 3 ilustra os principais tipos de estimulação e suas características em relação a eficácia e danos ao tecido.

Figura 3 – Principais tipos de estimulação e seus resultados.



Fonte - Merrill, Bikson e Jefferys (2015)

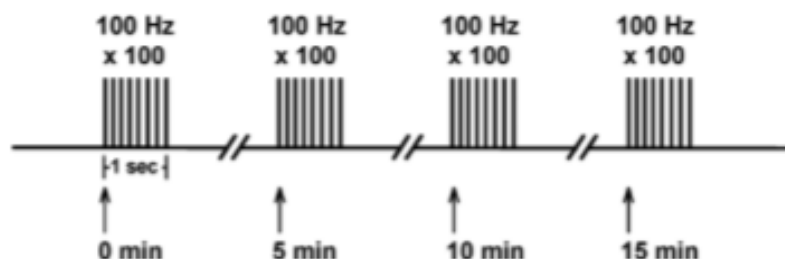
Atualmente, é comum fazer uso da tecnologia de estimulação em culturas de neurônios dissociados a partir de conjuntos de microeletrodos. As vantagens de utilizar esse tipo de tecnologia são muitas. Culturas de neurônios dissociados permitem um modelo

mais simples de funcionamento da atividade neuronal a partir da estimulação. Pela rede ser pequena, o impacto da estimulação é limitado em áreas observáveis. Além disso, esse tipo de cultura pode sobreviver por cerca de um ano *in vitro* (HALES; ROLSTON; POTTER, 2010).

Trabalhos científicos já demonstraram a eficácia da microestimulação no aprendizado celular. Johnson, Goel e Buonomano (2010) fizeram uso de culturas organotípicas e microestimulação bipolar para observar a forma de onda dos potenciais pós-sinápticos. O estudo concluiu que as mudanças na estrutura temporal da atividade neuronal refletem os intervalos dos trens de pulsos usados durante o treinamento, evidenciando a aprendizagem do tecido. Em acréscimo, puderam observar que essa plasticidade das dinâmicas temporais depende de mudanças na atividade dentro dos microcircuitos neurais.

Como anteriormente mencionado, os diferentes parâmetros dos protocolos de estimulação influenciam nos resultados de potenciação das células nervosas. Existem alguns protocolos de estímulo mais consolidados dentro da neurofisiologia. Kumar (2011) cita três protocolos básicos de microestimulação. O primeiro é o protocolo *High Frequency Stimulation* (HFS), que consiste em pulsos de alta frequência de cerca de 100Hz. Esses pulsos são repetidos determinado número de vezes e separados por intervalos de tempo constante, como mostra a Figura 4.

Figura 4 – Protocolo HFS.

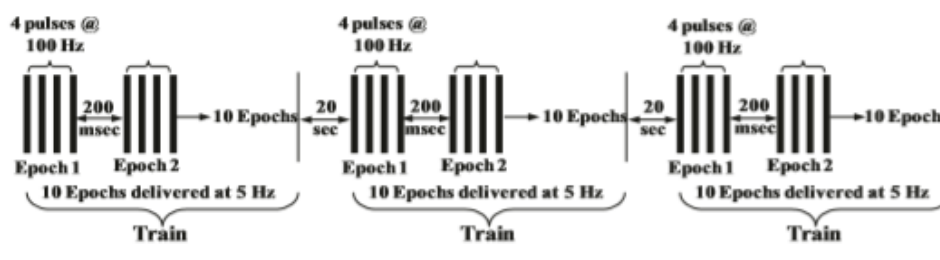


Fonte - Im et al. (2009)

Além do HFS, existe o protocolo *Low Frequency Stimulation* (LFS), que consiste na mesma estrutura de pulsos do HFS mas com frequência reduzida. É comum, para o HFS, utilizar trens de pulsos de frequência de 100Hz que duram um segundo (100 pulsos), cada trem possuindo um período na ordem de segundos até o próximo trem. Já para o LFS, os trens de pulso possuem frequência de 1Hz e duram 100 segundos (100 pulsos).

Outro protocolo comum é o *Theta Burst Stimulation* (TBS), que consiste em 3 trens de estímulo distanciados em 20 segundos, cada trem possuindo 10 períodos de estímulos distanciados de 200 milissegundos entre si, sendo que cada período consiste em 4 pulsos de 100Hz. A Figura 5 exemplifica esse protocolo.

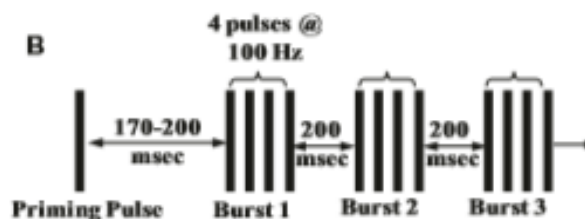
Figura 5 – Protocolo Theta Burst Stimulation (TBS).



Fonte - Kumar (2011)

O último protocolo apresentado é o *Primed Burst Stimulation* (PBS), que é muito semelhante ao TBS porém possui um pulso de preparo distanciado de 170ms a 200ms dos próximos trens de pulso. A Figura 6 ilustra esse protocolo. A partir desses estímulos, Kumar pode evidenciar que a LTP é uma melhoria duradoura na transmissão do sinal entre dois neurônios, a qual é fruto da estimulação síncrona do tecido.

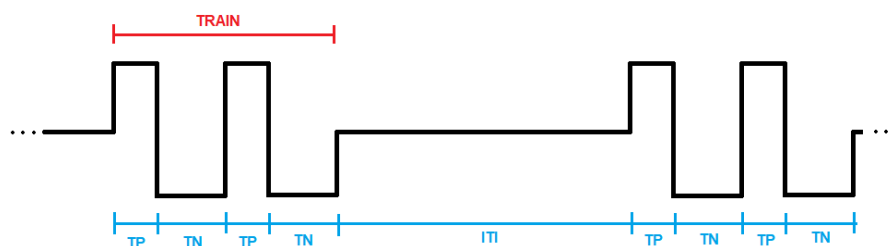
Figura 6 – Protocolo Primed Burst Stimulation (PBS).



Fonte - Kumar (2011)

Alguns outros protocolos comuns são citados por Manahan-Vaughan (2018). O protocolo Shock é um protocolo de alta frequência que consiste em 10 trens de 20 pulsos com intervalo entre pulsos de 5 milissegundos e intervalo entre trens de 2 segundos. Já o protocolo Basal se trata de uma estimulação de preparo ao tecido, sendo composto por estímulos com pulsos duplos e intervalo entre pulsos de cerca de 40 milissegundos utilizando uma onda quadrada de duração de 100 microssegundos. Os trens de pulsos possuem frequência de 0,033Hz e a duração da estimulação é de cerca de 1 hora. A Figura 7 apresenta a estrutura do protocolo Basal bipolar e seus principais parâmetros. TP representa o tempo de pulso positivo, TN o tempo de pulso negativo e ITI o intervalo entre trens de pulso.

Figura 7 – Protocolo Basal.



Fonte - Autor.

Assim, esses protocolos apresentados têm diferentes funções relacionadas aos estudos de neurofisiologia. Portanto, é necessário garantir que o equipamento gerador de estímulos seja versátil a ponto de permitir diversas opções de protocolos com diferentes valores de parâmetros, garantindo assim que possa ser usado em vários contextos e estudos comparativos.

2.3 Dispositivos de estimulação neuronal

Muitos dos conhecimentos da biologia têm avanços a partir de novas técnicas, procedimentos e tecnologias, estando diretamente ligadas à infraestrutura dos laboratórios. Contudo, diante dos cortes de investimento na ciência no Brasil, torna-se difícil realizar estudos que requerem equipamentos mais caros. Segundo [Land et al. \(2004\)](#), o custo de equipamento fisiológico às vezes inviabiliza integrar trabalhos de neurofisiologia em laboratórios. Sabendo disso, torna-se necessário desenvolver um equipamento que possua custo viável para laboratórios de universidades públicas brasileiras.

Nos equipamentos estimuladores de tecidos neuronais *in vitro* cujo objetivo é a indução da LTP e estudo de potenciais evocados relacionados a aprendizagem, é comum que os mesmos tenham características básicas semelhantes. De acordo com [McLean, Scott e Parker \(1996\)](#), “Estimuladores de corrente constante (ou de alta impedância) são preferíveis para estudos de potenciais evocados”. Esses estimuladores são caracterizados por possuírem saída de corrente controlada, variando sua tensão de saída de modo a manter a corrente constante.

Ademais, é comum observar que os protocolos de estímulo são gerados a partir de microcontroladores com saídas PWM ou conversores DAC. [Bontorin et al. \(2009\)](#) utiliza hardware modular para geração dos estímulos que são controlados via interface gráfica no computador (GUI) desenvolvida em linguagem C++. [Cheever et al. \(1998\)](#) desenvolveu um estimulador baseado em microprocessador Motorola MC68HC811 com comunicação com PC via serial, também utilizando GUI desenvolvida em C++ para definição dos

parâmetros de estímulo, obtendo resolução temporal de 32 microssegundos e permitindo 3 canais de estímulo simultâneos.

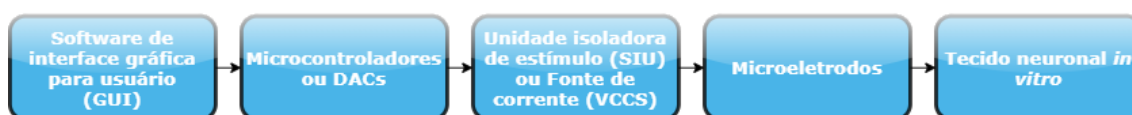
Outro exemplo semelhante é o trabalho de [Rolston, Gross e Potter \(2010\)](#), o qual utiliza GUI em C++ e um conversor digital-analógico (*Digital-to-Analog Converter*, DAC) de 16 bits para gerar os sinais analógicos. [Muller, Bakkum e Hierlemann \(2013\)](#) utilizam uma placa dedicada para conversão do sinal digital em analógico com 2 DACs de 10 bits e FPGA com gerador de funções arbitrárias, podendo gerar pulsos de 200 microssegundos de duração e alcançando resolução temporal abaixo de 50 microssegundos. [Holcomb et al. \(2012\)](#) utilizou um microcontrolador de 16MHz controlado pelo computador via conexão USB e 2 conversores DAC de 12 bits para gerar os protocolos.

A utilização de saídas de PWM do microcontrolador garante maior precisão dos ajustes temporais e custo menor em relação a utilização de DACs. Contudo, os DACs permitem gerar diferentes formatos de onda, não sendo restritos aos pulsos quadrados como no caso do PWM. O DAC ficaria limitado somente pela sua resolução e tempo de resposta, além de permitir que o ajuste de amplitude de saída seja feito via software.

Uma característica comum desses sistemas de estimulação é a presença de uma fonte de corrente controlada por tensão (*Voltage-Controlled Current Source*, VCCS), de maneira a converter os sinais de tensão gerados pelos microcontroladores ou DACs em sinais de corrente controlada, já que a carga aplicada nas culturas neuronais durante a estimulação tem grande importância. Alguns desenvolvedores desses sistemas optam por usar uma Unidade Isoladora de Estímulo (*Stimulus Isolation Unit*, SIU) após a fase de geração de protocolos por sinais de tensão de nível lógico. A SIU é responsável por aumentar a potência do sinal proveniente do DAC, além de garantir corrente constante e regulável de saída e isolar eletricamente o objeto de estudo das demais partes do sistema, diminuindo o nível de ruídos e os possíveis perigos de falta de isolamento galvânica associados a esse tipo de pesquisa ([LAND et al., 2004](#)).

A Figura 8 mostra um diagrama de blocos básico de um sistema de estimulação de tecidos neuronais com corrente controlada.

Figura 8 – Diagrama de blocos básico de um estimulador.



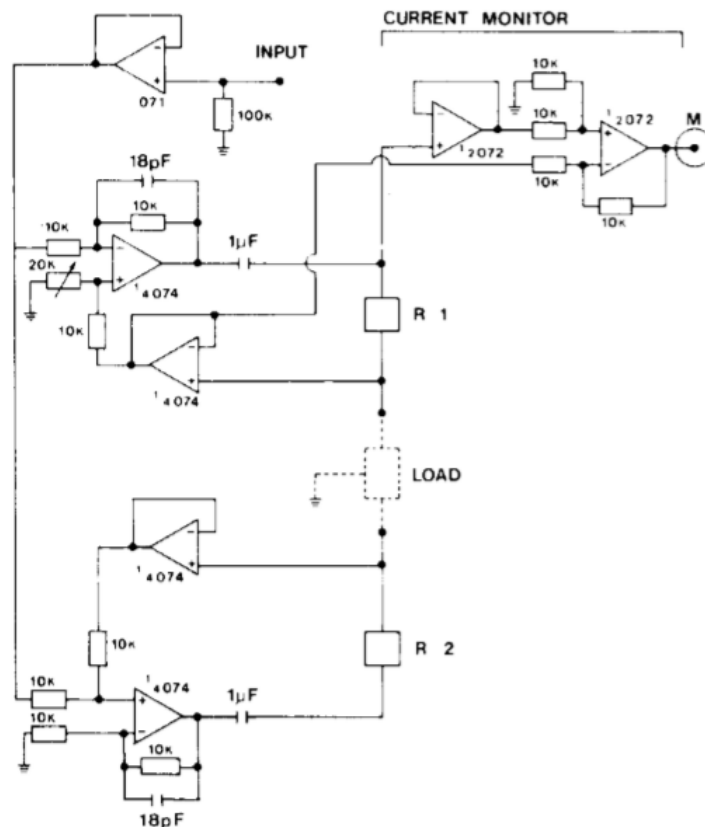
Fonte - Autor.

Existem diferentes tipos de topologias para a VCCS. Busca-se, normalmente, uma *compliance* mínima de $\pm 10V$. A *compliance* é a máxima variação de tensão que a fonte produz para manter a corrente constante numa carga e está diretamente relacionada à

tensão de alimentação do sistema e à impedância da carga. Visto que as impedâncias dos eletrodos e objetos de estudo são altas, é necessário uma *compliance* alta para poder garantir correntes de até 10mA na estimulação (DIGITIMER, 2016). Além disso, é comum que o ganho de conversão tensão-corrente seja variável para que se possa alterar a corrente utilizada na estimulação de acordo com o estudo.

Algumas abordagens iniciais, tais como a de Millar e Barnett (1988) buscam soluções a partir de estimuladores quasi-isolados ou isolados via transformador. Os estimuladores quasi-isolados têm um terminal que fornece corrente controlada ao tecido enquanto que o outro terminal drena a mesma corrente, assim nenhuma corrente deve fluir pelo conector de aterramento. A Figura 9 mostra um exemplo de VCCS quasi-isolada, que consiste de dois circuitos de corrente constante em configuração *push-pull*. O sinal de tensão de excitação é aplicada no ponto "Input", sendo convertido por corrente através de uma relação com os resistores iguais R1 e R2. O sistema pode possuir acoplamento AC e monitor de corrente, tendo *compliance* dependente da fonte de alimentação do sistema.

Figura 9 – Exemplo de SIU quasi-isolada.

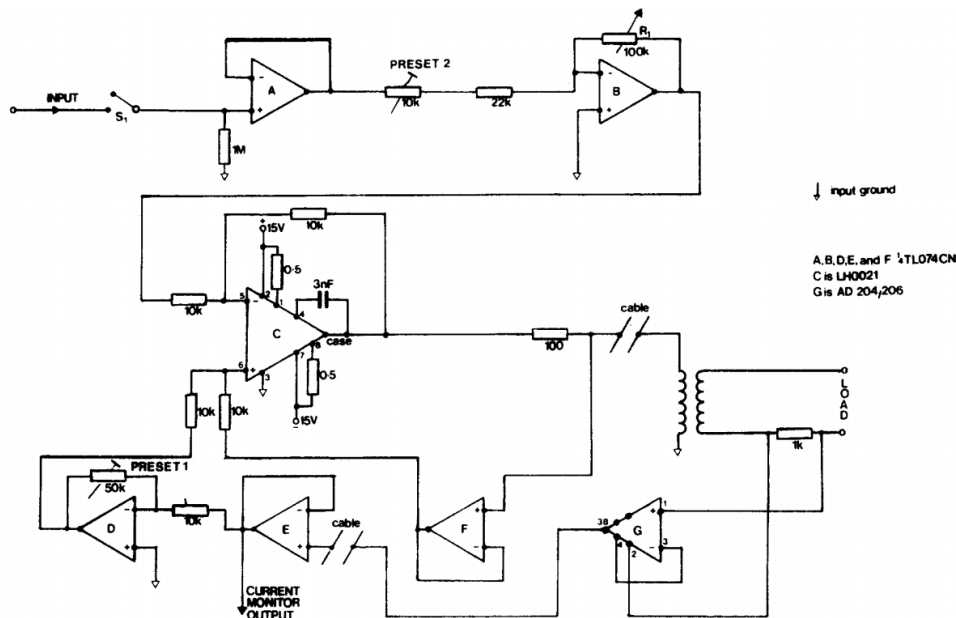


Fonte - Millar e Barnett (1988)

Outra topologia apresentada é de SIUs isoladas via transformadores, as quais possuem maior *compliance* e redução de ruídos. Um exemplo é apresentado na Figura 10,

onde o transformador isolador é presente logo antes da carga. Kadziela e Tomaszewski (1970) propõe um estimulador com isolamento da saída a partir de transformador com baixa capacitância e circuito alimentado por baterias, atingindo *compliance* de 155V.

Figura 10 – Exemplo de SIU isolada por transformador.

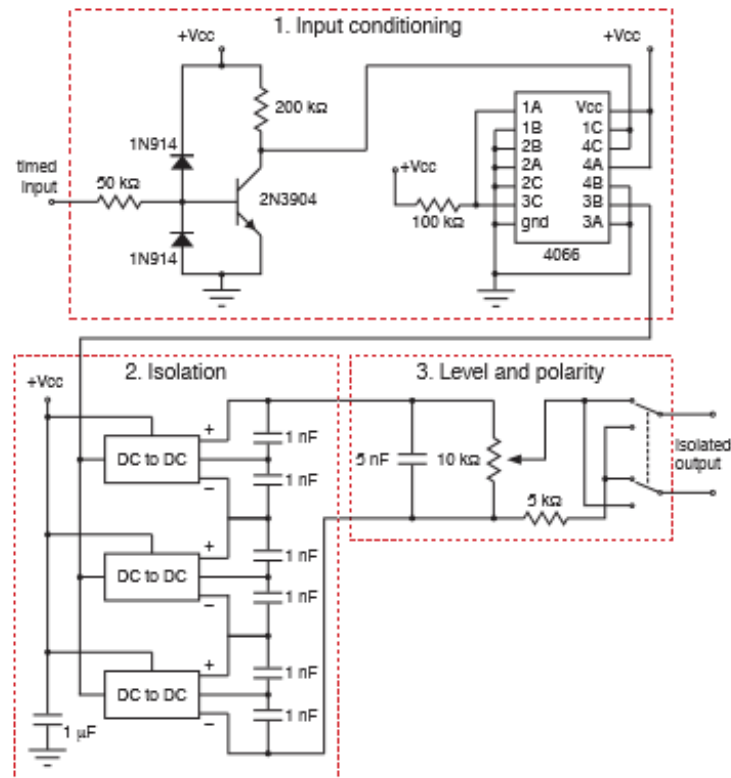


Fonte - Millar e Barnett (1988)

Outros trabalhos trazem soluções que utilizam fontes chaveadas e acoplamento óptico para as SIUs. Conforme Land et al. (2004), a SIU deve possuir características de isolamento maior que 1Gohm e acoplamento capacitivo abaixo de 20pF. Isso evita que a corrente vaze para os aparelhos de aquisição de dados. Além disso, deve possuir potência máxima de saída de cerca de 1W. O design desenvolvido no trabalho em questão utiliza conversores CC-CC, tendo capacidade de ligar e desligar em cerca de 50 microssegundos, o que garante boa resposta em frequência.

A Figura 11 mostra o circuito utilizado, em que uma entrada digital é amplificada e serve para ligar e desligar os conversores. Quando ligados, geram tensão de saída controlada por um potenciômetro. O custo estimado da SIU foi de 50 dólares e a *compliance* é de 100V.

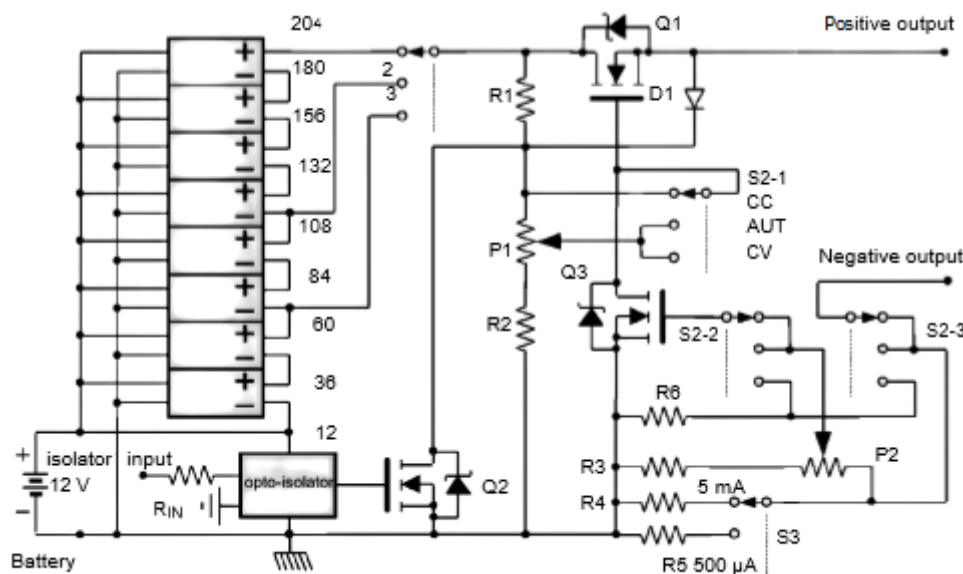
Figura 11 – Exemplo de SIU utilizando conversores CC-CC.



Fonte - Land et al. (2004)

Uma solução semelhante e mais versátil é a de Brasil e Leal-Cardoso (1999), em que há capacidade da SIU atuar em modo de corrente constante a partir do chaveamento de transistores HEXFET. A Figura 12 mostra a topologia desenvolvida, onde a entrada é isolada a partir de um optoisolador. O sinal de entrada é responsável pelo chaveamento das fontes CC-CC, responsáveis por garantir uma *compliance* de até 204V. Os modos de operação (tensão controlada, corrente controlada ou automático) são alterados a partir de uma chave. Essa topologia pode atingir boa performance, tendo resistência de aterramento de 100Gohms, capacitância de acoplamento de 35pF e tempo de subida e descida de corrente de 5 microssegundos, além de *compliance* de 200V.

Figura 12 – Exemplo de SIU utilizando conversores CC-CC e modo de corrente constante.

