

RODRIGO DE ALBUQUERQUE PACHECO ANDRADE

## **Desenvolvimento de uma interface sensorial sem fios para optogenética**

Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo como parte para obtenção do título de Doutor em Ciências, Programa de Engenharia Elétrica

Área de Concentração:  
Processamento de Sinais e Instrumentação  
Orientador: Prof. Dr. João Paulo Pereira do Carmo

São Carlos  
2022



RODRIGO DE ALBUQUERQUE PACHECO ANDRADE

## **Desenvolvimento de uma interface sensorial sem fios para optogenética**

### **Versão Corrigida**

Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo como parte para obtenção do título de Doutor em Ciências, Programa de Engenharia Elétrica

Área de Concentração:  
Processamento de Sinais e Instrumentação  
Orientador: Prof. Dr. João Paulo Pereira do Carmo

Trata-se da versão corrigida da tese. A versão original se encontra disponível na EESC/USP que aloja o Programa de Pós-Graduação de Engenharia Elétrica.

São Carlos  
2022

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,  
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS  
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da  
EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

D553d de Albuquerque Pacheco Andrade, Rodrigo  
Desenvolvimento de uma interface sensorial sem  
fios para optogenética / Rodrigo de Albuquerque  
Pacheco Andrade; orientador João Paulo Pereira do  
Carmo. São Carlos, 2022.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia Elétrica e Área de Concentração em  
Processamento de Sinais e Instrumentação -- Escola de  
Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo,  
2022.

1. Optogenética. 2. Wireless. 3. Interface  
Sensorial. 4. Aquisição de Biopotencial. 5.  
Instrumentação Médica. I. Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907



## FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Engenheiro **RODRIGO DE ALBUQUERQUE PACHECO ANDRADE**.

Título da tese: "Desenvolvimento de uma interface sensorial sem fios para optogenética".

Data da defesa: 21/10/2022.

### Comissão Julgadora

### Resultado

Prof. Associado **João Paulo Pereira do Carmo**  
**(Orientador)**  
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC-USP)

APROVADO

Prof. Dr. **José Alberto Peixoto Machado da Silva**  
(Universidade do Porto/U.Porto)

APROVADO

Prof. Dr. **Eduardo Columbari**  
(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita filho"/UNESP-  
Araraquara)

APROVADO

Prof. Associado **Thiago dos Santos Moreira**  
(Instituto de Ciências Biomédicas/ICB-USP)

APROVADO

Prof. Dr. **João Paulo Ramos Teixeira**  
(Instituto Politécnico de Bragança/IPB-Portugal)

APROVADO

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica:  
Prof. Dr. **João Bosco Augusto London Junior**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:  
Prof. Titular **Murilo Araujo Romero**



## Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus Pais,  
Maria Lêda de Albuquerque Pacheco e Paulo Braz de Andrade (*In memoriam*)  
E também dedico este trabalho a minha querida esposa e filho,  
Camila Ferreira Paes Andrade e Eduardo Paes Andrade



## Agradecimentos

Ao meu professor e orientador João Paulo Pereira do Carmo pela orientação, dedicação, ensinamentos, incentivo e apoio desde sempre.

Ao Professor Sergio Mascarenhas (*In memoriam*), pelo compartilhamento da jornada, ensinamentos, incentivos e transmissão da infinita paixão pela ciência.

Aos amigos e companheiros do time de engenharia que participam ou já participaram da jornada deste projeto, em especial ao Helder, Caio, Brunelli, Marcos, Mateus, Luis Felipe e João Bataglia, fundamentais para o sucesso no desenvolvimento do hardware, firmware, software e realização dos testes. Sem a participação de cada um de vocês esse projeto não teria sucesso e futuro.

Ao Professor Eduardo Colombari e seu doutorando Pedro Katayama, por todo o suporte no planejamento, no levantamento de requisitos, nos ensaios e na caracterização do sistema em bancada e em animais.

Ao Professor Thiago Moreira e a seu doutorando Cleyton Sobrinho pela abertura da oportunidade de parceria e realização do primeiro experimento piloto em animais do projeto.

À toda diretoria da Braincare e principalmente ao Plínio, Bremer, Arnaldo e Gustavo pela oportunidade de trilharmos juntos essa jornada científica de desenvolvimento de soluções e tecnologias na busca contínua por saúde e felicidade.

Aos demais amigos da Braincare, das equipes de Pesquisa, DHO, Digital, Analytics, Marketing, Financeiro, Operacional, Acesso e Adoção pela oportunidade de evoluirmos juntos no desenvolvimento e sucesso da brain4care;

À Yvoninha, Janaina, Professora Yvonne e Paulinho, por todo o suporte, incentivo e carinho durante a jornada do desenvolvimento desta tese e da minha jornada como pesquisador, cientista e engenheiro.

À minha querida madrinha Solange e à minha irmã Monique por todo o amor e companheirismo.

Ao meu Pai Paulo Braz (*In memoriam*) por sempre me incentivar aos estudos e mostrar que podemos e devemos sempre em pensar em retribuir para a sociedade, tudo aquilo que dela recebemos, sempre de maneira sustentável.

Aos meus irmãos, especialmente ao Gabriel, por todo o companheirismo e amizade crescente e verdadeira.

Ao meu pequeno grande filho Eduardo, que veio ao mundo durante o desenvolvimento deste trabalho e que no futuro poderá ler, se incentivar e ter gosto e amor pela ciência. Te amo incondicionalmente.

À minha querida esposa Camila, que incondicionalmente me apoiou, incentivou, acompanhou e contribuiu desde sempre nos meus sonhos e me deu estrutura incondicional para finalizar este trabalho. Te amo infinitamente.

À minha maravilhosa mãe que desde que eu era pequeno sonhava que um dia eu fosse “doutor”, e sempre fez de tudo e não mediu esforços para que eu chegasse lá. Foi e sempre será a minha maior incentivadora e fonte de inspiração. Meu amor e agradecimento eterno.

## Resumo

ANDRADE, R. A. P. (2022). **Desenvolvimento de uma interface sensorial sem fios para optogenética**. 2022. Tese (Doutorado Ciências pelo Departamento de Engenharia Elétrica) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

A ativação ou inibição de populações distintas de neurônios ou regiões cerebrais através de técnicas de atuação e controle é uma abordagem promissora para auxiliar no descobrimento do comportamento das funções cerebrais em diversas situações. A optogenética é um conjunto de ferramentas e técnicas que permitem o controle das funções cerebrais específicas através do uso da luz, de forma temporalmente e espacialmente precisa. Muitas das vezes, as redes neurais podem sofrer falhas devido à má formação genética ou doenças degenerativas que acabam interferindo no bom funcionamento do sistema nervoso. Com o uso dessas ferramentas, é possível estudar e mapear de forma precisa o comportamento do sistema nervoso dos animais. Trabalhos mais avançados na área necessitam de equipamentos robustos tanto para a atuação ótica quanto para aquisição de biopotenciais com diferentes canais com alta resolução e taxa de amostragem, obtendo mais controle dos efeitos nos neurônios impostos pelo uso da optogenética. Estes equipamentos geralmente são grandes, caros e necessitam de fios para entregar luz e receber os sinais neuronais, dificultando os estudos em animais cujo comportamento livre é necessário. Este trabalho desenvolve uma interface sensorial sem fios para optogenética, vestível e com possibilidade de customização de optrodos para diversas aplicações distintas. Além da evolução do desenvolvimento desta interface, este trabalho propiciará um planejamento para aplicação futura da Interface optogenética relacionada com o controle hemodinâmico em ratos.

Palavras-chave: Optogenética. Sem Fio. Interface Sensorial. Aquisição de Biopotencial. Instrumentação Médica.





## **Abstract**

ANDRADE, R. A. P. (2022). **Development of a wireless sensory interface for optogenetics**. 2022. Tese (Doutorado Ciências pelo Departamento de Engenharia Elétrica) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

The activation or inhibition of a distinct populations of neurons or brain regions through actuation and control techniques is a promising approach to aid in the discovery of the behavior of brain functions in various situations. Optogenetics is a set of tools and techniques that allow the control of specific brain functions using light, in a temporally and spatially precise manner. Neural networks can often fail due to genetic malformation or degenerative diseases that end up interfering with the proper functioning of the nervous system. With the use of these tools, it is possible to accurately study and map the behavior of the nervous system of animals. More advanced works in the area require a robust hardware setup both for optical and biopotential acquisition performance with different channels with high resolution and sample rate, obtaining more control of the effects on the neurons while using optogenetics. These devices are usually large, expensive and require fibers and wires to deliver light and receive neuronal signals, making it difficult to study animals whose freely behaving is required. This work develops a wearable wireless interface for optogenetics with the possibility of optrodes customization for several different applications. In addition to the evolution of the development of this interface, this work will provide a plan for future application of the optogenetic interface related to hemodynamic control in rats.

Keywords: Optogenetics. Wireless. Sensory Interface. Biopotential Acquisition. Medical Instrumentation.



## Sumário

1	Introdução .....	1
2	Tema e justificativa .....	5
2.1	Organização do trabalho .....	6
3	Revisão da literatura .....	7
3.1	O sistema nervoso do humanos.....	7
3.1.1	Sistema nervoso central .....	8
3.1.2	Sistema nervoso periférico .....	10
3.1.3	Células nervosas .....	14
3.1.4	Bioeletricidade .....	25
3.1.5	Estruturas do sistema nervoso dos humanos .....	35
3.2	Hemodinâmica .....	41
3.2.1	Coração .....	41
3.2.2	Vasos sanguíneos .....	43
3.2.3	Sangue .....	44
3.2.4	Fluxo sanguíneo .....	44
3.2.5	Pressão arterial.....	46
3.2.6	Resistência vascular.....	48
3.2.7	Retorno venoso .....	49
3.2.8	Líquor e a pressão intracraniana .....	50
3.2.9	Mecanismos de controle hemodinâmico.....	52
3.3	Instrumentação para aquisição de biossinais.....	55
3.3.1	Amplificadores de biossinais .....	56
3.3.2	Conversores analógicos digitais .....	58
3.3.3	Processamento, transmissão e interface .....	59
3.3.4	Bluetooth .....	60
3.4	A optogenética .....	65

3.4.1	A biologia molecular da optogenética .....	66
3.4.2	Instrumentação para optogenética .....	72
3.4.3	Sistemas optogenéticos sem fio .....	81
4	Desenvolvimento da interface sem fios para optogenética .....	86
4.1	Normas para dispositivos médicos e aplicações de optogenética em humanos .....	87
4.2	Levantamento de Requisitos e Arquitetura do Sistema.....	90
4.3	Desenvolvimento do hardware.....	96
4.3.1	Escolha dos componentes críticos .....	99
4.3.2	Desenvolvimento do módulo principal - Optobrain Interface .....	117
4.3.3	Optrodos.....	139
4.4	Desenvolvimento do software e dos firmwares .....	146
4.4.1	Arquitetura geral do sistema .....	146
4.4.2	Desenvolvimento do software.....	148
4.4.3	<i>Monitorization - Streaming e log</i> de Dados.....	153
4.4.4	Desenvolvimento do firmware.....	155
5	Materiais e Métodos .....	160
5.1	Protocolos de testes de bancada .....	160
5.1.1	Protocolo de testes do gerenciamento de energia.....	160
5.1.2	Protocolos de testes de Aquisição analógica .....	164
5.1.3	Protocolo de testes de transmissão de dados sem fio.....	173
5.1.4	Protocolo de testes de aquisição de dados de pressão.....	176
5.2	Preparação de experimento piloto com optogenética em camundongo	179
6	Resultados .....	183
6.1	Resultados dos testes de bancada .....	183
6.1.1	Análise do gerenciamento de energia .....	183
6.1.2	Resultados dos testes de aquisição analógica .....	189

6.1.3	Resultados dos testes de transmissão de dados sem fio .....	210
6.1.4	Resultados dos testes de aquisição de dados de pressão .....	213
6.2	Experimento piloto com optogenética em camundongo.....	216
7	Conclusões .....	219
8	Referências .....	222

## Lista de Figuras

Figura 1 - Camundongo sendo excitado com o uso de ferramentas optogenéticas (DEISSEROTH, 2015) .....	1
Figura 2 – Exemplo de microinterface sem fios suportada em infravermelho para estimulação ótica. (HASHIMOTO <i>et al.</i> , 2014).....	4
Figura 3 - Sistema Nervoso de um Humano (Servier Medical Art - Modificado)	7
Figura 4 - Sistema nervoso central de humanos (Servier Medical Art - Modificado).....	8
Figura 5 - Imagem do Encéfalo Humano e suas partes (Servier Medical Art - Modificado).....	9
Figura 6 - Sistema Nervoso Periférico em Humanos (Servier Medical Art - Modificado).....	10
Figura 7 – Nervos espinhais, Raízes Dorsais e Ventrals (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017).....	11
Figura 8 - Sistema Nervoso Simpático em Humanos (Servier Medical Art - Modificado).....	12
Figura 9 - Sistema Nervoso Parassimpático em Humanos (Servier Medical Art - Modificado).....	13
Figura 10 - Organização das células que compõem o tecido nervoso (Servier Medical Art) .....	15
Figura 11 - O Neurônio (Servier Medical Art - Modificado).....	16
Figura 12 - Formação do Axônio (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017) .....	17
Figura 13 - Terminação Axonal e a Sinapse (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017) .....	19
Figura 14 - Alguns tipos de Dendritos com diferentes estruturas (Servier Medical Art) .....	20
Figura 15 - Massa absoluta, número de neurônios e número de glias (non-neur) em um cérebro humano inteiro. Os valores são médias $\pm$ desvio padrão e se referem aos dois hemisférios juntos. As quantidades estão com unidade em bilhões. (AZEVEDO <i>et al.</i> , 2009).....	21
Figura 16 - Ilustração representando as células da glia do tipo Astrócitos. (Servier Medical Art).....	22

Figura 17 - Ilustração representando as células da glia do tipo Oligodendrócitos. (Servier Medical Art).....	23
Figura 18 - Ilustração representando as células da glia do tipo Microglia. (Servier Medical Art).....	23
Figura 19 - Ilustração representando as células da glia do tipo Ependimária. (Servier Medical Art).....	24
Figura 20 - Formação das células do sistema nervoso. (Servier Medical Art, Modificada).....	24
Figura 21 - Canais Iônicos de Sódio e Potássio nas células.....	27
Figura 22 - Medição do potencial de repouso da membrana. (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017) .....	28
Figura 23 - Potencial de ação (a) captado por um osciloscópio e suas (b) suas partes denominadas. (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017) .....	29
Figura 24 - Ilustração de algumas estruturas que compõem o encéfalo humano. (Servier Medical Art).....	36
Figura 25 - Mapa de Brodmann (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017).....	38
Figura 26 - Lobos Cerebrais (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017) .....	39
Figura 27 - Divisão do cérebro por áreas motoras, sensoriais e associativas. (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017) .....	39
Figura 28 - Subdivisão do córtex com áreas descritas. (Servier Medical Art - Modificado).....	40
Figura 29 - Visões superficial (superior) e seccional (Inferior) do coração humano.(FEHER, 2012).....	41
Figura 30 – Duas visões (lateral e frontal) da posição do coração dentro da cavidade torácica humana. (FEHER, 2012) .....	42
Figura 31 - Sequência de alguns eventos durante o ciclo cardíaco e seus efeitos na pressão. (FEHER, 2012).....	43
Figura 32 - Esquemático do fluxo sanguíneo e valores típicos de fluxos em repouso. (FEHER, 2012).....	46
Figura 33 - A pressão arterial para diferentes tipos de vasos sanguíneos (TORTORA; DERRICKSON, 2014).....	47
Figura 34 – Esquemático com os principais itens responsáveis pelo aumento da pressão arterial no corpo humano.(TORTORA; DERRICKSON, 2014) Adaptado.....	50

Figura 35 – Líquor cefalorraquidiano (Em azul escuro) e seu caminho no sistema nervoso central (Servier Medical Art - Modificado).....	51
Figura 36 - Localização dos barorreceptores em humanos (FEHER, 2012) ....	53
Figura 37 - Vias centrais para controle da frequência cardíaca e pressão arterial. (FEHER, 2012).....	54
Figura 38 - Gráfico com o comportamento e esquemático representando uma entrada pseudo-diferencial (TEXAS INSTRUMENTS, 2017a) .....	57
Figura 39 – Gráfico com o comportamento e esquemático representando uma entrada diferencial (TEXAS INSTRUMENTS, 2017a) .....	57
Figura 40 - Canais Bluetooth e suas frequências.(MATHWORKS, 2022) .....	60
Figura 41 - The Bluetooth Low Energy stack.(BLUETOOTH SIG, 2021) .....	62
Figura 42 - Opsinas e seus comportamentos perante comprimentos de onda específicos (ZHANG <i>et al.</i> , 2010).....	67
Figura 43 - Comprimentos de Onda de Luz e sua relação com as Opsinas (DEISSEROTH, 2010).....	68
Figura 44 – Árvore filogenética de Opsinas do Tipo I (ZHANG <i>et al.</i> , 2011) ....	71
Figura 45 - Gráfico do Pico de Ativação versus tempo de Cinética para vários tipos de Opsinas (YIZHAR <i>et al.</i> , 2011) .....	72
Figura 46 - Tipos de Canais Opsinas (DEISSEROTH, 2010).....	74
Figura 47 - A – Feixe de Luz emitido através de fibra não polida (A) e através fibra polida (B) (BRITT; MCDEVITT; BONCI, 2012) .....	75
Figura 48 - Esquemático de Optrodo 3D resultado de 15 optrodos dispostos 3 x 5. Cada optrodo promove simultaneamente a gravação de biopotencial e estimulação ótica através de uLEDs individualmente endereçáveis com diferentes comprimentos de onda e colimação usando microlentes. (GONCALVES <i>et al.</i> , 2017).....	76
Figura 49 - Trem de impulsos gerados em resposta a pulsação de luz para diferentes durações – 5 ms, 10 ms e 15 ms respectivamente (BOYDEN <i>et al.</i> , 2005) .....	77
Figura 50 - Efeitos indesejados na optogenética (WALZ, 2017) .....	78
Figura 51 - Esquema mostrando a regulação por PWM da intensidade do LED (CHEN <i>et al.</i> , 2017) .....	78
Figura 52 - Comparação da amplitude da foto-corrente evocada de um simples neurônio através de dois métodos de controle de intensidade luminosa.	



Controle de corrente DC (Esq.) e controle por PWM (Dir). (CHEN <i>et al.</i> , 2017)	79
Figura 53 - Representação esquemática de um sistema optogenético fornecido pela Thor Labs.	80
Figura 54 - Dispositivo para optogenética com ativação e aquisição de biopotencial (AMELI <i>et al.</i> , 2013)	82
Figura 55 - Dispositivo Implantável ultraminiaturizado da empresa Neurolux Inc. (YANG <i>et al.</i> , 2021)	83
Figura 56 – Dispositivo ultraminiaturizado, desenvolvido por pesquisadores da Neuralux, com capacidade de detecção do volume da bexiga de um rato. (a) arquitetura do sistema, (b) foto do sistema com proporção do tamanho, (c) ilustração do acesso cirúrgico para controle do volume da bexiga, (d) foto do animal em livre movimentação durante o experimento e (e) tomografia computadorizada do dispositivo ressaltando a posição do optrodo (OESS – Optoelectronic stimulation and sensing) e da interface principal (WCP – Wireless Control and Power) (MICKLE <i>et al.</i> , 2019)	85
Figura 57 - Arquitetura geral com os componentes da solução.	92
Figura 58 – Representação dos componentes elementares baseados nos requisitos para criação da arquitetura de hardware da interface	94
Figura 59 - Distribuição inicial dos componentes elementares planejados para a interface	94
Figura 60 – Pontos de teste em formato de <i>Teardrops</i> em uma placa de circuito impresso	98
Figura 61 - Analisador lógico Saleae. (SALEAE, 2022)	99
Figura 62 - Placa Intel Edison e sua arquitetura interna (Intel, 2014)	100
Figura 63 - Principais marcas pesquisadas de fabricantes de módulos bluetooth	102
Figura 64 - Módulo Bluetooth BMD-350 da Rigado (Rigado, 2018)	104
Figura 65 - Diagrama de Blocos dos módulos da Série BMD-300 da Rigado baseados no SoC nRF52832 (Rigado, 2018)	105
Figura 66 - Diagrama de blocos do ADS1299 (TEXAS INSTRUMENTS, 2017b)	107
Figura 67 - Placa de avaliação do ADS1299, Texas Instruments. (TEXAS INSTRUMENTS, 2017b)	108

Figura 68 - Diagrama Principal do Driver AS1109 (AMS - AS1109).....	109
Figura 69 - Diagrama de blocos com o esquemático interno do Driver (AMS - AS1109) .....	110
Figura 70 - Placa de Desenvolvimento do AS1109 .....	110
Figura 71 - Imagens dos modelos selecionados de conectores B2B da fabricante Hirose. <i>Header</i> (Esq.) e <i>Receptacle</i> (Dir.) .....	114
Figura 72 - Bateria modelo ICP621333PA-01 da fabricante Renata SA. ....	115
Figura 73 – Concepção inicial da disposição dos componentes e tamanho planejado da interface .....	117
Figura 74 - Layout proposto com posicionamento dos componentes (TEXAS INSTRUMENTS, 2017a) .....	118
Figura 75 - Esquemático de alimentação recomendada em modo Bipolar (TEXAS INSTRUMENTS, 2017a) .....	118
Figura 76 - Layout recomendado pela Texas Instruments para aquisição diferencial (TEXAS INSTRUMENTS, 2017b). .....	119
Figura 77 - Esquemático simplificado do componente LM27762 da Texas Instruments.....	120
Figura 78 - Esquemático de gerenciamento de energia da Optobrain Interface versão 1.0.....	121
Figura 79 - Esquema elétrico projetado para o conversor ADS1299 .....	122
Figura 80 - Esquemático projetado para o módulo bluetooth da Optobrain Interface versão 1.0.....	123
Figura 81 - Esquemáticos do módulo inercial e do conector de interface com o optrodo .....	124
Figura 82 - Projeto da PCB Optobrain Interface v1.0 .....	124
Figura 83 - Foto da PCB versão 1.0.2 montada e pronta para iniciar os testes .....	125
Figura 84 – <i>Layout</i> recomendado pelo fabricante do módulo BMD-350 (U1) contendo plano de terra (área em vermelho) mínimo para maior eficiência RF. ....	127
Figura 85 - Visão das camadas da placa de circuito impresso explicitando o plano de terra (Cinza escuro) e as áreas sem plano de terra (Branco).....	127

Figura 86 - Módulo Bluetooth NINA-B302 da fabricante u-blox e seu gráfico de potência de transmissão de acordo com sua antena tipo PIFA. (U-blox, USA)	129
Figura 87 - Esquemático do módulo bluetooth NINA-B302 da U-Blox.	130
Figura 88 - Esquemático de ligação do ADS1299 na versão 2.0 da Interface.	131
Figura 89 - Sugestão de atribuição dos pinos do board-to-board para melhor integridade do sinal feita pelo fabricante (Esquerda) e proposta final para o conector board-to-board de 40 pinos (Direita). (Hirose, Japão).	132
Figura 90 - Esquemático do conector board-to-board de interface com o optrodo seguindo a atribuição recomendada.	133
Figura 91 - Esquemático referente ao gerenciamento de energia da Optobrain Interface v2.0.	134
Figura 92 - Esquemáticos da interface contendo um LED RGB (Esquerda) e dois pontos para a solda de um botão externo (Direita) em modo <i>pull-up</i> .	134
Figura 93 – Desenho inicial da nova versão da placa e distribuição planejada dos componentes críticos.	135
Figura 94 - Projeto PCB Rígido-Flexível espelhado, mostrando ambas as faces da placa (Esquerda-Fundo da placa, Direita-Topo da placa).	136
Figura 95 - Planos de 3V3 e AGND nas camadas 2 e 3 da PCB.	137
Figura 96 - Destaque para as trilhas de alimentação de $\pm 2.5V$ e VIN.	138
Figura 97 - Cânulas para construção do optrodo. Cânula impressa em 3D (Esquerda) e Cânula da fabricante pela THORLABs	141
Figura 98 - Detalhes das pontas das fibras convencional e da usada na cânula da THORLABS.	141
Figura 99 – Oito exemplares de $\mu$ LEDs modelo DA2432 dentro da área circulado em preto.	142
Figura 100 - Dimensões do $\mu$ LED modelo DA2432 da Fabricante Cree.	142
Figura 101 - Placa de circuito com o $\mu$ LED soldado entre dois pads.	143
Figura 102 - Comparação da luminosidade emitida pelas cânulas.	143
Figura 103 - Setup inicial de teste do AS1109 com LEDs Cree.	144
Figura 104 – Primeiro projeto PCB customizado de optrodo criado pelo grupo.	144
Figura 105 - Primeiro optrodo fabricado pelo grupo com LED soldado.	145

Figura 106 - Visão final do optrodo 01 com dois LEDs da Dialight e cobertura com PDMS. ....	145
Figura 107 - Arquitetura geral detalhada do sistema.....	147
Figura 108 - Botões da tela inicial contendo as principais funções do Optobrain Software .....	149
Figura 109 - Padrão de acionamento de luz.....	151
Figura 110 - Tela de gerenciamento de rotinas de optogenética. ....	151
Figura 111 - Proposta inicial de tela de streaming dos dados. ....	153
Figura 112 - Imagem da Tabela contendo a comparação do formato TDMS junto aos principais tipos de arquivos existentes para log de dados. * As bases de dados podem exigir ferramentas extras no LabVIEW. (NI, 2022) .....	154
Figura 113 - Organização do formato TDMS.(NI, 2022).....	154
Figura 114 - Arquitetura do Firmware Optobrain .....	155
Figura 115 - Estrutura do pacote do protocolo proprietário Optobrain protocol .....	157
Figura 116 - Fluxograma contendo o esquema de gerenciamento de energia da PCB Optobrain Interface 2.0 .....	161
Figura 117 - Cinco topologias de testes de influência da alimentação.....	162
Figura 118 - Gráficos relacionado ao ruído de entrada disponibilizado no datasheet do ADS1299. Ruído de entrada pelo tempo (Esquerda) e Histograma de Ruído (Direita) para a taxa de amostragem de 250 Hz. ....	166
Figura 119 - Parte do esquemático da Optobrain Interface com destaque para o pino ADS_DRDY. ....	167
Figura 120 - Configurações de testes de CMRR modo AC. Diferencial à esquerda e Comum à direita. ....	170
Figura 121 - Esquema de montagem do teste de crosstalk. ....	171
Figura 122 - Setup de equipamentos para ensaio de taxa de transferências	174
Figura 123 - Tela do software <i>Wireshark</i> , responsável por capturar informações dos pacotes BLE transmitidos entre as placas. Destaque para informações referentes aos atributos do protocolo do bluetooth .....	175
Figura 124 - Arquitetura do SIMP (brain4care, Brasil).....	176
Figura 125 - Três morfologias de ondas de pressão distintas em suas alturas de Picos P1 e P2. - (1) Morfologia 1 com $P1 > P2$ , (2) Morfologia 2 com $P1 = P2$ e (3) Morfologia 3 com $P2 > P1$ . ....	178