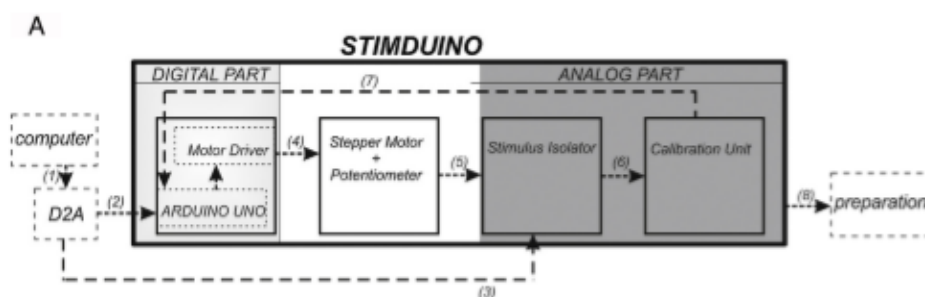


Fonte - Brasil e Leal-Cardoso (1999)

Um trabalho mais recente e com estrutura do sistema muito semelhante a apresentada na Figura 8 é o de Sheinin, Lavi e Michaelevski (2015), em que foi desenvolvido um gerador de estímulos *open-source* controlado por Arduino. Os sinais de estímulo são gerados pelo computador em conjunto com placa DAC e passam pela SIU que tem sua corrente de saída controlada pelo Arduino.

A Figura 13 mostra o processo desse sistema. Nele, o Arduino recebe os dados de uma unidade de calibração para ajustar o valor da corrente de saída da SIU a partir de um motor de passo acoplado a um potenciômetro. A topologia da SIU também utiliza conversores CC-CC e o sistema possui GUI desenvolvida em Matlab.

Figura 13 – Funcionamento do Stimduino.



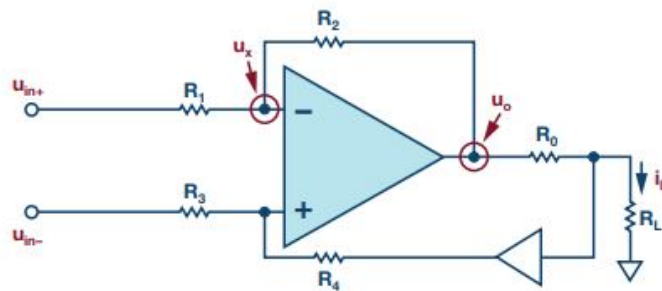
Fonte - Sheinin, Lavi e Michaelevski (2015)

Para alguns tipos de estimulação neuronal, como no caso de estimulações com múltiplos eletrodos, a *compliance* da fonte de corrente não precisa ser tão alta quanto

as soluções apresentadas anteriormente. Algumas topologias buscam garantir uma boa precisão de corrente de saída e boa resposta em frequência, baseando-se na topologia de *Howland Current Pump*.

Nesse tipo de topologia, um amplificador operacional é utilizado para converter o sinal de entrada de tensão em um sinal de corrente na carga. [Analog Devices \(2016\)](#) apresenta uma topologia de *Howland Current Pump* melhorada, onde um buffer é utilizado para fechar a malha de realimentação do sistema, garantindo maior precisão de corrente. A Figura 14 exemplifica esse topologia.

Figura 14 – Exemplo de *Howland Current Pump*.



Fonte - [Analog Devices \(2016\)](#)

A corrente de saída desse circuito pode ser calculada através da Equação 2.1, considerando um amplificador operacional ideal e que toda corrente que passa por R_0 também passa por R_L .

$$i_L R_0 \left[1 + \frac{R_1}{R_2} + R_L \left(1 - \frac{R_1}{R_2} * \frac{R_4}{R_3} \right) \right] = u_{in+} \left(\frac{R_4}{R_3} + 1 \right) - u_{in-} \left(\frac{R_4}{R_3} + \frac{R_1}{R_2} * \frac{R_4}{R_3} \right) \quad (2.1)$$

Se for garantido que $R_1 = R_2 = R_3 = R_4$, pode-se chegar a expressão de corrente de saída i_L de acordo com a Equação 2.2.

$$i_L = \frac{u_{in+} - u_{in-}}{R_0} \quad (2.2)$$

Como se pode notar, a corrente de saída independe da carga e é controlada somente pelo valor de resistência R_0 . Isso permite obter uma corrente de saída dependente dos valores de tensão de entrada, tendo fator de conversão tensão-corrente dado por R_0 .

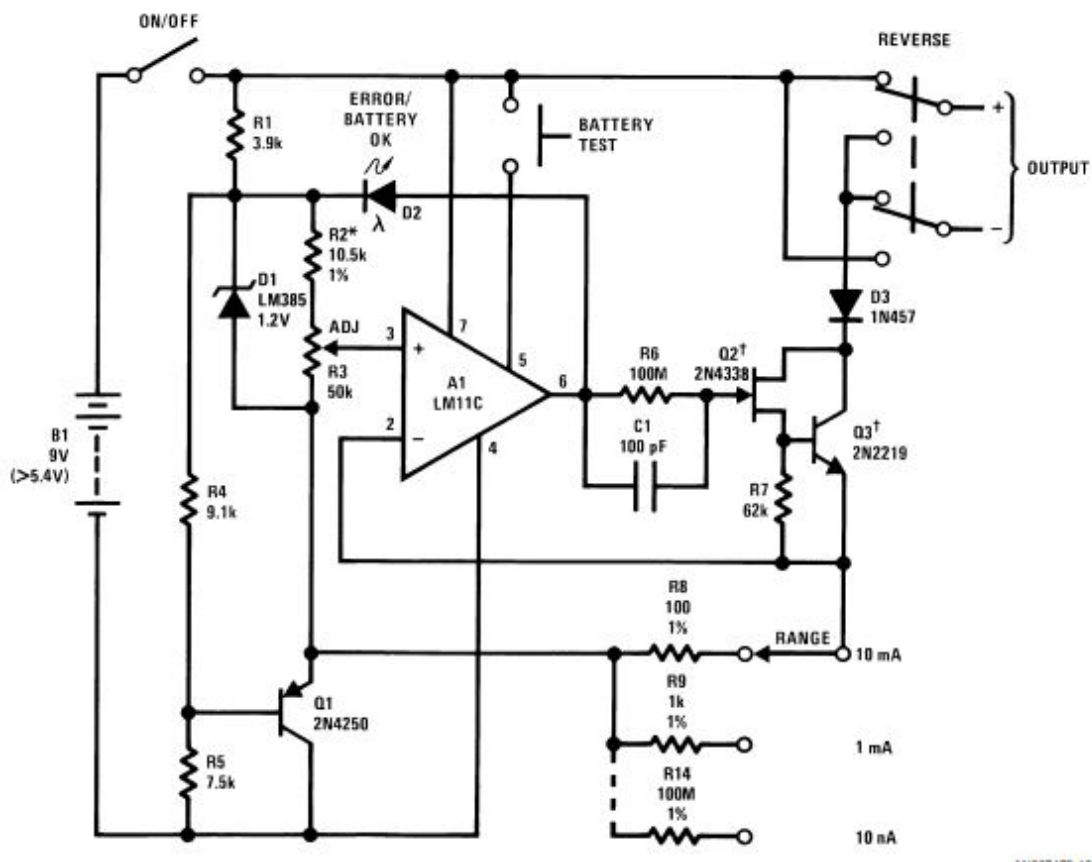
Analisando as características não ideais do circuito, é possível notar que escolher um amplificador operacional de precisão garante bom controle de corrente de saída. Além disso, para garantir boa capacidade de corrente de saída (cerca de 100mA) e boa performance

de sinais dinâmicos, é necessário utilizar um amplificador operacional com alto *slew-rate* e largura de banda (ANALOG DEVICES, 2016).

Outras topologias são apresentadas em Analog Devices (2016) e Analog Devices (2009), onde a *Howland Current Pump* é composta por dois amplificadores operacionais e um buffer. Esse tipo de topologia garante maior precisão CC para a fonte, embora aconteça perda de resposta em frequência. Para aplicações em microestimulação, ambos aspectos são importantes, mas garantir uma baixa distorção do sinal de tensão de entrada da fonte (gerado pelos DACs ou microcontroladores) garante maior confiabilidade para os estudos neurofisiológicos do que priorizar a precisão de amplitude de corrente.

Uma proposta mais compatível com a prática de aplicação dessa topologia em microestimulação unipolar é apresentada por Texas Instruments (1980). Nela, a VCCS alimentada por bateria garante uma faixa de corrente de saída entre 10nA e 10mA com *compliance* de 30V até -5V. Um potenciômetro de dez voltas permite ajustar a variação de corrente com precisão, conforme mostra a Figura 15.

Figura 15 – Proposta de *Howland Current Pump* unipolar.



Fonte - Texas Instruments (1980)

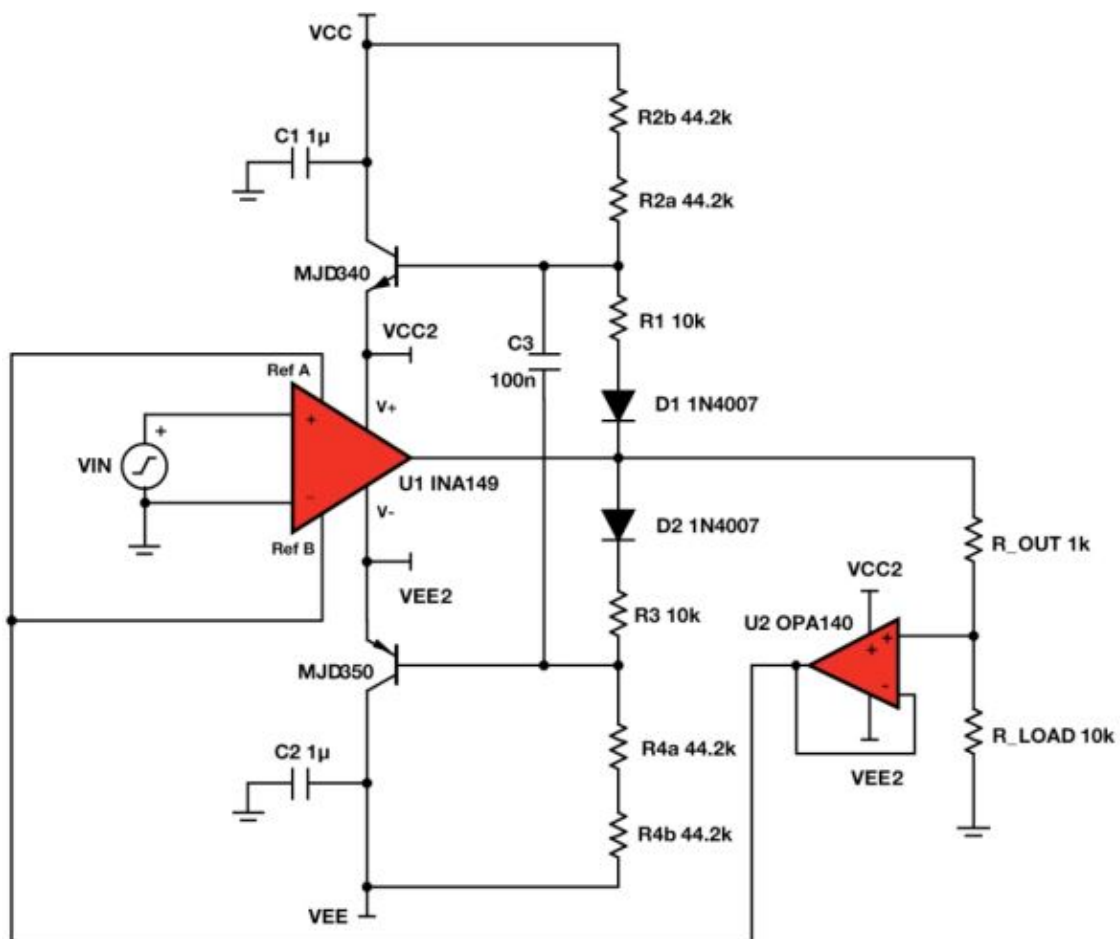
Nesse circuito, o amplificador operacional regula a tensão nos resistores de escala R_8 , R_9 e R_{14} . Essa tensão é determinada pela corrente que passa pelos transistores Q2 e

Q3, a qual é fornecida na saída. Um LED, D2, é usado para indicar saturação na saída. Se o LED for iluminado, há *compliance* suficiente para o circuito fornecer a corrente na carga, servindo como indicador.

Modificações na VCCS permitem aumentar a *compliance* das mesmas mesmo utilizando amplificadores operacionais de baixa tensão. Uma dessas é chamada de *Bootstrapping* e consiste em criar uma fonte de alimentação adaptativa em que as tensões positivas e negativas que alimentam o amplificador operacional são dependentes do valor instantâneo do sinal de saída. Isso permite a amplificadores convencionais atingirem tensões de saída maiores do que as convencionalmente impostas pelo seu limite de tensão de alimentação (ANALOG DEVICES, 2018).

Um exemplo de proposta de VCCS com alta *compliance* e precisão é apresentado em Texas Instruments (2013), conforme mostra a Figura 16.

Figura 16 – Exemplo de VCCS com alta *compliance* e precisão.



Fonte - Texas Instruments (2013)

Nesse circuito que combina a *Howland Current Pump* com a técnica de *Bootstrapping*, se torna possível fornecer 10mA de corrente bidirecional para cargas de até 10kΩ com

custo relativamente baixo. Conforme anteriormente mencionado, a VCCS tem relação de tensão-corrente dada pelo resistor R_{out} . Como forma de garantir que a corrente desejada seja fornecida a cargas de alta impedância, a tensão aplicada na base dos transistores NPN e PNP é determinada pela tensão de saída assim como a relação dos resistores R1, R2, R3 e R4, fazendo com que a alimentação dos amplificadores operacionais nunca ultrapasse seu limite ao mesmo tempo que fornece tensões de saída maiores (TEXAS INSTRUMENTS, 2013).

Assim, diversas topologias atendem os principais requisitos para uma fonte de corrente utilizada em microestimulações de culturas neuronais. É preciso avaliar o tipo de microestimulação para condicionar a *compliance*, precisão e resposta em frequência necessárias, assim como é importante levar em conta o custo do projeto e disponibilidade de componentes.

2.4 Estrutura para experimentos de microestimulação

A maioria dos experimentos em neurofisiologia requer muitos componentes experimentais acontecendo em paralelo, sendo necessário estimular o tecido ao mesmo tempo que se faz a aquisição dos sinais elétricos e dados de resposta do tecido. Além disso, é preciso diferentes equipamentos para posicionamento dos eletrodos e redução de ruídos.

Em uma estrutura básica para estimulação por conjuntos de microeletrodos, neurônios são colocados em soluções com microeletrodos. Durante um certo período, essas culturas formam redes de neurônios completos (HALES; ROLSTON; POTTER, 2010). A partir disso, a atividade das redes pode ser manipulada através de sequências de estimulação elétrica geradas pelo equipamento desenvolvido.

Para aquisição dos sinais elétricos do tecido, é comum a utilização de sinais de *trigger*, que servem para ativar o recebimento de dados em determinados momentos específicos da estimulação. O próprio gerador de sinais de tensão pode gerar os sinais de *trigger*, podendo ser utilizado o registro do sinal de estímulo para comparar com as respostas do tecido. Os dados de resposta podem ser obtidos a partir de osciloscópio ou um sistema de aquisição de dados com conversores analógico-digitais tal como apresentado por Scientifica Ltd (2016).

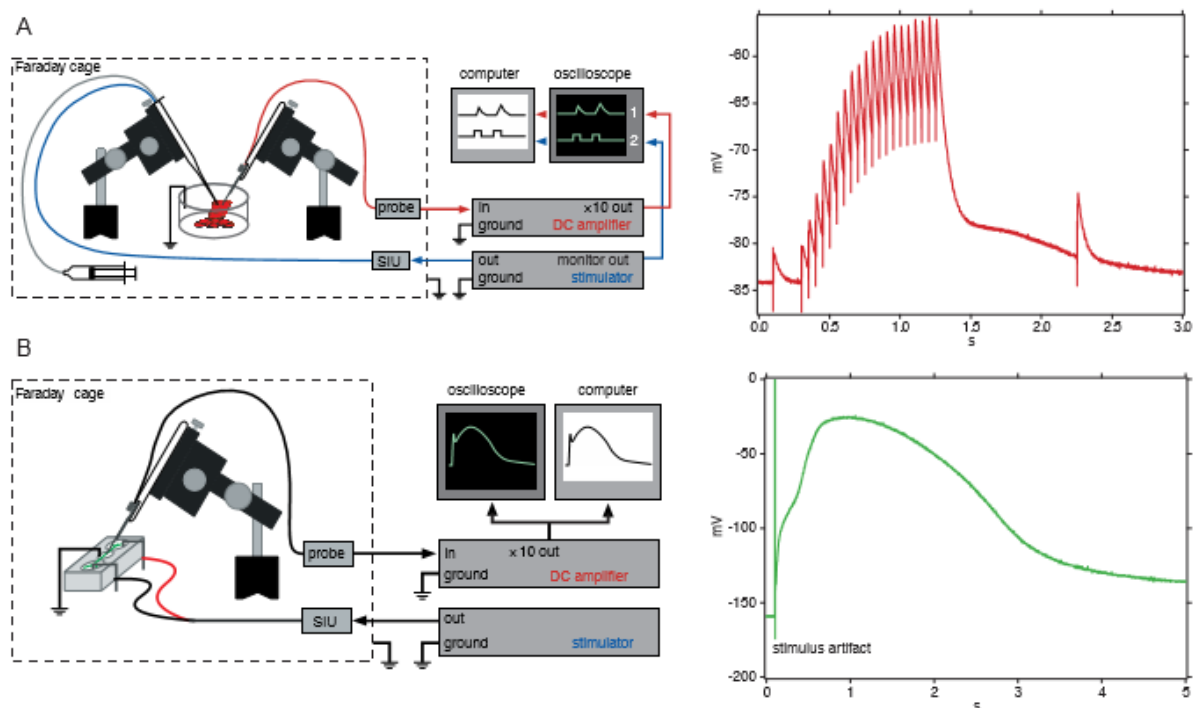
Segundo Giovanaz (2018), os materiais necessários para esse tipo de estimulação são:

- Computador e softwares: responsáveis pelo controle dos parâmetros de estimulação e suporte para aquisição de dados
- Estimulador: composto por gerador de estímulos e unidade isoladora de estímulo, responsável por gerar os estímulos de corrente elétrica a serem aplicados no tecido

- Aparelho estereotático: responsável pelo suporte mecânico e posicionamento preciso dos microeletrodos
- Gaiola de Faraday: envolve o equipamento do experimento e o objeto de estudo impedindo a entrada de ruído externo
- Microeletrodos bipolares: necessários para fixação no tecido e transporte das cargas elétricas
- Placa de aquisição de dados ou osciloscópio: usados para registro dos dados de sinais elétricos

Um exemplo de montagem de um sistema para esse tipo de experimento é apresentado na Figura 17, onde o tecido é aterrado e sofre estimulação via SIU a partir de 2 microeletrodos. Uma sonda é utilizada para adquirir os sinais de tensão na superfície do tecido. Todos os dispositivos envoltos pela Gaiola de Faraday são isolados eletricamente dos demais. Em 17.A, o sinal do estimulador é usado como comparativo para os dados adquiridos na superfície do tecido. Em 17.B, os dados são adquiridos paralelamente pelo osciloscópio e computador.

Figura 17 – Exemplos de montagens de sistema para microestimulação.



Fonte - Land et al. (2004)

Por fim, os equipamentos de estimulação de tecidos profissionais devem seguir normas como a IEC61010-1, da [International Electrotechnical Commission](#) (2001), que

determina padrões de segurança internacionais para equipamentos elétricos de uso em laboratório, e EN 61326-1, EN 61326-2 e EN 61326-3, que ditam padrões de emissão e imunidade para equipamentos de laboratório.

3 Metodologia

Esse capítulo apresenta a metodologia utilizada para desenvolvimento, experimentos e documentação do projeto.

3.1 Desenvolvimento do projeto

O projeto teve seu escopo, objetivos e justificativas definidas a partir de discussões com pesquisadores da área de neurociência da UFRGS relacionados ao Departamento de Bioquímica e ao Instituto de Física. As discussões serviram também para levantamento das especificações de projeto. O sistema foi desenvolvido considerando esses requisitos e buscando referenciais teóricos e práticos relacionados à área de neurofisiologia e aos equipamentos utilizados em laboratório.

3.2 Experimentos de caracterização do sistema

O sistema deve ser caracterizado a partir de suas propriedades elétricas, como forma de onda da saída, polaridade de saída, faixa de variação de corrente de saída, resolução de amplitude de corrente, resolução de corrente de saída, *compliance*, *slew-rate* e resolução temporal dos pulsos. Para isso, são necessários os seguintes equipamentos:

- Osciloscópio: observação das formas de onda e medição de grandezas elétricas e ao longo do tempo
- Placa de aquisição de dados: registro de dados de sinais elétricos em função do tempo
- Computador e software: análise dos dados obtidos a partir de placas de aquisição de sinais e osciloscópios e simulação de circuitos elétricos
- Resistores de precisão 1%: medição de corrente elétrica de saída do dispositivo e testes de *compliance*
- Multímetro: medição de grandezas elétricas

3.3 Experimentos de testes de aplicação do sistema

Uma vez que se tenha desenvolvido e caracterizado eletricamente o sistema, o mesmo deve ser submetido a experimentos aplicados na área de neurofisiologia a fim de testar sua funcionalidade. Assim, experimentos típicos para potenciação de células de

tecido neuronal devem ser realizados, coletando dados de resposta do tecido objeto de estudo. O objetivo é analisar os resultados e concluir se o equipamento consegue induzir tecidos a LTP, necessária para que se possa estudar diferentes fenômenos neurofisiológicos em laboratório.

Os equipamentos necessários para esses experimentos e os protocolos experimentais são apresentados por [Giovanaz \(2018\)](#). Os principais equipamentos necessários são:

- Computador e software: responsáveis pelo controle dos parâmetros de estimulação e suporte para aquisição de dados
- Estimulador: composto por gerador de estímulos e VCCS, é responsável por gerar os estímulos de corrente elétrica a serem aplicados no tecido
- Aparelho estereotáxico: responsável pelo suporte mecânico e posicionamento preciso dos microeletrodos
- Gaiola de Faraday: envolve o equipamento do experimento e o objeto de estudo impedindo a entrada de ruído externo
- Microeletrodos bipolares: necessários para fixação no tecido e transporte das cargas elétricas
- Placa de aquisição de dados ou osciloscópio: usados para registro dos dados de sinais elétricos

3.4 Documentação e acesso à tecnologia livre

O projeto é elaborado a partir dos princípios de tecnologia livre e hiperobjetos científicos. Assim, em todo o processo de desenvolvimento do mesmo é buscado utilizar ferramentas livres e transmitir o conhecimento abertamente. O interesse reside em ter acesso a informações como modelos teóricos, instruções de uso/manutenção, aplicações, códigos e processos de fabricação de forma sistemática, transparente e aberta, como apresenta [Pezzi \(2015\)](#).

Diante disso, todos os códigos de software presentes no projeto são livremente divulgados e documentados, assim como as ferramentas utilizadas no desenvolvimento dos mesmos. Essa metodologia é presente também na elaboração do hardware, onde se pode ter acesso aos diagramas esquemáticos, placas de circuito impresso e explicação do funcionamento do sistema. Assim, toda documentação de projeto pode ser acessada através de uma página da Web e está licenciada com a Licença CC BY-SA: Creative Commons - Atribuição-CompartilhaIgual 4.0 Internacional, a qual permite livre distribuição do material e adaptação do mesmo, desde que seguindo os termos de atribuição de crédito

e distribuição das alterações de forma livre. A página GIT para acesso a todo projeto é <<https://git.cta.if.ufrgs.br/luissestradioto/neuroest>> .

4 Desenvolvimento do Projeto

Como anteriormente mencionado na metodologia, as especificações de projeto foram definidas a partir de obtenção de informações com pesquisadores da área e são apresentadas abaixo:

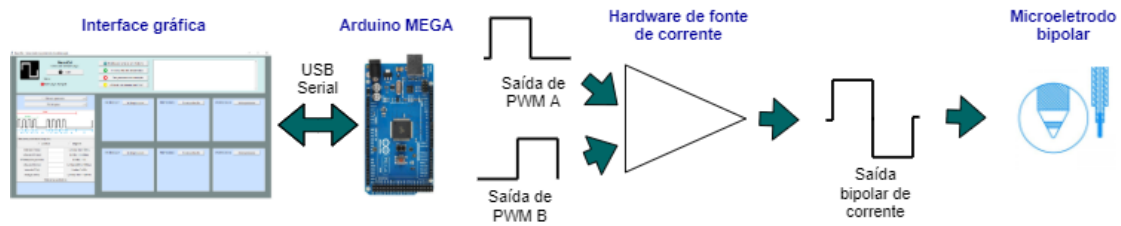
- Estimulador deve gerar diferentes protocolos, dentre eles: Protocolo Basal, Protocolo TBS, Protocolo HFS e Protocolo LFS
- Possuir ampla faixa de variação de parâmetros para cada protocolo gerado
- Gerar pulsos de corrente unipolares positivos, unipolares negativos ou bipolares
- Suprir/drenar pulsos de corrente com amplitude entre cerca de 1uA e 1mA com ajuste fino
- Possuir no mínimo dois canais de estimulação
- Possuir interface com capacidade de interromper e avançar protocolos manualmente, sequenciando até 6 protocolos
- Possuir uma terceira saída em cada canal para registro externo das estimulações

A partir disso, as escolhas técnicas foram tomadas e o projeto pode ser dividido em diferentes partes. A interface gráfica (*Graphical User Interface*, GUI) é programada em linguagem Python, que possui modelo de desenvolvimento comunitário e aberto. Ela utiliza recursos gráficos da biblioteca Tkinter e garante a definição dos protocolos de estímulo e parâmetros desejados. Utiliza comunicação serial com o microcontrolador para envio de comandos e informações.

Para geração de protocolos, foi escolhido utilizar um Arduino MEGA, plataforma de software e hardware abertos com microcontrolador ATmega 2560, permitindo que os estímulos sejam controlados a partir de saídas de PWM do dispositivo. Esse modelo de Arduino garante acesso a diversos timers, saídas de PWM e recursos necessários para atender os requisitos de projeto, possui custo acessível e é facilmente encontrado no Brasil.

Por fim, o hardware que converte os pulsos de tensão do Arduino em pulsos de corrente conta com corrente de saída ajustável, capacidade de fornecer corrente bipolar e boa resposta em frequência. Assim, a Figura 18 mostra a divisão por partes do projeto.

Figura 18 – Partes do projeto.



Fonte - Autor.

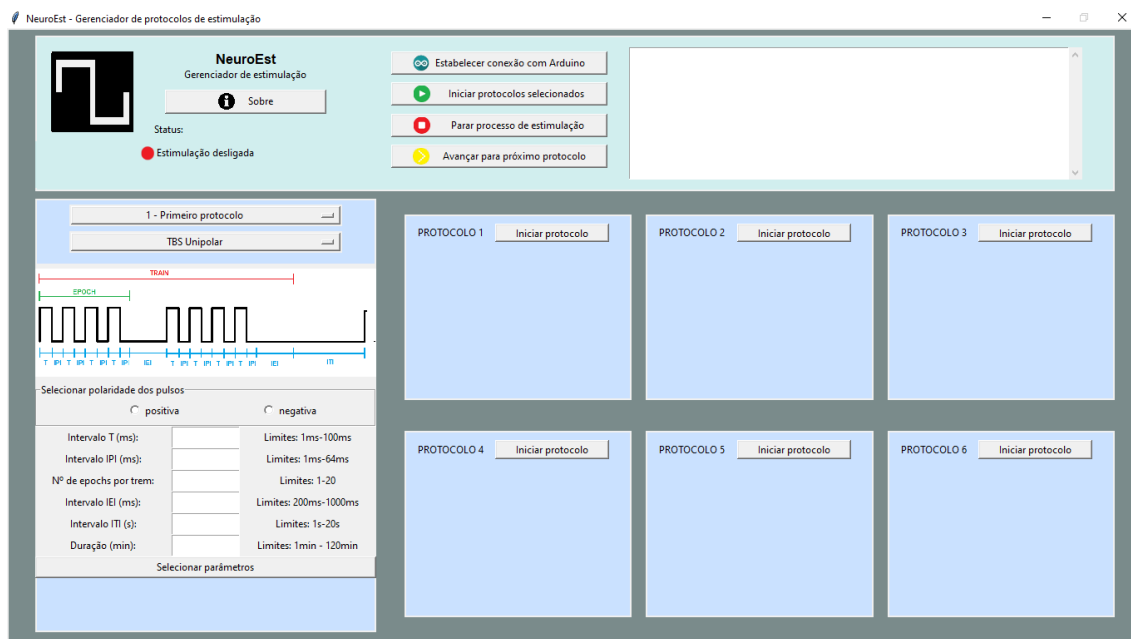
O projeto consiste em utilizar uma GUI para permitir ao usuário escolher as opções de estimulação desejadas. Essa GUI envia informações ao Arduino, que interpreta esses dados e assim gera os estímulos necessários na forma de sinais de tensão. Como é desejado que se possa estimular o tecido com corrente controlada e bipolar, uma VCCS é utilizada para converter os pulsos de tensão das saídas do Arduino em pulsos unipolares ou bipolares de corrente. Esses estímulos de corrente elétrica são transmitidos ao tecido através de microeletrodos.

4.1 Interface gráfica

O software para interface gráfica permite ao usuário definir os protocolos desejados para estimulação assim como seus parâmetros e fazer com que os mesmos sejam reproduzidos pelo microcontrolador através da comunicação serial via USB entre software de interface gráfica e o software do Arduino.

Para tanto, utiliza-se essa GUI para organização das variáveis de definição de protocolo a serem enviadas ao microcontrolador. A interface permite a seleção sequencial de até seis protocolos de estimulação e seus respectivos parâmetros assim como a conexão e envio desses parâmetros ao Arduino através da comunicação serial. O envio das variáveis desejadas é feito através de um protocolo de comunicação contendo as informações das variáveis e seus valores escolhidos. Além disso, a GUI permite a interrupção da estimulação e o avanço de protocolos de estímulo. A Figura 19 mostra o modelo de GUI desenvolvido.

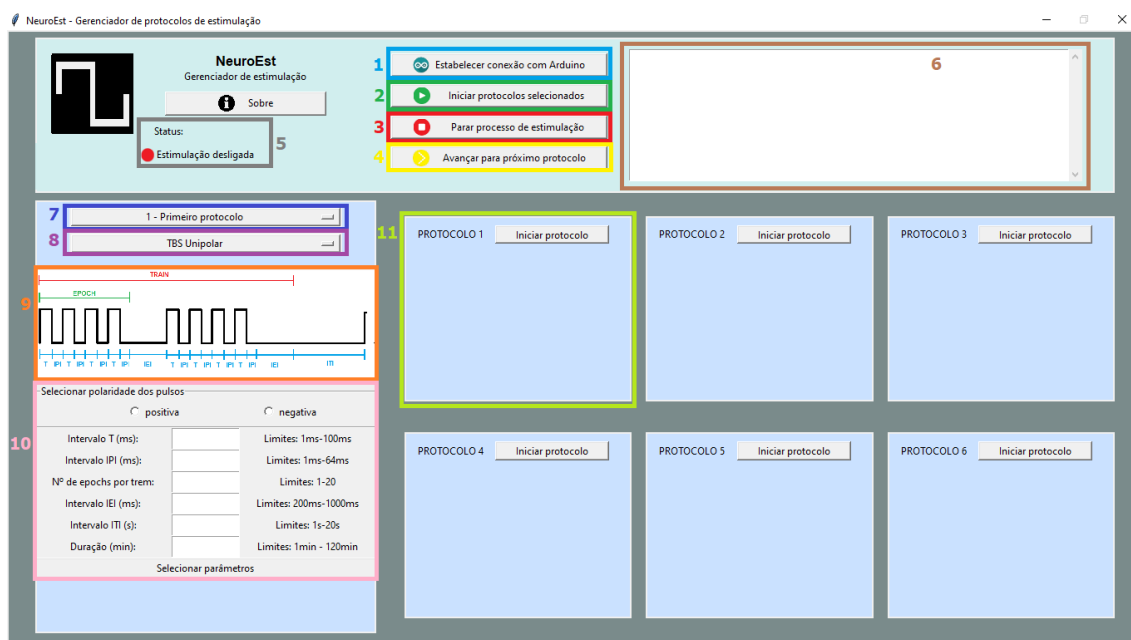
Figura 19 – Interface gráfica desenvolvida.



Fonte - Autor.

Conforme se observa na Figura 19, a interface conta com diversos recursos para definição dos protocolos. A Figura 20 mostra os diferentes recursos e finalidades do software com marcações coloridas.

Figura 20 – Interface gráfica com marcações de recursos e funcionalidades.



Fonte - Autor.

As funcionalidades de acordo com a numeração apresentada na Figura 20 são apresentadas abaixo:

1. **Botão para estabelecer conexão com o microcontrolador Arduino.** Permite a detecção automática da placa de Arduino MEGA caso a mesma esteja conectada ao computador e carregada com o devido software. Caso tudo ocorra corretamente, uma mensagem será mostrada no log (item 6).
2. **Botão para iniciar protocolos selecionados.** Após selecionar os três protocolos desejados para estimulação, esse botão permitirá enviar os dados de protocolos ao Arduino e iniciar o processo de estimulação.
3. **Botão para parar processo de estimulação.** Durante o andamento de uma estimulação, é possível interromper a mesma através desse botão. Será necessário iniciar uma nova estimulação caso desejado.
4. **Botão para avançar para próximo protocolo.** Durante o andamento de uma estimulação, esse botão permite pular o protocolo atual, avançando imediatamente para o início do próximo protocolo selecionado. Caso seja avançado o último dos seis protocolos, a estimulação é finalizada.
5. **Indicador de status de estimulação.** Indica se uma estimulação está ativa ou não. Caso estiver, indica o tempo decorrido de estimulação, o número da estimulação (de 1 a 6), o tipo de estimulação e sua duração total.
6. **Log de ações.** Registra as ações do usuário e indica sucesso ou falha nas suas interações. Pode indicar falhas de conexão, início da estimulação, armazenamento de parâmetros, entre outros.
7. **Opções de número de protocolo.** Permite escolher entre qual dos 6 protocolos sequenciais será alterado.
8. **Opções de tipo de protocolo.** Permite escolher o tipo de protocolo a ser utilizado para o número de protocolo selecionado.
9. **Visualização do protocolo selecionado.** Exibe a estrutura temporal do protocolo selecionado no item 7. Facilita o entendimento da estrutura e das variáveis do protocolo que serão selecionadas no item 10.
10. **Entradas para parâmetros do protocolo.** As entradas recebem os valores digitados pelo usuário para os parâmetros desejados relacionados ao protocolo selecionado. Aceitam somente valores numéricos. As variáveis de entrada dependem do tipo de protocolo selecionado. Possui um botão de selecionar parâmetros, que faz com que os dados do protocolo em questão sejam armazenados. Só a partir desse armazenamento

dos dados de cada um dos seis protocolos é que se pode iniciar a estimulação através do item 2.

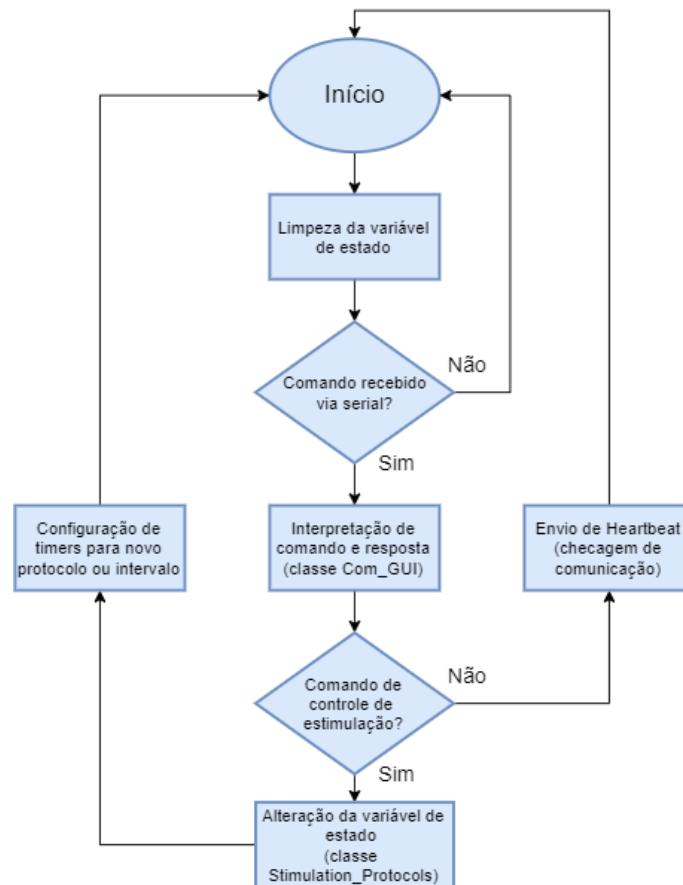
11. **Informações de protocolo selecionadas.** Exibem as informações definidas para os 6 protocolos sequenciais, facilitando a visualização da sequência de estimulação pelo usuário. Também possui um botão que permite iniciar imediatamente o protocolo em questão, permitindo que o usuário retorne a um protocolo já terminado ou avance para qualquer número de protocolo por ele definido.

Todo controle de sequência e tempo de estimulação assim como o armazenamento das variáveis de cada um dos seis protocolos é feito pela GUI. Os comandos são enviados ao Arduino serialmente e identificados por 2 bytes que antecedem a informação a ser enviada.

4.2 Software para Arduino

O software de Arduino serve para conexão serial com o computador (envio de dados para software de interface gráfica) e geração dos protocolos de estímulo. É compatível com Arduino MEGA 2560 R3 e utiliza diferentes saídas de PWM para geração dos protocolos. Boa parte da programação se dá em nível de registradores do ATmega2560 em linguagem C/C++ orientada a objeto. A Figura 21 mostra um fluxograma de funcionamento do software.

Figura 21 – Fluxograma de funcionamento do software de Arduino.

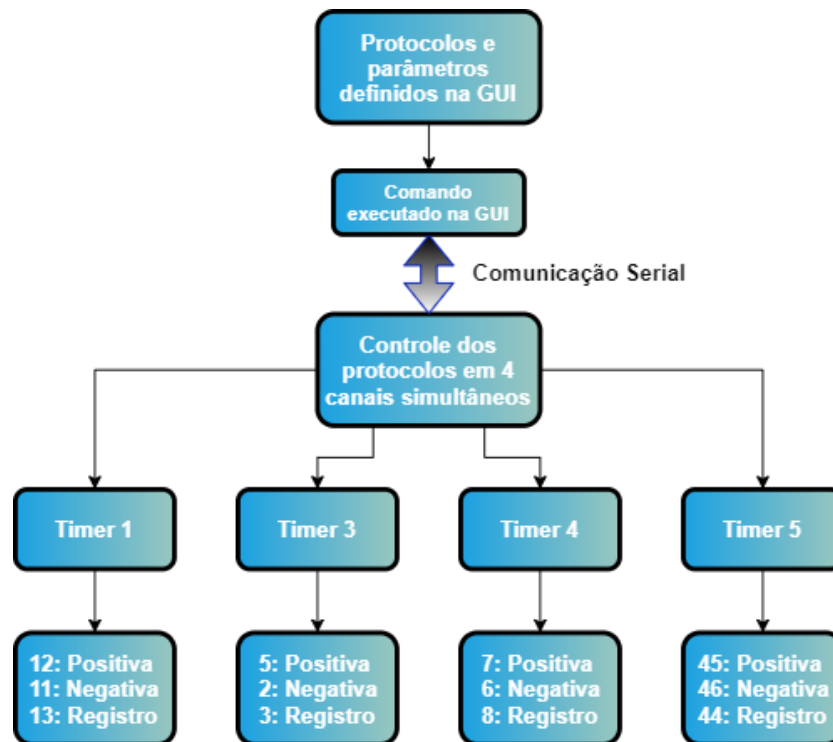


Fonte - Autor.

A classe "*Com-GUI*" é relacionada a comunicação com o software de GUI. Ela é responsável por receber os bytes de informação via comunicação serial e enviar confirmação dos recebimentos de informação para GUI. Já a classe "*StimulationProtocols*" é relacionada a configuração dos timers e das saídas de PWM do ATmega2560 para geração dos protocolos desejados.

A Figura 22 mostra um diagrama de blocos que explica a estrutura de entradas e saídas (IOs) utilizadas pelo software do Arduino. As saídas utilizadas estão relacionadas as saídas de PWM A, B e C do Atmega2560 (ATMEL CORPORATION, 2014).

Figura 22 – Estrutura de entradas e saídas do software.



Fonte - Autor.

Dessa forma, os protocolos e parâmetros definidos pelo usuário são enviados ao Arduino, que interpreta essas definições e gera os protocolos desejados a partir de saídas de PWM controladas pelos seus timers. Os protocolos são gerados simultaneamente nos quatro canais definidos pelos respectivos timers.

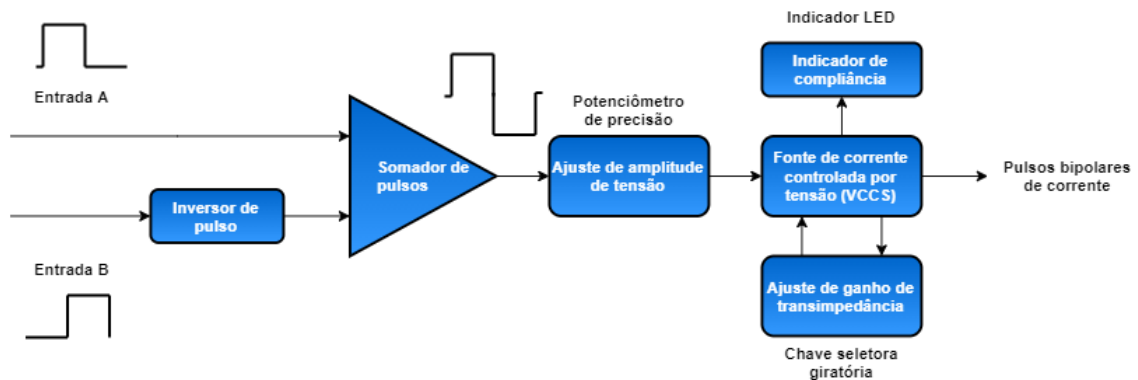
Cada canal possui 3 saídas de PWM, uma chamada de não-inversora para gerar os pulsos positivos de corrente no hardware de fonte de corrente, uma chamada de inversora e responsável por gerar os pulsos negativos de corrente e, por fim, uma saída de registro, que pode ser utilizada por um sistema de registro de estímulos que salva os sinais de tensão para posterior análise no trabalho científico. As saídas de PWM possuem tensão de saída de 0 ou 5V e corrente máxima de saída de 40mA, de acordo com as limitações do Arduino MEGA 2560 R3.

4.3 Hardware gerador de pulsos de corrente

O hardware é um sistema que converte os pulsos de tensão gerados pelo microcontrolador em pulsos de corrente. Para tanto, são necessárias duas entradas de pulsos de tensão invertidas entre si para gerar um sinal bipolar (pulsos positivos e negativos). Enquanto uma entrada tem seu valor alto, em 5V, a outra tem seu valor baixo, em 0V. Assim, o sistema utiliza um circuito que transforma pulsos positivos de tensão em pulsos

bipolares de corrente. Dessa forma, ela converte sinais de tensão em sinais de corrente, podendo variar a proporção de ganho de transimpedância (relação de tensão de entrada por corrente de saída). Uma vez que sejam gerados os pulsos de corrente, pode-se realizar a aplicação em tecidos neuronais através de microeletrodos bipolares. O diagrama de blocos desse sistema é apresentado na Figura 23.

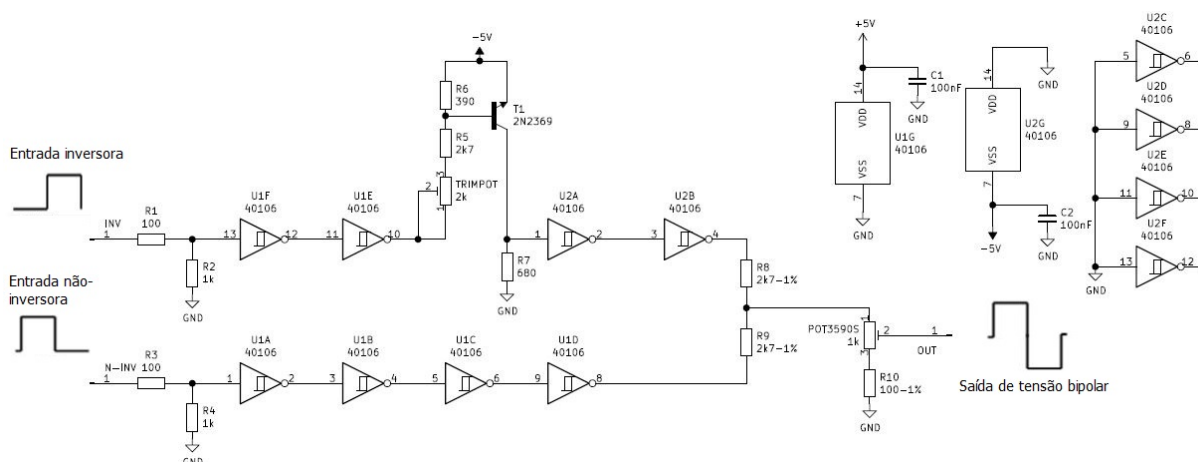
Figura 23 – Diagrama de blocos do hardware gerador de pulsos de corrente.



Fonte - Autor.

Assim, são necessários três blocos principais para descrição do circuito eletrônico que compõe o sistema. O primeiro é o circuito de ajuste de pulsos, responsável por receber os sinais de tensão de +5V do microcontrolador e ajustá-los para tensão de +5V e -5V. A Figura 24 mostra o diagrama esquemático do circuito.

Figura 24 – Diagrama esquemático do circuito de ajuste de pulsos.



Fonte - Autor.