Figura 126 - Setup completo do experimento de validação da aquisição de sinais derivados de sensores de pressão – (1) Visão geral do experimento, contendo uma garrafa cheia de água, com vias de acesso estanques na tampa e sensores de pressão posicionados e a eletrônica de aquisição abaixo. – (2) Detalhe do posicionamento do sensor não invasivo de captura da pressão – (3) Detalhe no retângulo vermelho da posição do microsenssor intraparenquimatoso da Codman, dentro de uma via com contato direto com o líquido e pressão interna – (4) Detalhe da eletrônica, contendo a Optobrain Interface alimentada por bateria com a conexão de ambos os sensores através do conector molex e o receptor dongle bluetooth próximo à interface. ....	178
Figura 127 – Camundongo em preparação para o experimento piloto de optogenética na bancada do laboratório do grupo NeuroBreath. ....	179
Figura 128 - Fontes de luzes sendo aplicadas na região de nervo vago no camundongo e posição do par de eletrodos de prata na região intercostal. (1) Aplicação do Laser através da cânula com fibra ótica; (2) Detalhe do posicionamento da fibra aplicando o laser de 473 nm; (3) Aplicação manual do optrodo desenvolvido na tese; (4) Detalhe da ponta do optrodo visto pelo microscópio. ....	180
Figura 129 - Setup em protoboard para validação da Optobrain Interface. (1) Placa de Desenvolvimento do AS1109 para ativação do Optrodo; (2) Bateria para alimentar a Interface; (3) Optobrain Interface v1.0.2; (4) <i>Front-End</i> Analógico com filtro passa baixa em protoboard; (5) Potenciômetro para ajuste de potência do LED na saída do AS1109; (6) Microcontrolador para envio de comando ao driver AS1109 em paralelo; ....	181
Figura 130 – Equipamentos de aquisição e ativação optogenética. (1) Pré Amplificador Diferencial de Biopotencial A-M Systems modelo 1700; (2) Interface de aquisição de dados CED modelo 1401; (3) Estimulador de onda, modelo S88 da Grass Techonolgies, USA; (4) Fonte de Laser (473 nm) com fibra acoplada da ThorLabs, USA, com potência ajustada em 12.5 mW. ....	182
Figura 131 - Aplicação manual do optrodo feito com LEDs sem uso de estereotáxico. ....	182
Figura 132 - Série temporal com janela de 50 ms mostrando o nível de interferência da alimentação nas quatro primeiras topologias. ....	183
Figura 133 - Comparação entre as topologias 2, 3 e 4. ....	184

Figura 134 - Comparação do efeito do ruído da alimentação nas topologias 3 e 4. ....	185
Figura 135 - Ruído da alimentação visto na topologia 5. ....	185
Figura 136 - Gráficos FFT para as topologias 1, 2, 3 e 4. ....	186
Figura 137 - Gráficos FFT para a topologia 5.....	186
Figura 138 - Ruído na entrada para ganho 2 e taxa de amostragem de 2000 Hz .....	191
Figura 139 - Ruído na entrada para ganho 4 e taxa de amostragem de 2000 Hz .....	192
Figura 140 - Ruído na entrada para ganho 8 e taxas de amostragem de 250 e 2000 Hz.....	193
Figura 141 - Ruído na entrada para ganho 12 e taxa de amostragem de 2000 Hz.....	194
Figura 142 - Ruído na entrada para ganho 24 e taxas de amostragem de 1000 (Esquerda) e 2000 (Direita) Hz.....	195
Figura 143 - Variação do offset relativo ao ganho da placa OPT004. ....	199
Figura 144 - Gráfico da relação da tensão de saída pelo ganho para seis canais.....	201
Figura 145 - Gráfico da resposta em frequência do filtro de decimação. ....	206
Figura 146 - Gráfico da resposta em frequência do filtro de decimação normalizado.....	206
Figura 147 - Resposta em frequência informada pelo datasheet do ADS1299. .....	206
Figura 148 -Curvas de linearidade sem e com o uso de filtros RC. ....	208
Figura 149 - Erro do ADC em função da tensão de entrada. ....	208
Figura 150 - Gráfico da taxa de transmissão pelo intervalo de conexão.....	211
Figura 151 - Gráfico da taxa de transmissão pela potência de saída do módulo .....	211
Figura 152 - Gráfico da taxa de transmissão pela duração do evento de conexão.....	212
Figura 153 - Série temporal do teste 1 com a aquisição dos dois tipos de sensores de pressão. ....	213
Figura 154 - Série temporal do teste 2 com a aquisição dos dois tipos de sensores de pressão. ....	214

Figura 155 - Série temporal do teste 3 com a aquisição dos dois tipos de sensores de pressão. ....	214
Figura 156 - Série temporal do teste 4 com destaque para o primeiro desnível mostrando as ondas de diferentes tecnologias, invasiva e não invasiva acompanhando a tendência. ....	215
Figura 157 - Foto da tela do software de aquisição Optobrain realizando a coleta do biopotencial durante experimento piloto. ....	216
Figura 158 - Registro de aquisição de EMG podendo perceber o efeito da respiração nas seleções em cinza como o efeito da movimentação do diafragma e batimento cardíaco nos picos como o da seleção em verde. ....	216
Figura 159 - Análise dos picos R para cálculo dos intervalos RR durante o experimento.....	217
Figura 160 - Análise Optogenética - Queda evidente da frequência cardíaca do camundongo durante o período de estimulação ótica.....	218

## Lista de Tabelas

Tabela 1 - Íons, suas concentrações e seus potenciais isolados .....	31
Tabela 2 – Exemplos de Biopotenciais, especificações e principais aplicações. (THAKOR, 2014) e (CORREIA; CARMO, 2013)- Adaptado.....	35
Tabela 3 - Classes dos dispositivos Bluetooth. ....	61
Tabela 4 - Formato do pacote de dados do protocolo BLE. ....	63
Tabela 5 - Opsinas, seus mecanismos, picos de ativação e cinéticas. (YIZHAR <i>et al.</i> , 2011) .....	71
Tabela 6 - Cores e seus comprimentos de onda.....	73
Tabela 7 - Tabela comparativa de módulos bluetooth.....	103
Tabela 8 - Tabela resumida do módulo BMD-350.....	104
Tabela 9 - Tabela comparativa entre ADCs .....	106
Tabela 10 - Comportamento do ADS1299 de acordo com os ganhos (1 e 2) para as frequências de amostragem.(TEXAS INSTRUMENTS, 2017b) .....	108
Tabela 11 - Tabela comparativa entre conectores B2B da fabricante Hirose. ....	112
Tabela 12 - Especificações da bateria ICP621333. (Renata batteries, Suíça) .....	116
Tabela 13 - Tabela de comparação de módulos bluetooth da u-blox contendo antena interna. ....	128
Tabela 14 - Comparação entre modelos específicos de LEDs para aplicação em optogenética.....	140
Tabela 15 - Configurações da receita de rotina optogenética. Cada padrão poderá receber as seguintes configurações.....	152
Tabela 16 - Percentual de dados úteis com relação ao número de bytes enviados por pacote. ....	157
Tabela 17 – Percentual de dados úteis teóricos comparados às características de tamanho dos conteúdos internos aos dados transmitidos pelo protocolo Bluetooth .....	158
Tabela 18 – Percentual de dados úteis relacionados com as configurações do bluetooth e do ADS1299 .....	158
Tabela 19 – Frequências, períodos e amplitudes das componentes de maior destaque do ruído da topologia 1.....	187
Tabela 20 - Comparativo entre as amplitudes da principal componente do ruído percebido de cada topologia .....	187



Tabela 21 - Perfis de consumo e suas características de energia .....	188
Tabela 22 - Comparação ruídos para ganho 1 (Valor medido / Valor de referência) .....	190
Tabela 23 - Comparação ruídos para ganho 2 (Valor medido / Valor de referência) .....	190
Tabela 24 - Comparação ruídos para ganho 4 (Valor medido / Valor de referência) .....	191
Tabela 25 - Comparação ruídos para ganho 8 (Valor medido / Valor de referência) .....	192
Tabela 26 - Comparação ruídos para ganho 12 (Valor medido / Valor de referência) .....	193
Tabela 27 - Comparação ruídos para ganho 24 (Valor medido / Valor de referência) .....	194
Tabela 28 - Análise de precisão da taxa de amostragem para 250 Hz. ....	196
Tabela 29 - Análise de precisão da taxa de amostragem para 500 Hz. ....	197
Tabela 30 - Análise de precisão da Placa OPT004 com taxas de amostragem de 1000 Hz e 2000 Hz.....	197
Tabela 31 - Variação de offset na placa OPT004 variando canal e ganho. ...	199
Tabela 32 - Análise do efeito do ganho na tensão de saída para cada canal.	200
Tabela 33 - CMRR para entrada DC considerando os 3 níveis de tensão aplicados. ( $V_1 = 0,2\text{ V}$ , $V_2 = 2\text{ V}$ e $V_3 = 3,8\text{ V}$ ) .....	201
Tabela 34 - CMRR para entrada AC para frequências de entrada de 1 e 100 Hz, com variação da taxa de amostragem de 250 a 2000 sps.....	202
Tabela 35 – Crosstalk entre os canais com frequência de 1 Hz e ganho de 1 V/V .....	203
Tabela 36 – Crosstalk entre os canais com frequência de 2 Hz e ganho de 1 V/V .....	203
Tabela 37 – Crosstalk entre os canais com frequência de 10 Hz e ganho de 1 V/V .....	204
Tabela 38 – Crosstalk entre os canais com frequência de 10 Hz e ganho de 2 V/V .....	204
Tabela 39 - Tabela do teste de linearidade. ....	207
Tabela 40 - Impedâncias de entrada dos canais sem filtro. ....	209
Tabela 41 - Setups e resultados da taxa de transmissão.....	210

### Lista de abreviaturas

$\mu$ LED	micro-LED
$\mu$ V	microvolts
AAMI	<i>association for the advancement of medical instrumentation</i> ou associação para o avanço da instrumentação médica
AAV	<i>adeno-associated virus</i> ou vírus adeno-associado
ABNT	associação brasileira de normas técnicas
AC	<i>alternate current</i> ou corrente alternada
AD	empresa Analog Devices
ADC	<i>analog-to-digital converter</i> ou conversor analógico-digital
ANATEL	agência nacional de telecomunicações
ARM	<i>advanced RISC machine</i>
ASCII	<i>american standard code for information interchange</i> ou código padrão americano para o intercâmbio de informação
BLE	<i>Bluetooth low energy</i>
bps	<i>bits per second</i> ou bits por segundo
BR	<i>basic rate</i>
CEUA	comissão de ética no uso de animais da USP
ChR2	<i>channelrhodopsin-2</i>
CMRR	<i>common mode rejection ratio</i> ou razão de rejeição em modo comum
COTS	<i>components off-the-shelf</i>
CSV	<i>comma-separated values</i> ou valores separados por vírgula
CVLM	<i>caudal ventrolateral medulla</i> ou bulbo ventrolateral caudal
DAC	<i>digital-to-analog converter</i> ou conversor digital-analógico
DC	débito cardíaco
DC	<i>direct current</i> ou corrente contínua

DC/DC	<i>direct current/direct current</i>
DDR	<i>double data rate</i>
DFU OTA	<i>data firmware upgrade over the air</i> ou atualização de <i>firmware</i> pelo ar através da própria ligação sem fios
DNA	ácido desoxirribonucleico
DS	débito sistólico
DSP	<i>digital signal processing</i> ou processador digital de sinal
ECG	eletrocardiograma
EcoG	eletrocorticograma
EDR	<i>endpoint detection and response</i>
EDR	<i>enhanced data rate</i>
EEG	eletroencefalograma
EEPROM	<i>electrically erasable programmable read-only memory</i> ou memória somente de leitura programável apagável eletricamente
EESC	Escola de Engenharia de São Carlos
EMG	eletromiograma
ENOB	<i>effective number of bits</i> ou número efetivo de bits
EOG	eletro-oculograma
ESD	<i>electrostatic discharge</i> ou descarga eletroestática
FC	frequência cardíaca
FCC	federal communications commission
FDA	foods and drug administration
FFT	<i>fast Fourier transform</i> ou transformada rápida de Fourier
FSR	<i>full-scale range</i> ou gama completa
GND	<i>ground</i> ou terra/massa
GPIO	<i>general purpose input/output</i>
I <sup>2</sup> C	<i>inter-integrated circuit</i>
I <sup>2</sup> S	<i>inter-IC sound</i>
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
IMU	<i>inertial measurement unit</i> ou unidade de medição inercial

INMETRO	instituto nacional de metrologia
IR	<i>infrared</i> , ou infravermelho
ISM	<i>industrial, scientific, and medical</i>
ISO	international organization for standardization ou organização internacional de normalização
kbps	<i>kilobits per second</i> ou kilobits por segundo
LDO	<i>low-dropout regulator</i> ou regulador de baixa queda
LE	<i>low energy</i>
LED	<i>light-emitting diode</i> ou diodo emissor de luz
LFP	<i>local field potential</i> ou potencial de campo local
LSB	<i>least significant bit</i> ou bit menos significativo
MCU	<i>microcontroller unit</i> ou microcontrolador
mA	miliamperes
mAh	miliamperes hora
mV	milivolts
NA	núcleo ambíguo
NaN	Not a Number
NFC	<i>near field communication</i>
NI	<i>National Instruments</i>
NpHR	<i>halorhodopsin</i>
NTS	núcleo do trato solitário
nV	nanovolts
OTS	<i>off-the-shelf</i> ou <i>de prateleira</i>
PA	pressão arterial
PCB	<i>printed circuit board</i> ou placa de circuito impresso
PDMS	<i>dimetil polissiloxano</i>
PHY	<i>physical</i>
PIC	pressão intracraniana
PIFA	<i>planar inverted F antenna</i> ou antena planar invertida em F
PWM	<i>pulse-width modulation</i> ou modulação por largura de impulsos

PZT	piezoelétrico
QFM	<i>quad flat no leads</i>
RC	<i>resistance and capacitor</i> ou resistência e capacitor
RF	<i>radio-frequency</i> ou radiofrequência
RGB	<i>red, green and blue</i> ou vermelho, verde e azul
RVLM	<i>rostral ventrolateral medulla</i> ou bulbo ventrolateral rostral
SAR ADC	<i>successive-approximation</i> ADC ou ADC de aproximações sucessivas
SAR	<i>successive-approximation register</i> ou registrador de aproximações sucessivas
SDK	<i>software development kit</i> ou kit de desenvolvimento de software
SIG	<i>special interest group</i> ou grupo de interesses especiais
SIMP	SIMulador de Pressões
SMD	<i>surface-mount device</i> ou dispositivo de montagem superficial
SN	sistema nervoso
SNAP	sistema nervoso autônomo ou SNP Visceral
SNAP	sistema nervoso parassimpático
SNAS	sistema nervoso simpático
SNC	sistema nervoso central
SNP	sistema nervoso periférico
SoC	<i>system-on-chip</i> ou sistema em um <i>chip</i>
SPI	<i>serial peripheral interface</i>
sps	<i>samples per second</i> ou amostras por segundo
TDMS	structured, binary file format
TP	<i>test point</i> ou ponto de teste
UART	<i>universal asynchronous receiver/transmitter</i>
UDP	<i>user datagram protocol</i>
UL	UL Solutions – Safety organization
ULP	<i>ultra low-power</i>
USB	<i>universal serial bus</i> ou barramento universal série

USP Universidade de São Paulo

VChR1 *volvox-channelrhodopsin-1*

XML *standard generalized markup language* ou linguagem padronizada de marcação genérica

## 1 Introdução

A Optogenética é a combinação de métodos genéticos com óticos para alcançar ganhos ou perdas de funções ou eventos bem definidos em células específicas de tecidos vivos. (DEISSEROTH, 2011). A tecnologia combina ferramentas genéticas de controle segmentáveis a regiões com células específicas e que respondem à luz, e tecnologias para entregar a luz nos locais sob investigação de forma controlada.

Os principais tipos de células estudadas atualmente são as **células do sistema nervoso** pois este é o responsável pela transmissão de sinais entre diferentes áreas do corpo coordenando suas ações voluntárias e involuntárias. Para isso, a optogenética faz uso de proteínas opticamente ativadas (**opsinas**) para controle de funções neuronais, sendo uma metodologia em desenvolvimento na neurociência na busca do conhecimento sobre o sistema neurológico. As técnicas de optogenética proveem um meio de ativação ou inibição de populações distintas de neurônios com precisão sem precedente no âmbito espacial, temporal e neuroquímico. Estas técnicas são o único método disponível capaz de ativar populações neuronais específicas incorporadas em estruturas densas e heterogêneas em um período de milissegundos. (BRITT; MCDEVITT; BONCI, 2012)

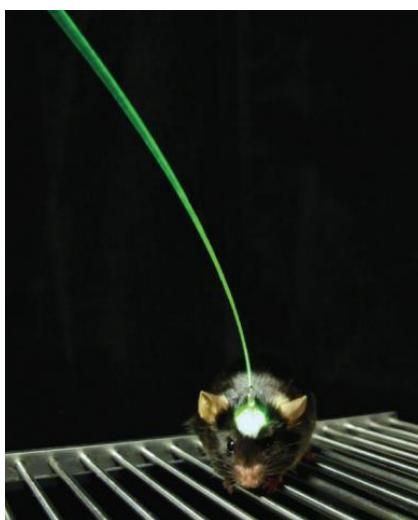


Figura 1 - Camundongo sendo excitado com o uso de ferramentas optogenéticas (DEISSEROTH, 2015)

O cérebro humano é considerado o mais fascinante existente em termos de número de neurônios e número de conexões neuronais, sendo composto por aproximadamente 86 bilhões de neurônios. O **neurônio** é constituído por duas partes, sendo uma região central que contém o núcleo chamada de **Soma** e numerosos tubos finos, que irradiam da região central, chamados de **Neuritos**. Os Neuritos são divididos em Axônios e Dendritos (WOOLSEY; HANAWAY; GADO, 2017). Os neurônios estão conectados a outros neurônios através de sinapses e o conjunto de neurônios conectados formam uma grande rede interconectada, chamada de **rede neural**. Esta rede possui uma grande capacidade de processamento e armazenamento de informação.

O sistema nervoso é formado por um grande conjunto complexo de neurônios, onde a comunicação é realizada através de impulsos, ou potenciais de ação que passam para outros neurônios através das sinapses. As sinapses, quando elétricas, podem ser transmitidas através de diferentes concentrações de íons de sódio e potássio de forma extremamente rápida, onde o disparo de um potencial de ação em um neurônio (pré-sináptico) gera a transmissão de um impulso para outros neurônios (pós-sinápticos), tornando-os mais ou menos provável que estes disparem seus próprios potenciais de ação. Para que estes potenciais de ação de fato ocorram, é importante que o **somatório** destes impulsos recebidos seja suficiente para alcançar o potencial de ação que dispara os impulsos. A integração de potenciais que ocorrem em locais diferentes dos neurônios, mas ao mesmo tempo, são chamados de **somatórios espaciais**. A integração de potenciais que ocorrem no mesmo lugar, mas em momentos ligeiramente diferentes são chamados de **somatórios temporais**.

O comportamento neuronal muitas das vezes podem sofrer falhas devido à má formação genética ou doenças degenerativas que acabam interferindo no bom funcionamento do sistema nervoso. A optogenética chega com esse conjunto de ferramentas que auxiliam e propiciam o estudo do comportamento desta grande rede, ativando ou inibindo propositalmente e com precisão, certas populações neuronais. Sabe-se que as células neuronais geralmente não são naturalmente influenciáveis com eficiência por luz. E por



isso, é necessário criar a funcionalidade de sensibilização à luz nas células onde se busca o controle. Uma das formas é recorrendo ao uso de opsinas.

As opsinas são um grupo de proteínas sensíveis à luz e funcionam como canais na membrana das células que quando ativadas, podem permitir que íons positivos ou íons negativos específicos entrem na célula, facilitando ou dificultando o potencial de ação daquele conjunto de células alvo na presença de luz. Cada tipo de opsina é sensível a um comprimento (ou faixa de comprimento) de onda específico e permite seletivamente a passagem de tipos íons específicos. As mais conhecidas e utilizadas, são opsinas do tipo microbiais, como a ChR2 (Channelrhodopsin-2), VChR1 (Volvox-Channelrhodopsin-1) e NpHR (Halorhodopsin). Essas opsinas podem ser entregues nos neurônios de diversas formas, onde a mais comum é através de vetores virais.

Uma vez que o neurônio possua certas opsinas em sua membrana celular, é necessário no mínimo um conjunto de ferramentas ópticas devidamente instaladas para que ocorra o processo de excitação através da iluminação direta destes neurônios. Além da atuação óptica, a aquisição de biopotencial local é de extrema importância para analisar o comportamento e eficiência da atuação óptica realizada.

Diversas tecnologias no ramo da instrumentação optogenética vêm sendo desenvolvidas e evoluídas para entregar de forma cada vez mais fácil e com eficiência a atuação das células modificadas e a leitura de suas repostas. As principais ferramentas em uso, são lasers dispostos em equipamentos de bancada que através de fibras-ópticas realizam a entrega da luz com potência e comprimentos de onda ótimos para as células alvo.

Tecnologias sem fio também vêm se mostrando muito promissoras no estudo com optogenética. Com tamanhos cada vez menores, instrumentações vestíveis/implantáveis têm sido desenvolvidas permitindo o controle de animais com comportamentos livres, ampliando o campo de estudos e diminuindo estresses gerados pela presença de fios e fibras pendurados.

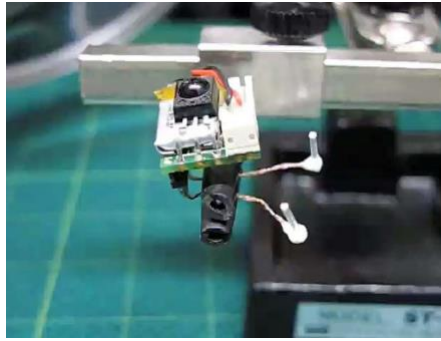


Figura 2 – Exemplo de microinterface sem fios suportada em infravermelho para estimulação ótica.  
(HASHIMOTO *et al.*, 2014)

Para concluir, a Figura 2 mostra uma interface controlada sem fios suportada por luz infravermelha, a qual possui dois canais optrodos de excitação neuronal compostos por LEDs guiados por fibra-ótica.

## 2 Tema e justificativa

A optogenética foi escolhida em 2010 como o método do ano entre todas as áreas da ciência e engenharia pelo Jornal especializado em pesquisas interdisciplinares ***Nature Methods***. Destacada em 2005 por Deisseroth em Stanford nos estados unidos (BOYDEN *et al.*, 2005) a optogenética é uma área de exponencial crescimento. Entretanto sua aplicação atualmente é limitada aos laboratórios que possuem os instrumentos (complexos, grandes e caros) e dominam os processos e ferramentas optogenéticas.

A crescente demanda por dispositivos cada vez mais compactos, inteligentes, conectados e de baixo custo é uma tendência em diversas áreas, propiciando uma disseminação do uso dessas tecnologias. A integração dessa tendência com a optogenética cria a possibilidade de aumentar o acesso e incentivar as pesquisas em neurociências desvendando o comportamento do cérebro diante de diversas situações, normais, patológicas ou situacionais, identificando redes de neurônios particulares e suas complexas responsabilidades e feitos perante o sistema nervoso e o corpo humano. Diversos trabalhos em pesquisas translacionais têm sido realizados principalmente em roedores na busca do conhecimento do comportamento do cérebro com a possibilidade de controle temporalmente e espacialmente precisos através da optogenética.

Este trabalho tem o objetivo principal de desenvolver um microssistema neuronal wireless para uso em optogenética. Os objetivos específicos são:

- Realizar um estudo sobre as especificações necessárias para o desenvolvimento de interfaces optogenéticas com aquisição de biopotencial e outros biossinais;
- Desenvolvimento do projeto e execução de uma interface wireless para optogenética com aquisição de biopotencial;
- Verificação, validação e caracterização da interface, com testes em laboratório, demonstrando a eficiência na atuação e na aquisição de biossinais sem perdas de informação;
- Planejamento e testes do uso da interface para experimentos *in vivo* com intenção futura de controle hemodinâmico.

## 2.1 Organização do trabalho

Esta tese de doutorado foi organizada e formatada seguindo as diretrizes para apresentação de teses da EESC-USP, de forma a manter o padrão para facilitar a leitura e um bom entendimento desse trabalho interdisciplinar. Para tanto este documento é composto pelas seguintes partes:

*Capítulo 1:* Introdução onde se apresenta os conceitos fundamentais e de interfaces para uso em optogenética.

*Capítulo 2:* São apresentados o tema e sua justificativa, seguido dos objetivos específicos e a organização do trabalho.

*Capítulo 3:* Apresenta a revisão da literatura abordando o sistema nervoso e suas diversas características, a hemodinâmica e seus mecanismos naturais de controle, a instrumentação médica focando na aquisição de biopotenciais e finaliza abordando a Optogenética e sua instrumentação abordando as características principais.

*Capítulo 4:* Neste capítulo é descrito todo o Desenvolvimento da Interface sem fios para optogenética e sua evolução.

*Capítulo 5:* Materiais e métodos contendo todos os protocolos dos testes em bancada e do piloto em animais.

*Capítulo 6:* Contém os resultados dos testes feitos em bancadas e do piloto feitos em animais.

*Capítulo 7:* São apresentados as conclusões e perspectivas futuras no projeto e evolução da Interface.

### 3 Revisão da literatura

A Revisão da literatura deste trabalho, como a primeira do grupo que trabalha a temática da optogenética, aborda todas as áreas que envolvem este desenvolvimento, desde o conhecimento da hemodinâmica, do sistema nervoso e suas especificidades elétricas, passando pela biologia molecular neuronal com os seus canais de íons responsáveis pelos potenciais intracelulares, instrumentação médica para aquisição de bio-sinais até uso da optogenética para controlar o sistema mais complexo do mundo, o Sistema nervoso.

#### 3.1 O sistema nervoso do humanos

O **sistema nervoso** (SN) é responsável pela transmissão de sinais entre diferentes áreas do corpo coordenando suas ações voluntárias e involuntárias. O SN de uma forma geral, é constituído pelo sistema nervoso central (SNC) e o sistema nervoso periférico (SNP).