O circuito recebe dois sinais de tensão de PWM de +5V do microcontrolador de acordo com os protocolos de estimulação desejados pelo usuário. Um dos sinais (parte

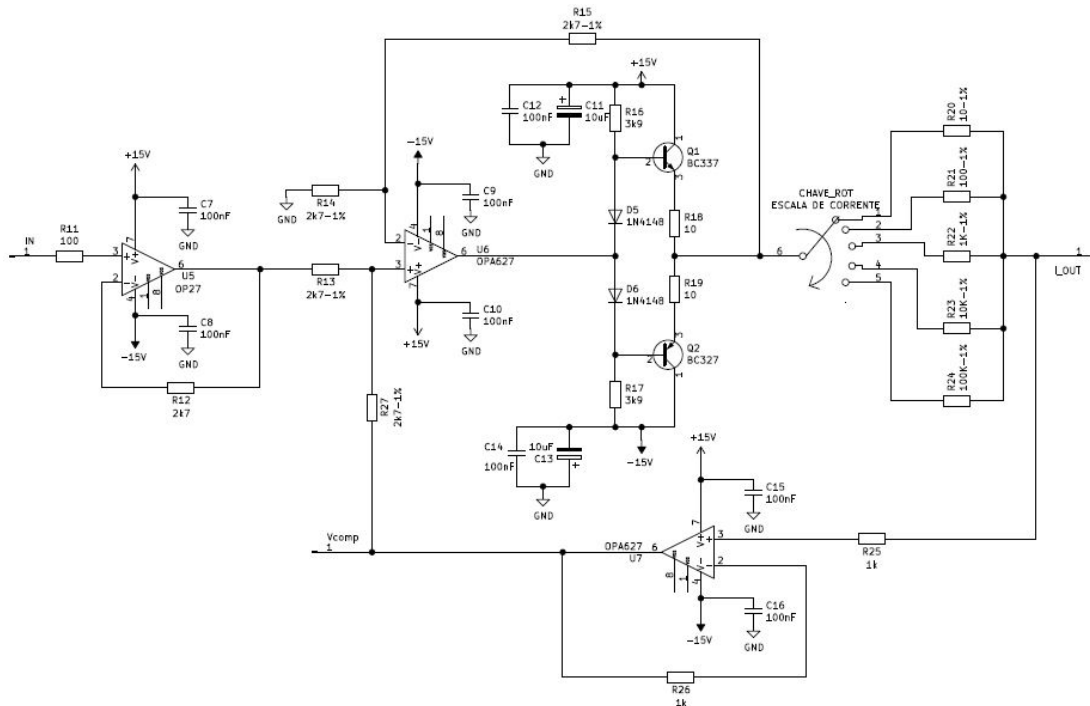
inferior) passa por inversores do circuito integrado 40106 (inversores CMOS com histerese). Assim, o sinal resultante é o mesmo da entrada, já que passa por 4 inversores.

O outro sinal (parte superior) também passa por 4 inversores, mas tem sua tensão transformada de +5V para -5V no meio do processo, permitindo que a saída do último inversor seja de -5V. Esse processo é necessário tendo em vista que o microcontrolador não pode gerar tensões negativas. Os inversores são utilizados pois garantem uma saída com tempo de transição de sinal alto/baixo ou baixo/alto de cerca de 100ns e também permitem uma simetria na saída do sinal para tensão positiva e negativa (TEXAS INSTRUMENTS, 2017). Isso assegura pulsos bipolares de tensão com baixo tempo de transição entre -5V e +5V.

Após esse processo, os dois sinais são somados, resultando em um sinal bipolar de tensão. Esse sinal somado é então passado por um divisor de tensão através de um potenciômetro de 10 voltas de modelo 3590S que permite um ajuste fino da tensão de saída do circuito entre 100mV e 1V, o que se reflete posteriormente em um ajuste fino da corrente de saída de acordo com a escala selecionada.

A segunda parte do sistema é o circuito responsável por converter os sinais de tensão bipolares em sinais de corrente bipolares, tendo corrente de saída ajustável pelo usuário. Requer ajuste fino para aplicação em pesquisas científicas por meio da utilização de microeletrodos. Além disso, requer boa resposta em frequência para não alterar o formato dos pulsos de entrada. O circuito se baseia na topologia de VCCS para realizar essa conversão de tensão em corrente. Esse circuito é basicamente uma *Howland Current Pump* com buffer e que possui um buffer de corrente bipolar com transistores na saída para alcançar correntes bipolares de maior amplitude. A Figura 25 ilustra o diagrama esquemático desse circuito.

Figura 25 – Diagrama esquemático do circuito de VCCS.



Fonte - Autor.

Conforme se observa na Figura 25, primeiramente o sinal bipolar de tensão passa por um buffer que consiste em um OP27, que é um amplificador operacional de baixo ruído, alta velocidade e alta precisão (ANALOG DEVICES, 2015). Esse buffer é necessário para garantir estabilidade na tensão de entrada da *Howland Current Pump*. Os resistores utilizados no buffer são recomendados para aplicações com ganho unitário.

Após esse processo, o sinal de tensão é então aplicado na *Howland Current Pump* composta por dois OPA627 com resistores de precisão para manter alta rejeição de modo-comum do sistema. Note que a saída do OPA627 superior, que é o operacional responsável pela saída de corrente do sistema, está ligada a um buffer de corrente composto por transistores bipolares.

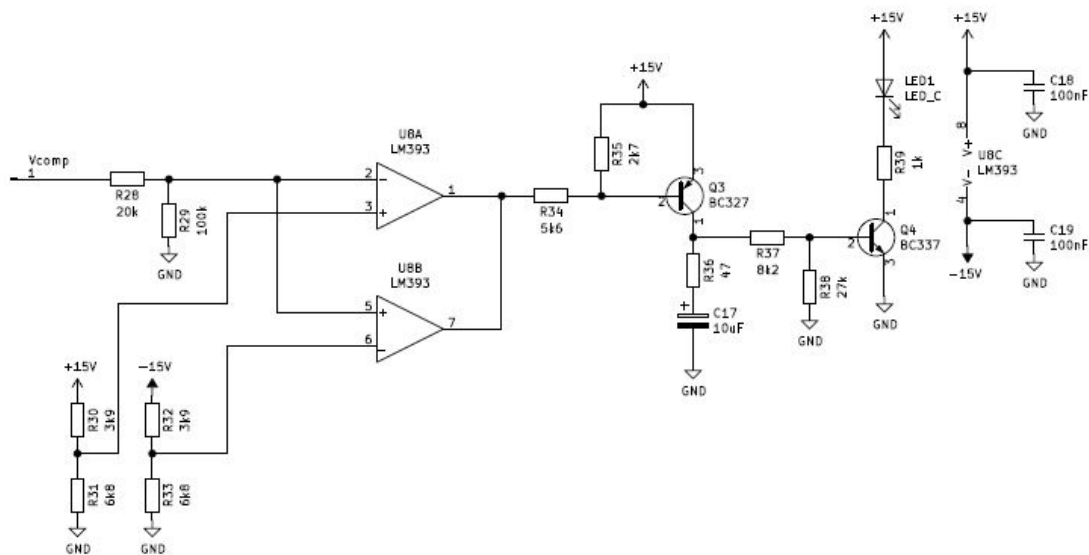
Esse buffer de corrente deve ser equilibrado para manter simetria dos pulsos de corrente e é essencial para garantir correntes de saída de até 100mA para o sistema, visto que o OPA627 tem corrente de saída máxima de cerca de 45mA (TEXAS INSTRUMENTS, 2015). Após o buffer de corrente, o sinal passa por uma chave seletora em que o usuário pode ajustar a escala de corrente de saída do sistema através da variação do resistor que dita o ganho de transimpedância do sistema. Esses resistores devem ter boa precisão para melhor precisão da escala e ajuste de corrente. Por fim, o sinal é realimentado utilizando outro OPA627 que garante a estabilidade da corrente de saída do sistema.

Portanto, é possível ao usuário ajustar a corrente elétrica de saída através de duas

interfaces de ajuste: uma chave seletora presente na fonte de corrente altera a escala da corrente de saída, variando entre as opções de 1uA-11uA, 10uA-110uA, 100uA-1,1mA, 1mA-11mA e 10mA-110mA. Além disso, um potenciômetro de 10 voltas presente no circuito de ajuste de pulsos permite um ajuste fino da corrente de saída de acordo com a escala escolhida.

Por fim, a terceira parte do sistema é o circuito indicador de *compliance*. Esse circuito é responsável por indicar se o limite de *compliance* da fonte de corrente foi atingido. A *compliance* da fonte de corrente é a máxima variação de tensão que a fonte produz para manter a corrente constante na carga. Uma fonte de *compliance* baixa aplicando corrente em uma carga com alta impedância pode não conseguir injetar a corrente desejada, já que os limites de tensão da fonte são atingidos. Assim, como forma de indicar que o limite foi alcançado, esse circuito aciona um LED. A Figura 26 mostra o diagrama esquemático desse circuito.

Figura 26 – Diagrama esquemático do circuito indicador de *compliance*.



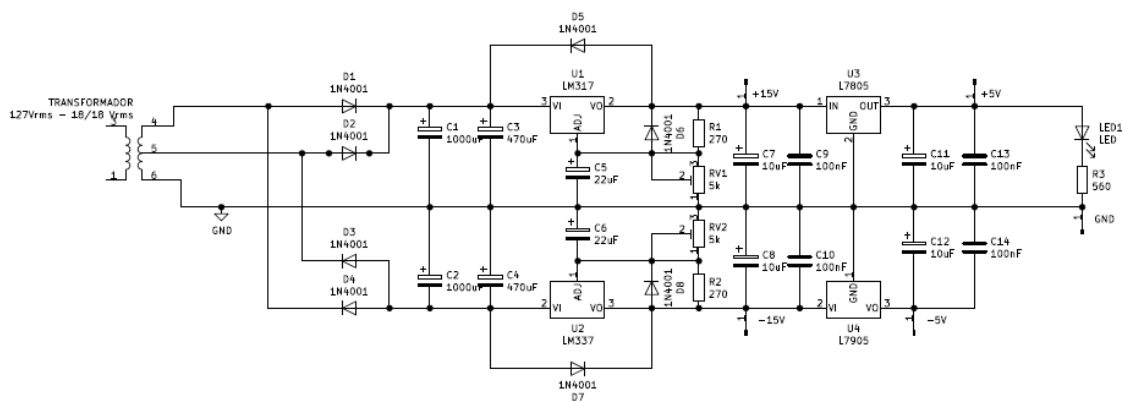
Fonte - Autor.

Conforme se observa, o sinal de tensão da fonte de corrente é levemente reduzido por um divisor de tensão e comparado com referências de tensão de +9,5V e -9,5V, que são as tensões para aviso de limite de *compliance* do sistema (optou-se por uma tensão de aviso menor que a tensão de alimentação do sistema visto que os amplificadores operacionais não são *rail-to-rail*, garantindo que o usuário não opere a estimulação em condições de saturação). O circuito comparador é um integrado LM393. Se o sinal na entrada do comparador for maior que 9,5V em módulo (sinal que corresponde a tensão na carga), o comparador irá gerar uma tensão positiva na saída que irá acionar os transistores BJT, acionando assim o LED indicador.

Isso permite que o usuário saiba quando o limite de *compliance* foi atingido. Quando esse limite é atingido, a corrente fornecida pela carga chega a um valor máximo que permanece inalterado até redução da carga ou da corrente de saída.

Por fim, como forma de alimentar os circuitos com as tensões necessárias de $\pm 15V$ e $\pm 5V$, foi desenvolvida uma fonte de tensão linear utilizando um transformador e reguladores de tensão. Por ser uma fonte com uso de transformador, ela possui isolamento galvânico, permitindo maior segurança e confiabilidade para o processo de estimulação. O diagrama esquemático da fonte pode ser observado na Figura 27.

Figura 27 – Diagrama esquemático da fonte de alimentação linear.

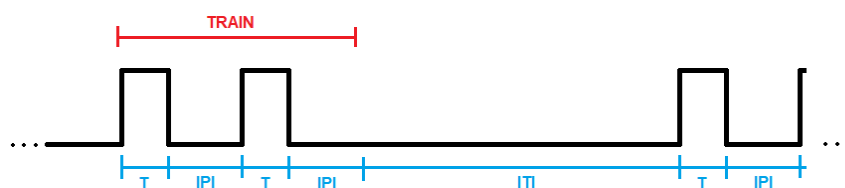


Fonte - Autor.

4.4 Protocolos de estimulação gerados pelo sistema

A partir do sistema descrito anteriormente, é possível gerar diferentes tipos de protocolos de estimulação com variação nos seus parâmetros característicos. Conforme previamente mencionado, os protocolos possuem diferentes funções durante o processo de estimulação de um tecido neuronal. A partir do sequenciamento de até seis protocolos, torna-se possível uma grande faixa de estudos científicos nessa área. As Figuras 28, 29, 30, 31 e 32 que definem os protocolos e as faixas de variação dos seus parâmetros são mostrados a seguir:

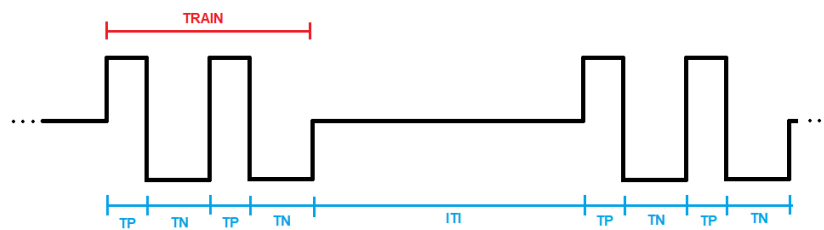
Figura 28 – Protocolo Basal Unipolar.



Fonte - Autor.

- Largura de pulso T: entre $4\mu s$ e $10000\mu s$
- Intervalo entre pulsos IPI: entre $1ms$ e $100ms$
- Intervalo entre trens ITI: entre $1s$ e $60s$
- Duração do protocolo: entre $1min$ e $120min$

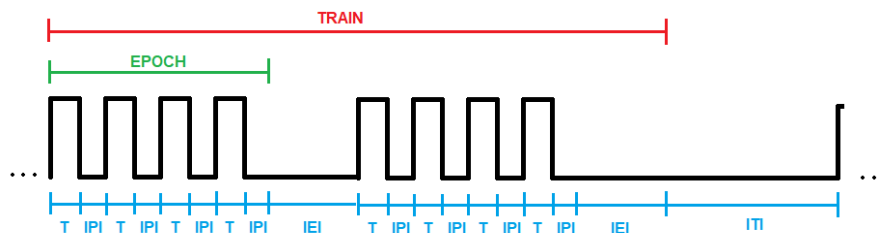
Figura 29 – Protocolo Basal Bipolar.



Fonte - Autor.

- Largura de pulso positivo TP: entre $100\mu s$ e $10000\mu s$
- Largura de pulso negativo TN: entre $100\mu s$ e $10000\mu s$
- Intervalo entre trens ITI: entre $1s$ e $60s$
- Duração do protocolo: entre $1min$ e $120min$

Figura 30 – Protocolo TBS Unipolar.

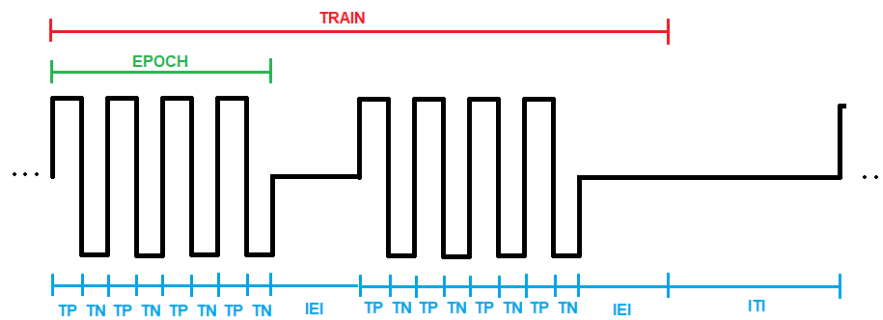


Fonte - Autor.

- Largura de pulso T: entre $10\mu s$ e $10000\mu s$
- Intervalo entre pulsos IPI: entre $1ms$ e $100ms$
- Intervalo entre epochs IEI: entre $50ms$ e $500ms$
- Intervalo entre trens ITI: entre $100ms$ e $1000ms$

- Quantidade de pulsos por epoch: entre 1 e 10 pulsos
- Quantidade de epochs por trem: entre 1 e 10 epochs
- Duração do protocolo: entre 1min e 120min

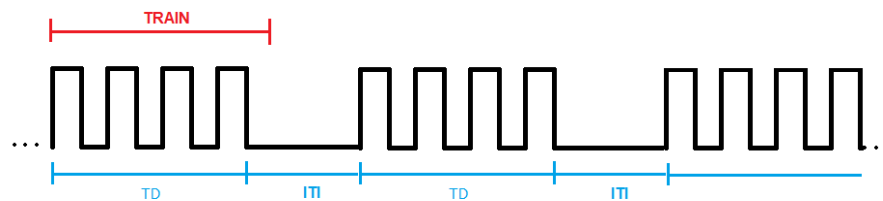
Figura 31 – Protocolo TBS Bipolar.



Fonte - Autor.

- Largura de pulso positivo TP: entre $5\mu s$ e $10000\mu s$
- Largura de pulso negativo TN: entre $5\mu s$ e $10000\mu s$
- Intervalo entre epochs IEI: entre $10ms$ e $300ms$
- Intervalo entre trens ITI: entre $100ms$ e $1000ms$
- Quantidade de pulsos por epoch: entre 1 e 10 pulsos
- Quantidade de epochs por trem: entre 1 e 10 epochs
- Duração do protocolo: entre 1min e 120min

Figura 32 – Protocolos HFS e LFS.



Fonte - Autor.

- Duração do trem de pulsos TD: $1s$ e $20s$

- Frequência dos pulsos de estímulo: entre 4Hz e 200Hz
- Intervalo entre trens ITI: entre 1s e 600s
- Duração do protocolo: entre 1min e 120min

5 Estimativas de custo de projeto

Visto que um dos objetivos de projeto é atingir um custo acessível para fabricação do sistema, é demandado detalhar o custo total do hardware desenvolvido. A Tabela 1 mostra o cálculo de custo de projeto, feito no mês de outubro de 2020. O custo de equipamentos adicionais não foi incluído, como microeletrodos e computador para controle do processo de estimulação.

Tabela 1 – Cálculo de custo de projeto.

Componente	Valor	Quantidade
Arduino MEGA 2560 R3	R\$120,00	1
CD40106BE	R\$2,50	8
OPA627AU	R\$85,00	8
OP27GSZ	R\$5,30	4
LM393	R\$1,50	4
Capacitor Cerâmico 100nF	R\$0,10	48
Capacitor Eletrolítico 1000uF/35V	R\$1,00	4
Capacitor Eletrolítico 470uF/35V	R\$1,00	4
Capacitor Eletrolítico 10uF/25V	R\$0,50	8
Resistor 10ohm 1%	R\$0,10	12
Resistor 47ohm 1%	R\$0,10	52
Resistor 100ohm 1%	R\$0,10	20
Resistor 390ohm 1%	R\$0,10	4
Resistor 1kohm 1%	R\$0,10	24
Resistor 2k7ohm 1%	R\$0,10	36
Resistor 3k9ohm 1%	R\$0,10	16
Resistor 5k6ohm 1%	R\$0,10	4
Resistor 6k8ohm 1%	R\$0,10	8
Resistor 8k2ohm 1%	R\$0,10	4
Resistor 10kohm 1%	R\$0,10	12
Resistor 27kohm 1%	R\$0,10	4
Resistor 100kohm 1%	R\$0,10	8
Trimpot vertical 3296W 2k	R\$1,90	4
Potenciômetro 10 voltas 3590S 1k	R\$20,00	4
Interruptor rotativo 6 posições	R\$12,00	4
Transistor 2N2369	R\$1,50	4
Transistor BC327	R\$0,20	8
Transistor BC337	R\$0,20	8
LED 5mm	R\$0,20	8
Diodo 1N4148	R\$0,05	8
Diodo 1N4001	R\$0,05	16
Resistor 270ohm	R\$0,10	4
Trimpot vertical 3296W 5k	R\$1,90	4
Transformador 127/220V para 18V+18V 500mA	R\$25,00	2
Regulador de tensão LM317	R\$2,00	2
Regulador de tensão LM337	R\$2,00	2
Regulador de tensão L7805	R\$2,00	2
Regulador de tensão L7905	R\$2,00	2
Caixa Patola PB900	R\$50,00	1
Fabricação das PCBs	R\$50,00	1
Total	R\$1366,00	

Fonte: Autor.

Assim, para um sistema estimulador com 4 canais bifásicos simultâneos e controle a partir de interface gráfica, o custo total é de cerca de R\$1400,00. Pesquisando custos de produtos semelhantes no mercado, é possível estabelecer comparações. A Digitimer, fabricante de estimuladores para pesquisa e uso clínico, possui diversos produtos semelhantes ao projeto (<https://www.digitimer.com/>).

A NL800A Current Stimulus Isolator (DIGITIMER, 2007), que é uma SIU que converte pulsos de entrada em saída de corrente unipolar em 1 canal, custa £442,00. Isso equivale a R\$3.224,34 para uma conversão feita no dia 18 de outubro de 2020. Como vantagens, essa unidade é alimentada a bateria, garantindo isolamento do sistema e ajuste de escala de corrente entre $10\mu A$ e $10mA$. Contudo, tem limitações na largura e frequência dos estímulos e só atende estímulos unipolares em canal único. Para uma configuração semelhante a solução proposta no projeto, seriam necessárias 8 dessas SIUs.

Já uma SIU bipolar, como a DS4 (DIGITIMER, 2011), custa £1613,00. Isso equivale a R\$11.766,65 para uma conversão feita no dia 18 de outubro de 2020. Possui isolamento de entrada, *compliance* de $\pm 48V$, suporta pulsos de corrente com largura maior que $2\mu s$ e resposta em frequência de cerca de 5kHz, conta com escalas de corrente de $10\mu A$ e $10mA$ e atende somente um canal de estimulação. Suas características são muito semelhantes a do projeto, embora seja superior em isolamento e *compliance*. Contudo, seriam necessárias quatro DS4 para uma configuração igual a desejada, o que traria um custo muito alto.

Vale lembrar que esses produtos apresentados somente convertem os pulsos de tensão em pulsos de corrente, mas não são geradores de protocolos de estimulação. Um produto gerador dos pulsos de estímulo é o NL301 (DIGITIMER, 1996). Ele conta com ajuste de largura de pulso de $50\mu s$, $150\mu s$ ou $500\mu s$ com saídas de pulso TTL. Permite ajuste de frequência de estímulo para pulsos constantes, mas não possui capacidade de controle de protocolos mais avançados com variações de intervalos entre pulsos. Para isso, é necessário outros módulos vendidos pela empresa. Seu custo é de £394,00. Isso equivale a R\$2.874,18 para um único canal.

Dessa forma, é possível notar que o custo de projeto é muito inferior aos produtos apresentados. Embora os produtos contem com alimentação a bateria e maior *compliance*, não conseguem desempenhar a mesma função do modelo proposto sem que seja necessária a compra de diversos módulos auxiliares para controle dos protocolos de estimulação. Ademais, existe também custos para transporte e importação desses produtos. Isso tornaria o custo total para esse tipo de trabalho científico muito alto, sem contar que esse tipo de produto possui difícil acesso a manutenção. Assim, para as demandas levantadas pelos pesquisadores, o projeto proposto possui melhor custo-benefício.

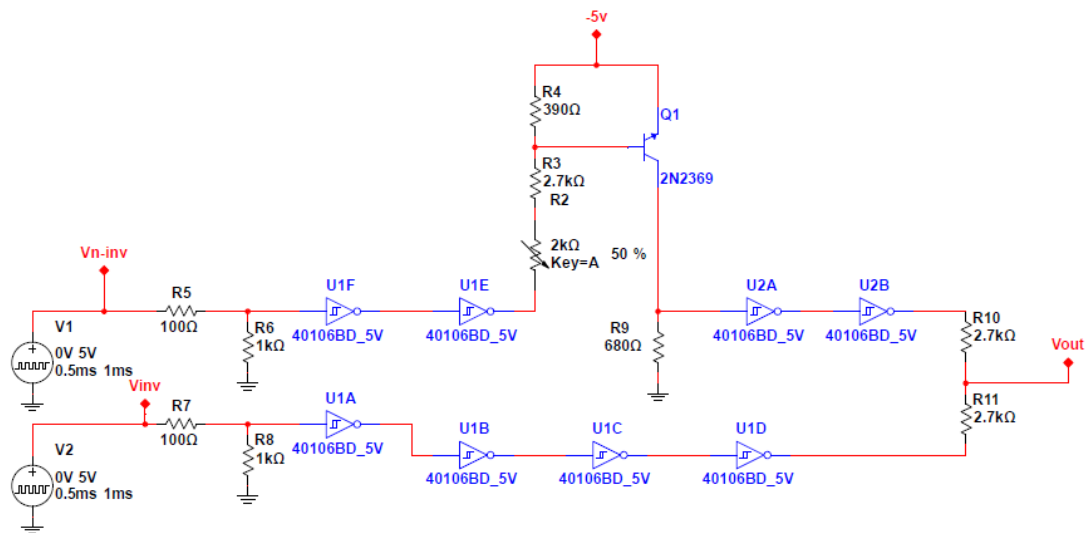
6 Simulações

Como forma de observar o comportamento esperado dos circuitos propostos, foram desenvolvidas simulações elétricas com modelos de componentes iguais aos utilizados no projeto. Visto que não se pode encontrar um software de simulação elétrica de código aberto que suprisse as demandas desses ensaios, foi utilizado o software Multisim, da National Instruments. Os dados foram exportados e os gráficos foram gerados utilizando a biblioteca Pyplot em linguagem Python.

6.1 Simulação do circuito de ajuste de pulsos

Como forma de observar o funcionamento do circuito de ajuste de pulsos, foi realizada uma simulação transiente do mesmo. Dois sinais de tensão defasados entre si, simulando as saídas inversora e não-inversora de PWM do Arduino, foram aplicados na entrada do sistema. Optou-se por utilizar sinais com período de $100\mu S$ para simulação. A Figura 33 mostra o circuito montado no simulador.

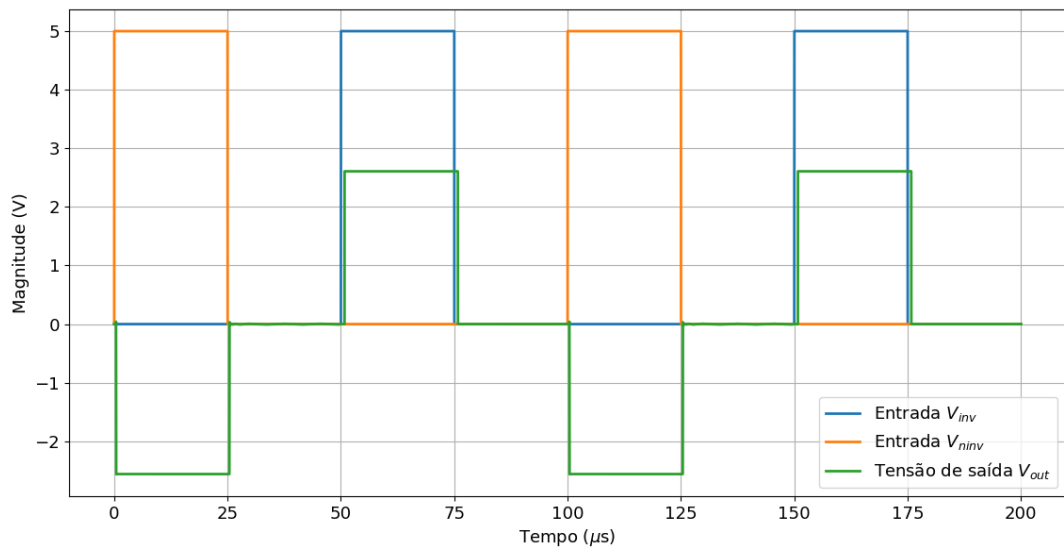
Figura 33 – Diagrama esquemático do circuito de ajuste de pulsos simulado.



Fonte - Autor.

Utilizando a análise transiente, foi possível observar os sinais de entrada e saída do circuito, conforme mostra a Figura 34. O sinal de entrada utilizado nesse caso foi de $25\mu s$.

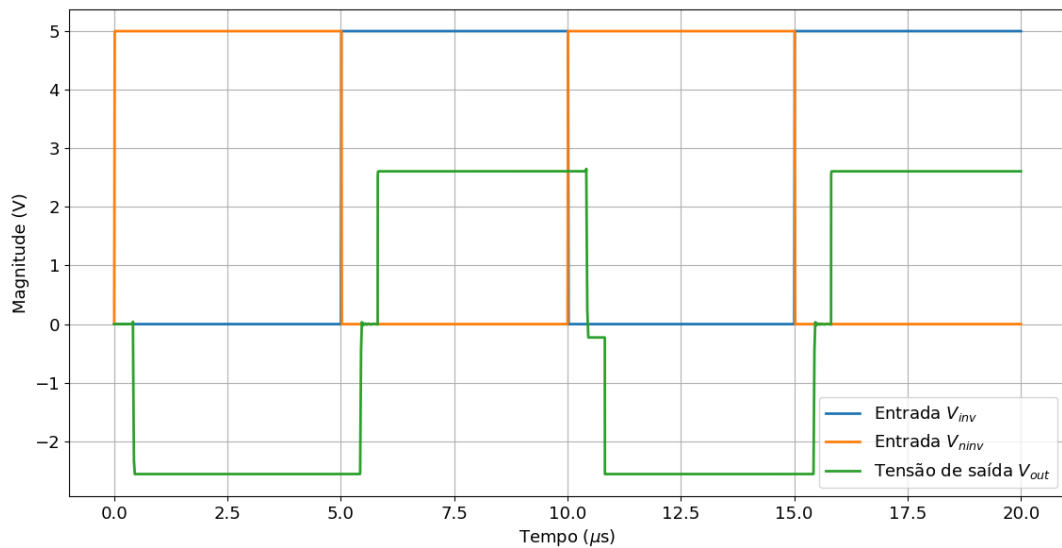
Figura 34 – Resultado da simulação do circuito de ajuste de pulsos.



Fonte - Autor.

É possível observar que as entradas de tensão inversora (V_{inv}) e não-inversora (V_{ninv}) são somadas, sendo que a entrada não-inversora tem sua tensão invertida em sinal. Assim, é possível gerar um pulso de tensão bipolar na saída (V_{out}) a partir de dois pulsos de tensão positivos na entrada.

Para um sinal com pulsos de $5\mu s$ com saída inversora e não-inversora sem período em 0V, o resultado da simulação pode ser observado na Figura 35.

Figura 35 – Simulação do circuito de ajuste de pulsos com $5\mu s$.

Fonte - Autor.

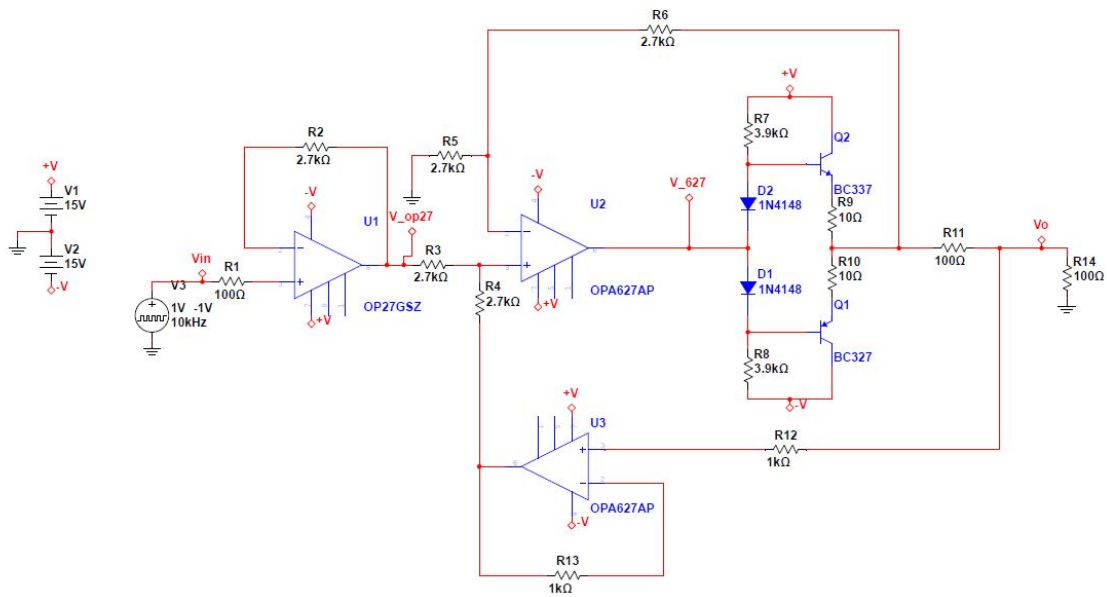
É possível observar um pequeno atraso de propagação dos sinais causado pelo inversor 40106, conforme esperado pelas características apresentadas no Datasheet. Esse atraso não afeta as características da simulação. Além disso, há um curto espaço de tempo em que o sinal de saída está em 0V devido a histerese do inversor. Visto que esse tempo é relativamente curto e há simetria entre sinal positivo e negativo, ele não deve afetar o processo de estimulação dos tecidos.

Como anteriormente mencionado, a magnitude da tensão de saída pode ser ajustada posteriormente utilizando um divisor de tensão com um potenciômetro de 10 volts. Isso garante ajuste fino da tensão que é convertida em corrente pela VCCS. Além disso, há baixa distorção do sinal, mesmo para frequências altas. Assim, pode-se concluir que o circuito tem o comportamento desejado.

6.2 Simulação da VCCS

Foram realizadas análises transientes dos sinais de Tensão de Entrada V_{in} e Corrente de Saída I_L , variando os parâmetros de Frequência do Sinal de Entrada f_{in} , Resistência de Conversão Tensão-Corrente R_{11} e Resistência de Carga R_L . A Figura 36 mostra o diagrama esquemático do circuito simulado no Multisim.

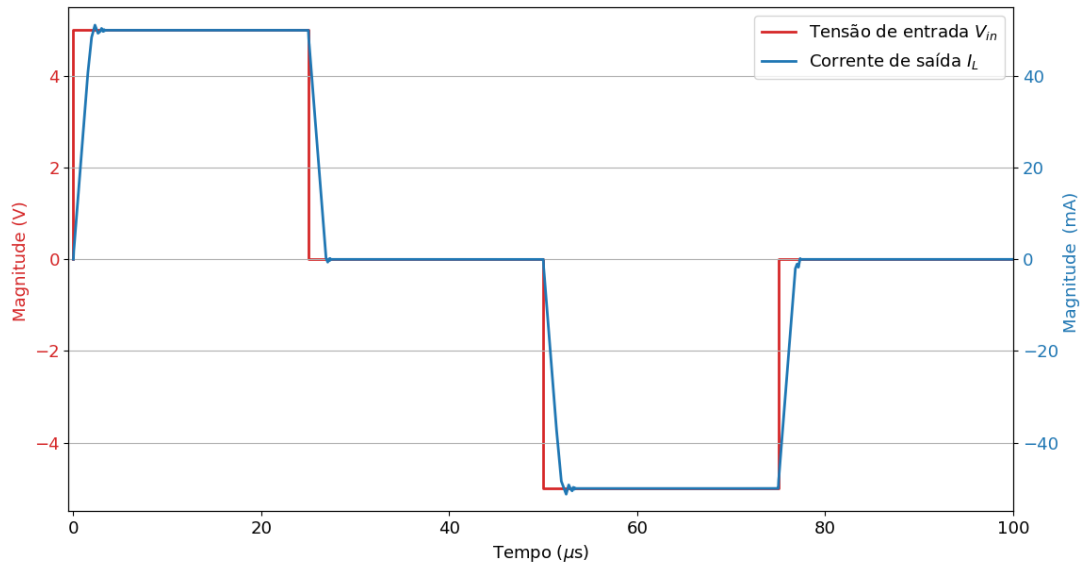
Figura 36 – Diagrama esquemático do circuito de VCCS simulado.



Fonte - Autor.

Visto que a maior parte dos sinais de estimulação estão na faixa de frequência de 1kHz até 50kHz, optou-se por utilizar f_{in} de 10kHz ou 50kHz. Os valores de R_{11} utilizados foram 100Ω, 10kΩ e 100kΩ, cobrindo o caso mais extremo de correntes da ordem de microamperes. Já R_L teve valores de 100Ω e 1000Ω, podendo observar o comportamento da fonte em caso de saturação por limite de *compliance*.

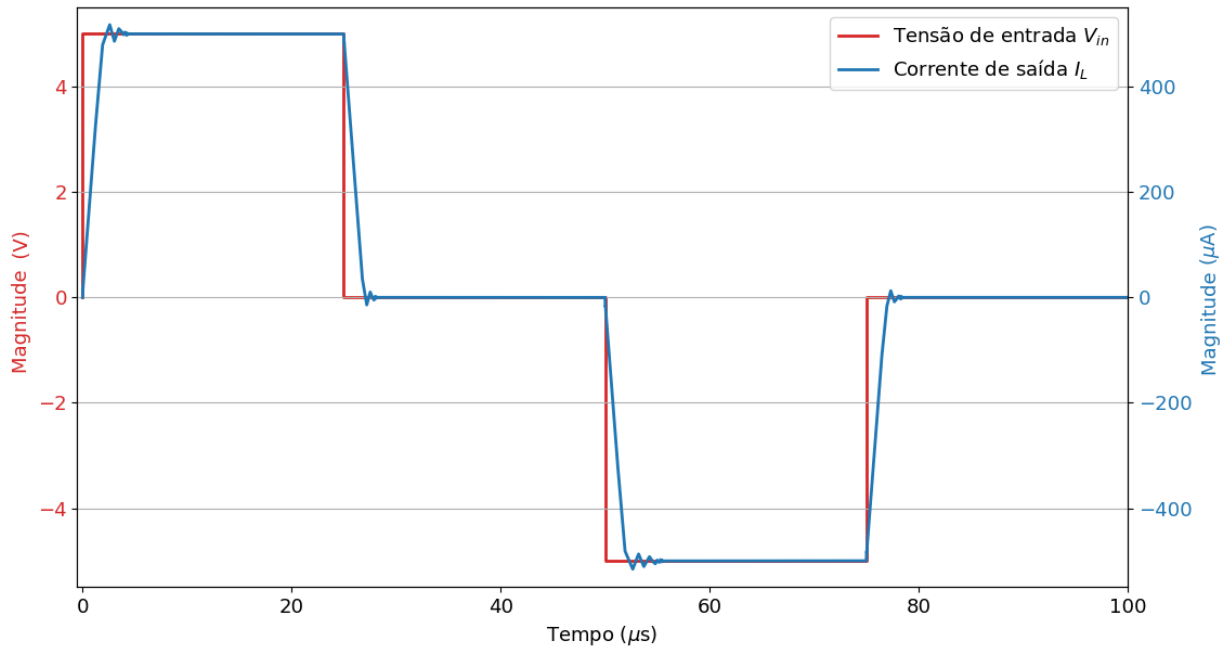
Primeiramente, optou-se por simular um caso mais comum, utilizando $f_{in}=10\text{kHz}$, $R_L=100\Omega$, $R_{11}=100\Omega$ e $V_{in} = \pm 5V$. O resultado dessa simulação transiente pode ser observado na Figura 37.

Figura 37 – Simulação com $f_{in}=10\text{kHz}$, $R_L=100\Omega$, $R_{11}=100\Omega$ e $V_{in} = \pm 5\text{V}$.

Fonte - Autor.

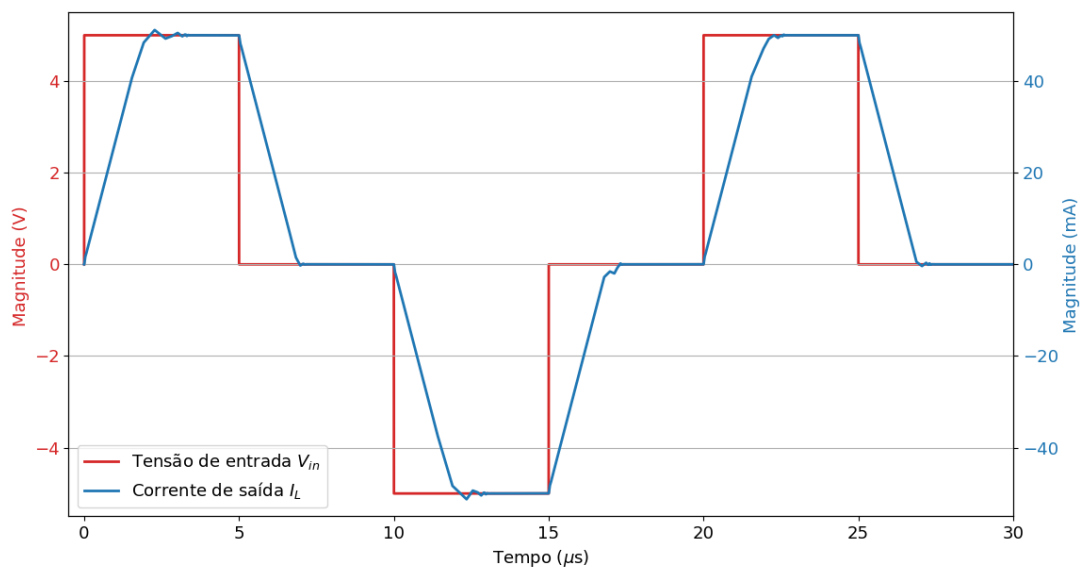
Conforme se pode observar, a corrente de saída I_L sofre pouca distorção em relação a tensão de entrada V_{in} . Além disso, as distorções são equivalentes para correntes positivas e negativas, garantindo que exista equilíbrio de carga no objeto de estudo. Nesse caso, visto que $R_{11}=100\Omega$, uma tensão de 5V deve fornecer uma corrente de saída de 50mA. A simulação mostra que o circuito se comporta de acordo com o esperado para essa situação.

No caso de se aumentar R_{11} para $10\text{k}\Omega$ e manter os outros parâmetros fixos, por exemplo, é esperado que a VCCS se comporte de maneira semelhante a Figura 37, mas com uma corrente menor de cerca de $500\mu\text{A}$. A Figura 38 apresenta essa situação, provando que a fonte mantém o comportamento esperado, com pouca variação na distorção da corrente de saída.

Figura 38 – Simulação com $f_{in}=10\text{kHz}$, $R_L=100\Omega$, $R_{11}=10\text{k}\Omega$ e $V_{in} = \pm 5\text{V}$.

Fonte - Autor.

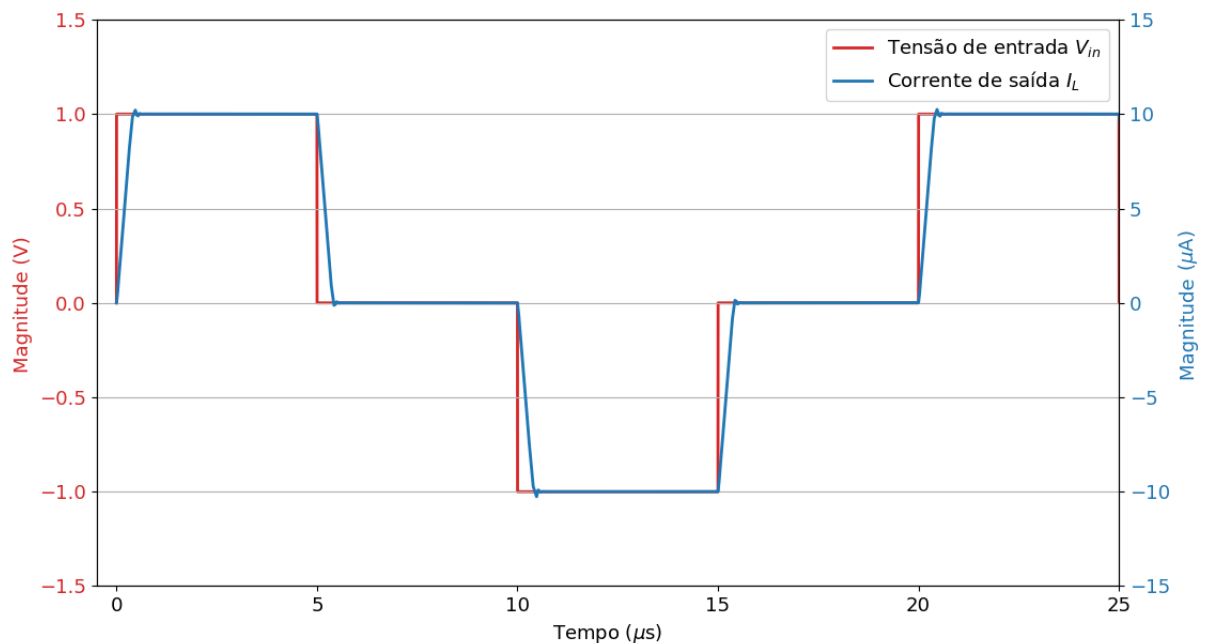
Também é possível observar o comportamento da VCCS em casos de frequência extremos, onde os pulsos são da ordem de poucos microssegundos. Para isso, optou-se por utilizar $f_{in}=50\text{kHz}$, $R_L=100\Omega$, $R_{11}=100\Omega$ e $V_{in} = \pm 5\text{V}$. A Figura 39 mostra o resultado dessa simulação.

Figura 39 – Simulação com $f_{in}=50\text{kHz}$, $R_L=100\Omega$, $R_{11}=100\Omega$ e $V_{in} = \pm 5\text{V}$.

Fonte - Autor.

Observa-se que, nesse caso, a distorção da corrente de saída é grande. Isso acontece pois a frequência do sinal de entrada é alta (50kHz) e a amplitude da corrente de saída também é alta (50mA), fazendo com que o sistema distorça o sinal devido a sua limitação de *Slew rate*. Contudo, essa é uma situação que não ocorre nas práticas de microestimulação, já que frequências de estimulação altas com correntes de estimulação altas causariam danos aos tecidos neuronais. Assim, é adequado simular o sistema em condições de alta frequência e menor corrente. Para tanto, utilizou-se $f_{in}=50\text{kHz}$, $R_L=100\text{k}\Omega$, $R_{11}=100\Omega$ e $V_{in} = \pm 1\text{V}$. O resultado dessa estimulação pode ser observado na Figura 40.

Figura 40 – Simulação com $f_{in}=50\text{kHz}$, $R_L=100\Omega$, $R_{11}=100\text{k}\Omega$ e $V_{in} = \pm 1\text{V}$.