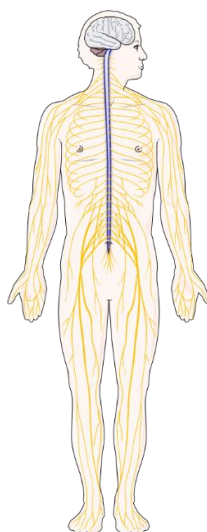


Figura 3 - Sistema Nervoso de um Humano (Servier Medical Art - Modificado)

### 3.1.1 Sistema nervoso central

O **sistema nervoso central** é formado pelo encéfalo e pela medula espinhal como mostrado na figura abaixo:

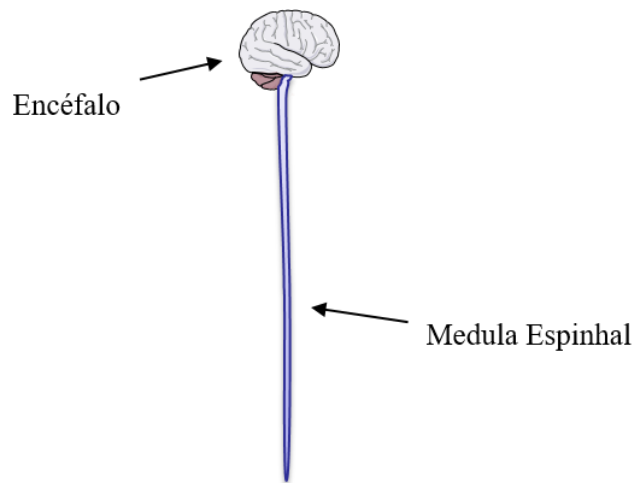


Figura 4 - Sistema nervoso central de humanos (Servier Medical Art - Modificado)

É no SNC que toda análise de informações ocorre. Uma característica do SNC é que ele é todo protegido e envolvido pelos ossos. O **encéfalo**, que é composto pelo cérebro, cerebelo e tronco encefálico é protegido pelo crânio. A medula espinhal é envolvida pela coluna vertebral óssea e se liga ao encéfalo através do tronco encefálico.(BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017)

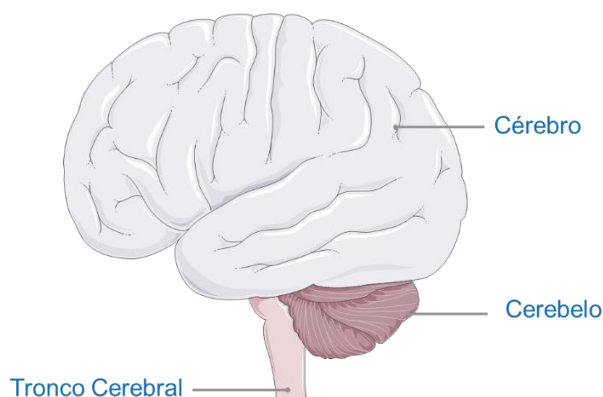


Figura 5 - Imagem do Encéfalo Humano e suas partes (Servier Medical Art - Modificado)

A maior parte do encéfalo é composta pelo **cérebro**. Ele é composto por dois hemisférios. Geralmente, o hemisfério esquerdo recebe sensações e controla o movimento do lado direito do corpo. A recíproca para o hemisfério direito é a mesma. É no cérebro que a maioria das informações são processadas. Ele será mais bem detalhado ao decorrer do trabalho.

O **cerebelo** está situado posterior ao cérebro. Responsável principalmente pelo controle do movimento, seus hemisférios, ao contrário do cérebro, não estão invertidos. Apesar do seu pequeno tamanho, possui aproximadamente quatro vezes quantidade de neurônios que os dois hemisférios cerebrais juntos (AZEVEDO *et al.*, 2009).

O **tronco encefálico** ou **tronco cerebral** é responsável por retransmitir informações do cérebro à medula espinhal, afinal, é por ele também que passam todos os axônios que levam as informações dos neurônios do encéfalo à medula. Possui papel importante na regulação das funções vitais, como a respiração, a consciência e o controle da temperatura corporal. (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017)

A **medula espinhal** é o maior condutor de informações do corpo ao cérebro e vice-versa. Ela se comunica com o corpo através dos nervos espinhais, ligando pele, articulações, músculos e outros órgãos ao cérebro.

### 3.1.2 Sistema nervoso periférico

O **sistema nervoso periférico** consiste nos neurônios e partes dos neurônios encontrados em sua maioria fora do SNC, incluindo os neurônios sensoriais e neurônios motores. Os neurônios sensoriais trazem sinais para o SNC e os neurônios motores levam os sinais do SNC. Ele está presente em praticamente todo o corpo e é formado por fibras nervosas, gânglios nervosos e órgãos terminais dividido em duas partes: Somático e o Autônomo. A Figura 6 mostra uma imagem que representa o SNP.

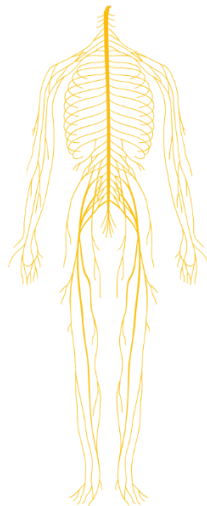


Figura 6 - Sistema Nervoso Periférico em Humanos (Servier Medical Art - Modificado)

#### 3.1.2.1 Sistema nervoso somático

O **SNP somático** é responsável pela inervação da musculatura esquelética da qual são derivadas as ações voluntárias do corpo e pela percepção de estímulos externos – sensorial –, como tato, dor, calor e etc. Os corpos celulares dos neurônios somatosensoriais estão localizados fora da medula espinhal em agrupamentos chamados de **gânglios da raiz dorsal**. Os



corpos celulares dos neurônios motores estão dentro do SNC. As localizações dos corpos celulares são estratégicas para garantir velocidade na sensibilização e na geração de respostas musculares. Os Axônios entram e saem (Axônios Aferentes e Eferentes, respectivamente) da medula espinhal através das raízes dorsais e ventrais respectivamente como mostrado na **Figura 7**.

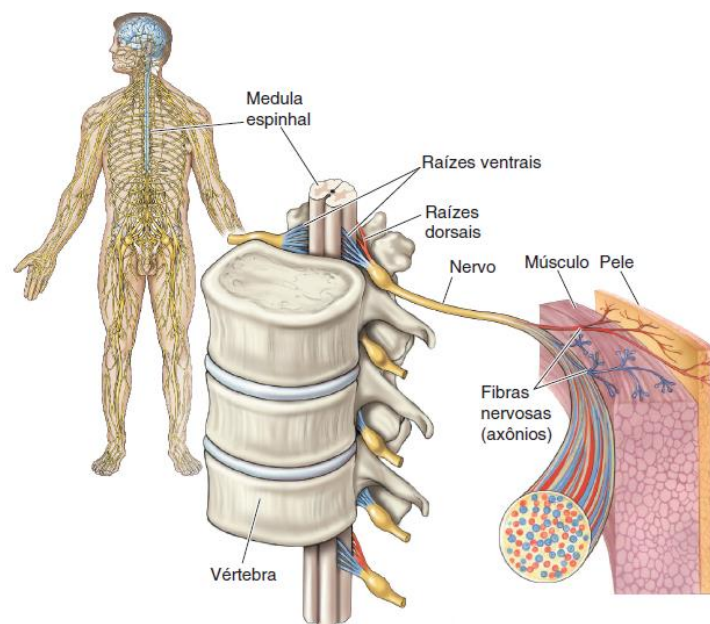


Figura 7 – Nervos espinhais, Raízes Dorsais e Ventrais (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017)

### 3.1.2.2 Sistema nervoso autônomo

O **SNP Autônomo**, também conhecido como **SNA**, neurovegetativo ou SNP Visceral é dividido pelos Sistemas Nervosos Simpático (SNAS) e parassimpático (SNAP) e consiste em neurônios que inervam órgãos internos, vasos sanguíneos e glândulas. Os axônios sensoriais viscerais transmitem as informações sobre funções viscerais para o SNC, como pressão, temperatura, PH, e porcentagem de Oxigênio e Dióxido de Carbono do sangue arterial por exemplo. As fibras viscerais motoras comandam por exemplo, a contração e relaxamento dos músculos que formam a parede intestinal, a frequência

cardíaca e o diâmetro dos vasos sanguíneos. A pressão arterial (PA) neste caso é controlada pelo SNA por meio da frequência cardíaca que regula o fluxo sanguíneo e do diâmetro dos vasos que levam o sangue arterial e devolvem o sangue venoso.

A **Figura 8** e a **Figura 9** abaixo, mostram os SNAS e SNAP. As diferenças entre os dois sistemas podem ser vistas do ponto de vista anatômico, farmacológico e fisiológico. Aqui ressaltaremos as diferenças anatômicas e fisiológicas.

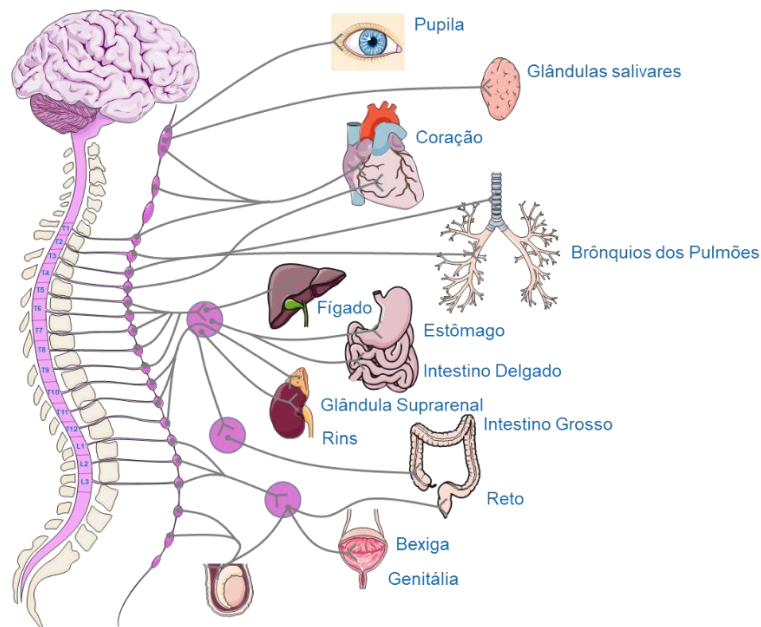


Figura 8 - Sistema Nervoso Simpático em Humanos (Servier Medical Art - Modificado)

Anatomicamente, no SNAS os neurônios pré ganglionares abrangem todos os segmentos medulares torácicos e os dois primeiros segmentos medulares lombares (De T1 a L2), sendo classificados como Tóraco-lombares. (PURVES *et al.*, 2012)

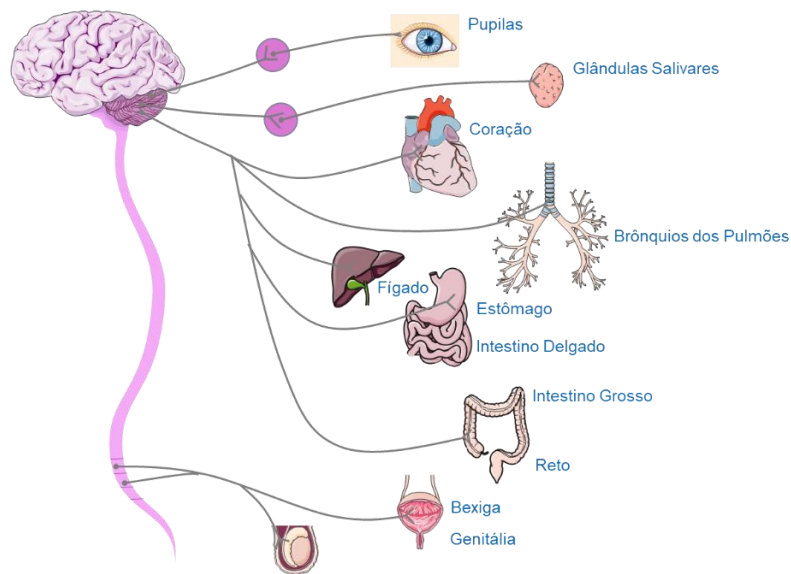


Figura 9 - Sistema Nervoso Parassimpático em Humanos (Servier Medical Art - Modificado)

No SNAP, a anatomia se distingue por conta dos neurônios pré ganglionares terem sua origem no tronco encefálico e nos segmentos sacrais S2 a S4, sendo classificados como Crânio-Sacrais. (PURVES *et al.*, 2012)

Com relação às diferenças fisiológicas, o SNAS geralmente atua de forma contrária ao SNAP em um determinado órgão, mas sempre de forma harmônica. O SNAP apresenta ação localizada por órgão ou região do organismo. O SNAS atua de forma difusa atingindo vários órgãos, conforme as figuras acima ilustram.

### 3.1.2.3 Quantidade de neurônios em humanos

Antigamente se pensava que no cérebro humano existiam cerca de 100 bilhões de neurônios e 1 trilhão de células gliais (Dez vezes o número de neurônios). Entretanto em 2009 cientistas brasileiros (AZEVEDO *et al.*, 2009) criaram uma técnica chamada de fracionamento isotrópico, onde puderam contar de forma precisa o número de células do cérebro. Essa técnica destrói a parede das células nervosas através do uso de um detergente deixando seus núcleos intactos transformando o cérebro em uma sopa de núcleos de forma

isotrópica e homogênea. Foram utilizados quatro cérebros de homens brasileiros com idades de 50, 51, 54 e 71, com óbitos por causas não neurológicas.

O Resultado da contagem mostra que o cérebro humano possui em média **86.1 bilhões de neurônios** e **84.6 bilhões de células gliais**. Apenas 19% de todos os neurônios encontrados no cérebro humano estão localizados no córtex cerebral, enquanto o tamanho do córtex representa cerca de 82% da massa cerebral.(AZEVEDO *et al.*, 2009)

Atualmente, estudos comparando o número de neurônios, com o peso cerebral e o peso total do corpo têm sido realizados em vários animais, comparando densidades em determinados locais do cérebro, dobras, gasto energético e etc..(MOTA; HERCULANO-HOUZEL, 2015)(AZEVEDO *et al.*, 2009).

Ainda de acordo com (AZEVEDO *et al.*, 2009) o número de neurônios encontrados no cerebelo dos humanos é cerca de 80,2% contra apenas 10.3% da massa total

### 3.1.3 Células nervosas

Todos os tecidos e órgãos do corpo são formados por células cujas funções especializadas e o modo como interagem determinam as funções dos órgãos. O cérebro é um órgão – seguramente, o mais sofisticado e complexo que a natureza inventou. Para entender seu funcionamento é necessário compreender as ações individuais e combinadas das células nervosas.

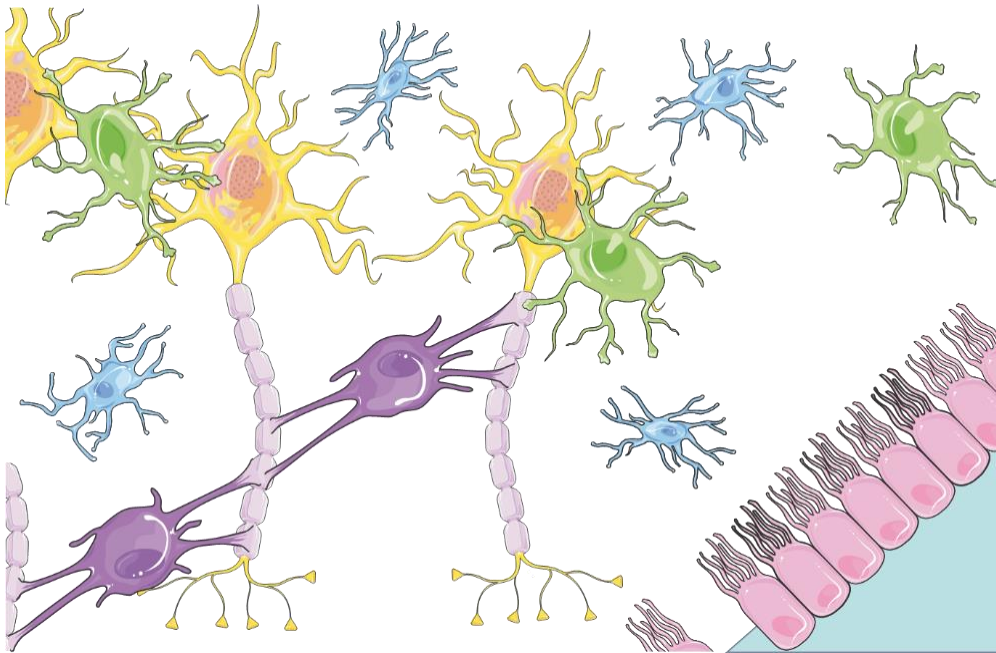


Figura 10 - Organização das células que compõem o tecido nervoso (Servier Medical Art)

O conteúdo interno de um neurônio é separado do meio externo pela membrana neuronal sustentada por um esqueleto interno chamado de **citoesqueleto** dando a cada parte da célula sua aparência tridimensional característica. Como já citado anteriormente, existem dois diferentes tipos celulares no sistema nervoso. *Glíias e Neurônios*.

### 3.1.3.1 Neurônio

O **neurônio** é constituído por duas partes: Uma região central que contém o núcleo chamada de **Soma** e numerosos tubos finos, que irradiam da região central, chamados de **Neuritos**. Os Neuritos são divididos em Axônios e Dentritos. O corpo de um neurônio geralmente origina apenas um axônio.(WOOLSEY; HANAWAY; GADO, 2017)

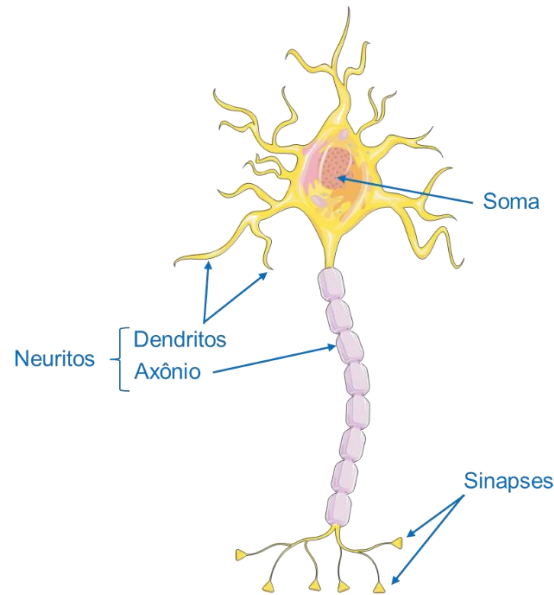


Figura 11 - O Neurônio (Servier Medical Art - Modificado)

O conteúdo interno de um neurônio é separado do meio externo pela membrana neuronal sustentada por um esqueleto interno chamado de citoesqueleto dando a cada parte da célula sua aparência tridimensional característica.

**O Soma** é a parte central do neurônio de forma aproximada a uma esfera, com aproximadamente 20  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Possui em seu interior um fluido aquoso composto por uma solução salina rica em potássio e organelas. As organelas encontradas nos neurônios são semelhantes àsquelas encontradas nas demais células do corpo, como o núcleo e o citoplasma (composto por retículos endoplasmáticos liso e rugoso, complexo de Golgi, mitocôndrias, etc.). (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017)

A função dos neurônios não pode ser compreendida sem o conhecimento prévio da estrutura e da função da membrana neuronal e de suas diversas proteínas associadas. Inclusive é o principal agente por onde a optogenética é aplicada. A sua notável capacidade de transferir sinais elétricos por todo o sistema só é possível pois a membrana seletivamente e quimicamente permite

ou bloqueia os impulsos através de canais de íons que serão vistos nos próximos capítulos.

Sendo assim, a **membrana neuronal** funciona como uma barreira seletiva que delimita o citoplasma internamente no neurônio impedindo a entrada de certas substâncias presentes nos fluidos externos que banham os neurônios. Ela possui cerca de 5 nanômetros de espessura e é toda engastada por proteínas. Algumas dessas proteínas bombeiam substâncias de dentro para fora. Outras proteínas regulam quais substâncias podem acessar o interior do neurônio. A composição proteica da membrana, varia de acordo com sua localização.

O **axônio** é uma estrutura exclusiva dos neurônios, altamente especializada nos processos de transferência de informações, cobrindo distâncias e enviando impulsos elétricos à locais distantes no sistema nervoso.

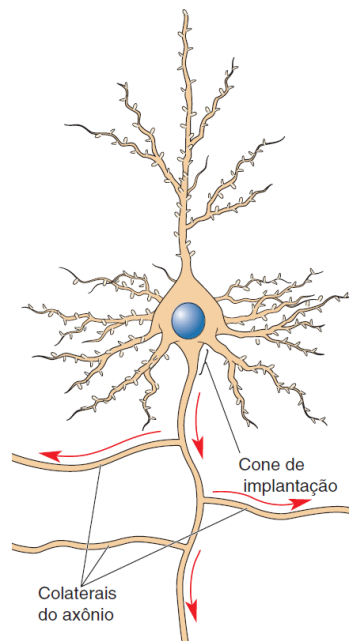


Figura 12 - Formação do Axônio (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017)

É iniciado a partir de uma região chamada de cone de implantação conforme mostrado na **Figura 12**, que se torna afilado para formar o segmento inicial e em alguns casos as suas colaterais.

Todas as proteínas presentes no axônio são derivadas do soma, pois o mesmo não possui ribossomos, não existindo assim a síntese proteica no local. As proteínas presentes na membrana dos axônios são as responsáveis pela alta capacidade de condução elétrica, transformando-os em verdadeiros condutores elétricos capazes de enviar informações ao longo de grandes distâncias. (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017)

O tamanho dos axônios pode chegar a mais de um metro de comprimento podendo ou não ser ramificados. A velocidade do sinal elétrico varia conforme o diâmetro do axônio, que varia desde menos de 1 um até cerca de 25 um em humanos. Assim como nos condutores metálicos, quanto maior o diâmetro do axônio, mais rápida é a transmissão do impulso. O fim do axônio é chamado de terminação axonal e é o local onde o neurônio entra em contato com outras células (Neuronais ou não) passando as informações nervosas para elas. Esse ponto de contato é chamado de sinapse e apresenta grande número de mitocôndrias, indicando alta demanda energética no local. (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017).

As **Sinapses** são pontos de contato utilizados para realizar comunicação com outros neurônios. Existem dois diferentes tipos de sinapses, as químicas e as elétricas. A maioria das sinapses são químicas, fazendo o uso de **neurotransmissores**, mensageiros químicos que carregam informação de um neurônio para o outro. A sinapse, assim como os potenciais neuronais serão abordados com mais detalhes no **Capítulo 3.2**.



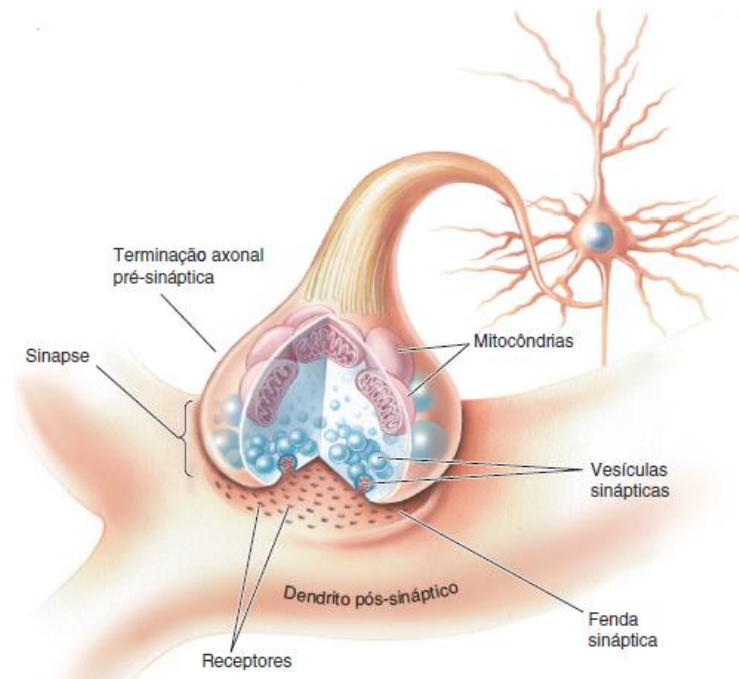


Figura 13 - Terminação Axonal e a Sinapse (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017)

**Os Dendritos** são neuritos responsáveis pela recepção das sinapses (milhares) destinadas ao neurônio. Seu nome é derivado da palavra árvore em grego pois estes neuritos lembram galhos. A classificação dos neurônios é baseada na grande variedade de forma e tamanho dessas árvores. Aliás, o termo árvore é utilizado para denominar um conjunto de dendritos de um único neurônio – **Árvore Dendrítica**. Cada ramo dessa árvore é chamado de **ramo dendrítico**.

A membrana dendrítica, localiza sob as sinapses de outros neurônios, também é conhecida como membrana pós-sináptica e apresenta muitas moléculas contendo proteínas chamadas de **receptores**, as quais detectam os neurotransmissores na fenda sináptica. A **Figura 13** acima apresenta uma Terminação Axonal com o Dendrito pós-sináptico representando a Sinapse.

O citoplasma dos dendritos, muitas vezes se assemelha ao citoplasma encontrado no axônio. O citoplasma é repleto de elementos do citoesqueleto para dar sua forma característica e de mitocôndrias devido à alta demanda energética, assim como na terminação axonal pré-sináptica. (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017)

Os neurônios podem ser classificados de acordo com sua expressão gênica ou sua estrutura. A classificação estrutural pode facilitar o entendimento sobre o funcionamento dessas células em conjunto. Alguns classificadores estruturais podem ser citados. São eles: Número de Neuritos, tipos de arborização dendrítica, tipos de conexões e comprimento do axônio. A **Figura 14** ilustra alguns tipos de dendritos com diferentes estruturas.