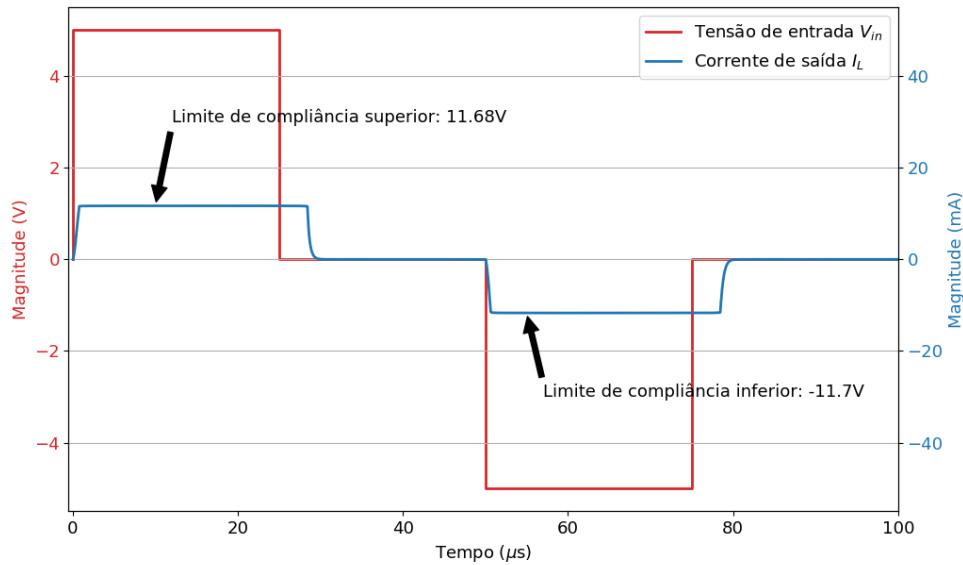


Fonte - Autor.

Nota-se que, para mesma f_{in} e correntes de saída menores, a distorção do sinal é muito menor, estando de acordo com o desejado para o sistema. Dessa forma, pode-se concluir que a VCCS permite a estimulação utilizando protocolos de alta frequência sem grande distorção do sinal.

Também foi desejado observar o comportamento da VCCS quando o limite de *compliance* é alcançado. Para isso, utilizou-se $f_{in}=10\text{kHz}$, $R_L=1000\Omega$, $R_{11}=100\Omega$ e $V_{in} = \pm 5\text{V}$. Nesse caso, é esperado que a corrente de saída alcance um valor limite, relacionado ao produto R_L e I_L que é a tensão de saída do sistema. Se esse produto ultrapassar os limites de *compliance* da fonte, a corrente de saída é distorcida. A Figura 41 mostra essa situação simulada.

Figura 41 – Simulação com $f_{in}=10\text{kHz}$, $R_L=1000\Omega$, $R_{11}=100\Omega$ e $V_{in} = \pm 5V$.

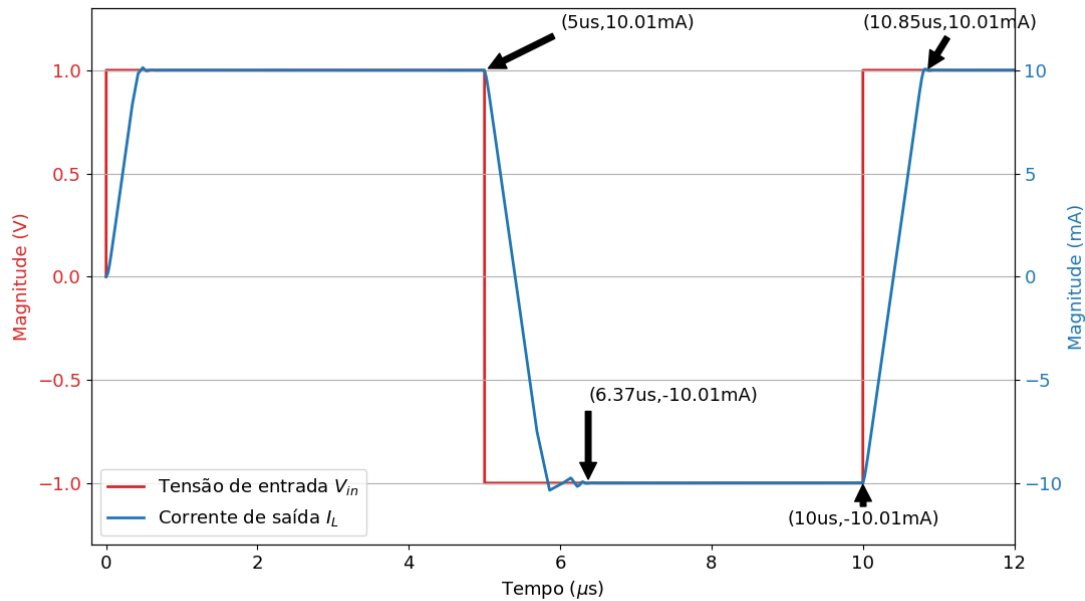


Fonte - Autor.

A situação simulada está de acordo com o esperado, visto que, ao atingir uma I_L de cerca de 11,7mA, a corrente é distorcida e limitada pela *compliance* do sistema, que, para uma alimentação simétrica de $\pm 15V$, é cerca de $\pm 11,7V$ (considerando as não idealidades dos amplificadores operacionais do sistema). Assim, é necessário ao usuário observar se a *compliance* do sistema está sendo atingida ao realizar um processo de estimulação para evitar distorções indesejadas. Isso pode ser feito a partir do circuito indicador proposto anteriormente.

Também foi desejado calcular o *Slew rate* de saída do sistema. Para tanto, o circuito foi simulado para a situação de transição direta entre pulso positivo e negativo, $f_{in}=100\text{kHz}$, $R_L=100\Omega$, $R_{11}=1\text{k}\Omega$ e $V_{in} = \pm 1V$. O resultado pode ser observado na Figura 42. Estão marcados na figura os pontos de interesse para cálculo do *Slew rate*.

Figura 42 – Simulação com $f_{in}=100\text{kHz}$, $R_L=100\Omega$, $R_{11}=1\text{k}\Omega$ e $V_{in} = \pm 1\text{V}$.

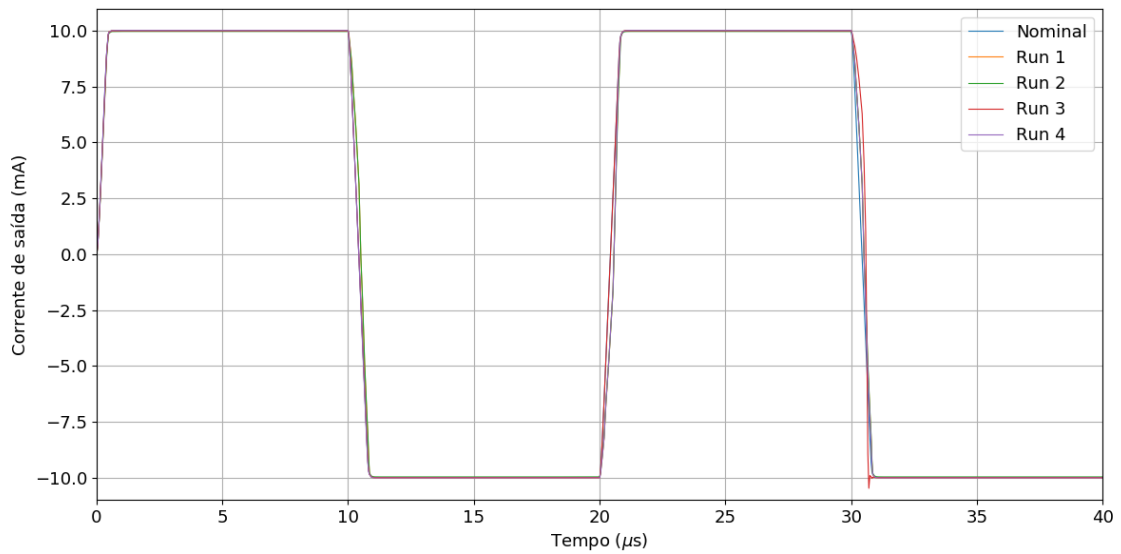


Fonte - Autor.

Conforme se observa, é possível calcular um *Slew rate* de corrente de saída de aproximadamente $19,1\text{mA}/\mu\text{s}$, ou, em termos de tensão de saída, cerca de $1,91\text{V}/\mu\text{s}$, o que é suficiente para não distorcer os pulsos de estímulo comumente utilizados.

Por fim, foi desejado compreender os impactos das tolerâncias dos componentes utilizados para desenvolver a VCCS. Assim, considerando resistores de tolerância de 1% e as variações de parâmetros dos modelos dos componentes semicondutores, pode-se fazer uma simulação Monte Carlo para verificar tal impacto. Foi utilizado um sinal de entrada de $f_{in}=50\text{kHz}$, $R_L=100\Omega$, $R_{11}=100\Omega$ e $V_{in} = \pm 1\text{V}$. A Figura 43 mostra o resultado da simulação.

Figura 43 – Simulação de Monte Carlo para VCCS.

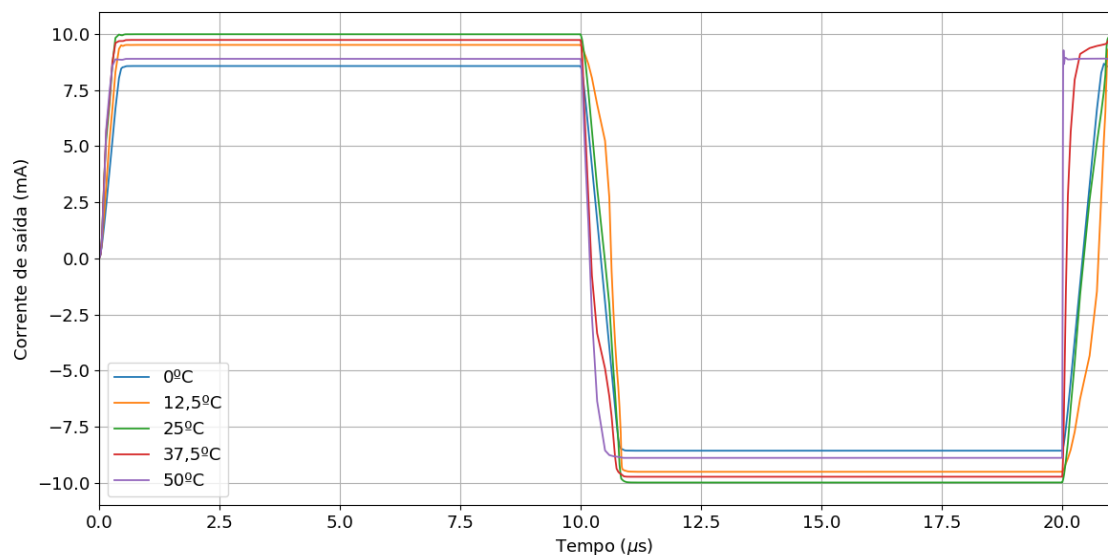


Fonte - Autor.

Conforme se observa, a variabilidade dos componentes não afeta significativamente o desempenho do circuito, sendo que resistores de tolerância 1% são suficientes para garantir boa precisão na corrente de saída dos sistema. A média de amplitude de corrente do sistema para 4 runs foi de 10,00mA com um desvio padrão de 17,73μA.

Em acréscimo, foi feita uma análise para observar o impacto da variação de temperatura no desempenho do sistema. A simulação considerou $f_{in}=50\text{kHz}$, $R_L=100\Omega$, $R_{11}=100\Omega$ e $V_{in} = \pm 1V$ e variações de temperatura entre uma faixa comercial de 0°C até 50°C. A Figura 44 mostra o resultado da simulação,

Figura 44 – Simulação considerando variação de temperatura na VCCS.



Fonte - Autor.

Nota-se que a variação de temperatura dentro de uma faixa de $\pm 10^{\circ}\text{C}$ não afeta o desempenho de maneira significativa. Para variações maiores, o erro de amplitude de corrente de saída do sistema começa a aumentar, chegando a 15% para temperaturas de 50°C . Assim, é necessário garantir que o sistema opere nas condições próximas a temperatura ambiente de 27°C .

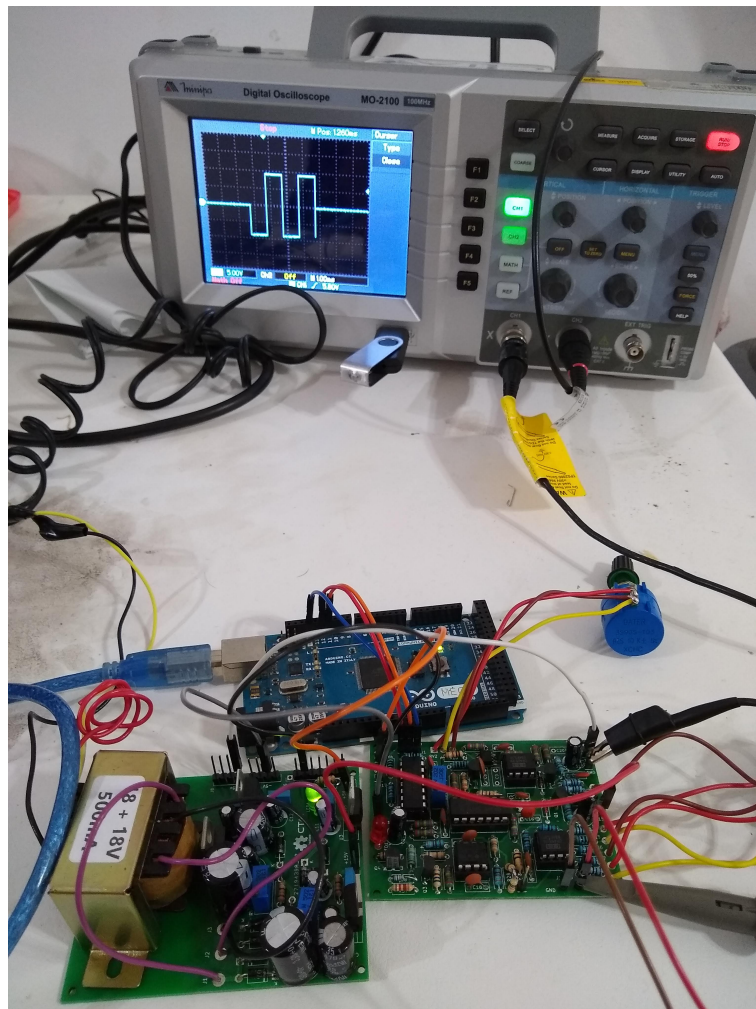
Dessa forma, pode-se concluir que as simulações da VCCS exibem o comportamento esperado da mesma para as diferentes situações. Os resultados obtidos pelas simulações asseguram que as especificações de projeto podem ser cumpridas com o circuito desenvolvido.

7 Experimentos e Resultados

Como anteriormente descrito na metodologia, os experimentos devem permitir observar o comportamento do sistema desde a etapa de geração de protocolos pelo Arduino até a conversão em pulsos de corrente pela VCCS. Para tanto, foi montado um protótipo do sistema utilizando placas de circuito impresso de duas camadas, contendo os circuitos de fonte de alimentação, conversão de pulsos, VCCS e indicador de *compliance*. As placas e protótipo podem ser visualizadas no Apêndice A. As saídas de PWM do Arduino são conectadas nas entradas do circuito de conversão de pulsos.

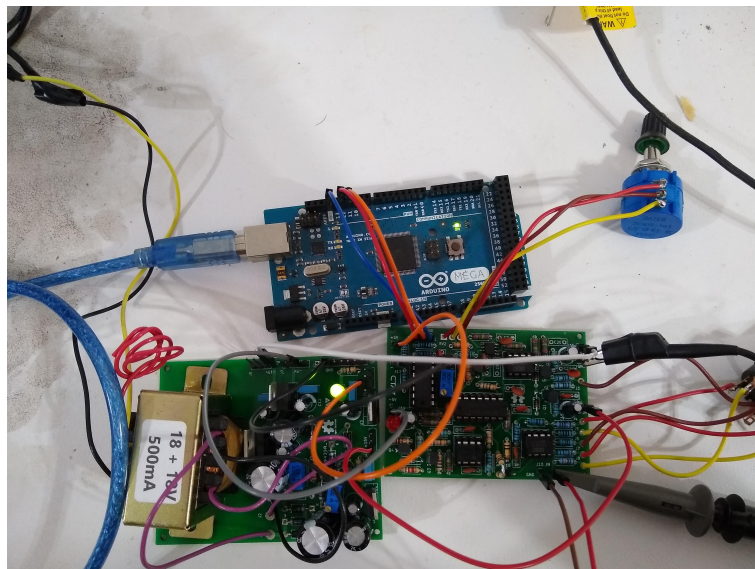
Para observar as formas de onda desejadas, utilizou-se um osciloscópio Minipa MO-2100. As cargas que controlam a corrente de saída do sistema são resistores de precisão 1%. A corrente de saída pode ser observada a partir da tensão no resistor de saída. A montagem do sistema para os testes e caracterização pode ser visualizada nas Figuras 45 e 46.

Figura 45 – Montagem do experimento para testes e caracterização do sistema.



Fonte - Autor.

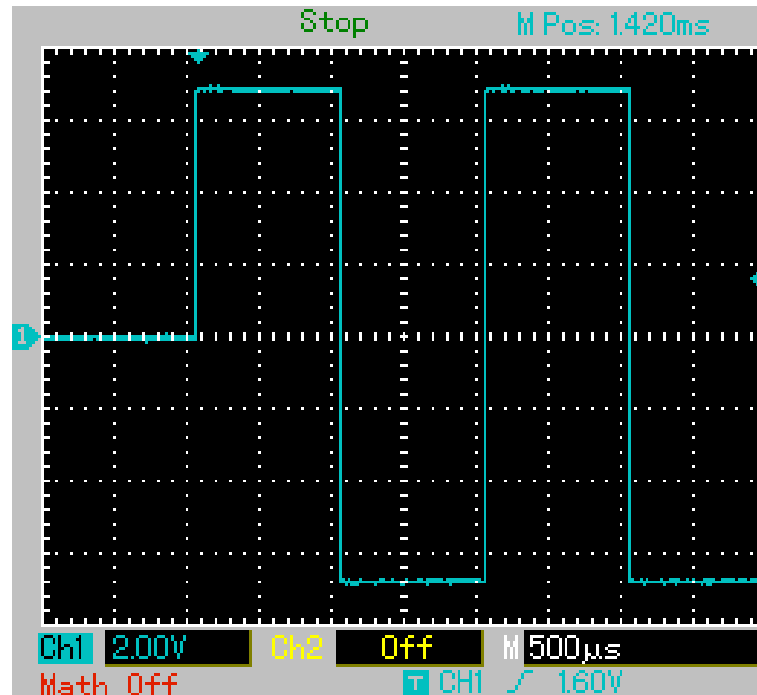
Figura 46 – Protótipos e montagem para experimento.



Fonte - Autor.

Primeiramente, foram observados os padrões temporais dos protocolos gerados. Utilizando um Protocolo Basal Bipolar com tempo de pulso positivo $TP = 1000\mu s$, tempo de pulso negativo $TN = 1000\mu s$, intervalo entre trens de pulso ITI de $1s$, resistência de carga de $R_L = 100\Omega$, resistência de ganho de transimpedância de $R_{11} = 100\Omega$ e tensão de entrada da VCCS de $V_{in} = \pm 700mV$, pode-se observar a forma de onda da Figura 47.

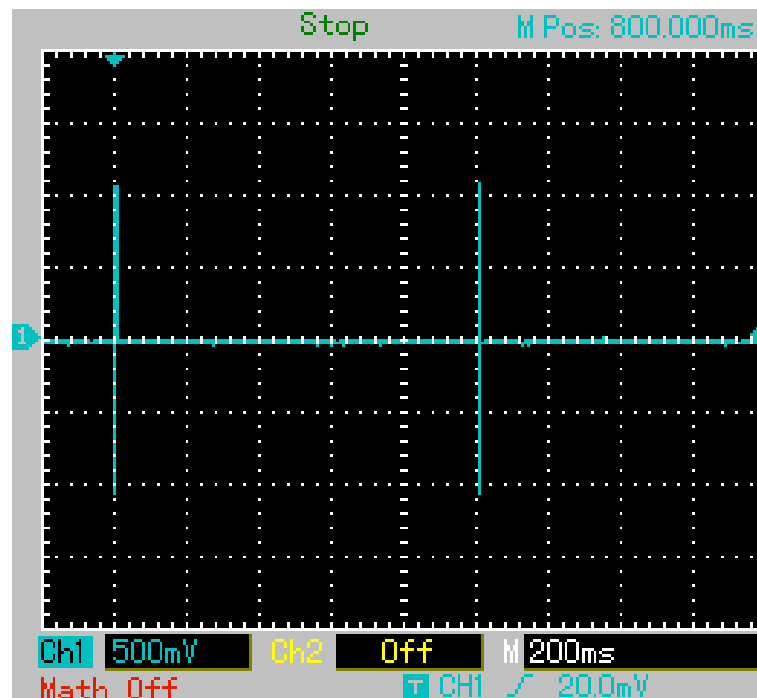
Figura 47 – Protocolo Basal Bipolar com $TP = 1000\mu s$, $TN = 1000\mu s$, $R_L = 100\Omega$, $R_{11} = 100\Omega$ e $V_{in} = \pm 700mV$



Fonte - Autor.

Conforme se pode observar, a forma de onda obtida está de acordo com os parâmetros definidos anteriormente, tanto em questão dos parâmetros de tempo, definidos por software, assim como os parâmetros de amplitude, definidos pelo ajuste do potenciômetro que controla a tensão de entrada da VCCS e pelo ajuste da chave seletora que define o resistor de ganho de transimpedância da VCCS.

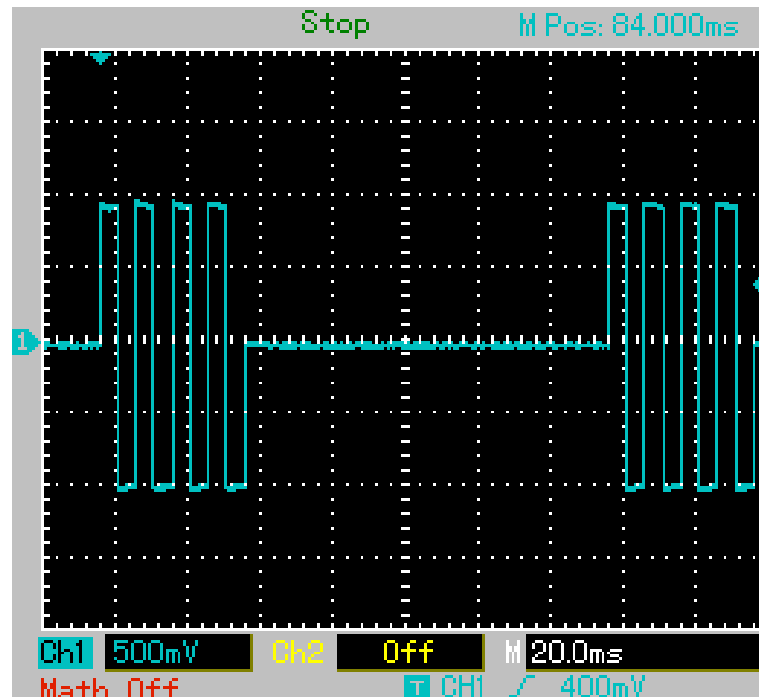
O intervalo entre os trens de pulso de 1s pode ser observado na Figura 48. O padrão de dois pulsos positivos e negativos desse tipo de protocolo é repetido a cada 1 segundo, definido pelo parâmetro ITI.

Figura 48 – Protocolo Basal Bipolar com $ITI = 1s$.

Fonte - Autor.

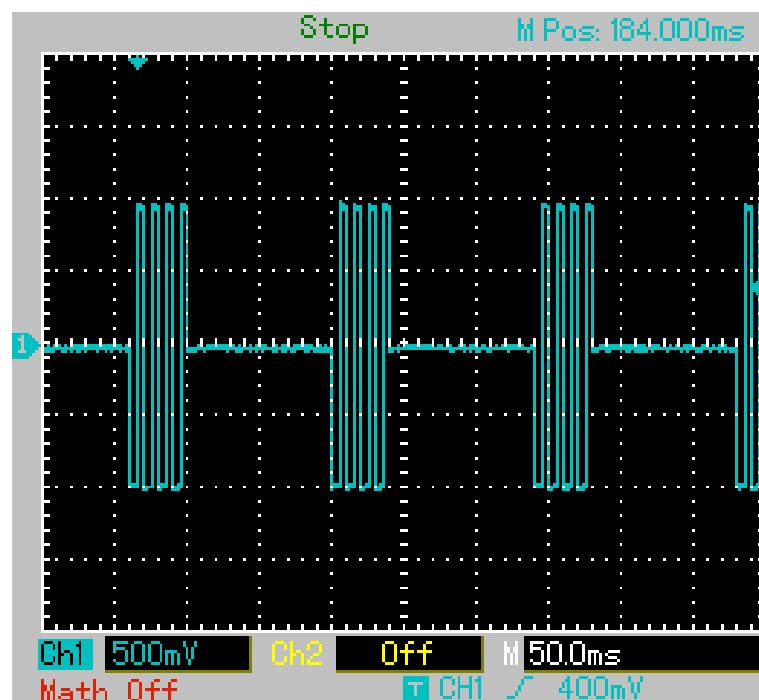
Nota-se que as configurações temporais dos protocolos estão de acordo com o esperado, assim como ocorre para o protocolo TBS mostrado nas Figuras 49 e 50. Nelas, o protocolo TBS bipolar é definido por tempo de pulso positivo $TP = 5ms$, tempo de pulso negativo $TN = 5ms$, intervalo entre *epochs* de $IEI = 100ms$, intervalo entre trens de *epochs* ITI de $500ms$, 4 pulsos por *epoch* e 8 *epochs* por trem. A resistência de carga de $R_L = 1k\Omega$, resistência de ganho de transimpedância de $R_{11} = 100\Omega$ e tensão de entrada da VCCS de $V_{in} = \pm 1V$.

Figura 49 – Protocolo TBS bipolar com $TP = 5ms$, $TN = 5ms$, $IEI = 100ms$, $ITI = 500ms$, 4 pulsos por epoch, 8 epochs por trem.



Fonte - Autor.

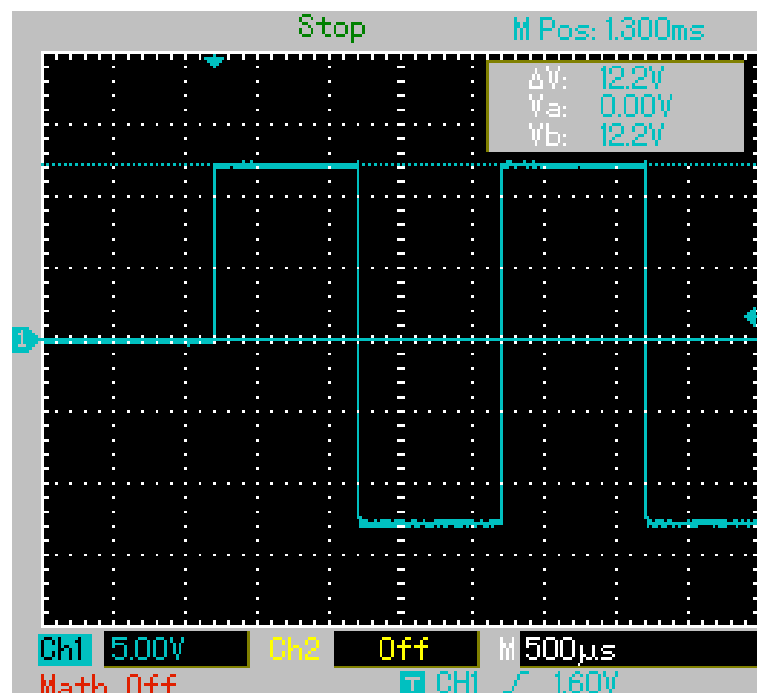
Figura 50 – Protocolo TBS bipolar com $TP = 5ms$, $TN = 5ms$, $IEI = 100ms$, $ITI = 500ms$, 4 pulsos por epoch, 8 epochs por trem, visualização do intervalo entre epochs.



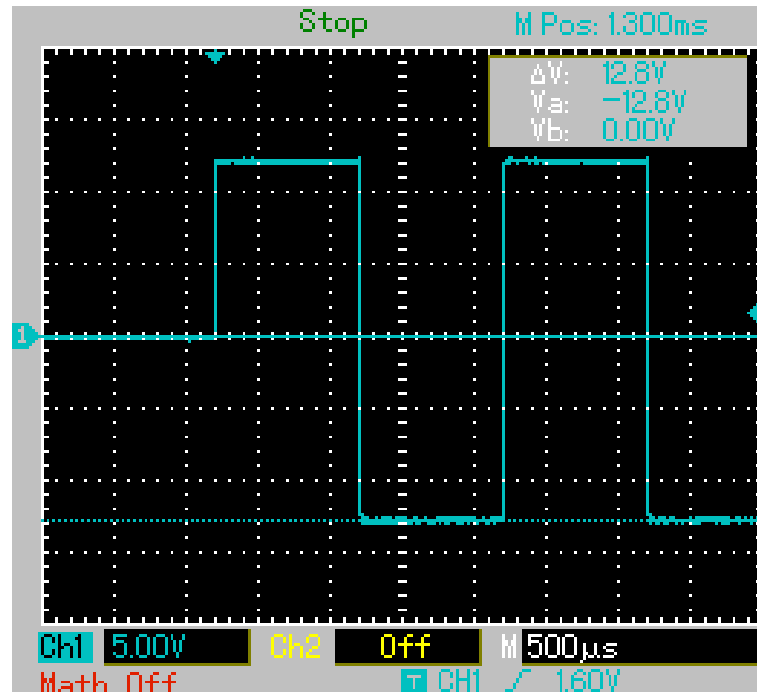
Fonte - Autor.

Pode-se notar que a precisão temporal dos protocolos gerados é satisfatória. Ademais, é desejado definir a *compliance* do sistema. Para isso, foi utilizado o Protocolo Basal Bipolar com tempo de pulso positivo $TP = 1000\mu s$, tempo de pulso negativo $TN = 1000\mu s$, intervalo entre trens de pulso ITI de $1s$, resistência de carga de $R_L = 1k\Omega$, resistência de ganho de transimpedância de $R_{11} = 100\Omega$ e tensão de entrada da VCCS de $V_{in} = \pm 1V$. Isso garante uma saturação por limite de *compliance*, visto que a tensão esperada na carga para essa configuração seria em torno de $\pm 100V$. As Figuras 51 e 52 mostram os limites de *compliance* da VCCS para correntes positivas e negativas de saída.

Figura 51 – Medida de *compliance* positiva da VCCS.



Fonte - Autor.

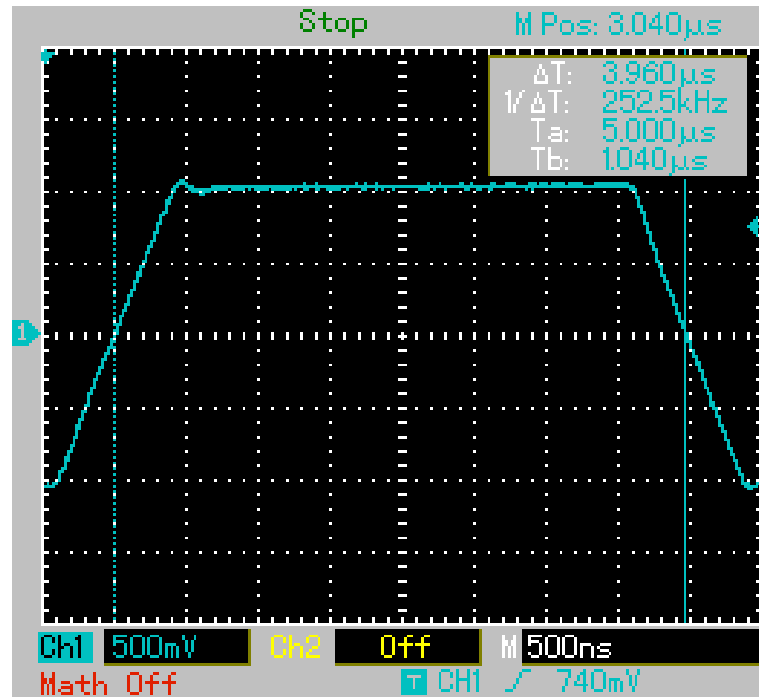
Figura 52 – Medida de *compliance* negativa da VCCS.

Fonte - Autor.

Conforme se observa, a *compliance* positiva é de cerca de $12,2V$, enquanto a negativa é de cerca de $12,8V$. Esses limites são maiores que os limites simulados de $11,7V$. Esse aumento se deve, provavelmente, a incertezas na tensão de alimentação do sistema, nos valores obtidos pelo osciloscópio e nos resistores de carga utilizados.

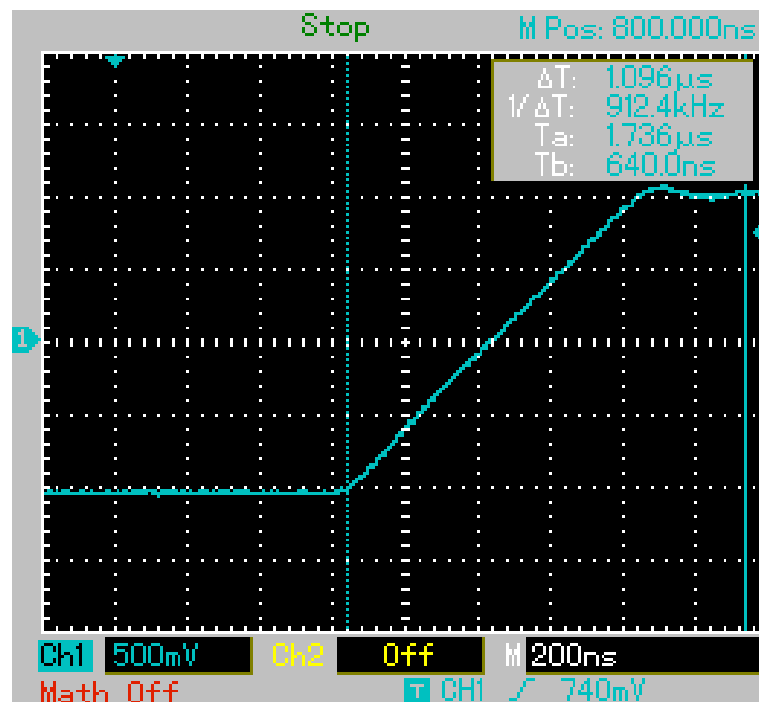
Ademais, foi desejado observar o comportamento da saída com pulsos de largura mínima, na ordem de $10\mu s$. Assim, foi utilizado o Protocolo Basal Bipolar com tempo de pulso positivo $TP = 4\mu s$, tempo de pulso negativo $TN = 1000\mu s$, intervalo entre trens de pulso ITI de $1s$, resistência de carga de $R_L = 100\Omega$, resistência de ganho de transimpedância de $R_{11} = 1k\Omega$ e tensão de entrada da VCCS de $V_{in} = \pm 1V$. As Figuras 53, 54 55, 56 e 57 mostram essa análise e a medida do *Slew rate*.

Figura 53 – Protocolo Basal Bipolar com $TP = 4\mu s$, $R_L = 100\Omega$, $R_{11} = 1k\Omega$ e $V_{in} = \pm 1V$.



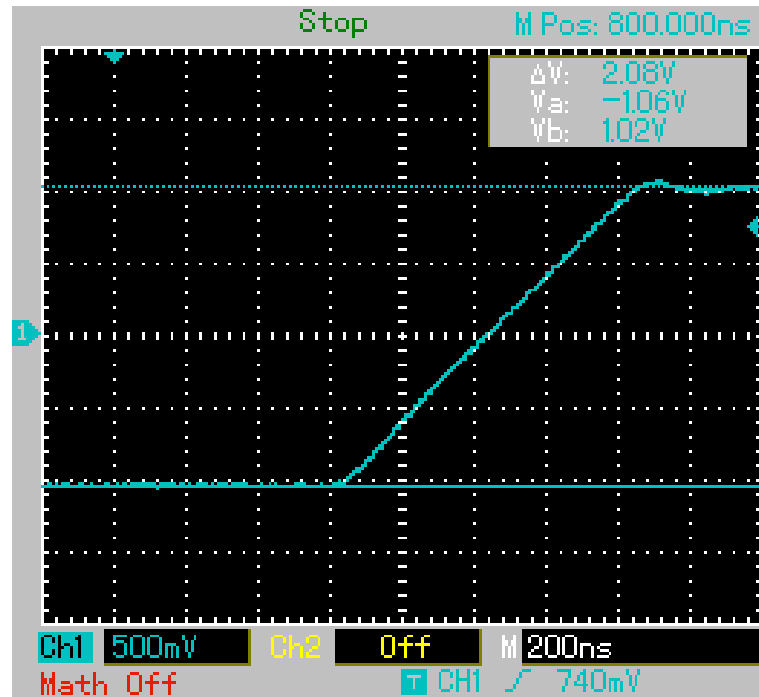
Fonte - Autor.

Figura 54 – Medida de tempo para *Slew rate* com transição negativa-positiva.



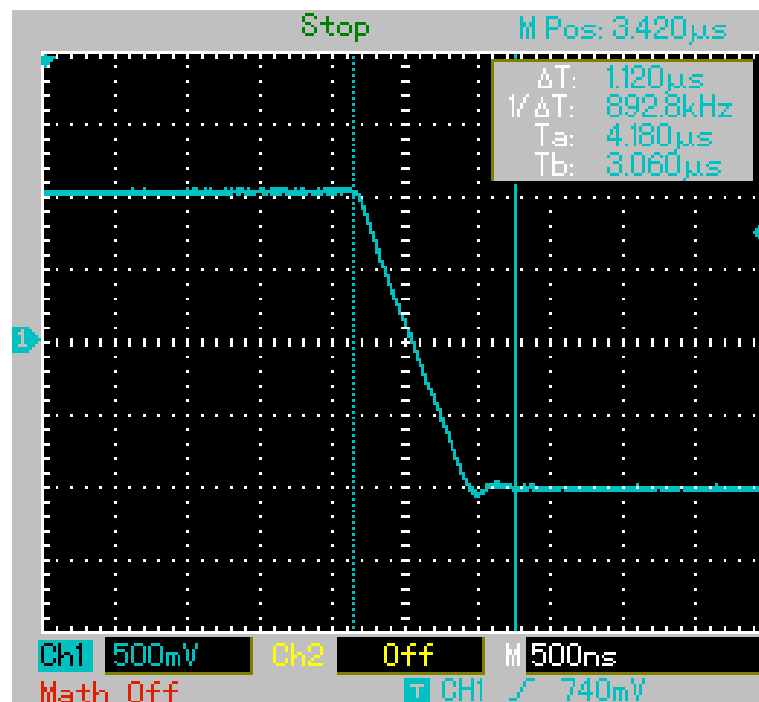
Fonte - Autor.

Figura 55 – Medida de amplitude para *Slew rate* com transição negativa-positiva.

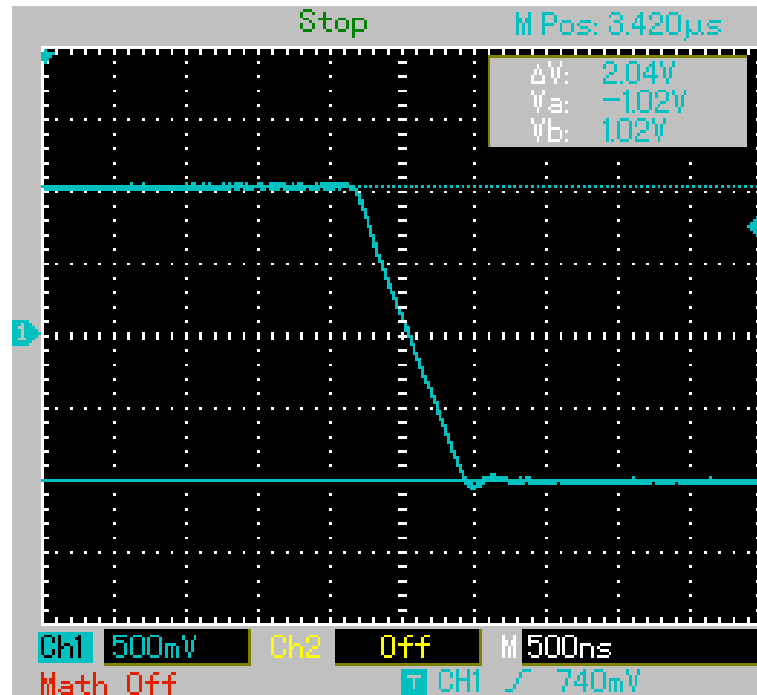


Fonte - Autor.

Figura 56 – Medida de tempo para *Slew rate* com transição positiva-negativa.



Fonte - Autor.

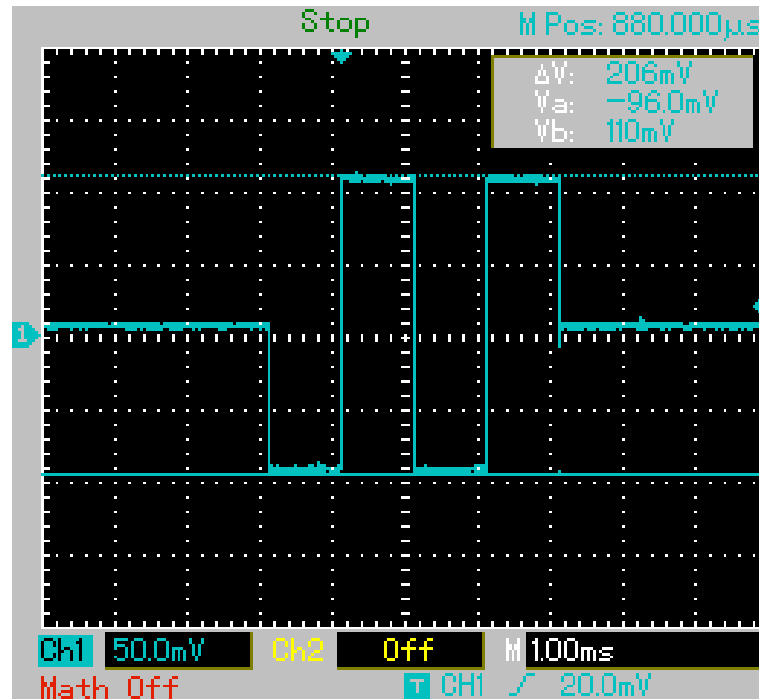
Figura 57 – Medida de amplitude para *Slew rate* com transição positiva-negativa.

Fonte - Autor.

A partir disso, foi possível determinar o *Slew rate* do sistema, que nesse caso foi de $1,90V/\mu s$ ou $19,0mA/\mu s$ (considerando ganho de transimpedância de 100Ω) para transição negativa-positiva e $1,82V/\mu s$ ou $18,2mA/\mu s$ para transição positiva-negativa. O *Slew rate* médio do sistema é de aproximadamente $1,85V/\mu s$ ou $18,5mA/\mu s$. Esse resultado está de acordo com as simulações anteriormente realizadas em que se obteve *Slew rate* de $1,91V/\mu s$, além de suprir as necessidades de projeto visto que larguras de pulso muito pequenas com altas amplitudes de corrente são dificilmente utilizadas.

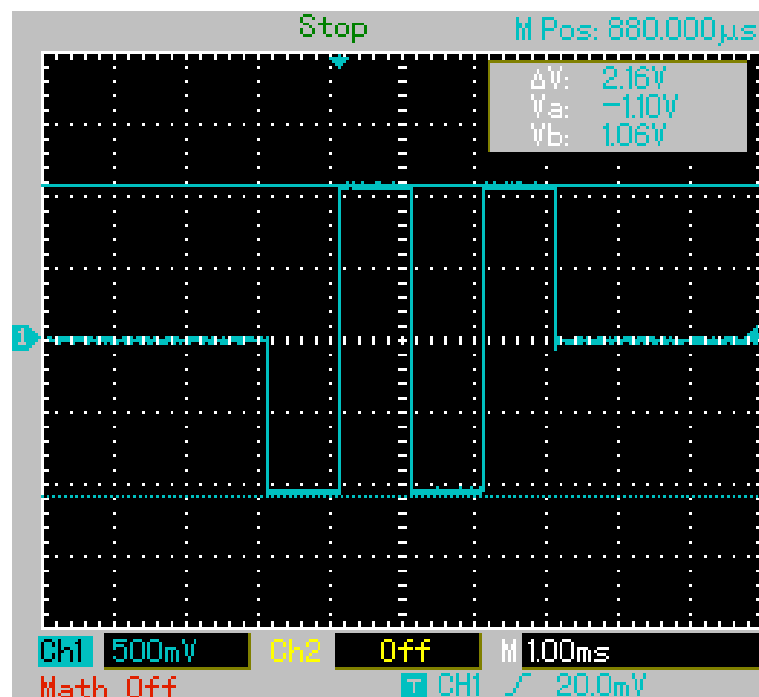
Por fim, foi desejado obter a resolução de corrente mínima do sistema, para condição onde a resistência de ganho de transimpedância é máxima ($R_{11} = 100k\Omega$), gerando uma corrente de saída da ordem de $1\mu A$. Assim, variou-se a tensão de entrada V_{in} da VCCS entre seus limites de acordo com as voltas do potenciômetro que controla o divisor de tensão. Para essas medidas, foi usado o Protocolo Basal Bipolar com tempo de pulso positivo $TP = 1000\mu s$, tempo de pulso negativo $TN = 1000\mu s$, intervalo entre trens de pulso ITI de $1s$, resistência de carga de $R_L = 100k\Omega$, resistência de ganho de transimpedância de $R_{11} = 100k\Omega$. As Figuras 58 e 59 mostram as tensões de saída obtidas.

Figura 58 – Medida de tensão de saída para menor escala de corrente de saída e ajuste fino de V_{in} no mínimo.



Fonte - Autor.

Figura 59 – Medida de tensão de saída para menor escala de corrente de saída e ajuste fino de V_{in} no máximo.



Fonte - Autor.

Como se pode observar, a corrente mínima nesse caso é de $0,96\mu A$ e a corrente máxima é de $11\mu A$, o que corresponde a uma faixa de variação para menor escala de $10,04\mu A$ dentro das voltas de um potenciômetro de precisão com resolução de 0,029% (BOURNS PRECISION POTENTIOMETERS, 2003). Isso corresponde a uma resolução de ajuste mínima de $2,94nA$, permitindo que o usuário ajuste com precisão a corrente de saída desejada para o sistema.