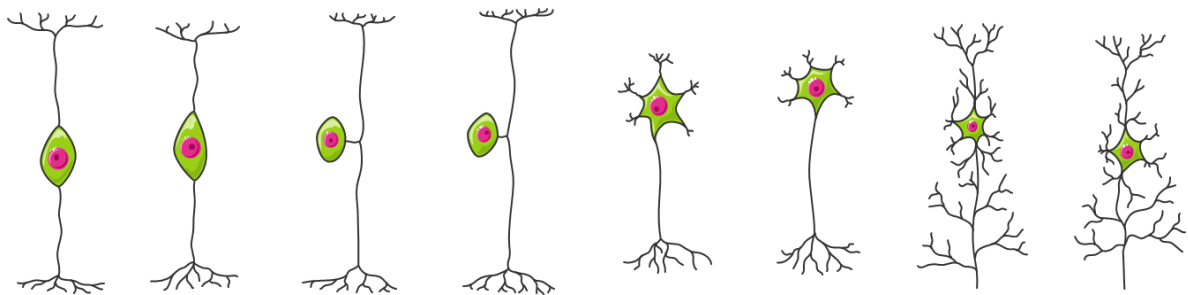


Figura 14 - Alguns tipos de Dendritos com diferentes estruturas (Servier Medical Art)

Um único neurônio geralmente não consegue fazer muito sozinho. Para o funcionamento correto do sistema nervoso, os neurônios são organizados e atuantes em grupos de neurônios que trabalham juntos. Individualmente, eles se conectam a outros neurônios, com o objetivo de em conjunto estimular ou inibir a atividade momentânea do receptor. Esses circuitos podem ser bem grandes envolvendo redes neuronais complexas. Mas os neurônios não funcionam sozinhos. Eles dependem das células gliais para a manutenção das suas atividades principais.

### 3.1.3.2 Células gliais

As células da glia são células não neuronais do sistema nervoso central que proporcionam suporte e nutrição aos neurônios. De característica mais arredondada, a glia está presente no cérebro humano na mesma ordem de

grandeza que o número de neurônios, cerca de 84.6 bilhões (AZEVEDO *et al.*, 2009).

Antigamente se pensava que o número de glias era até 10 vezes mais que os neurônios em todo o SNC. Essa diferença inclusive até pode ocorrer em alguns locais do cérebro. A **Figura 15** representa a contagem feita pelos cientistas brasileiros.

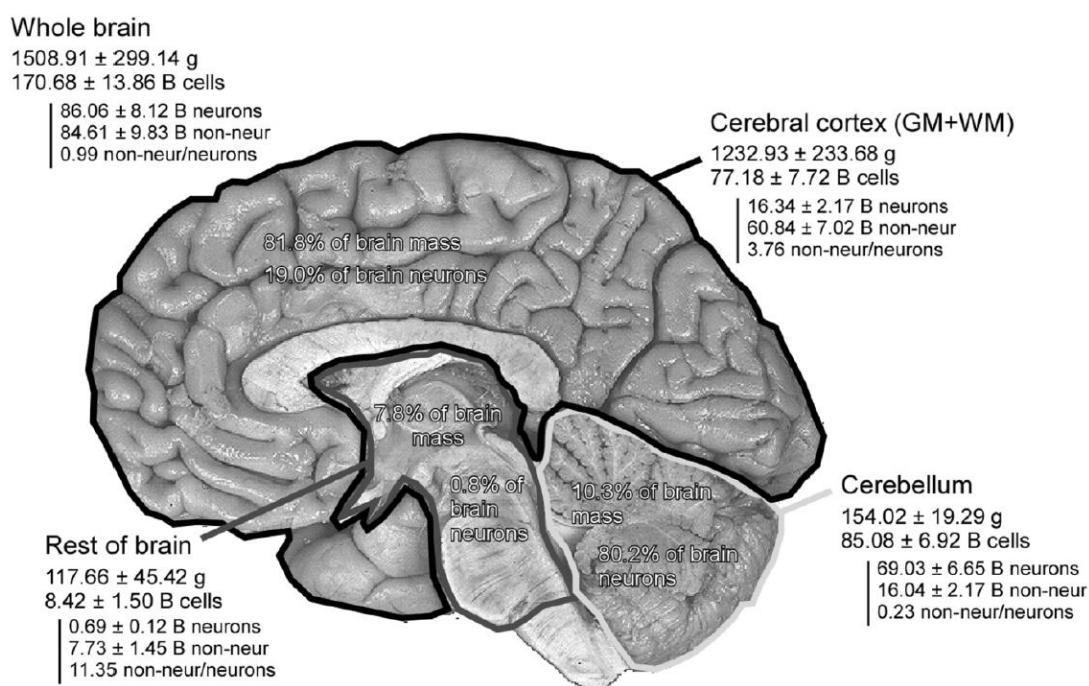


Figura 15 - Massa absoluta, número de neurônios e número de glias (non-neur) em um cérebro humano inteiro. Os valores são médias ± desvio padrão e se referem aos dois hemisférios juntos. As quantidades estão com unidade em bilhões. (AZEVEDO *et al.*, 2009)

Pode se perceber pela relação entre os tipos de células (Neurônios e Glias), que a maior concentração de neurônios se encontra no Cerebelo onde foram encontradas quase 70 bilhões de neurônios contra 16 bilhões de glias, uma relação de 0.23 glias/neurônios. No córtex, essa relação é maior, pois a concentração de glia supera a de neurônios, quase invertendo o que ocorre no cerebelo em números de células neuronais. No resto do cérebro a relação aumenta para 11.35 glias/neurônios.

As principais funções das células da glia são cercar os neurônios e mantê-los em seu lugar e em homeostase, fornecendo nutrientes e oxigênio além de isolar um neurônio do outro. Além disso, a glia destrói patógenos e remove neurônios mortos. Podem produzir moléculas que modificam o crescimento de dendritos e axônios. Participam ativamente nas transmissões sinápticas, regulando a liberação de neurotransmissores.

Existem cinco tipos principais de células da glia no sistema nervoso. Destes cinco, quatro são encontrados apenas no SNC. São eles: Astrócitos, Oligodendrócitos, Células Ependimárias e a Microglia.

Os **Astrócitos** estão em maioria no cérebro, elas ajudam a regular o fluxo de sangue no cérebro, regula a comunicação e durante o desenvolvimento, auxiliam os neurônios a encontrar o caminho aos seus destinos.

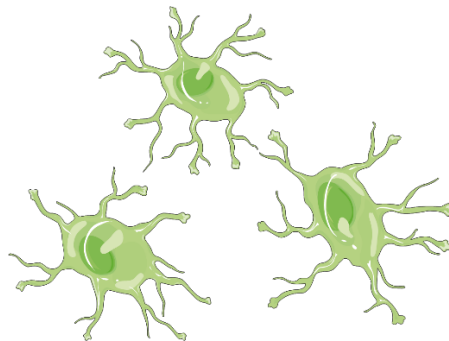


Figura 16 - Ilustração representando as células da glia do tipo Astrócitos. (Servier Medical Art)

Os **Oligodendrócitos** são células responsáveis pela produção de **mielina**, uma substância que isola os axônios de vários neurônios em forma de bainha. Além de proteger, a mielina aumenta violentamente a velocidade com a qual um potencial de ação ocorre. As **células de Schwann**, possuem função similar, dividindo a responsabilidade na produção da mielina, entretanto, **atuam apenas no SNP** enquanto os **Oligodendrócitos atuam apenas dentro do SNC**.

A esclerose múltipla, por exemplo, é um tipo de doença crônica neurológica autoimune que ataca corroendo a bainha de mielina, fazendo com que os

axônios percam essa capa de proteção, gerando interferência na comunicação neuronal. A **Figura 17** ilustra os Oligodendrócitos.

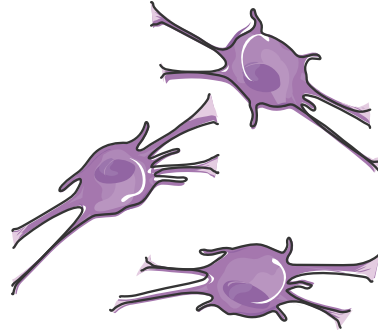


Figura 17 - Ilustração representando as células da glia do tipo Oligodendrócitos. (Servier Medical Art)

A **Microglia** executa o processo de limpeza, removendo células mortas e outros componentes encontrados dentro do SNC. Essa limpeza é realizada através de lisossomos, encontrados nesta célula fagocitária. Além disso, a microglia tem atraído muito interesse, pois pode estar envolvida na remodelação de conexões sinápticas, eliminando-as. (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017)

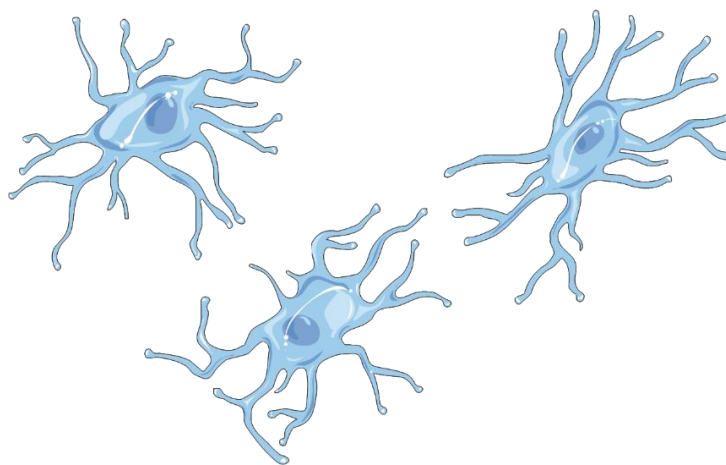


Figura 18 - Ilustração representando as células da glia do tipo Microglia. (Servier Medical Art)

As **Células Ependimárias** ilustradas na **Figura 19**, recobrem os ventrículos cerebrais e o canal central da medula espinhal. Por estes locais, percorrem o líquido cefalorraquidiano que com o auxílio dos cílios encontrados nestas células circula no interior do canal central da medula e dos ventrículos por onde é produzido.

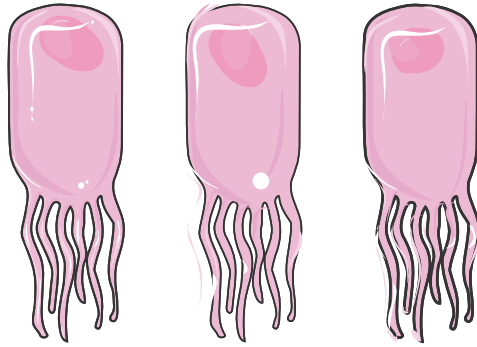


Figura 19 - Ilustração representando as células da glia do tipo Ependimária. (Servier Medical Art)

As células neuronais específicas podem ser formadas por células-tronco multipotentes chamadas de Células da Glia Radial.(BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017) Essas podem formar tanto neurônios quanto células da glia. A **Figura 20** ilustra a formação dessas células nervosas.

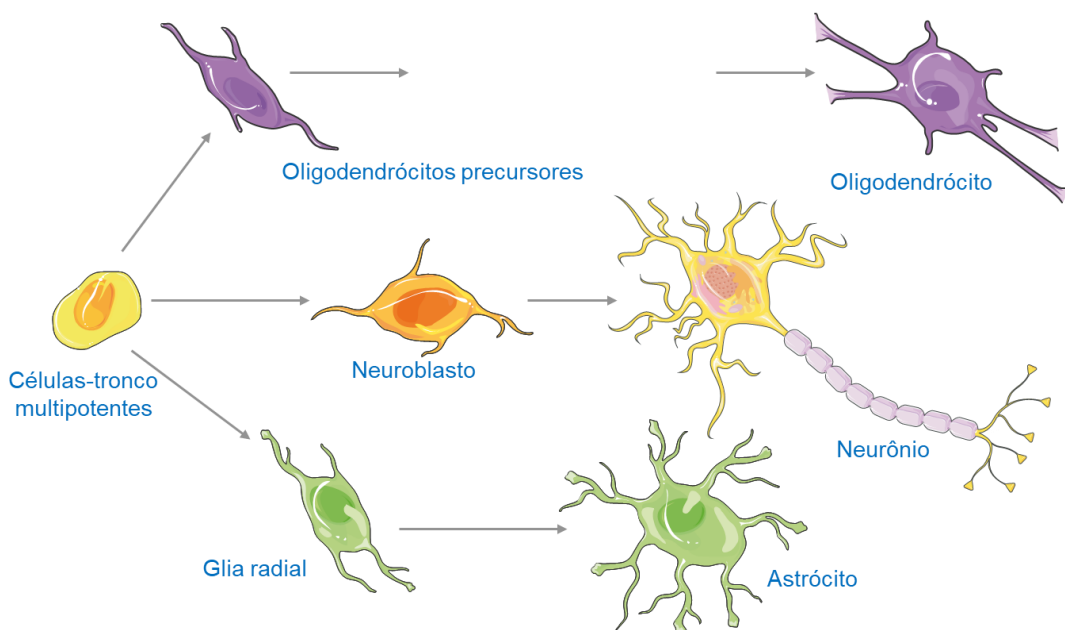


Figura 20 - Formação das células do sistema nervoso. (Servier Medical Art, Modificada)

### 3.1.4 Bioeletricidade

Potenciais elétricos originados de sistemas biológicos são resultado dos gradientes de concentração de íons através da membrana que circula as células. Galvani que na década de 60 do século XVIII (1760's) realizou experimentos em coxas de rã, onde descobriu que músculos e células nervosas eram capazes de produzir eletricidade, demonstrando mais tarde que essa eletricidade é originada de reações químicas (OFFNER, 1984). Por isso é atribuído a Galvani a descoberta da bioeletricidade.

A aquisição de Biopotenciais é a capacidade de eletronicamente realizar a leitura, amplificação, conversão e registro de sinais de origem biológica, como os potenciais de ação dos neurônios, intracelular ou extracelular por exemplo. Essa tecnologia constitui um avanço no diagnóstico médico pois a sua análise permite antecipar uma grande variedade de patologias (através das aquisições de EEG, EMG, ECG e EOG por exemplo) e entender o funcionamento do cérebro e do corpo o qual ele controla. O projeto de instrumentação eletrônica de aquisição não dispensa o conhecimento da especificidade destes sinais, muito pelo contrário, se faz necessário o entendimento detalhado do comportamento eletroquímico de todo o sistema nervoso. Sabe-se atualmente que os biopotenciais resultam de bio-sinais produzidos no seio das células eletricamente excitáveis que compõem o tecido nervoso, muscular e glandular. As células eletricamente ativas apresentam um potencial de repouso e desencadeiam um potencial de ação quando devidamente estimuladas. (CORREIA; CARMO, 2013)

#### 3.1.4.1 Tecidos excitáveis

A geração de sinais bioelétricos ocorre em células eletricamente excitáveis. Estas células são eletricamente ativas e formam o seguinte grupo de tecidos: o **tecido nervoso**, o **tecido muscular** e o **tecido glandular**. Existem dois tipos de potenciais: O potencial de repouso e o potencial de ação.

O **potencial de ação** sucede-se a um **potencial de repouso** e é desencadeado somente em reação a uma estimulação da célula eletricamente ativa. Os mecanismos responsáveis pela geração de biopotenciais e pela condução de impulsos elétricos no corpo só são compreensíveis após o conhecimento prévio dos conceitos de neurônios e células gliais, do sistema nervoso, do potencial de repouso e do potencial de ação. A função dos neurônios também não pode ser compreendida sem o conhecimento da estrutura e da função da membrana neuronal e de suas proteínas associadas. Essa biologia molecular será abordada detalhadamente nos capítulos seguintes.

Os potenciais elétricos originados de sistemas biológicos são resultados do gradiente de concentração dos íons através das membranas que circundam as células que formam os seres vivos. **Os íons** são espécies químicas eletricamente carregadas, resultantes de um átomo ou molécula que perdeu ou ganhou elétrons. Os íons carregados negativamente são chamados de **ânions** e os íons carregados positivamente, são chamados de **cátions**.

Alguns canais iônicos são altamente seletivos para um determinado tipo de íon, mas outros canais permitem a passagem de vários tipos.



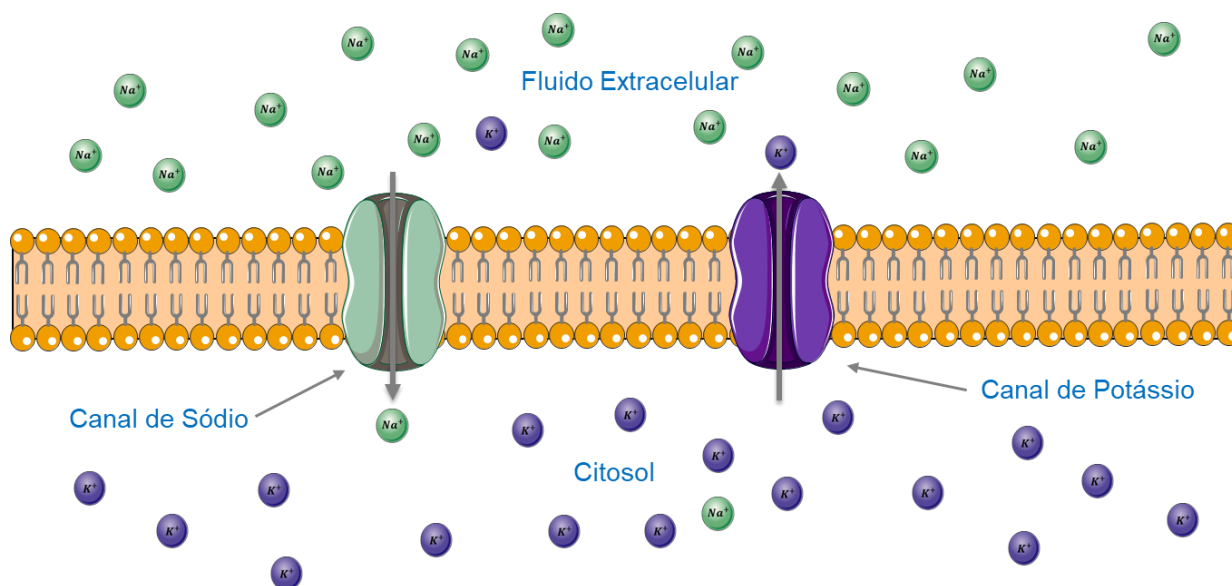


Figura 21 - Canais Iônicos de Sódio e Potássio nas células

Canais iônicos que permitem a passagem de  $K^+$  são chamados de canais de potássio e canais que permitem a passagem de  $Na^+$  são chamados de canais de sódio. A Figura 21 ilustra os canais iônicos seletivos descritos acima.

Nos neurônios, grande parte do potencial de repouso da membrana depende do movimento de íons de potássio através de seus canais.

O potencial de membrana é o resultado de uma média ponderada dos potenciais de equilíbrio dos diferentes íons permeantes. Isso quer dizer que se apenas uma espécie iônica permeante estiver presente, o potencial de membrana será determinado pelo potencial de equilíbrio desse íon.

### 3.1.4.2 Potencial de repouso

Uma célula com membrana excitável que não se encontra gerando impulsos, se encontra em potencial de repouso. Nestas células, o citosol – líquido que preenche o interior do citoplasma – em contato com a superfície interna da membrana, que possui carga negativa quando comparada ao exterior. A membrana celular de um neurônio, impede que determinados cátions (moléculas carregas positivamente), como o sódio ( $Na^+$ ) e Potássio ( $K^+$ ) ou ânions (moléculas carregas negativamente), como o Cloro ( $Cl^-$ )

passem facilmente. O potencial de repouso da membrana é determinado pela distribuição desigual dos íons entre o interior e o exterior da célula e pelas diferentes permeabilidades da membrana para diferentes tipos de íons. Resumindo, o **potencial de membrana** é a tensão elétrica através da membrana com relação ao meio externo e pode ser medido inserindo através um bioamplificador com um voltímetro ou osciloscópio usando como interface um microeletrodo de vidro no citosol contendo uma solução salina eletricamente condutiva e o posicionamento de um referencial elétrico metálico do lado externo à célula. A Figura 22 ilustra a medição do potencial de repouso da célula. Pode-se perceber a maior concentração de íons negativos no interior da célula e maior de íons positivos do lado de fora, mostrando que o potencial de repouso é negativo e em geral, seu valor é de  $-65\text{ mV}$ . Esse potencial de repouso negativo é extremamente importante para o funcionamento do sistema nervoso. (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017)

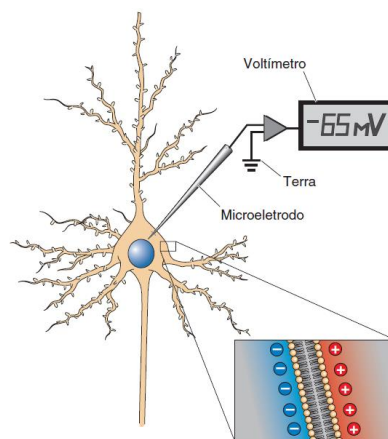


Figura 22 - Medição do potencial de repouso da membrana. (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017)

### 3.1.4.3 Potencial de ação

O potencial de ação é uma onda criada pela alteração temporária no potencial da membrana de forma temporal/somática iniciada nos dendritos e/ou no soma e percorre a membrana até o axônio. Para que isso ocorra, o tecido deve ser estimulado de forma adequada, ou seja, é preciso que essa estimulação torne o potencial da membrana mais positivo e superior ao

potencial do meio externo. Ele é uma resposta de tudo ou nada e propaga-se através do axônio em direção às terminações axonais onde as sinapses ocorrem. Os potenciais de ação gerados por uma porção da membrana são similares em tamanho e duração e quando são propagados pelo axônio não diminuem de intensidade.

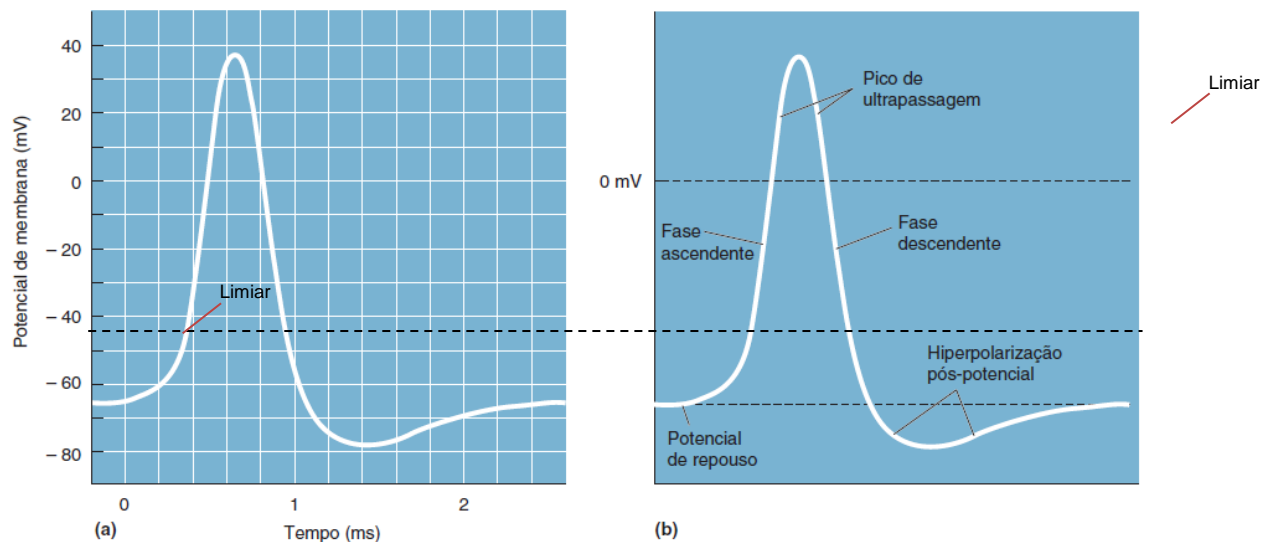


Figura 23 - Potencial de ação (a) captado por um osciloscópio e suas (b) suas partes denominadas.  
(BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017)

A formação de um potencial de ação pode ser dividida em cinco passos. (1) Estímulo de uma célula sensorial, ou outro neurônio, ou a luz no caso das células com opsinas, (2) se o limiar (threshold) de excitação é alcançado, todos os canais de  $Na^+$  se abrem e a membrana despolariza. (3) No pico do potencial de ação ou pico de ultrapassagem, os canais de  $K^+$  são abertos e os íons de potássio começam a deixar a célula. Ao mesmo tempo, os canais de  $Na^+$  são fechados. (4) A membrana inicia o processo de hiperpolarização com os íons de  $K^+$  continuando a deixar a célula. Neste instante, a Hiperpolarização da membrana impede que ela seja disparada novamente devido ao seu estado refratário. (5) Os canais de  $K^+$  se fecham e a bomba de sódio potássio restaura o potencial de repouso do neurônio.

### 3.1.4.4 Eletrofisiologia neuronal

A eletrofisiologia é a ciência da fisiologia que mede o fluxo de íon em tecidos biológicos. Essa grande concentração de íons cria um potencial de equilíbrio que pode ser calculada. O potencial de equilíbrio de um íon pode ser calculado aplicando-se a Equação de Nernst

$$E_{ion} = 2,303 \frac{RT}{zF} \log_{10} \frac{[Íon^+]_e}{[Íon^+]_i}$$

$E_{ion}$  = potencial de equilíbrio do íon

$R$  = constante dos gases

$T$  = temperatura absoluta

$z$  = número de cargas elementares (ou valência) do íon

$F$  = constante de faraday

$Íon_e$ . = concentração externa de Íons.

$Íon_i$  = concentração interna de Íons

De acordo com (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017), a equação de Nernst é derivada dos princípios da físico-química, onde no equilíbrio ocorre o balanço exato de duas influências: A difusão e a eletricidade.

A **difusão** força o íon a favor do gradiente de concentração e a **eletricidade** faz com que o íon seja atraído por cargas opostas e repellido por cargas iguais. A temperatura influencia diretamente na difusão, aumentando a diferença de potencial. Por simplificação, considera-se a temperatura corporal normal próximo de 37°C onde os potenciais de equilíbrio para os principais íons estão descritos abaixo:

$$E_K = 61,54 \text{ mV} \log_{10} \frac{[K^+]_e}{[K^+]_i}$$

$$E_{Na} = 61,54 \text{ mV} \log_{10} \frac{[Na^+]_e}{[Na^+]_i}$$

$$E_{Cl} = -61,54 \text{ mV} \log_{10} \frac{[Cl^-]_e}{[Cl^-]_i}$$

$$E_{Ca} = 30,77 \text{ mV} \log_{10} \frac{[Ca^{2+}]_e}{[Ca^{2+}]_i}$$

Com isso é possível calcular o potencial de equilíbrio de um íon facilmente à temperatura ambiente apenas sabendo as concentrações iônicas nos dois lados da membrana.

Tabela 1 - Íons, suas concentrações e seus potenciais isolados

Ion	Concentração extracelular (mM)	Concentração intracelular (mM)	Razão Externo/Interno	$E_{ion}$
$Na^+$	150	15	10	62 mV
$K^+$	5	100	0.05	- 80 mV
$Cl^-$	150	13	11.5	- 65 mV
$Ca^{2+}$	2	0.0002	10000	123 mV
Ânions orgânicos ( $A^-$ )	-	100	-	-

Se a membrana de um neurônio fosse permeável somente aos íons de potássio, o potencial de repouso da membrana seria algo em torno de -80 mV, o mesmo potencial de equilíbrio do íon. Mas essa não é a realidade. O que ocorre é um conjunto de potenciais com concentrações e íons diferentes compartilhando o mesmo local. O potencial de repouso da membrana, conforme citado anteriormente é de - 65 mV. Essa diferença ocorre pelo fato de a membrana do neurônio não ser permeável apenas aos íons de potássio. O Sódio também permeia as membranas e dado o conhecimento de sua concentração e permeabilidade, é possível calcular o potencial de membrana no equilíbrio aplicando a equação de Goldman. Com isso, para uma membrana permeável apenas aos íons de Sódio e Potássio a 37°C, tem-se:

$$V_m = 61,54 \text{ mV} \log \frac{P_K [K^+]_e + P_{Na} [Na^+]_e}{P_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i}$$

Onde:

$V_m$  = Potencial de membrana

$P_K$  = Permeabilidade relativa do potássio

$P_{Na}$  = Permeabilidade relativa do sódio

$[K^+]_e$  = Concentração externa de íons de potássio

$[K^+]_i$  = Concentração interna de íons de potássio

$[Na^+]_e$  = Concentração externa de íons de sódio

$[Na^+]_i$  = Concentração interna de íons de sódio

Se a permeabilidade relativa do potássio for 40 vezes maior que a permeabilidade do sódio, tem-se:

$$V_m = 61,54 \text{ mV} \log \frac{40(5) + 1(150)}{40(100) + 1(15)} = 61,54 \text{ mV} \log \frac{350}{4015}$$

$$V_m = 61,54 \text{ mV} \log 0,0871731 = 61,54 \text{ mV} * (-1,0596175) = -65,21 \text{ mV}$$

$$V_m \cong -65 \text{ mV}$$

O valor calculado através da equação de Goldman bate com os valores medidos através das aquisições demonstradas em diversos trabalhos (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017)

### 3.1.4.5 Biopotenciais elétricos

Os campos elétricos gerados por potenciais de ação que acompanham a condução dos impulsos nervosos e a despolarização das membranas celulares podem ser propagadas através de várias camadas de tecido do corpo e ser percebidos inclusive na superfície da pele (NORTHROP, 2018). Tais potenciais são nomeados de acordo com suas fontes:

O **Eletromiograma (EMG)** pode ser adquirido superficialmente ao nível da pele ou com eletrodos em agulha diretamente inseridos no musculo alvo. No caso da aquisição superficial existe uma desvantagem, pois apenas podem ser medidos músculos superficiais e a leitura apresenta pouca resolução espacial.

O Coração é composto em sua grande maioria de células musculares contrácteis que funcionam de forma semelhante às células musculares. As contrações dos músculos cardíacos são provocadas por impulsos elétricos. Entretanto estes impulsos elétricos não vêm diretamente do sistema nervoso, pois o coração possui um conjunto de células capazes de gerar o seu próprio potencial de ação. Estas células se chamam Células Marca-Passo. O sistema nervoso nesse caso atua apenas como um regulador da frequência cardíaca de acordo com a demanda do corpo. A atividade cardíaca é consequência de uma sequência de acontecimentos resultantes da atividade mecânica e elétrica gerada pelas células marca-passo. Como resultado desta atividade, as correntes conduzidas através do organismo humano geram diferenças de potencial na superfície da pele, as quais podem ser medidas com a utilização de eletrocardiógrafos. O registro temporal desses potenciais denomina-se **eletrocardiograma (ECG)**

O **eléto-oculograma (EOG)** é outro tipo de sinal eletrofisiológico, resultante da diferença de potencial entre a córnea e a retina. Utilizado para monitorar movimentações do olho, de acordo com o posicionamento dos eletrodos, é possível determinar movimentos em diferentes direções, mas sem a precisão de medir movimentos absolutos, pois a variação de potencial da pele é superior à do sinal do **EOG**, o que gera imprecisão.

De forma aplicada, as contribuições de corrente elétrica de todos os processos celulares ativos dentro de um volume de tecido cerebral sobrepõem-se a um dado local no meio extracelular e geram um potencial em relação a um potencial de referência. A diferença de tensão elétrica entre dois locais dá origem a um campo elétrico que pode ser monitorado por eletrodos colocados no meio extracelular com resolução de tempo de sub-milissegundos e podem ser usados para interpretar muitas características da comunicação e computação neuronal.

O **eletroencefalograma (EEG)** é o nome dado ao registro desse potencial elétrico gerado pela ação integrada dos neurônios e é um exame feito para avaliar a atividade elétrica do cérebro, sendo assim uma sequência temporal dos potenciais extracelulares de campo gerados por sua ação síncrona em determinada região. Os sinais de EEG podem ser coletados fazendo uso de eletrodos aplicados sobre o couro cabeludo. Para aquisições feitas diretamente sobre o córtex, o registro é denominado de **Eletrocorticograma (ECoG)**. Os potenciais ocorrem primariamente nas células piramidais do córtex, e então eles são conduzidas às demais camadas externas do córtex passando então pelo líquido, Meninges (Pia-máter, Aracnoide e Dura-máter) chegando até o osso craniano, periósteo e pele. Em todo esse caminho o sinal original misturado com os sinais vizinhos é atenuado devido à baixa condutividade dos componentes como o osso.

Quando os registros são realizados por pequenos eletrodos no interior do cérebro o registro é denominado Potencial de Campo Local (**LFP** - Local Field Potential). (BUZSÁKI; ANASTASSIOU; KOCH, 2012)

Os métodos para estudar impulsos nervosos e LFP podem ser divididos, de modo geral, em dois tipos: intracelulares e extracelulares. O registro intracelular requer a colocação de um microeletrodo no interior de um neurônio ou axônio. O pequeno tamanho dos neurônios torna este método um desafio, além de explicar por que muitos dos estudos pioneiros a respeito de potenciais de ação foram realizados em neurônios de invertebrados, que chegam a ser 50 a 100 vezes maiores que neurônios de mamíferos. (CORREIA; CARMO, 2013)



A Tabela 2 resume os diferentes tipos de bio-sinais, suas características de sinais, tipos de sensores (Eletrodos), possíveis fontes de erros de medições e aplicações.

Tabela 2 – Exemplos de Biopotenciais, especificações e principais aplicações. (THAKOR, 2014) e (CORREIA; CARMO, 2013)- Adaptado

Fonte	Amplitude (mV)	Largura de banda (Hz)	Sensor (eletrodos)	Fontes de erros de medição	Aplicações
ECG	1-5	0.05-100	Ag, AgCl e outros	Artefatos de movimentação e 50/60Hz.	Diagnóstico de isquemias, arritmias, etc.
EEG	0.001-0.01	0.5-40	Ouro, Ag-AgCl e outros	Térmico, Ruídos RF	Distúrbios do sono, convulsão e mapeamento cortical, etc.
EMG	1-10	20-2000	Ag, aço inox – Agulhas	50/60Hz, RF	Função muscular, doenças neuromusculares, próteses, etc.
EOG	0.01-0.1	dc-10	Ag, AgCl e outros	Potencial da pele por movimentação	Posição do olho, estado do sono, reflexo vestibulo-ocular, etc.

### 3.1.5 Estruturas do sistema nervoso dos humanos

O sistema nervoso dos humanos é o mais incrível já encontrado em toda a natureza. Quando comparado ao SN de outros animais, o humano é superior em número de neurônios no córtex cerebral, o que ressalta a sua capacidade cognitiva. Quando o tema é gasto energético, o cérebro humano gasta cerca de 25% da energia diária de um indivíduo. (AZEVEDO *et al.*, 2009). Isso demonstra o alto processamento, quando comparado a outros animais.

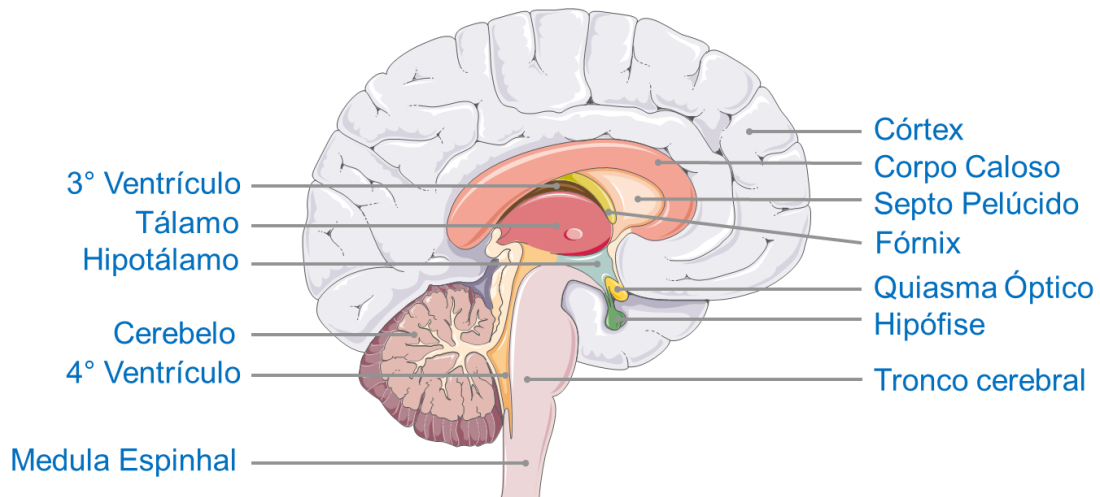


Figura 24 - Ilustração de algumas estruturas que compõem o encéfalo humano. (Servier Medical Art)

As estruturas do encéfalo são classificadas conforme a função e sua formação estrutural. Abaixo serão listadas e brevemente descritas as principais estruturas do encéfalo.

O **sistema ventricular** é um conjunto de ventrículos com canais os interconectando. Composto por quatro ventrículos, dois laterais, e dois centrais (terceiro e quarto ventrículo) revestidas por células ependimárias. O sistema é comunicante entre si e contínuo com o canal central da medula espinhal. Cada ventrículo possui um **plexo coróide** responsável por produzir o líquido. (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017)

O **corpo caloso** é uma enorme união, formada por axônios que unem o córtex cerebral dos dois hemisférios. Sua função primária é a integração da atividade motora, sensorial e cognitiva entre os hemisférios. O **Septo Pelúcido** é uma divisória interna formada por duas lâminas verticais de tecido nervoso misto que separa os dois ventrículos laterais. (DUQUE PARRA, 2012)

O **Fórnix** é um feixe de fibras axonais constituído por duas metades simétricas localizada na região central do cérebro, abaixo do corpo caloso e entre os ventrículos. Liga o corpo mamilar ao Hipocampo e às Amígdalas e ao Tálamo. O **Hipocampo** é considerado a principal área da memória podendo converter a memória de curto prazo em memória de longo prazo. As **Amígdalas** são responsáveis pelas sensações de medo, comportamento sexual e

comportamento agressivo. São as principais responsáveis pelo circuito predatório, onde ao mesmo tempo faz o predador ganhar agressividade e a presa ficar imóvel por medo. (HAN *et al.*, 2017)

O **Tálamo** é o portal para o córtex cerebral, sendo a região onde todas as vias sensoriais que transmitem a visão, audição e sensações somáticas fazem sinapses com os neurônios no caminho em direção ao córtex. O Tálamo é constituído por duas massas cinzentas situadas na profundidade dos hemisférios centrais. Com sua localização central, contém diversos núcleos com funcionalidades distintas. A parte ventral do núcleo talâmico anteromedial é fortemente visada pelo núcleo pré mamilar dorsal, principal região hipotalâmica que responde às ameaças de agressores predadores específicos. (RANGEL; BALDO; CANTERAS, 2018)

O **Hipotálamo** executa funções mais primitivas controlando o sistema nervoso autônomo, regulando as funções corporais em resposta à necessidade do organismo, ligando inclusive o sistema nervoso ao sistema endócrino. Com isso, ele controla a homeostase corporal, o apetite, o balanço de água no corpo, comportamento sexual e é o principal centro da expressão corporal. O **Quiasma ótico** é uma estrutura em forma de X onde cruzam os axônios provenientes dos olhos que se originam nos nervos óticos e se destinam ao tálamo no núcleo geniculado lateral. (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017)

A **Hipófise**, também conhecida como glândula pituitária está localizada abaixo do hipotálamo. É considerada como a glândula mestra, secretando hormônios que controlam o funcionamento de outras glândulas. Grande parte de suas funções são reguladas pelo hipotálamo. A hipófise é responsável pela regulação de outras glândulas e de várias funções do organismo, como o crescimento do corpo por exemplo. (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017)

O **córtex** é a camada mais externa do encéfalo sendo fundamental para a percepção sensorial consciente, processamento das sensações, aprendizado, linguagem, controle voluntário do corpo humano, cognição, etc. Os corpos celulares dos neurônios corticais geralmente são arranjados em camadas ou lâminas, dispostos paralelos à superfície do encéfalo, tendo pelo menos uma camada contendo células piramidais contendo dendritos apicais (longos) que

se estendem emitindo múltiplos ramos. O córtex é uma área complexa e como visto acima, possui múltiplas funções. O primeiro cientista a realizar o mapeamento citoarquitetônico do córtex foi o neurologista alemão Korbinian Brodmann, que dividiu o córtex cerebral em 52 regiões distintas, baseado em diferenças regionais, como densidade, distribuição, forma e tamanho dos corpos celulares. Ele considerou critérios funcionais e patológicos para a definição das áreas além da citoarquitetura no estudo realizado por ele em 1909. Entretanto, atualmente se sabe que essa arquitetura é mais heterogênea do que o mapa de Brodmann sugeria.(AMUNTS; ZILLES, 2015)

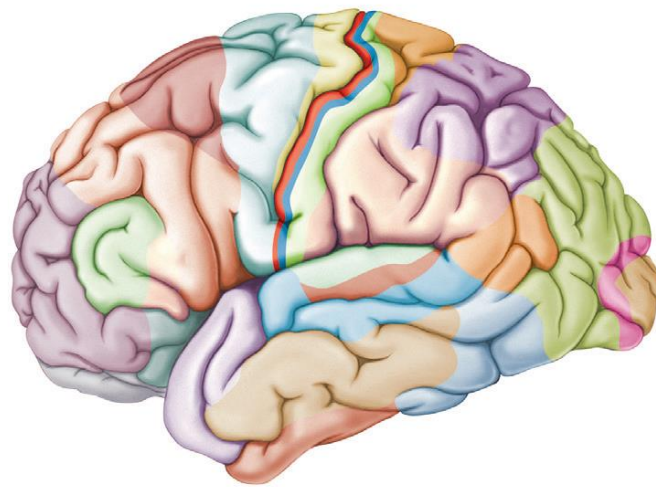


Figura 25 - Mapa de Brodmann (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017)

Por convenção, o cérebro é subdividido em lobos. Os lobos são nomeados de acordo com os ossos do crânio que estão acima deles.

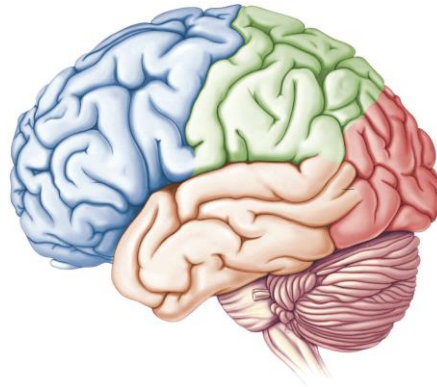


Figura 26 - Lobos Cerebrais (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017)

O **lobo frontal** (Em azul) conforme mostrado na Figura 26 é encontrado na parte anterior do cérebro. O Sulco central separa o lobo frontal do **lobo parietal** (Em verde). O **lobo Occipital** (Em vermelho) é localizado na parte posterior do cérebro. Abaixo dos três lobos se encontra o **lobo temporal**. Entretanto, como Brodmann já nos mostrava, apesar de não ter conseguido provar em sua época, o cérebro pode ser separado por áreas que estão relacionadas às suas funções. A **Figura 27** mostra as áreas de acordo com suas funções, onde a área vermelha é um conjunto de áreas motoras, as áreas verdes são áreas sensoriais e as áreas roxas, são áreas associativas.

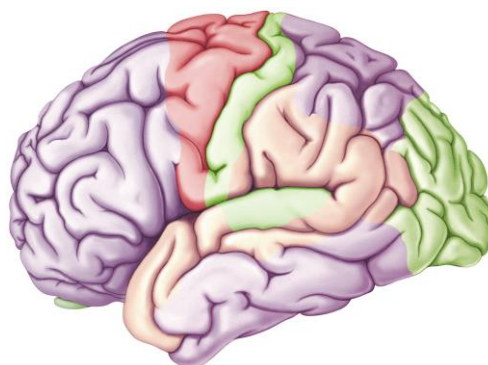


Figura 27 - Divisão do cérebro por áreas motoras, sensoriais e associativas. (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017)

Essas áreas podem ser mais bem subdivididas de acordo com suas funções primárias. A Figura 28 delimita e descreve as áreas de acordo com a função.

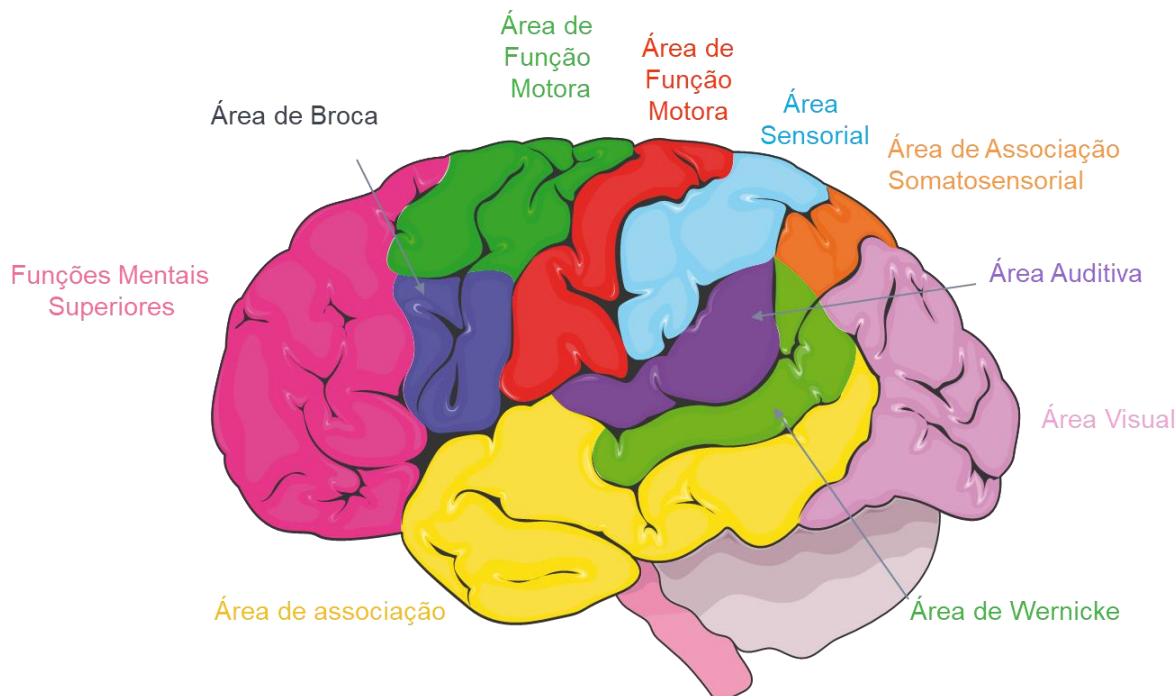


Figura 28 - Subdivisão do córtex com áreas descritas. (Servier Medical Art - Modificado)

Ainda não existe um modelo perfeito e universalmente aceito que descreve detalhadamente as áreas. Entretanto, a partir dos modelos levantados e dos estudos realizados, inclusive com o advento da optogenética e da aquisição de biopotenciais, essa estruturação tende a ser amadurecida e validada. Para isso, deve ser possível acessar essas áreas e realizar leituras de biopotenciais emitidos pelos neurônios em suas respectivas áreas.

## 3.2 Hemodinâmica

A Hemodinâmica (Hemo = Sangue; dinâmica = força) é a área da fisiologia que estuda as forças envolvendo a circulação do sangue pelo corpo, onde nos vasos sanguíneos estão contidos a maior parte das rotas. Ela pode ser dividida em três partes. A Hemodinâmica Cardíaca, Arterial e Venosa.

### 3.2.1 Coração

O coração é o órgão responsável pelo bombeamento do sangue para todo o corpo. Ele se conecta aos vasos sanguíneos e cria a pressão realizando uma contratilidade que força a ejeção do sangue do coração para diferentes partes do corpo. Através da artéria pulmonar, leva o sangue venoso para os pulmões e através da artéria aorta leva o sangue arterial para a oxigenação de todo o corpo. A Figura 29 mostra as visões superficial e seccional do coração humano.

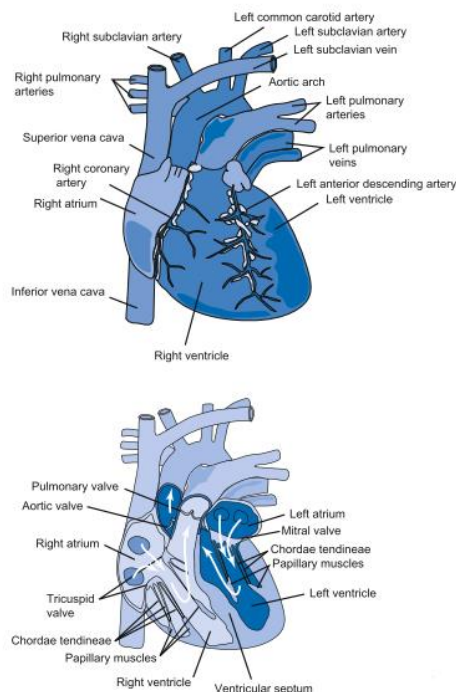


Figura 29 - Visões superficial (superior) e seccional (Inferior) do coração humano.(FEHER, 2012)

A visão seccional do coração humano mostra a direção do fluxo sanguíneo dentro de suas cavidades. Durante a diástole, o sangue entra no átrio direito e segue em direção ao ventrículo direito, através de uma válvula tricúspide. Durante a sístole, o ventrículo direito se contrai, fechando a válvula tricúspide e enviando o sangue através da válvula pulmonar para ser circulado no pulmão. Com o sangue saindo do pulmão, ele retorna ao coração entrando no átrio esquerdo e fluindo através da válvula mitral para o ventrículo esquerdo. Durante a mesma sístole, ocorre o fechamento da válvula mitral e a contração do ventrículo esquerdo, enviando o sangue através da válvula aórtica para a circulação sistêmica do sangue no corpo. Na Figura 29, a visão seccional inferior destaca pela direita, todo o processo em azul escuro, referente ao sangue arterial, e em azul claro, o caminho do sangue venoso.

Nos humanos, o coração está localizado no centro da cavidade torácica orientado obliquamente, com o ápice do coração apontado para baixo e para esquerda como mostra a Figura 30.

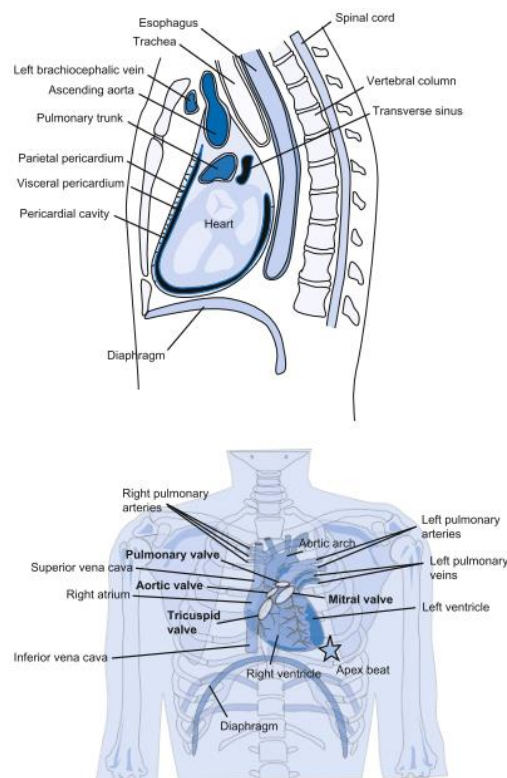


Figura 30 – Duas visões (lateral e frontal) da posição do coração dentro da cavidade torácica humana.

(FEHER, 2012)



A Figura 31 mostra a influência dessa sequência de eventos nos comportamentos da pressão arterial e do volume ventricular esquerdo.

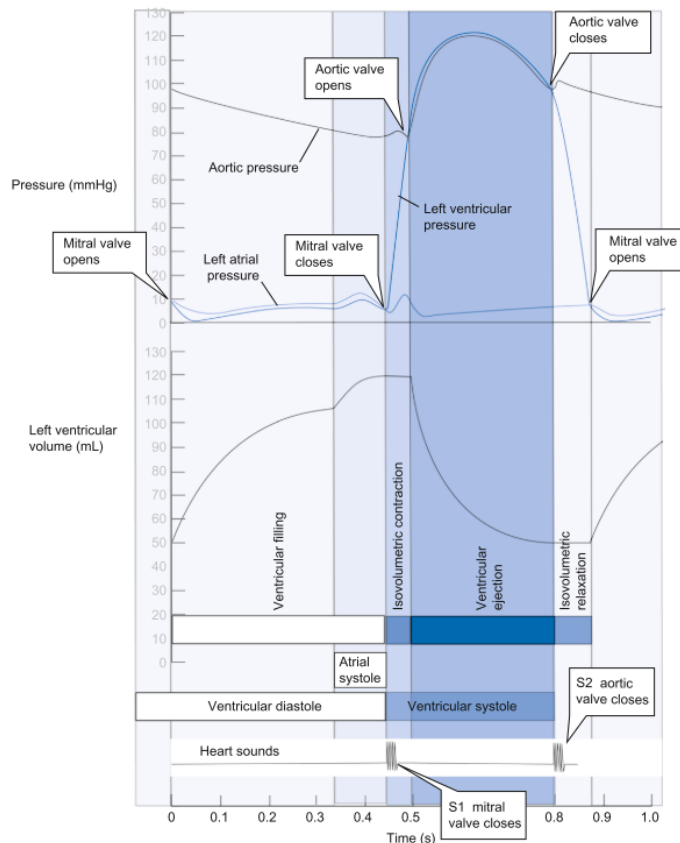


Figura 31 - Sequência de alguns eventos durante o ciclo cardíaco e seus efeitos na pressão. (FEHER, 2012)

### 3.2.2 Vasos sanguíneos

Os vasos sanguíneos são tubos ocos por onde o sangue flui e é distribuído ao corpo. É dividido basicamente por artérias e veias, onde as primeiras, são responsáveis por levar o sangue com altas pressões ao corpo, e a segunda, responsáveis por trazer o sangue em baixa pressão de volta. Seu coletivo é chamado de sistema vascular onde internamente estão divididos em cinco tipos: Grandes artérias, arteríolas, capilares, vênulas e grande veias. (FEHER, 2012)

O sistema vascular tem basicamente cinco funções principais:

1. Transformar o fluxo pulsátil do sangue em um fluxo contínuo;
2. Distribuir o sangue para diversos órgãos;
3. Realizar a troca de materiais nos tecidos;
4. Servir como reserva de volume sanguíneo através das veias.
5. Ajustar localmente as pressões e fluxos sanguíneos realizando a contração (Vasoconstrição) ou dilatação (Vasodilatação) dos vasos.