Por fim, observando os valores apresentados no datasheet do ATMEGA2560 (ATMEL CORPORATION, 2014), é possível determinar a resolução temporal de ajuste de parâmetros de protocolo. Tendo em vista que o *clock* do microcontrolador é de 16MHz e que o software configura timers para utilizar *prescaler* de 8 ou 64, a resolução temporal mínima é de $0,5\mu s$.

A partir dos dados coletados e das especificações dos componentes, pode-se definir os parâmetros de interesse do projeto de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros característicos do sistema obtidos pelos experimentos e especificações.

Parâmetro	Valor
Corrente mínima de saída	$1\mu A$
Corrente máxima de saída	110mA
<i>compliance</i>	$\pm 12,5V/\mu s$
<i>Slew rate</i>	$\pm 1,85V/\mu s$
Resolução mínima de ajuste de corrente	$2,94nA$
Resolução temporal dos parâmetros	$0,5\mu s$

Fonte - Autor.

8 Conclusões

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que o sistema atingiu os requisitos definidos a partir das demandas dos pesquisadores da área. A interface gráfica permite a configuração dos protocolos desejados para estimulação assim como todo o controle do processo em tempo real, garantindo praticidade e versatilidade ao sistema. O software do Arduino garante 4 canais de estimulação bipolares com registro dos estímulos, podendo ser utilizado em trabalhos científicos com arranjos de microeletrodos.

O hardware para geração dos pulsos de corrente atingiu as demandas de ajuste preciso de corrente de saída (resolução na menor escala de $2,94nA$ e 5 escalas de corrente entre $1\mu A$ e $10mA$), baixa distorção dos pulsos de estímulo (*Slew rate* de $\pm 1,85V/\mu s$) e *compliance* suficiente para processos comuns de estimulação ($\pm 12,5V$).

Em comparação a outros sistemas semelhantes, como os apresentados por [Cheever et al. \(1998\)](#) e por [Muller, Bakkum e Hierlemann \(2013\)](#), nota-se a superioridade do projeto em termos de versatilidade de protocolos de estímulo gerados, assim como melhor resolução temporal dos parâmetros e maior número de canais de estimulação. Comparando a SIU a outros trabalhos como de [Brasil e Leal-Cardoso \(1999\)](#) e [Land et al. \(2004\)](#), pode-se concluir que, embora a *compliance* do sistema desenvolvido seja muito menor, sua resposta em frequência é superior, estando de acordo com as especificações desejadas.

Além disso, os objetivos de desenvolver um sistema com custo acessível e tecnologia aberta foram alcançados, visto que o custo de projeto é menor do que os equipamentos vendidos no mercado e todo o processo de reprodução do sistema está documentado e licenciado sob CC BY-SA. Como vantagem, também nota-se que todos os componentes podem ser adquiridos no Brasil.

Dessa forma, os resultados dos testes satisfazem as especificações de projeto definidas anteriormente. Como se trata de um projeto aberto, futuras modificações podem ser feitas por qualquer pessoa que desejar utilizar o equipamento. Alguns possíveis trabalhos futuros para melhoria do projeto são:

- Montagem do corpo do equipamento, com caixa e interface física com o usuário
- Experimentos em aplicações reais de estudos de microestimulação (com microeletrodos e tecidos neuronais)
- Implementação de novos protocolos de estimulação
- Aumento da *compliance* do sistema para abranger maior número de estudos científicos de neurologia através de técnica de *bootstrap* e aumento de tensão de operação do

sistema

- Implementação de seleção de escala de corrente de saída via software através de relés ou transistores utilizados como chaves digitais
- Avaliação de viabilidade de gerar sinais de estímulo através de DACs controlados pelo Arduino, permitindo gerar formatos de onda variados na saída do sistema assim como ajustar a corrente de saída via software
- Desenvolvimento de leitura do sinal de tensão na carga pelo conversor analógico-digital (ADC) do Arduino para correção automatizada da corrente de saída de forma a atender o limite de *compliance* do sistema, além de ser possível implementar ajuste de *compliance* via software através de uso de DAC secundário
- Desenvolvimento de isolamento entre partes digitais e analógicas através de optoacoplamento do sinal de saída do Arduino, possivelmente reduzindo ruídos do circuito digital na parte analógica
- Remoção do buffer de tensão de entrada na VCCS ou troca do amplificador operacional OP27 para OP37 para melhoria significativa do *Slew rate* do sistema

Referências

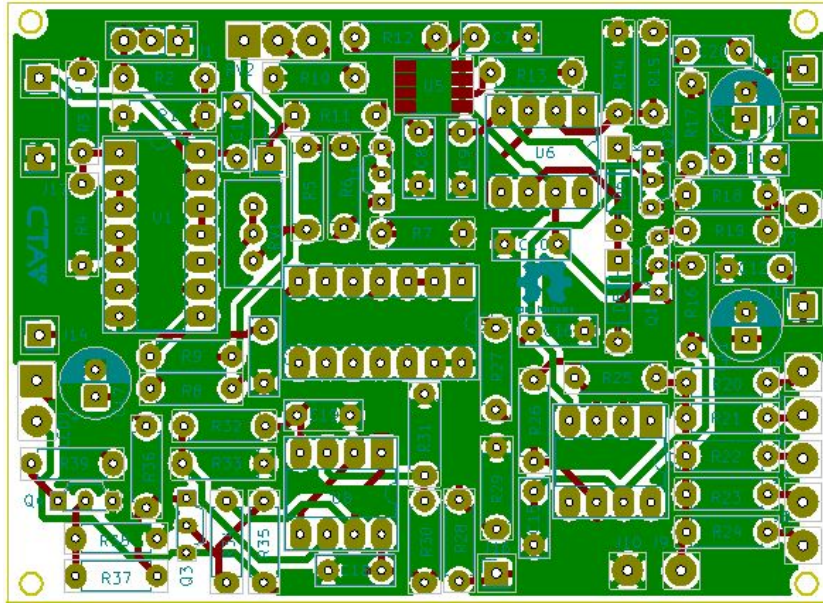
- ANALOG DEVICES. *Difference Amplifier Forms Heart of Precision Current Source*. [S.l.], 2009. Citado na página 26.
- ANALOG DEVICES. *OP27 Low Noise, Precision Operational Amplifier*. Norwood, MA, 2015. Citado na página 43.
- ANALOG DEVICES. *A Large Current Source with High Accuracy and Fast Settling*. [S.l.], 2016. Citado 2 vezes nas páginas 25 e 26.
- ANALOG DEVICES. *AN-1593: Extending Op Amp Operating Range via Bootstrapping*. Norwood, MA, 2018. Citado na página 27.
- ATMEL CORPORATION. *8-bit Atmel Microcontroller with 16/32/64KB In-System Programmable Flash*. San Jose, CA, 2014. Citado 2 vezes nas páginas 39 e 74.
- BLISS, T.; COLLINGRIDGE, G. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, v. 361, p. 31–39, jan. 1993. Citado na página 15.
- BONTORIN, G. et al. A real-time system for multisite stimulation on living neural networks. *2009 Joint IEEE North-East Workshop on Circuits and Systems and TAISA Conference*, v. 361, p. 1–4, jul. 2009. Citado na página 19.
- BORGES, R. R. et al. Sincronização de disparos em redes neuronais com plasticidade sináptica. *Rev. Bras. Ensino Fís.*, v. 37, n. 2, p. 9, 2015. Citado 2 vezes nas páginas 14 e 15.
- BOURNS PRECISION POTENTIOMETERS. *3590 - Precision Potentiometer*. [S.l.], 2003. Citado na página 74.
- BRASIL, R. O.; LEAL-CARDOSO, J. H. An optically coupled power stimulus isolation unit with high voltage and fast rise time output. *Braz J Med Biol Res*, v. 32, n. 6, p. 767–771, 1999. Citado 3 vezes nas páginas 23, 24 e 75.
- CHEEVER, E. A. et al. A versatile microprocessor-based multichannel stimulator for skeletal muscle cardiac assist. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, v. 45, n. 1, p. 56–67, jan. 1998. Citado 2 vezes nas páginas 19 e 75.
- DIGITIMER. *NL301 - Pulse Generator*. United Kingdom, 1996. Citado na página 51.
- DIGITIMER. *NL800A Current Stimulus Isolator*. United Kingdom, 2007. Citado na página 51.
- DIGITIMER. *DS4 - Bi-phasic Stimulus Isolator*. United Kingdom, 2011. Citado na página 51.
- DIGITIMER. *Constant Current Stimulation and Compliance Voltage*. [S.l.], 2016. Citado na página 21.

- GIOVANAZ, G. *Dominando e aprimorando uma montagem experimental de Eletrofisiologia Extracelular em ratos*. 48 p. Dissertação (Trabalho de Diplomação (Engenharia Física)) — Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018. Citado 2 vezes nas páginas 28 e 32.
- HALES, C. M.; ROLSTON, J. D.; POTTER, S. M. *How to Culture, Record and Stimulate Neuronal Networks on Micro-electrode Arrays (MEAs)*. [S.l.], 2010. Citado 3 vezes nas páginas 11, 17 e 28.
- HOLCOMB, M. R. et al. Continuous-waveform constant-current isolated physiological stimulator. *Review of Scientific Instruments*, v. 83, p. 1–6, abr. 2012. Citado na página 20.
- IM, H.-I. et al. Post-training dephosphorylation of eef-2 promotes protein synthesis for memory consolidation. *PLoS ONE*, v. 4, p. 1–17, out. 2009. Citado na página 17.
- INTERNATIONAL ELECTROTECHNICAL COMMISSION. *IEC61010-1: Safety requirements for electrical equipment for measurement, control, and laboratory use*. Citado na página 29.
- IVRY, R. B.; SCHLERF, J. E. Dedicated and intrinsic models of time perception. *Trends Cogn Sci.*, v. 12, n. 7, p. 273–280, jun. 2008. Citado na página 15.
- JOHNSON, H. A.; GOEL, A.; BUONOMANO, D. V. Neural dynamics of in vitro cortical networks reflects experienced temporal patterns. *Nat Neurosci*, v. 8, n. 13, p. 917–919, jun. 2010. Citado 2 vezes nas páginas 11 e 17.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524 p. Citado na página 14.
- KADZIELA, W.; TOMASZEWSKI, R. A constant-voltage and constant-current stimulus isolation unit. *Acta Neurobiol.*, v. 30, p. 181–187, jun. 1970. Citado na página 22.
- KANDEL, E. *Principles of Neural Science*. 5. ed. New York: McGraw-Hill Education, 2013. 1747 p. Citado na página 13.
- KRAUTHKAMER, V.; BEKKEN, M.; HOROWITZ, J. L. Morphological and electrophysiological changes produced by electrical stimulation in cultured neuroblastoma cells. *Bioelectromagnetics*, v. 12, p. 299–314, 1991. Citado na página 15.
- KUMAR, A. Long-term potentiation at ca3–ca1 hippocampal synapses with special emphasis on aging, disease, and stress. *Front Aging Neurosci.*, v. 3, p. 1–20, maio 2011. Citado 3 vezes nas páginas 11, 17 e 18.
- LAND, B. R. et al. Tools for physiology labs: Inexpensive equipment for physiological stimulation. the journal of undergraduate neuroscience education. *Front Aging Neurosci.*, v. 3, n. 1, p. A30–A35, jun. 2004. Citado 7 vezes nas páginas 11, 19, 20, 22, 23, 29 e 75.
- MANAHAN-VAUGHAN, D. *Handbook of in Vivo Neural Plasticity Techniques*. 1. ed. [S.l.]: Academic Press, 2018. 574 p. Citado na página 18.
- MCLEAN, L.; SCOTT, R. N.; PARKER, P. Stimulus artifact reduction in evoked potential measurements. *Arch Phys Med Rehabil*, v. 77, p. 1286–1292, dez. 1996. Citado na página 19.

- MERRILL, D. R.; BIKSON, M.; JEFFERYS, J. G. Electrical stimulation of excitable tissue: design of efficacious and safe protocols. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 141, p. 171–198, fev. 2015. Citado na página 16.
- MILLAR, J.; BARNETT, T. G. Isolated constant-current stimulation circuits for neuroscience applications. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 24, p. 81–87, maio 1988. Citado 2 vezes nas páginas 21 e 22.
- MULLER, J.; BAKKUM, D. J.; HIERLEMANN, A. Sub-millisecond closed-loop feedback stimulation between arbitrary sets of individual neurons. *Frontiers in Neural Circuits*, v. 6, p. 1–11, jan. 2013. Citado 2 vezes nas páginas 20 e 75.
- PEZZI, R. Ciência aberta: dos hipertextos aos hiperobjetos. In: *Ciência aberta, questões abertas*. Rio de Janeiro: Ibict, 2015. Citado na página 32.
- PEZZI, R. P. et al. Desenvolvimento de tecnologia para ciência e educação fundamentado nos preceitos de liberdade do conhecimento: o caso do centro de tecnologia acadêmica. *Liinc em Revista*, v. 13, p. 205–222, maio 2017. Citado na página 12.
- ROLSTON, J. D.; GROSS, R. E.; POTTER, S. M. Closed-loop, open-source electrophysiology. *Frontiers in Neuroscience*, v. 4, p. 1–8, set. 2010. Citado na página 20.
- SCIENTIFICA LTD. *Controlling and Coordinating Experiments in Neurophysiology: SciMethods: Basics*. [S.l.], 2016. 5 p. Citado na página 28.
- SHEININ, A.; LAVI, A.; MICHAILEVSKI, I. Stimduino: An arduino based electrophysiological stimulus isolator. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 243, p. 8–17, jan. 2015. Citado na página 24.
- TEHOVNIK, E. J. Electrical stimulation of neural tissue to evoke behavioral responses. *J Neurosci Methods*, v. 65, n. 1, p. 1–17, mar. 1996. Citado 2 vezes nas páginas 11 e 15.
- TEXAS INSTRUMENTS. *Applying a New Precision Op Amp*. Dallas, 1980. Citado na página 26.
- TEXAS INSTRUMENTS. *A High-Voltage Bidirectional Current Source*. Dallas, 2013. Citado 2 vezes nas páginas 27 e 28.
- TEXAS INSTRUMENTS. *OPA627 and OPA637 Precision High-Speed Difet® Operational Amplifiers*. [S.l.], 2015. Citado na página 43.
- TEXAS INSTRUMENTS. *CD40106B CMOS Hex Schmitt-Trigger Inverters*. [S.l.], 2017. Citado na página 42.

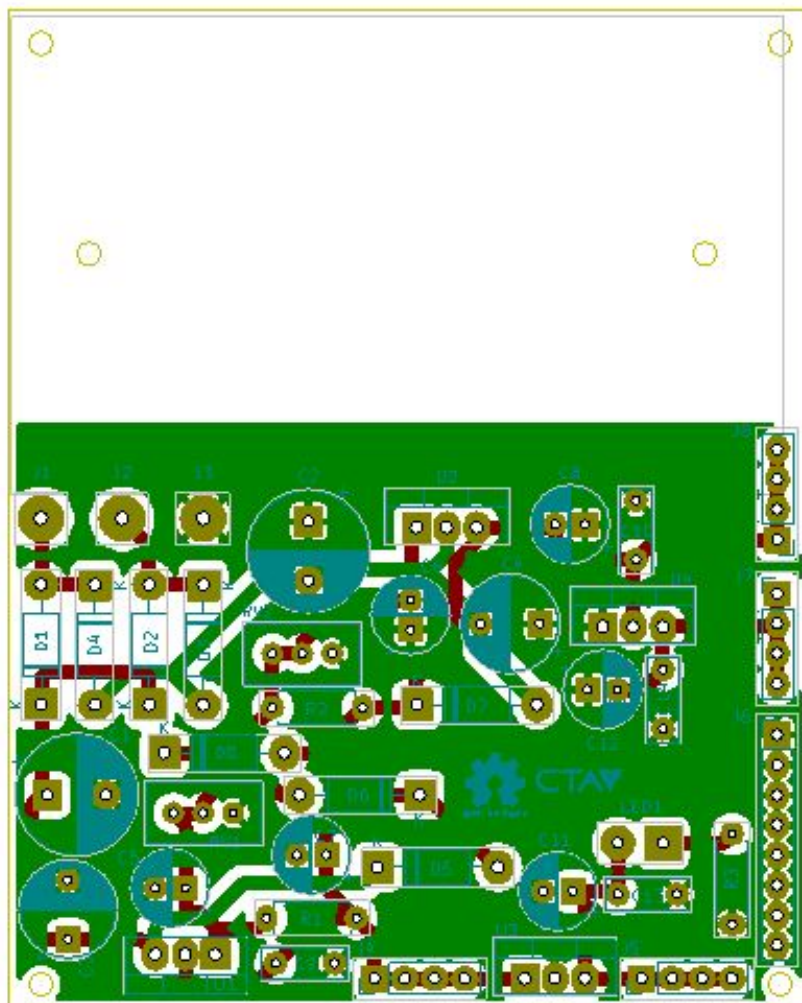
APÊNDICE A – Imagens

Figura 60 – Placa de circuito impresso para o circuito de conversão dos pulsos de tensão em pulsos de corrente.



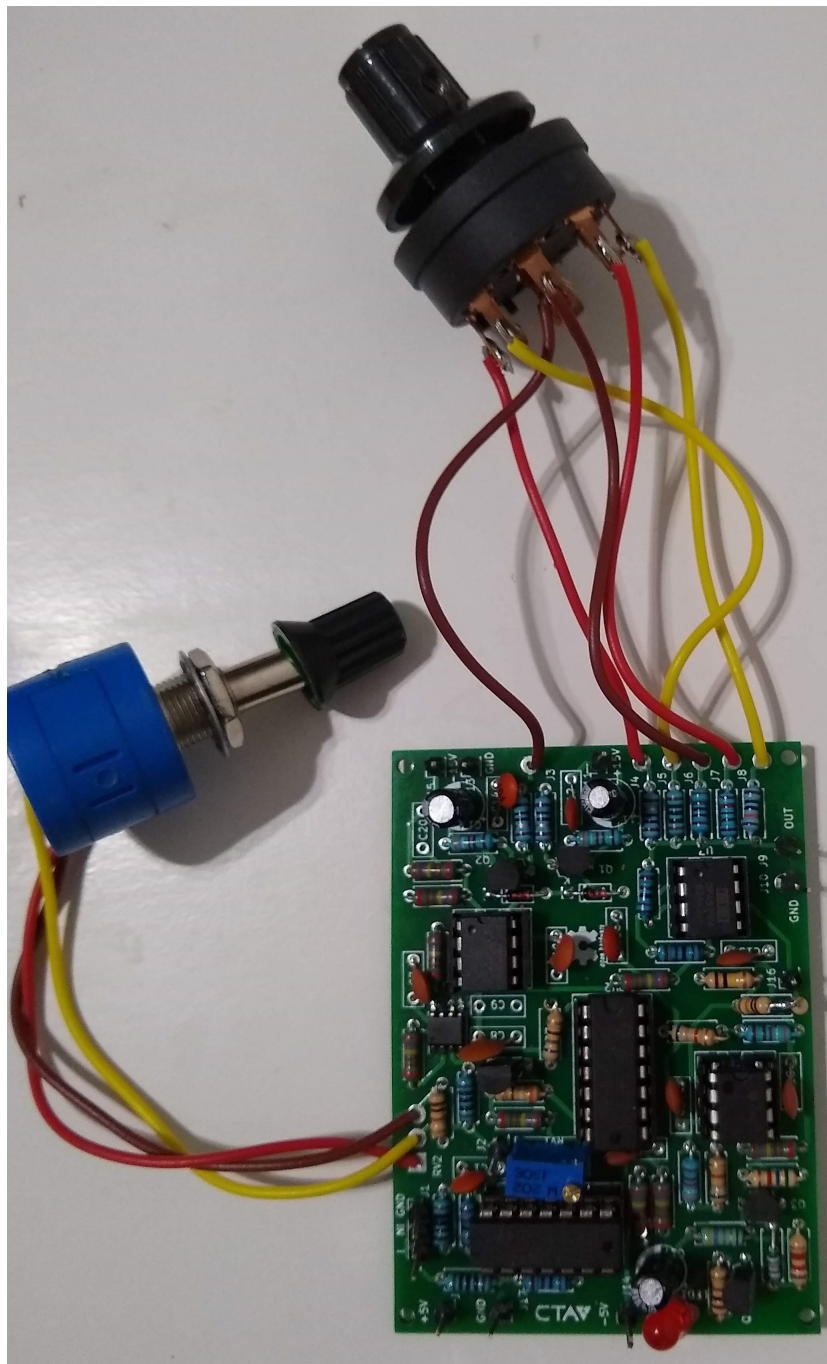
Fonte - Autor.

Figura 61 – Placa de circuito impresso para o circuito de fonte de tensão linear.



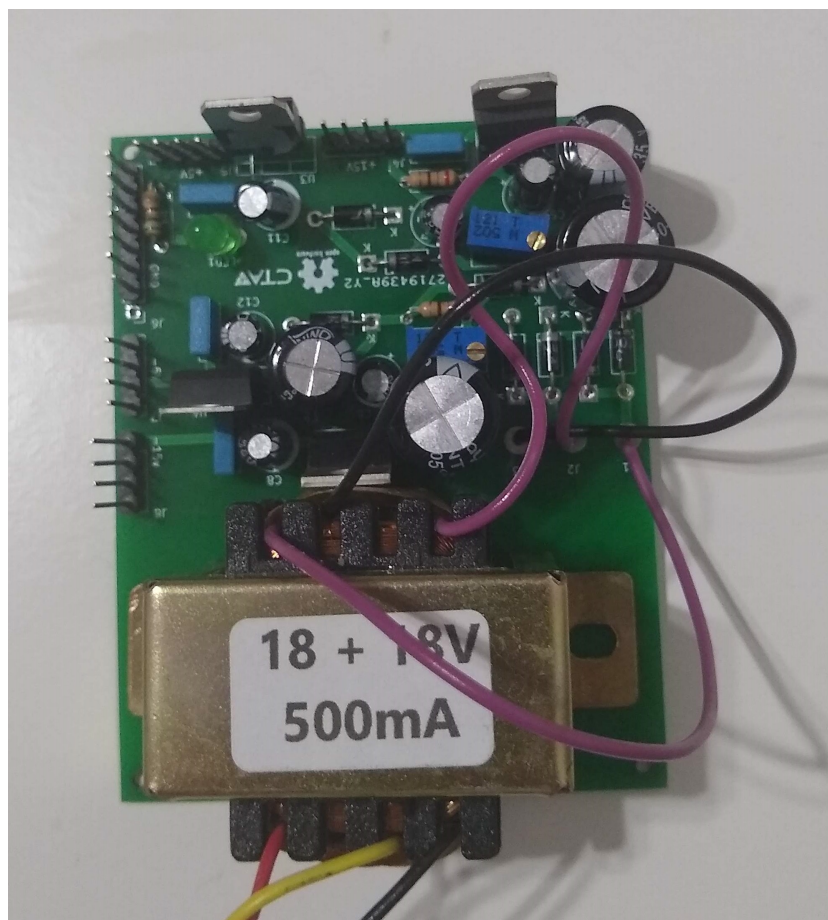
Fonte - Autor.

Figura 62 – Protótipo do circuito de conversão dos pulsos de tensão em pulsos de corrente..



Fonte - Autor.

Figura 63 – Protótipo da fonte de tensão linear do sistema.



Fonte - Autor.