### 3.2.3 Sangue

O Sangue é um fluido não newtoniano responsável por levar oxigênio e nutrientes para o corpo. Ele completa o sistema circulatório e consiste em células suspensas em plasma. Equivalente entre 6-8% do total de massa do corpo humano, possui densidade próxima de  $1.06\text{g/cm}^3$  e viscosidade entre 3.5 e 5.5 vezes a da água. A viscosidade, se tratando de um fluido não newtoniano, depende da taxa de cisalhamento aplicada. Em outras palavras, o diâmetro do vaso influencia na viscosidade. As células suspensas são divididas entre os glóbulos vermelhos em maior quantidade e os glóbulos brancos. O plasma é um fluido cor de palha que contém eletrólitos, proteínas, metabólitos, hormônios, nutrientes e resíduos. Além de ser responsável por carregar esses inúmeros materiais o plasma também define a composição eletrolítica e a osmolaridade do líquido extracelular. Algumas proteínas são responsáveis por dissolver e formar coágulos sanguíneos. A função principal dos glóbulos vermelhos é realizar o transporte de Oxigênio e tamponamento do pH do sangue. Os glóbulos brancos são responsáveis pela inflamação e pela resposta à invasão de parasitas e micróbios no corpo. (FEHER, 2012)

### 3.2.4 Fluxo sanguíneo

O Fluxo sanguíneo é uma variável local calculada como o volume de sangue que flui através de um tecido, órgão ou vaso sanguíneo do corpo por um determinado período. Sua unidade geralmente é dada por mililitros por minuto (mL/min). O Fluxo sanguíneo distribuído pelo coração para abastecer o corpo humano, é chamado de **Débito Cardíaco** (DC) e essa medida é importante para se determinar o desempenho cardíaco dos seres. Sabe-se que o coração é uma bomba premente, e possui uma frequência de premência, chamada de **frequência cardíaca** (FC). A cada batida do coração, o mesmo, através de uma pressão exercida, ejeta uma quantidade de sangue através do ventrículo esquerdo para a artéria aorta, levando sangue oxigenado para todo o corpo. Essa quantidade de sangue que sai do coração a cada batida, é denominada de **débito sistólico** (DS)

O DC pode ser calculado através da seguinte fórmula:

$$DC = FC * DS$$

A distribuição da quantidade total de sangue que vai para cada área do corpo depende de dois fatores principais: A **pressão** e a **resistência vascular** exercida nos diferentes **vasos sanguíneos**. A Figura 32 mostra um esquemático do fluxo sanguíneo e valores típicos de fluxos em repouso. O cérebro recebe quase 15% do fluxo sanguíneo total do corpo. Os rins recebem 20% e fígado e intestinos que juntos recebem quase 25%. Em comparação, os músculos somados recebem cerca de 30%.

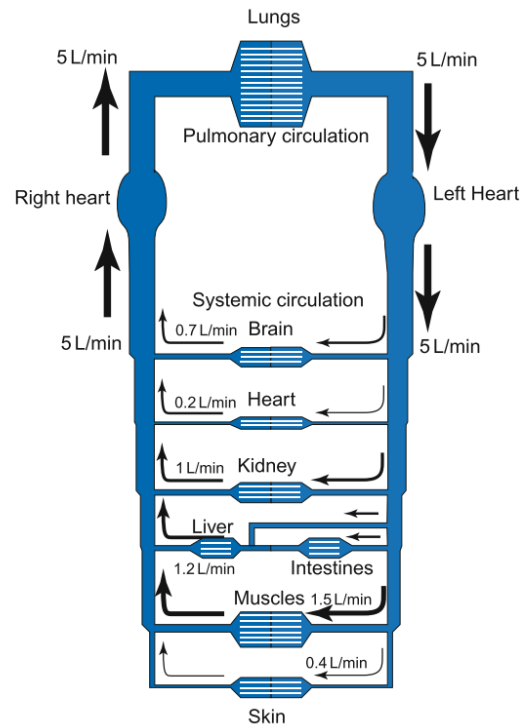


Figura 32 - Esquemático do fluxo sanguíneo e valores típicos de fluxos em repouso. (FEHER, 2012)

### 3.2.5 Pressão arterial

O sangue flui dentro dos vasos de regiões que possuem maior pressão, para regiões de menor pressão. Quanto maior for a diferença de pressão, maior será o fluxo sanguíneo. A contração causada pelos ventrículos a cada batimento cardíaco gera a pressão dentro das artérias. Essa pressão hidrostática exercida do sangue contra as paredes arteriais é denominada de pressão arterial.

As artérias possuem uma excelente capacidade controlar a pressão e o fluxo sanguíneo para que a entrega do sangue nos capilares seja homogênea e contínua, sem pulsatilidades. A Figura 33 mostra o comportamento da pressão arterial em diferentes tipos de artérias.

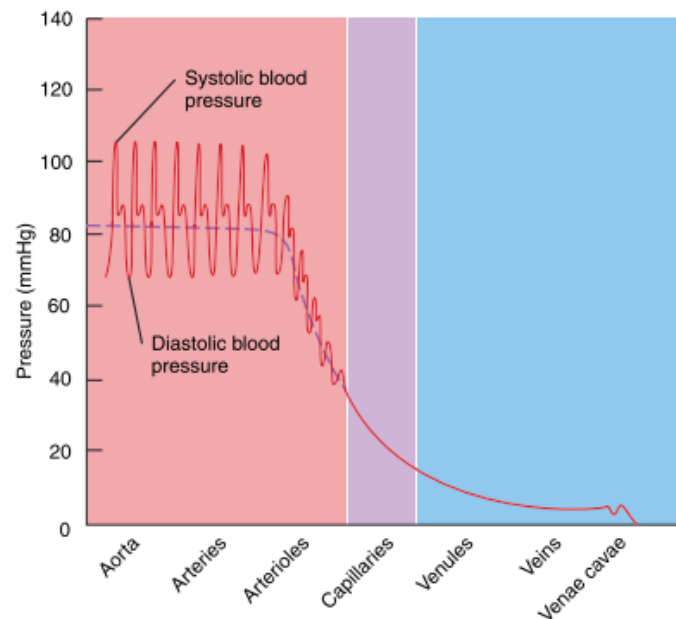


Figura 33 - A pressão arterial para diferentes tipos de vasos sanguíneos (TORTORA; DERRICKSON, 2014)

O sistema cardiovascular é considerado um sistema fechado, entretanto ele é elástico. Isso significa que seu volume pode ser variado, aumentando ou diminuindo e assim o sistema responde se expandindo ou contraindo. Portanto, a chegada de um volume é acompanhada por uma mudança na pressão.

A relação entre a alteração do volume e a mudança de pressão é dada pela equação abaixo:

$$\Delta P = \frac{\Delta V}{C}$$

Onde  $\Delta P$  é a **diferença de pressão**,  $\Delta V$  é a **diferença de volume** e  $C$  é chamado de **Complacência**. Um sistema complacente é aquele que se expande (Permite alterar o seu volume) mais facilmente (Com menor diferença de pressão), ou seja, uma grande alteração no volume produz uma pequena alteração na pressão. Quanto mais rígida for a parede dos vasos, mais resistência ele sofre com a alteração de volume, produzindo maior diferença de pressão.

### 3.2.6 Resistência vascular

A resistência vascular é definida como a oposição ao fluxo sanguíneo, causada pela fricção entre o sangue e os vasos sanguíneos. A resistência vascular, depende do **diâmetro interno do vaso (lúmen)**, da **viscosidade do sangue** e do **comprimento total do vaso**.

Quanto menor for o lúmen, maior será a resistência ao fluxo sanguíneo. A resistência é inversamente proporcional à quarta potência do diâmetro interno do vaso.

$$R \propto \frac{1}{d^4}$$

Isso significa que se o diâmetro interno do vaso reduzir pela metade, a resistência aumenta 16 vezes. A capacidade dos vasos de reduzir seu diâmetro interno, é chamado de **vasoconstrição**. A capacidade dos vasos de aumentar seu diâmetro interno, é chamado de **vasodilatação**. Existem duas categorias de controle de calibre dos vasos. O Controle Local e o Controle Sistêmico. O Controle Local, também chamado de intrínseco, pode ser executado através de respostas miogênicas, secreções endoteliais, controle metabólico e secreções parácrinas locais. Já o controle sistêmico, também conhecido como extrínseco, é controlado sistemicamente através dos nervos e através de hormônios, como epinefrina, vasopressinas, angiotensinas e peptídeos natriuréticos atriais (FEHER, 2012).

A viscosidade do sangue depende principalmente da razão entre a quantidade de glóbulos vermelhos e o plasma. Quanto maior a viscosidade, maior a resistência à passagem deste sangue nos vasos. Qualquer condição que aumente a viscosidade do sangue, como a desidratação por exemplo, acarretará o aumento da pressão arterial.

Quanto maior o comprimento de um vaso sanguíneo, maior a resistência vascular. Pessoas obesas possuem predisposição a ter hipertensão arterial, por causa dos vasos sanguíneos adicionais que perfundem as camadas adiposas, aumentando o comprimento total dos vasos. De acordo com

(TORTORA; DERRICKSON, 2014) se estima que mais de **650 km de vasos sanguíneos** adicionais se desenvolvam **para cada quilo de gordura no corpo**.

A resistência periférica total é o somatório de todas as resistências vasculares. Pelo fato do diâmetro das principais artérias e veias serem grandes, a resistência nestes vasos é muito pequena, pelo fato do sangue quase não entrar em contato com a parede destes vasos. Entretanto, os pequenos vasos como arteríolas, capilares e vênulas, contribuem para a resistência total majoritariamente. Com isso, as arteríolas possuem grande contribuição no controle da resistência total periférica, controle esse feito no centro vasomotor localizado no tronco cerebral.

### 3.2.7 Retorno venoso

O retorno venoso é volume de sangue que flui de volta ao coração através das veias. A diferença de pressão venosa, mesmo sendo pequena, por volta de 16 mmHg, normalmente é suficiente para essa função e é gerada pela contração do ventrículo esquerdo. Se a pressão sanguínea porventura aumentar no átrio e no ventrículo direito, por consequência o retorno venoso irá diminuir.

Além do coração, outros dois mecanismos são responsáveis para bombear o sangue venoso de volta ao coração: Os músculos esqueléticos e a força causada pela respiração.

Uma vez explanadas as principais características do sistema hemodinâmico, a Figura 34 mostra um esquemático que resume do ponto de vista do aumento da pressão arterial, todos os principais fatores que contribuem para tal. Em verde tem-se os componentes que afetam o **aumento do débito cardíaco** e em azul, os componentes que **umentam a resistência vascular periférica**.

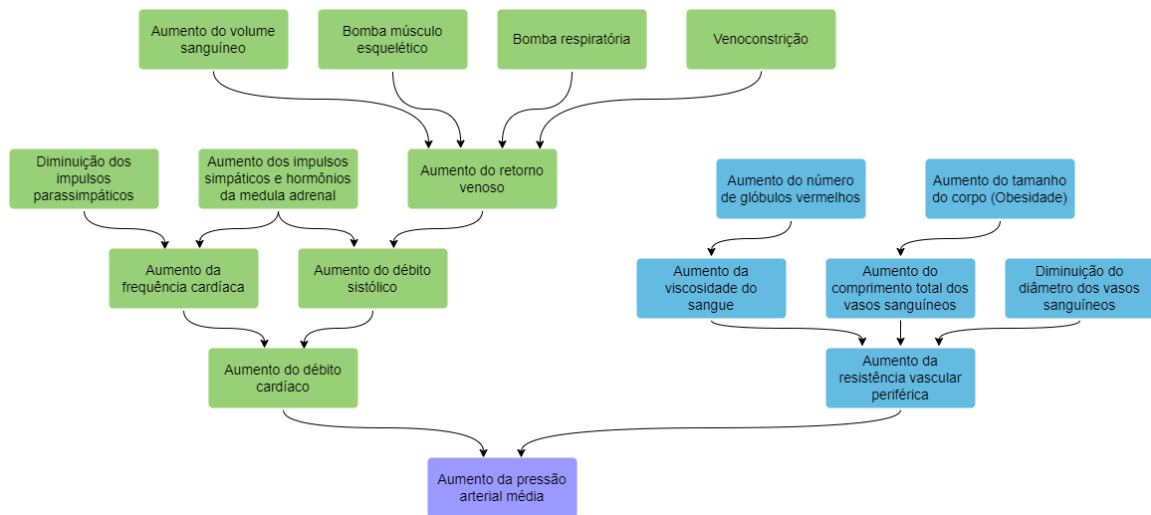


Figura 34 – Esquemático com os principais itens responsáveis pelo aumento da pressão arterial no corpo humano.(TORTORA; DERRICKSON, 2014) Adaptado.

### 3.2.8 Líquor e a pressão intracraniana

A maior parte dos órgãos humanos apresenta pressão ambiente de perfusão sanguínea próxima à pressão atmosférica ou menor (CZOSNYKA; PICKARD, 2004). Entretanto, no SNC, a pressão ambiente é diferente por estar circundada e protegida pelo esqueleto axial (cavidade craniana e canal vertebral). Esta pressão circundante é denominada pressão intracraniana (PIC).

Sob condições normais, o conteúdo intracraniano inclui (em volume):

- Parênquima cerebral – 80 a 85%
- Líquido cérebro-espinhal (líquor) – 5 a 10%
- Sangue – 8 a 12 %



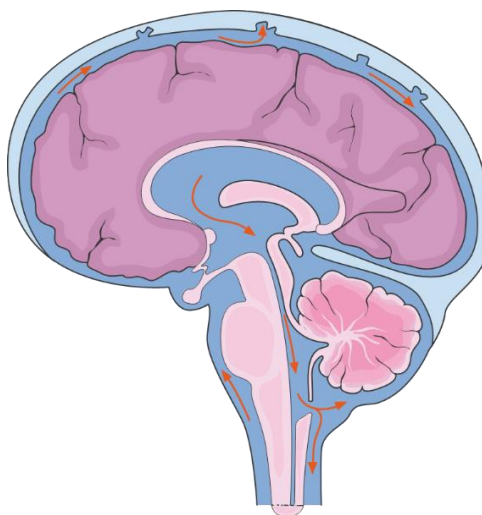


Figura 35 – Líquor cefalorraquidiano (Em azul escuro) e seu caminho no sistema nervoso central (Servier Medical Art - Modificado)

O **Líquor** cefalorraquidiano conhecido também como líquido cérebro-espinhal é um fluido aquoso e incolor, com pequenas quantidades de proteína, potássio, glicose e cloreto de sódio que ocupa o espaço subaracnóideo e as cavidades ventriculares e está representado em azul escuro com seu fluxo indicado pelas setas vermelhas na **Figura 35**. A função primordial do Líquor é de proteção mecânica do SNC, distribuindo a pressão (seja ela natural ou causado por algum impacto) em virtude do Princípio de Pascal, igualmente em todos os pontos. Dessa maneira o Líquor funciona como um sistema amortecedor dos choques que atingem o sistema nervoso central, pois este, fica totalmente submerso no líquido e de acordo com o Princípio de Arquimedes, o torna muito mais leve, o que reduz drasticamente o risco de traumatismo do encéfalo resultantes do contato direto com os ossos do crânio. Se o encéfalo ou os vasos sanguíneos que o irrigam aumentam de volume, o líquido é drenado e diminui a pressão intracraniana, para manter o volume constante sendo este fenômeno chamado de autorregulação. O Volume total do líquido em adultos é de 100 a 150 cm<sup>3</sup>, renovando-se completamente a cada oito horas (MACHADO, 2004).

A PIC é um dos principais parâmetros vitais do corpo humano, e o principal se tratando de SNC pois para o oxigênio chegar até todas as dezenas de bilhões

de neurônios e células gliais, a pressão de perfusão cerebral tem que estar controlada e otimizada.

### 3.2.9 Mecanismos de controle hemodinâmico

Sabe-se que o coração é a principal bomba responsável pelo aumento da pressão sanguínea. Esta pressão pode ser aumentada, elevando o débito cardíaco através da alteração da complacência ou da resistência arterial, ou até alterando o volume sanguíneo dispostos nos vasos. Sendo assim, pode-se dizer de maneira estruturada que a pressão sanguínea é regulada controlando três variáveis fundamentais e independentes:

1. Contratilidade cardíaca – Controla a força de contração do coração;
2. Contratilidade do músculo liso vascular – Calibre e complacência dos vasos;
3. Volume sanguíneo total – Regulação da função renal;

Os mecanismos de regulação são divididos de acordo com sua velocidade de resposta:

1. Mecanismos neurogênicos – Resposta rápida (Segundos);
2. Mecanismos hormonais – Resposta intermediária (Minutos a horas);
3. Mecanismos intrínsecos – Resposta lenta devido ao volume sanguíneo total (Dias a semanas)

Para se controlar de maneira dinâmica uma variável fisiológica, o corpo necessita de sensores que levem essa informação até o sistema nervoso central. Quando se fala do controle da hemodinâmica, os sensores responsáveis pela leitura da pressão arterial são chamados de barorreceptores. Estes sensores são encontrados nos seios carotídeos e no arco aórtico. Os seios carotídeos são as bifurcações que separam as artérias carótidas comuns para as carótidas externas e internas (Esquerdas e direitas). Já o arco aórtico pode ser encontrado na saída do coração após a válvula aórtica. Estes

barorreceptores atuam em diferentes momentos. (FEHER, 2012; TORTORA; DERRICKSON, 2014)

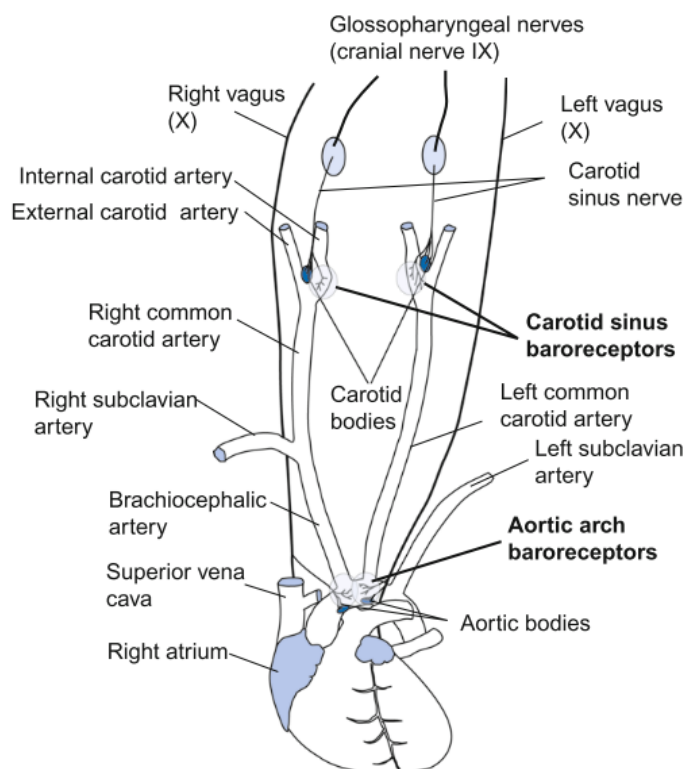


Figura 36 - Localização dos barorreceptores em humanos (FEHER, 2012)

O aumento da pressão nestas regiões, estica as paredes dos vasos fazendo com que os barorreceptores ali localizados sejam excitados. Enquanto, nos humanos, os barorreceptores do arco aórtico são ativados com pressões entre 30 e 90 mmHg (e saturam com pressões superiores), os receptores dos seios carotídeos (mais numerosos em comparação ao anterior) são ativados com pressões entre 70 e 140 mmHg. Na pressão normal, apenas um quarto das fibras dos seios carotídeos são ativadas, e conforme a pressão aumenta, aumenta o número de fibras excitadas.

Essa excitação aumenta a velocidade de disparo de impulsos elétricos. A velocidade com a qual essas paredes são esticadas, também aumentam a velocidade de disparo desses impulsos elétricos (FEHER, 2012). Os impulsos são levados diretamente para o tronco encefálico através dos nervos aferentes glossofaríngeos (CN IX) partindo dos seios carotídeos e vagos (CN X) partindo do arco aórtico. No tronco encefálico, esses sinais são integrados, consequentemente reduzindo a estimulação do simpático para o sistema

cardiovascular e aumentando a estimulação do parassimpático sobre o vago para o coração. Com o aumento da estimulação do nervo vago, este entrega os impulsos ao nó sinusal, fazendo o coração reduzir a frequência cardíaca. Essa estimulação em conjunto com a redução da atividade simpática, gera uma menor contratilidade do miocárdio, reduzindo assim, o débito cardíaco. Além disso, com a baixa estimulação do nervo simpático, os vasos sofrem vasodilatação, conseqüentemente diminuindo a resistência total periférica.

Este fenômeno, conhecido como **barorreflexo**, auxilia como um mecanismo rápido de *feedback* negativo diretamente no controle da pressão arterial, aumentando ou reduzindo a frequência e o débito cardíaco de acordo com a pressão (menor ou maior) percebida pelos barorreceptores. O tempo de resposta entre o aumento na pressão arterial e o efeito de bradicardia, é de 0.5 segundos. Já a vasodilatação possui um tempo de resposta de 1.5 segundos (FEHER, 2012).

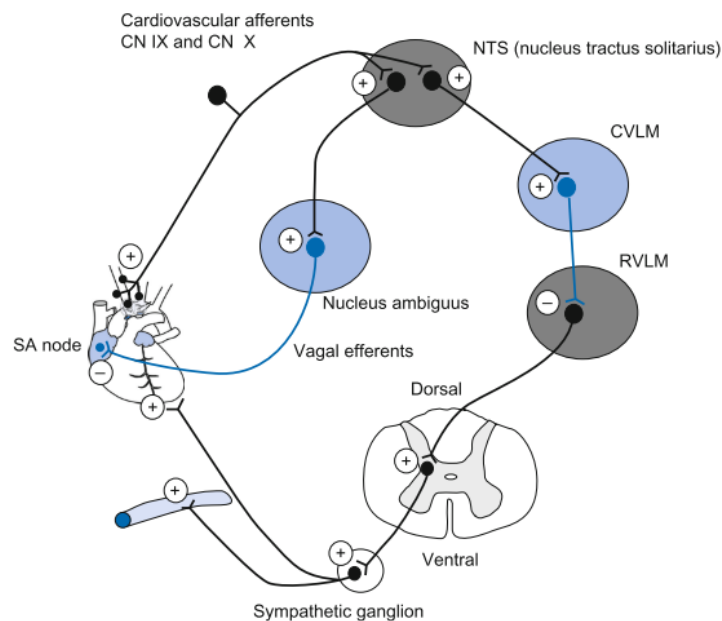


Figura 37 - Vias centrais para controle da frequência cardíaca e pressão arterial. (FEHER, 2012)

A Figura 37 mostra o caminho percorrido pelos nervos sensores do sistema barorreflexo, também chamados de aferentes e os atuadores, conhecidos como eferentes. Os nervos aferentes CN IX e CN X sobem até o tronco encefálico, chegando especificamente no núcleo do trato solitário (NTS), onde o sinal é integrado. Após a integração, o NTS excitado envia essa informação

para o Núcleo Ambíguo (NA) e para o Bulbo Ventrolateral Caudal (CVLM, *Caudal Ventrolateral Medulla*), além do hipotálamo. O Núcleo Ambíguo, através da parte Eferente do Nervo Vago, excita diretamente o nó sinusal. Por outro lado, o CVLM uma vez excitado, inibe as células do Bulbo Ventrolateral Rostral (RVLM – *Rostral Ventrolateral Medulla*) reduzindo a excitação das células simpáticas pré-ganglionares na medula espinhal torácica

### 3.3 Instrumentação para aquisição de biossinais

A instrumentação para aquisição de biossinais precisa estar preparada para converter o sinal que o corpo emite e converter em um sinal que possa ser calibrado ou extraído algum parâmetro associado. Podemos realizar a aquisição de biopotenciais como ECG, EEG, EMG, EOG etc. diretamente como sinais elétricos, podemos realizar também a aquisição de pressões invasivas ou não invasivas sanguíneas e intracranianas através de sensores piezoresistivos, velocidade de fluxo sanguíneo através de doppler, respiração, mecanicamente através de cintas, através de parâmetros associados ao ECG ou até gasometrias como a capnografia. Para o débito cardíaco, métodos como a termodiluição ou fluxometria transesofágica são utilizados.

Nem todos os biossinais são entregues da mesma forma. Alguns deles são calibrados através de uma referência e disponibilizados em valores absolutos instantâneos, médios, máximos e mínimos, outros possuem forma de onda e em todos eles, parâmetros associados podem ser extraídos, como frequência (cardíaca e respiratória, por exemplo), saturação de oxigênio, etc.

A forma de transdução também varia de acordo com o biossinal. Sinais elétricos, geralmente são capturados através de eletrodos. Pressões precisam de um transdutor de pressão para se converter em valores elétricos que possam ser calibrados.

Esses sinais, uma vez convertidos em elétricos, podem ser condicionados e digitalizados para seu armazenamento, calibração e monitorização discreta ou contínua.

Os Eletrodos são peças fundamentais para aquisição de biopotenciais. A função dele é promover a interface elétrica entre a instrumentação de aquisição de biopotencial e o corpo de estudo. Os eletrodos são classificados de acordo com sua construção (Ativos ou Passivos), seu local de aplicação (Invasivo ou Não Invasivo) e o tipo de biopotencial (ECG, EEG, ECoG, etc.) a ser adquirido. Os **eletrodos não invasivos** são posicionados sobre a pele ou coro cabeludo e para aumentar a condutância, um gel/pasta/creme eletrólito é utilizado em alguns casos. Esse eletrólito é rico em substâncias iônicas as quais são absorvidas pela pele diminuindo a resistência promovendo a troca de cargas entre o eletrodo e a pele (CORREIA; CARMO, 2013). Os **eletrodos invasivos** geralmente estão mais próximos da fonte monitorada e seu formato é importante para que ele capture as tensões/correntes apenas do local desejado e não receba interferência de locais vizinhos.

### 3.3.1 Amplificadores de biossinais

Um amplificador de biopotencial tem por objetivo promover um ganho nos biossinais derivados dos eletrodos, garantindo uma proteção contra distorções indesejadas. Os Amplificadores usados para gravações de biopotenciais podem ser divididos em grupos de acordo as terminações. Amplificadores do tipo **single-ended** ou extremidade única, **pseudo diferenciais** e amplificadores **diferenciais**. Esses amplificadores podem ter rejeição a sinal contínuo ou não de acordo com a necessidade.

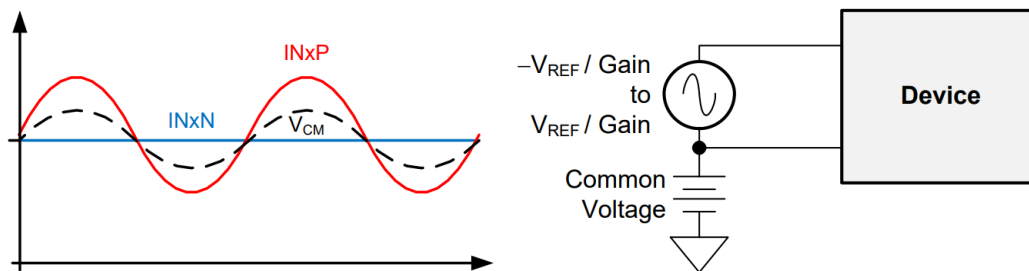


Figura 38 - Gráfico com o comportamento e esquemático representando uma entrada pseudo-diferencial (TEXAS INSTRUMENTS, 2017a)

A **Figura 38** representa o comportamento e o esquemático de uma entrada pseudo-diferencial. Neste caso é possível reparar que a entrada negativa permanece estável por conta da tensão de modo comum que é fixa, tendo a entrada positiva tendo uma maior flutuação e como efeito, a própria tensão de modo comum é vista variante.

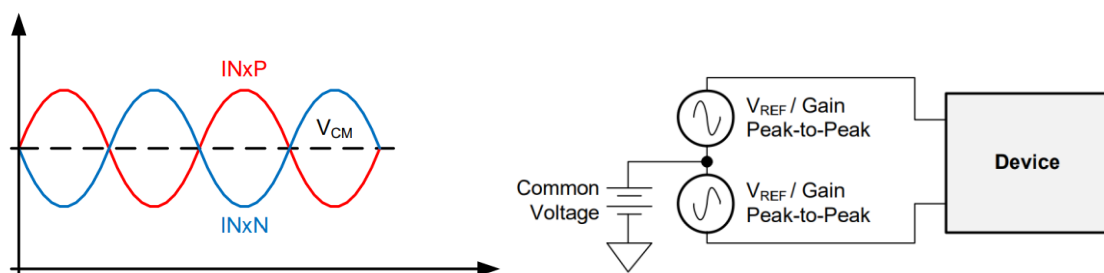


Figura 39 – Gráfico com o comportamento e esquemático representando uma entrada diferencial (TEXAS INSTRUMENTS, 2017a)

Na **Figura 39** é possível perceber o comportamento de uma entrada diferencial, onde as entradas variam e a tensão de modo comum se mantém fixa.

Uma característica importante dos amplificadores diferenciais é a de apresentarem elevado ganho diferencial e baixo ganho de modo-comum levando a que apresentem elevado fator de rejeição de modo-comum, dado

pelo quociente dos dois ganhos. Com isso, o ruído, que geralmente é comum a ambas as entradas, tende a ser atenuado.

**CMRR** é o acrônimo para *Common Mode Rejection Ratio* ou Razão de Rejeição em Modo Comum. Sendo uma característica dos amplificadores diferenciais. Quando dois sinais da mesma amplitude, frequência e fase são aplicados às entradas (inversora e não inversora) de um operacional eles deveriam se cancelar e nenhuma saída deveria ocorrer. Entretanto, na prática, um sinal de pequena amplitude ainda aparece, sendo especificado em relação ao ganho máximo em termos de atenuação ou rejeição em dB. A capacidade de um amplificador operacional rejeitar estes sinais iguais é chamada de rejeição em modo comum e essa razão ou relação é medida em dB.

### 3.3.2 Conversores analógicos digitais

Os sinais biológicos quando conduzidos aos eletrodos, chegam em forma de tensão ou corrente elétrica analógica. Para esses dados serem processados em computadores, necessitam ser convertidos. Os Conversores Analógico-Digitais (ADC) foram criados para converter os sinais analógicos que são contínuos na amplitude e no tempo, para sinais discretos e finitos. A discretização dos sinais digitais no domínio do tempo deve-se ao fato dos valores serem processados em intervalos discretos impostos pelo sistema que efetua os cálculos numéricos. Diferentes arquiteturas de ADCs estão disponíveis. A arquitetura sigma-delta (ou  $\Sigma\Delta$ ) é mais propícia para aplicações de elevada resolução.

As especificações dos ADCs são importantes e estão diretamente ligadas a qualidade do biossinal coletado. Requisitos como tipo de entrada (Single-ended, diferencial), resolução (número de bits), taxa de amostragem (amostras por segundo), span (mV), tensão de modo comum (V) e CMRR (dB) geralmente são os mais considerados.

O número efetivo de bits (**ENOB** – Effective number of bits) é a medição do intervalo dinâmico de um ADC e seu circuito associado. A resolução de um



ADC é dada pelo número de bits utilizado para representar um valor analógico, sendo esse número  $2^N$  considerando uma resolução de N bits. Entretanto, todos os circuitos analógicos introduzem ruídos e distorções que acabam diminuindo a resolução efetiva onde alguns bits menos significativos são desconsiderados. O ENOB varia de acordo com o ganho, a tensão de referência e o ruído de tensão RMS medido no circuito. A equação é apresentada abaixo, onde  $V_{REF}$  é a tensão de referência do conversor, Gain é o ganho utilizado e  $V_{RMS}$  é o ruído em RMS.

$$ENOB = \log_2 \left( \frac{V_{REF}}{\sqrt{2} \times Gain \times V_{RMS}} \right)$$

O Intervalo dinâmico (Dynamic Range) é a relação entre a tensão de referência e a menor parte do sinal (Geralmente dado pelo ruído em RMS) e é uma razão que é representado em decibéis e é calculado através da equação abaixo:

$$Dynamic\ Range = 20 \times \log \left( \frac{V_{REF}}{\sqrt{2} \times Gain \times V_{RMS}} \right)$$

Totalmente dependente do ruído RMS, o ENOB e o Intervalo dinâmico, são sensíveis ao Ganho e ao Intervalo de amostragem (Sample rate).

### 3.3.3 Processamento, transmissão e interface

Os conversores analógicos são periféricos que possuem interface para serem utilizados por sistemas de processamento. Em sistemas embarcado, os microcontroladores são sistemas de processamento de baixo consumo e atualmente possuem altíssima capacidade de processamento. Alguns modelos específicos possuem funções de DSP (*Digital signal processing*). Atualmente existem não apenas microcontroladores, mas sistemas completos dentro de um

único chip. Os chamados SoCs (*System on Chip*) são sistema que são dotados além do processamento, diversas interfaces de comunicação e transmissão sem fio, como *bluetooth* e WIFI por exemplo. Com gerenciamento de energia configurável, esses SoCs podem ser ULP (*Ultra Low Power*), chegando em consumos extremamente baixos, na ordem de 150  $\mu\text{A}$ .

### 3.3.4 Bluetooth

O Bluetooth é uma tecnologia (protocolo) de rede sem fios de especificação aberta, criada em 1998, através de um consórcio formado inicialmente por grandes empresas como Ericsson, IBM, Toshiba, Nokia e Intel, atualmente conhecido como consórcio **Bluetooth SIG** (*Bluetooth Special Interest Group*) com mais de 30,000 membros ao redor do mundo.

O Bluetooth opera na faixa ISM (Industrial, Scientific, Medical) centrada em 2.45 GHz, podendo variar entre 2.402 e 2.480 GHz.

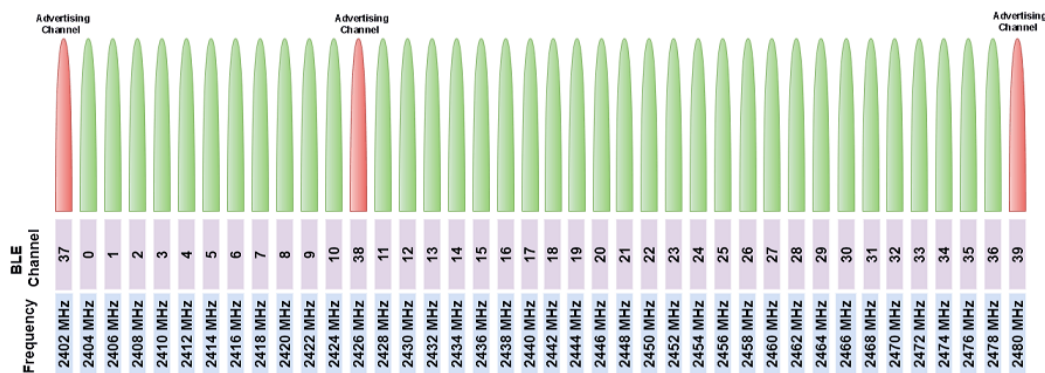


Figura 40 - Canais Bluetooth e suas frequências.(MATHWORKS, 2022)

O espectro de frequência é dividido entre 39 canais, onde destes, três canais são reservados para *advertising*. Estes canais de publicidade servem para que os dispositivos possam publicar suas disponibilidades conexões ou enviar informações para múltiplos dispositivos ao mesmo tempo. Os demais 36 canais podem ser utilizados para realizar comunicação direta entre dispositivos.

Para fazer o uso da tecnologia Bluetooth, um dispositivo deve ser capaz de interpretar determinados “perfis” Bluetooth. Os perfis são definições de aplicações específicas e comportamentos gerais de interface cujo dispositivos que possuem o padrão bluetooth de comunicação estão aptos a usar para se comunicar com outros dispositivos dotados de mesma tecnologia. Estes perfis incluem configurações para parametrizar e para controlar a comunicação desde o início. A adesão aos perfis economiza tempo para transmitir os parâmetros, uma vez que ambos os lados já aguardam o tipo de mensagem e formato a ser recebido. Há uma grande variedade de perfis Bluetooth que descrevem muitos tipos diferentes de aplicativos ou casos de uso para dispositivos. Seja para transmitir áudio de um fone sem fio, dispositivos de interface com o computador, como mouses e teclados, dados médicos em sensores de saturação de oxigênio, pressão arterial e temperatura, balanças de precisão, dentre outras centenas de perfis já estabelecidos pelo SIG. (BLUETOOTH SIG, 2022)

O protocolo foi primariamente projetado para baixo consumo de energia com baixo alcance, dependendo da potência. A Tabela 3 especifica as classes existentes, com suas potências e alcances máximos aproximados.

Tabela 3 - Classes dos dispositivos Bluetooth.

<b>Classe</b>	<b>Potência máxima permitida</b>	<b>Alcance (aproximado)</b>
<b>Classe 1</b>	100 mW (20 dBm)	Até 100 metros
<b>Classe 2</b>	2.5 mW (4 dBm)	Até 10 metros
<b>Classe 3</b>	1 mW (0 dBm)	~1 metro

Desde a sua criação, o Bluetooth passou por atualizações ganhando novas versões. Todas as versões suportam retrocompatibilidade, ou seja, dispositivos com bluetooth de versões mais recentes, conseguem se comunicar dispositivos dotados de versões anteriores.

A partir da **versão 4.0** foi criado no início de 2010 a versão **Bluetooth Low Energy (BLE)**, também conhecida como Bluetooth Smart. Diferente dos protocolos clássicos, chamados de *Basic Rate/Enhanced Data Rate* (BR/EDR), o protocolo do BLE usa um sistema de modulação mais simples e tende a

fornecer consumo e custo de energia consideravelmente reduzidos, enquanto mantém um alcance de comunicação semelhante. Como protocolo, ele não é compatível com as versões BR/EDR, entretanto, existem dispositivos que possuem a capacidade de operar em modo duplo, compartilhando uma única antena de rádio.

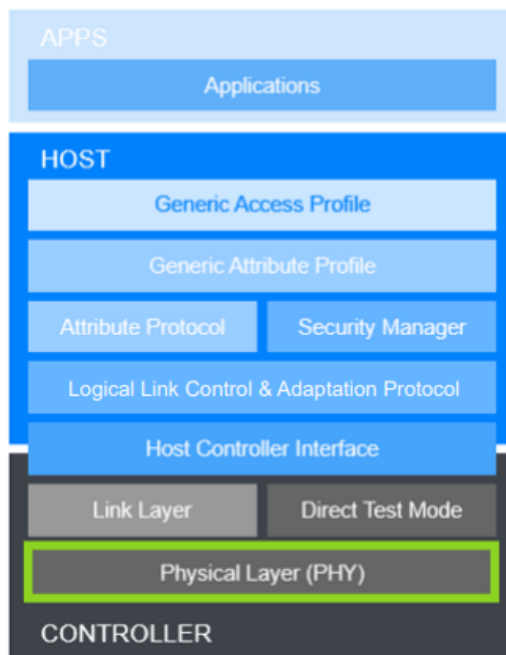


Figura 41 - The Bluetooth Low Energy stack.(BLUETOOTH SIG, 2021)

A Figura 41 exibe a pilha com as camadas do Bluetooth LE. Separado em três partes, o controlador (CONTROLLER), responsável pela camada física que envia e recebe os sinais em radiofrequência, o hospedeiro (HOST) que possui todas as principais regras, atribuições de perfis, camadas de segurança e interface entre o controlador e as aplicações (APPS), que como o próprio nome diz, contém as aplicações dos usuários.

A **versão 5**, também conhecida como Bluetooth 5, é a mais recente no ano de 2022 e possui como uma de suas maiores características, a possibilidade de operar sobre a camada física de 2 Mbps (LE 2M PHY), o que possibilita transferir dados em uma maior taxa, quando comparado a bluetooth que operam sobre o PHY convencional de 1Mbps (LE 1M PHY).

Mas isso não significa que as taxas de transmissão cheguem próximas aos valores de 1Mbps ou 2 Mbps. Isso porque o protocolo bluetooth opera sobre algumas regras importantes, como limite de número de pacotes por intervalo de conexão, intervalo entre os quadros, possibilidade de ter pacotes vazios sendo enviados na ausência de pacotes úteis disponíveis para envio, dentre outras informações que compõem o pacote de dados que não necessariamente são os dados úteis que se queira transmitir.

Para entender melhor os fatores que influenciam na taxa de transmissão útil, se faz necessário uma verificação detalhada do formato do pacote de dados bluetooth no formato LE, como é mostrado na Tabela 4.

Tabela 4 - Formato do pacote de dados do protocolo BLE.

Preamble	Access Address	PDU (2-257 bytes)					CRC
1 byte (1M PHY)	4 bytes	LL Header	Payload (0-251 bytes)			MIC	3 bytes
		2 bytes	L2CAP Header	ATT Data (0-247 bytes)		4 bytes	
ATT Header			ATT Payload				
Op Code	Attribute Handle		Up to 244 bytes				
2 bytes (2M PHY)			4 bytes	1 byte	2 bytes		

O tamanho da mensagem útil que cada pacote permite carregar é chamado de **ATT Payload**, onde no Bluetooth LE acima da versão 4.2 suportam até 244 bytes. Considerando que o tamanho completo do pacote pode possuir 262 bytes (uma vez que o MIC é opcional), significa um aproveitamento máximo teórico de 93% do pacote.

Além do tamanho do pacote, a frequência de transmissão e o intervalo com a qual ele é enviado determinará a taxa máxima de transmissão. Com isso, os fatores mais comuns que impactam na taxa de transmissão são listados abaixo:

- Camada física de transmissão - PHY ( LE 1 Mbps ou LE 2 Mbps);
- Intervalo de Conexão;
- Número máximo de pacotes por intervalo de conexão;
- ATT MTU (ATT Maximum Transmission Unit);

- Extensão de comprimento dos Dados (*Data Length Extension*);
- Tipo de Operação (Escrita com resposta vs. Escrita sem resposta);
- IFS (Inter Frame Space – Espaço entre quadros);
- Transmissão de pacotes vazios;
- Sobrecarga do pacote;

A **camada física de transmissão**, determina a frequência de transmissão do rádio pelo ar entre o transmissor e receptor. O **intervalo de conexão** determina quantos pacotes poderão ser enviados durante uma conexão. Quanto maior o intervalo, maior a quantidade possível de pacotes a serem enviados. O intervalo de conexão e a quantidade máxima de pacotes por intervalo pode variar entre diferentes dispositivos de diferentes fabricantes e seus valores geralmente são negociados no início da conexão e podem ser dinamicamente atualizados com base no perfil de uso.

A **extensão de comprimento dos dados** é uma característica criada a partir da versão 4.2, que permite alcançar 251 bytes totais de Payload (onde 244 são efetivos), contra 27 bytes quando a extensão não é ativada. O **ATT MTU** é a máxima quantidade de dados que podem ser manipuladas pelo transmissor e receptor durante a transmissão. O tipo de operação determina se a conexão será dependente de resposta ou não. Operações independentes de resposta possuem maior taxa transmissão e ainda assim são bem eficientes. O espaço entre quadros é, como o próprio nome diz, o tempo mínimo de espera entre dois pacotes consecutivos enviados no mesmo canal. Seu valor geralmente é de 150  $\mu$ s.

Durante as transmissões, caso o dispositivo que receba pacotes de dados, não tenha dados disponíveis para enviar de volta, pelo protocolo bluetooth, ele deverá responder enviando pacotes vazios. Por todos estes acordos, a mensagem que o pacote carrega, possui uma sobrecarga de informações extras àquelas chamadas de dados da aplicação (*application data – ATT data*) diminuindo a carga útil a ser transferida por pacote.

Diferentes dispositivos suportam diferentes taxas máximas de transferência. De acordo com o fabricante, os SoCs da família nrf52 da Nordic Semicondutores, possuem taxa de **transmissão útil máxima de 1447.2 kbps** (1.41 Mbps)

demonstrando uma eficiência útil de mais 70% da capacidade máxima da camada física de 2 Mbps. (DERHGAWEN, 2021)

### 3.4 A optogenética

A Optogenética é a combinação de métodos genéticos com óticos para alcançar ganhos ou perdas de funções ou eventos bem definidos em células específicas de tecidos vivos. (DEISSEROTH, 2011). A tecnologia combina ferramentas genéticas de controle, segmentáveis a regiões com células específicas e que respondem à luz, e tecnologias para entregar a luz nos locais sob investigação de forma controlada.

A Optogenética faz uso de proteínas opticamente ativadas para controle de funções neuronais, sendo uma metodologia em desenvolvimento na neurociência na busca do conhecimento sobre o sistema neurológico. As técnicas de optogenética proveem um meio de ativação ou inibição de populações distintas de neurônios com precisão sem precedente no âmbito espacial, temporal e neuroquímico. É o único método disponível capaz de ativar populações neuronais específicas incorporadas em estruturas densas e heterogêneas em um período de milissegundos. (BRITT; MCDEVITT; BONCI, 2012)

Em 1979, o Biólogo Molecular Britânico Francis Crick disse que o maior desafio da neurociência seria a necessidade de controlar apenas um tipo de célula no cérebro deixando as outras inalteradas, pois as técnicas desenvolvidas utilizando correntes elétricas, pulsos eletromagnéticos e etc. não eram capazes de serem precisas em células bem definidas, e quando eram precisas (fármacos) eram muito lentas. Crick ainda especulou mais tarde que a luz poderia ter propriedades para servir como ferramenta de controle. Entretanto, naquela época, os neurocientistas não conheciam nenhum método que pudesse fazer as células serem sensíveis à luz. (DEISSEROTH, 2011)

Em 1971, oito anos antes dos comentários de Crick, os alemães Walther Stoeckenius e Dieter Oesterhelt, descobriram que uma bactéria chamada

***Halobacterium halobium*** continha um pigmento roxo devido um tipo de proteína presente (sozinha) na membrana da bactéria que era quimicamente semelhante a uma rhodopsina e trabalhava como uma bomba iônica ativada instantaneamente por luz. (OESTERHELT; STOECKENIUS, 1971). Mais tarde, em 1977, os Japoneses Akemi Matsuno-Yagi e Yasuo Mukohata, se baseando nos trabalhos de Oesterhelt e Stoeckenius, realizaram um trabalho onde foram isolados duas colônias, uma de células vermelhas (não contendo a proteína) e outra de células roxas, onde foi possível perceber que, sobre a presença de luz (fluorescente), a cultura com a proteína teve seu pH aumentado (MATSUNO-YAGI; MUKOHATA, 1977). Ambos os trabalhos foram importantes para identificar a proteína ***halo-rhodopsin*** e algumas de suas propriedades.

Em 2002, um grupo alemão, liderado por Geor Nagel do instituto Max-Planck e por Peter Hegemann da Universidade de Regensburg, descreveu uma nova opsina chamada de **Channelrhodopsin-1** encontrada nas algas verdes *Chlamydomonas reinhardtii*. (NAGEL *et al.*, 2002), tendo um ano depois indentificado e descrito a **Channelrhodopsin-2** (NAGEL *et al.*, 2003).

Apesar de todas estas descobertas, apenas em 2005 as primeiras opsinas microbiais foram levadas aos neurônios para controle das funções cerebrais de forma precisa. Os americanos Edward Boyden e Karl Deisseroth de Stanford foram os responsáveis juntamente com sua equipe a controlar de forma bem definida populações neuronais específicas em animais de forma temporalmente precisa usando luz. (BOYDEN *et al.*, 2005)

### 3.4.1 A biologia molecular da optogenética

Um pré-requisito para qualquer experimento usando ferramentas de optogenética, é a entrega e a expressão dos genes de DNA optogenéticos nas células de interesse. Com esse DNA, a célula alvo é capaz de sintetizar nos ribossomos as opsinas que serão encontradas mais tarde na membrana celular funcionando como um canal ativado por luz,



Cada tipo de opsina possui um funcionamento específico para um comprimento de onda de luz sensível.

### 3.4.1.1 Opsinas

As Opsinas são um grupo de proteínas sensíveis a luz. Essas proteínas funcionam como canais na membrana das células que quando ativadas, podem fazer com que íons positivos ou íons negativos entrem na célula. Cada tipo de opsina é sensível a um comprimento (ou faixa de comprimento) de onda específico e permite seletivamente a passagem de tipos íons também específicos. As mais conhecidas e utilizadas, são opsinas do tipo microbiais, como a ChR2 (Channelrhodopsin-2), VChR1 (Volvox-Channelrhodopsin-1) e NpHR (Halorhodopsin).

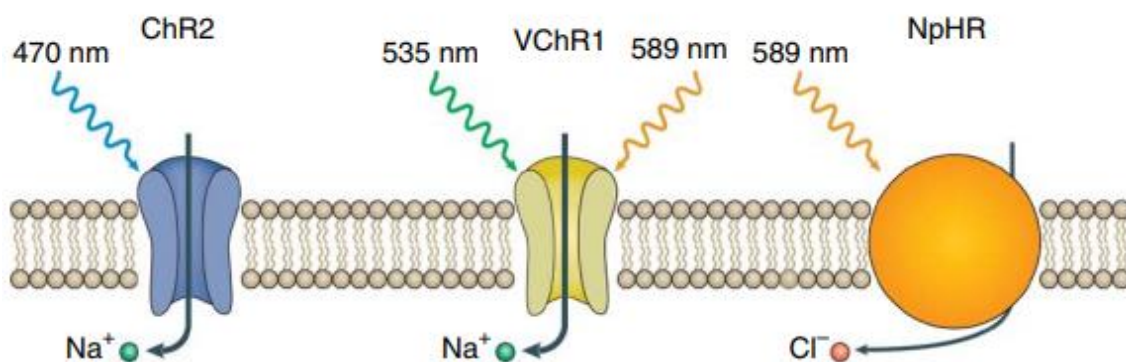


Figura 42 - Opsinas e seus comportamentos perante comprimentos de onda específicos (ZHANG *et al.*, 2010)

A **Figura 42** ilustra estas três opsinas. A primeira (ChR2) é ativada com luz azul com comprimento de 470 nm e com isso abre o canal permitindo a entrada de íons de sódio nas células. A segunda opsina ilustrada (VChR1) também abre o canal para os íons de sódio, entretanto, é ativada por comprimentos de ondas no espectro do verde (535 nm) e amarelo (589 nm). A terceira opsina (NpHR) permite a entrada de íons de cloro quando ativada através da cor amarela (589 nm). (ZHANG *et al.*, 2010)

A resposta de cada opsina tem seu pico de ativação em diferentes comprimentos de onda. A **Figura 43** mostra a resposta relativa das opsinas de acordo com o comprimento de onda. Isso quer dizer que uma luz de comprimento de onda de 500 nm, possui uma resposta relativa de 50% para o ChR2, 70% para o VChR1 e 25% para o NpHR.

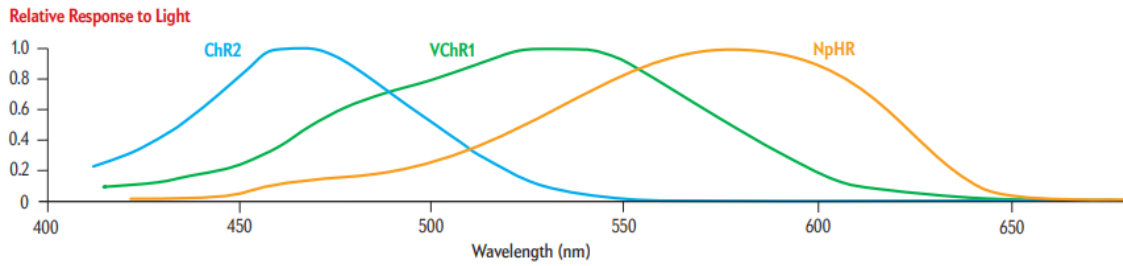


Figura 43 - Comprimentos de Onda de Luz e sua relação com as Opsinas (DEISSEROTH, 2010)

### 3.4.1.2 Entrega e expressão do gene opsina

Como citado no início do capítulo, um pré-requisito essencial para qualquer experiência optogenética é a entrega de DNA que codifica o (s) gene (s) optogenético (s) nas células de interesse. Isso quer dizer que os neurônios não são naturalmente sensíveis à luz. É preciso que as opsinas (proteínas) sejam engastadas na membrana celular para que através delas, ocorram a troca iônica (De cátions ou ânions) na presença da luz, facilitando ou dificultando a despolarização neuronal que dispara os potenciais de ação.

Os três métodos mais utilizados para a entrega do gene são vírus, eletroporação *in vivo* e geração de animais transgênicos já com opsinas.

As Abordagens virais tornaram-se mais populares devido à sua rápida geração e facilidade de uso. Os **vetores virais** baseados em lentivírus (Vírus de ação lenta) e Vírus Adeno-associado (AAV – Adeno-associated vírus) podem ser usados para entrega endereçada do gene Opsina em diversos tipos de animais, de roedores a primatas (ZHANG *et al.*, 2010). Estes vetores virais podem ser produzidos de maneira muito fácil e segura em menos de duas semanas. Entretanto, para aqueles que não possuem as condições de cultura e produção própria, muitas universidades e centros de pesquisa têm se especializado com estrutura para a produção dessas culturas e alguns disponibilizam ao público com fins de pesquisa. O Grupo de Optogenética de Stanford através do Dr. Karl Deisseroth e Charu Ramakrishnan disponibilizaram através do site do grupo, um canal para requisição de vetores virais. Atualmente, mais de mil materiais já foram enviados para o mundo todo, inclusive o Brasil (DEISSEROTH, 2018). O tempo para a expressão do gene opsina através dos vírus varia. Em geral, para cérebros de roedores, a expressão atinge níveis funcionais dentro de 3 semanas após a injeção do AAV e dentro de 2 semanas após a injeção do lentivírus. Para se alcançar níveis de expressão mais completos nos processos axonais distais, períodos acima de 6 semanas ou mais podem ser necessários. (ZHANG *et al.*, 2010)

A **eletroporação** *in vivo* é uma técnica de microbiologia onde um campo elétrico é aplicado sobre as células de forma intensa aumentando a permeabilidade de membrana celular permitindo a transferência de íons, moléculas e inclusive material genético (DNA) para dentro da célula. Com isso, a eletroporação também pode ser usada para fornecer DNA de Opsinas a neurônios do SNC. Atualmente essa técnica é utilizada inclusive *in utero* para entrega do gene nos embriões de roedores. Uma vantagem da eletroporação é que a entrega de DNA pode ser de qualquer tamanho, permitindo o uso de segmentos maiores de promotores para assim alcançar maior especificidade do tipo específico de célula alvo (ZHANG *et al.*, 2010), entretanto o método não possui precisão espacial na entrega do DNA semelhante aos vírus.

As tecnologias de geração de **animais transgênicos**, apesar de mais trabalhosas podem ser utilizadas para a expressão de pedaços específicos de genes em neurônios de ratos ou camundongos. Em princípio, qualquer tipo de célula identificada via marcadores celulares pode ser alterada, fundindo o gene opsina no promotor (região do DNA que inicia a transcrição de um determinado gene) do marcador do tipo específico de célula. O tempo para obter uma linhagem transgênica estabilizada de ratos pode levar de seis meses a um ano. Existem laboratórios especializados na criação e venda de animais geneticamente modificados contendo opsinas em determinadas células neuronais.(ZHANG *et al.*, 2010)

### 3.4.1.3 Tipos de opsinas e suas funções

Os genes de Opsina podem ser divididos em duas superfamílias distintas: Opsinas microbianas (Tipo I) e opsinas animais (Tipo II). As proteínas de ambos os tipos requerem retinal (Vitamina A), um micronutriente que serve como antena para os fótons. Quando o retinal é ligado, as opsinas funcionais são denominadas rodopsinas. (FENNO; YIZHAR; DEISSEROTH, 2011)

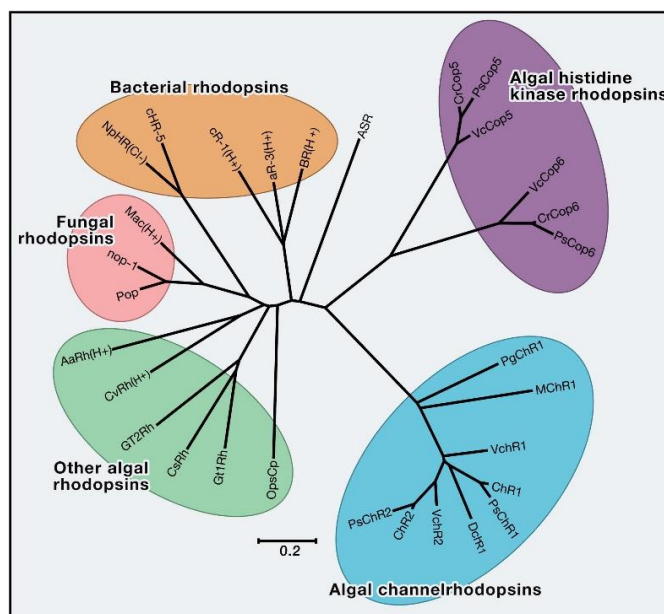


Figura 44 – Árvore filogenética de Opsinas do Tipo I (ZHANG *et al.*, 2011)

A **Figura 44** apresenta a árvore filogenética das opsinas do Tipo I (Microbiana). As ChR2 e VChR1 são encontradas nas algas e a NpHR em bactérias.

A **Tabela 5** mostra as três principais opsinas utilizadas atualmente em estudos, com seus mecanismos de ação, cor e comprimento de onda de maior pico de ativação e cinética de fechamento dos canais.

Tabela 5 - Opsinas, seus mecanismos, picos de ativação e cinéticas. (YIZHAR *et al.*, 2011)

Opsina	Mecanismo	Cor	Pico de Ativação	Off Kinetics
<b>ChR2</b>	Bomba de Cátions	Azul	470 nm	~10 ms
<b>VChR1</b>	Bomba de Cátions	Verde ou Amarelo	535 nm	133 ms
<b>NpHR</b>	Bomba de Cloro	Amarelo	589 nm	4.2 ms

O gráfico mostrado na **Figura 45** é mais global e demonstra vários tipos de opsinas segregadas em grupos de acordo com sua forma e velocidade de ativação. As opsinas mais utilizadas citadas acima são de rápida ativação ou inibição.

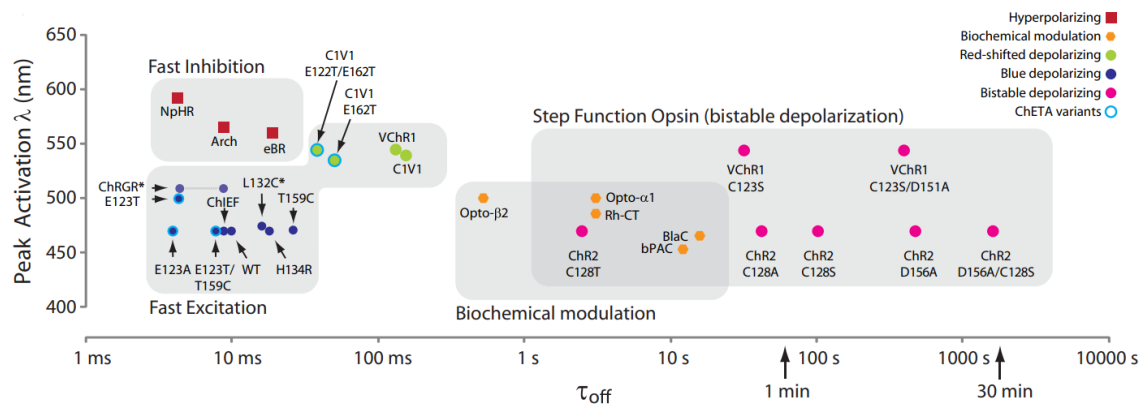


Figura 45 - Gráfico do Pico de Ativação versus tempo de Cinética para vários tipos de Opsinas (YIZHAR *et al.*, 2011)

### 3.4.2 Instrumentação para optogenética

A Instrumentação para Optogenética é dotada de diversas ferramentas e especificações, a fim de garantir a correta atuação e transmissão da luz para as células alvo. A escolha da fonte de luz, da fibra, construção do optrodo e da forma de chaveamento, são cruciais para o sucesso nessa jornada.

#### 3.4.2.1 Fontes de luz

Existem três parâmetros vitais na seleção de uma fonte de luz:

- Tipo de Fonte
- Comprimento de Onda
- Intensidade Luminosa

As duas opções mais comuns para o tipo de fonte incluem lasers de estado sólido (DPSS) bombeados por diodo e díodos emissores de luz (LEDs).

Tabela 6 - Cores e seus comprimentos de onda

Cor	Comprimento de onda
Violeta	380–450 nm
Azul	450–495 nm
Verde	495–570 nm
Amarelo	570–590 nm
Laranja	590–620 nm
Vermelho	620–750 nm

É importante que a fonte de luz seja apropriadamente alimentada, fornecendo luz suficiente para fornecer ativação. As opsinas típicas como ChR2 são ativadas ao máximo por menos de 1 mW (WARDEN; CARDIN; DEISSEROTH, 2014) de luz em um comprimento de onda específico. Para alcançar esse nível de luz na opsina, o uso de laser era inicialmente indicado devido sua capacidade de produzir maior intensidade luminosa. As perdas de luz ocorrem em qualquer junção (colimadores, conectores, divisores), bem como quando a luz passa através do tecido. Os lasers de 50-200 mW são normalmente utilizados para o trabalho in vivo para permitir a ativação máxima da proteína. (BRITT; MCDEVITT; BONCI, 2012)

### 3.4.2.1.1 DPSS

Os lasers DPSS são fáceis de usar e poderosos o suficiente para assegurar a ativação máxima das opsinas. Eles são caracterizados pelo comprimento de onda e intensidade da luz que emitem, e podem ser conduzidos por sinais digitais ou analógicos através dos drivers de controle.

Como um laser emite luz em um comprimento de onda específico (diferente do LED que pode ter seu espectro mais espalhado), é importante usar o laser apropriado para ativar uma proteína específica de opsina.

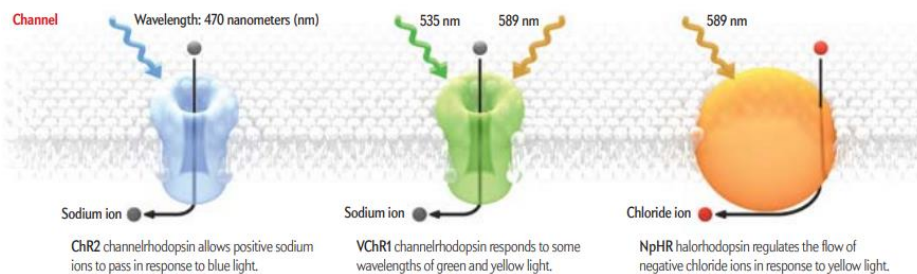


Figura 46 - Tipos de Canais Opsinas (DEISSEROTH, 2010)

A Opsina ChR2 por exemplo é ativada ao máximo por luz azul de 470 nm. A proteína vChR1 é ativada ao máximo por luz amarela de 589 nm, no entanto, ele pode ser ativado por um laser verde de 535 nm, que é significativamente menos caro do que um laser amarelo. A proteína Halorhodopsina inibitória é ativada ao máximo por luz amarela de 589 nm. (DEISSEROTH, 2010)

### 3.4.2.1.2 LED

Os LEDs representam uma alternativa (cada vez mais utilizada) aos lasers para ativar proteínas optogenéticas. Os LEDs são menores, mais baratos e disponíveis em uma maior variedade de cores e bem menos complexos. Entretanto geralmente proporcionam menos luz. Para aplicações in vivo, a luz do LED se não aplicada diretamente no tecido deve ser colimada em uma fibra óptica e existe uma grande dificuldade em realizar esse acoplamento



sem grandes perdas mantendo uma intensidade de luz suficiente. (BRITT; MCDEVITT; BONCI, 2012) A melhor alternativa é selecionar LEDs com excelente performance com baixa temperatura.

### 3.4.2.2 Fibra óptica

A fibra óptica, como dito anteriormente, é a principal forma de transmitir a luz gerada à distância para aplicação nas áreas desejadas. Na optogenética, as fibras são classificadas como de modo único ou múltiplo. A geometria do tecido que se espera iluminar deve influenciar a escolha do tamanho do núcleo da fibra: fibras menores podem causar menos danos nos tecidos se implantadas in vivo, mas geralmente são mais frágeis se quebrando mais facilmente principalmente quando menor que 100  $\mu\text{m}$ . Cuidados extras com as fibras devem ser tomados referente à qualidade de transmissão e entrega da luz.

A Figura 47 exibe a diferença entre duas fibras com diferentes qualidades de polimento, fazendo com que a potência luminosa final seja menor naquela não polida. (BRITT; MCDEVITT; BONCI, 2012)

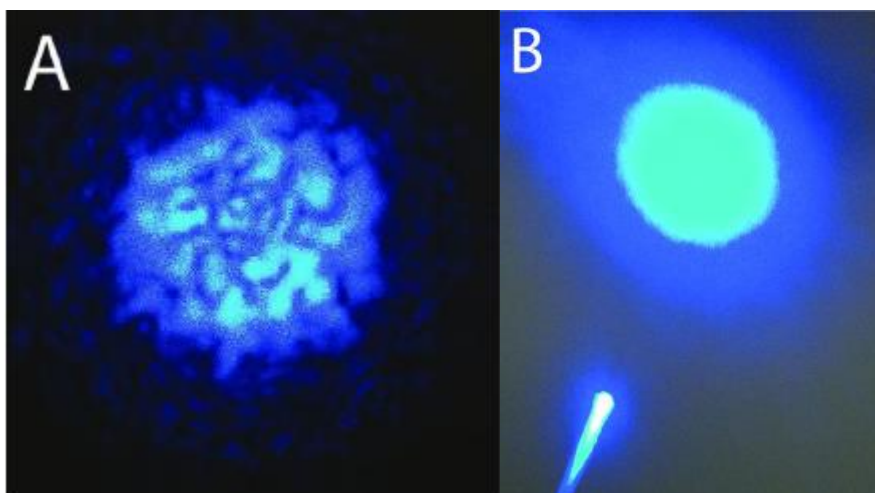


Figura 47 - A – Feixe de Luz emitido através de fibra não polida (A) e através fibra polida (B) (BRITT; MCDEVITT; BONCI, 2012)

### 3.4.2.3 Optrodos

Os Optrodos são ferramentas de aplicação optogenética que unem os eletrodos que realizam gravações de biopotenciais com as fibras ou LEDs para estimulação ótica. Funcionalmente, os optrodos precisam prover estabilidade e confiabilidade na estimulação e leitura para garantir a qualidade dos estudos evitando inclusive danificar o tecido cerebral no momento do implante.

As dimensões de optrodos variam de acordo com os estudos realizados e do tipo de animal em uso, mas geralmente são da ordem de milímetros, onde o comprimento pode ser maior caso se deseje acessar áreas mais profundas do encéfalo. Uma estrutura robusta é necessária para evitar que ele se agarre ou mesmo quebre dentro do tecido cerebral. Os materiais que entram em contato precisam ser biocompatíveis para evitar respostas imunológicas do tecido, o que certamente pode comprometer o estudo. Caso os LEDs sejam dispostos no optrodo, deve-se evitar o sobreaquecimento, pois além do risco de queima do tecido, a mínima alteração de temperatura ( $<1^{\circ}\text{C}$ ) influencia diretamente no rendimento das aberturas dos canais iônicos. Isso pode ser feito isolando os LEDs com PDMS ou algum outro material que faça o isolamento térmico e elétrico. Por isso deve-se levar em consideração também o uso de períodos curtos de ativação dos LEDs (GONCALVES *et al.*, 2017) (BRITT; MCDEVITT; BONCI, 2012)

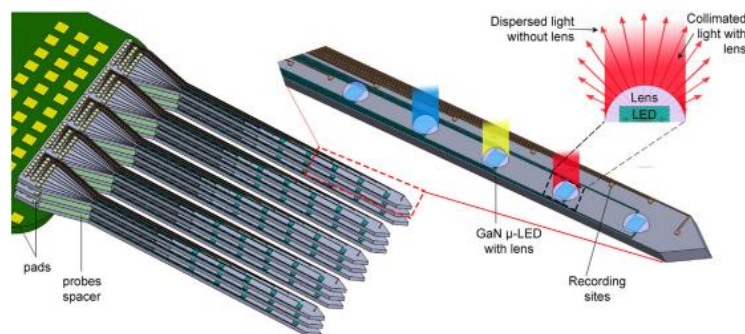


Figura 48 - Esquemático de Optrodo 3D resultado de 15 optrodos dispostos 3 x 5. Cada optrodo promove simultaneamente a gravação de biopotencial e estimulação ótica através de uLEDs individualmente endereçáveis com diferentes comprimentos de onda e colimação usando microlentes. (GONCALVES *et al.*, 2017)

### 3.4.2.4 Formas de chaveamento e triggering em optogenética

A forma de chaveamento de luz ótima, varia para cada tipo de opsina, comprimento de onda, intensidade da luz, região alvo e tipo de experimento. A ChR2 pode ser ativada com pulsos de luz de comprimento de 473 nm e potência variando de 1 a 5mW, com duração de 0.1 a 15ms (CHEN *et al.*, 2017). Os tempos de intervalo também podem variar com valores acima de 0.1 ms, mas geralmente acima de 10 ms. (BOYDEN *et al.*, 2005; BRITT; MCDEVITT; BONCI, 2012; LIN, 2012)

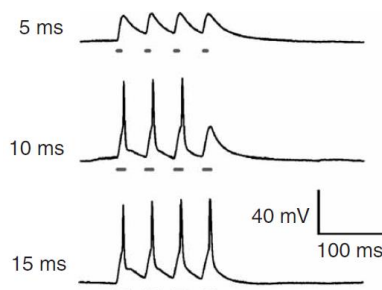


Figura 49 - Trem de impulsos gerados em resposta a pulsação de luz para diferentes durações – 5 ms, 10 ms e 15 ms respectivamente (BOYDEN *et al.*, 2005)

A despolarização da célula ocorre de maneira instantânea com atraso médio de 50  $\mu$ s após a ativação da luz, demonstrando a cinética rápida do sistema. (BOYDEN *et al.*, 2005)

Apesar de ser uma técnica poderosa, a optogenética possui certas limitações e cuidados a serem tomados com a excitação ou inibição. Basicamente, a velocidade da ativação e desativação dos canais de opsinas determina a frequência de disparo e os intervalos de atuação óticos levando em consideração inclusive os canais iônicos (de sódio principalmente) convencionais das células tanto para a despolarização quanto para a repolarização. Em alguns casos a ação dos canais é mais lenta, bloqueando a possibilidade de disparos mais rápidos. Os avanços da biologia molecular na optogenética tem avançado aumentando a velocidade de abertura e fechamento

dos canais óticos, evitando inclusive a influência dessas opsinas nos canais nativos das células que quando lentos, podem ser imprecisos.

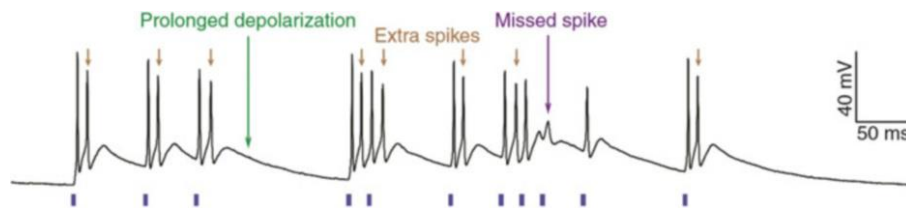


Figura 50 - Efeitos indesejados na optogenética (WALZ, 2017)

A potência de emissão dos LEDs usados na optogenética está ligado diretamente a quantidade de fótons recebidos e com isso, na eficiência do canal no processo de despolarização. A potência emitida pelo LED varia conforme a tensão e a corrente que alimenta o diodo. O controle convencional de potência se dá através do controle de corrente DC que passa pelo LED. Realizar esse ajuste via sistema digital pode se tornar um desafio. Um forma alternativa se sistemas embarcado para se controlar a intensidade luminosa é através de PWM (Pulse-Width Modulation ou Modulação por largura de pulso) que é uma técnica bem conhecida de modulação de sua razão cíclica para transportar qualquer sinal, de origem luminosa ou elétrica, controlando o valor médio entregue. Neste caso, ora emitindo luz, ora não emitindo. (CHEN *et al.*, 2017) A Figura 51 demonstra um esquema comparando duas formas de controle de potência luminosa dos LEDs. Uma delas através de ajuste de corrente DC e outra através de controle PWM.

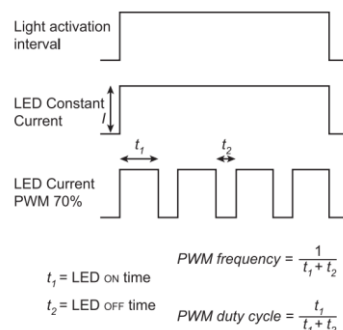


Figura 51 - Esquema mostrando a regulação por PWM da intensidade do LED (CHEN *et al.*, 2017)

Experimentos foram realizados demonstrando o uso de PWM como uma alternativa válida no controle de potência luminosa de LEDs na atuação ótica para ativação e despolarização dos neurônios quando comparado ao controle analógico convencional de corrente DC. A **Figura 52** mostra a comparação dos dois processos com controle de potência, comparando com a amplitude da foto-corrente evocada de um simples neurônio para diversas potências.

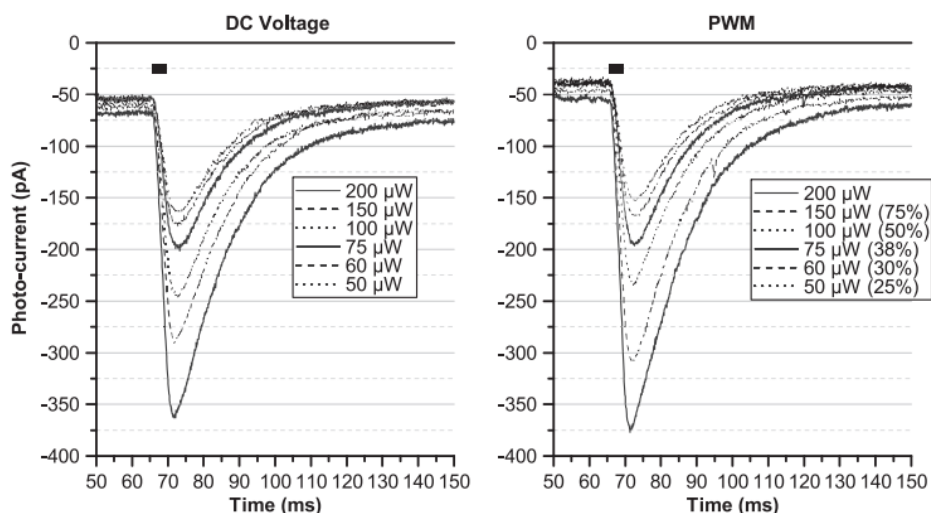


Figura 52 - Comparação da amplitude da foto-corrente evocada de um simples neurônio através de dois métodos de controle de intensidade luminosa. Controle de corrente DC (Esq.) e controle por PWM (Dir).

(CHEN *et al.*, 2017)

Essa comparação valida o uso de PWM para chaveamento e controle da intensidade luminosa para aplicações de optogenética.

### 3.4.2.5 Sistemas optogenéticos comerciais de bancada

Desde quando a optogenética foi inventada, por volta de 2010 por Karl Deisseroth, diversas empresas criaram ou aumentaram seu portfólio de equipamentos e sistemas focados para aplicação em optogenética.

Empresas como a Thorlabs, Crystal Laser, Cobolt – Hubner, RPMC Lasers, Coherent, Conduct Science, UltraLasers, Noldus, 89north, OptoEngine, CNI

Laser, NeuroLux, etc. são algumas das principais fabricantes de fontes de luzes e acessórios para optogenética.

Um sistema dedicado e convencional para uso em optogenética, geralmente possui os seguintes itens:

- Fonte de Luz;
- Driver para alimentação e controle da fonte de Luz;
- Gerador de função para criar o padrão de luz a ser enviado para os neurônios;
- Acessórios gerais, como fibras óticas, conectores, adaptadores e cânulas com as fibras que terão a responsabilidade de entregar a luz em um local específico.

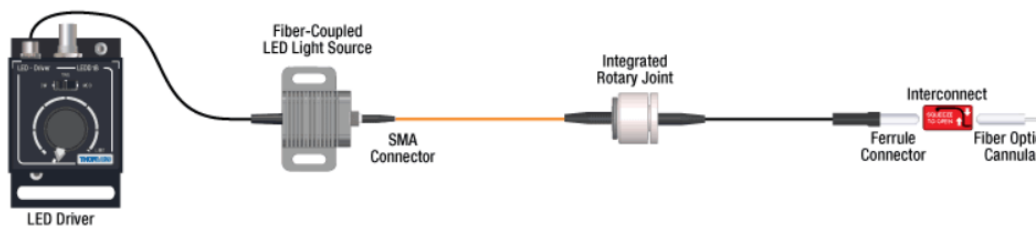


Figura 53 - Representação esquemática de um sistema optogenético fornecido pela Thor Labs.

A Figura 53 demonstra uma representação esquemática dos principais componentes de um sistema para aplicação optogenética. Atualmente os dispositivos de bancada são um pouco mais portáteis e permitem seu uso de maneira um pouco mais livre não necessitando estarem fixos em racks, mas ainda assim os cabos são uma presença que traz algumas limitações para as aplicações.

### 3.4.3 Sistemas optogenéticos sem fio

Devido ao vasto desenvolvimento de opsinas microbianas nos últimos 17 anos, muito se aprendeu no entendimento das relações causais entre a atividade neuronal e o comportamento em cérebros saudáveis e não saudáveis. Entretanto, conforme este entendimento evoluiu, estudos mais complexos envolvendo diferentes populações neuronais têm sido feitos (AMELI *et al.*, 2013; KRAVITZ *et al.*, 2010), necessitando de dispositivos capazes de ativar diferentes locais nos mesmos animais com precisão temporal e espacial cada vez mais exigentes. Em paralelo, com a crescente capacidade de desenvolvimento de microdispositivos, diversos trabalhos foram desenvolvidos, e com eles, dispositivos implantáveis de atuação optogenética contendo diversos canais, inclusive dispostos em *arrays* 1D e 2D foram desenvolvidos (GONCALVES *et al.*, 2017) para atender a complexa demanda de ativação dessas populações neuronais.

Entretanto, algumas dessas aplicações complexas que estudam o comportamento livre de animais durante longos períodos, necessitam de microdispositivos implantáveis e sem fios, evitando assim que a presença de cabos ou fibras acima do animal causem estresses, inflamações ou que de alguma maneira interfiram negativamente no estudo.

Com isso, diversos trabalhos e sistemas sem fio foram desenvolvidos nos últimos anos (FAN; LI, 2015). Esses dispositivos sem fio podem ser categorizados entre aqueles que usam baterias e aqueles que são alimentados através de radiofrequência (MONTGOMERY *et al.*, 2015). Em sua maioria, esses dispositivos implantáveis possuem apenas a capacidade de realizar ativações optogenéticas através de *arrays* com  $\mu$ LEDs, mas outros dispositivos (apesar de serem poucos) já contam com canais de aquisição de biopotencial elétrico agregado (AMELI *et al.*, 2013).



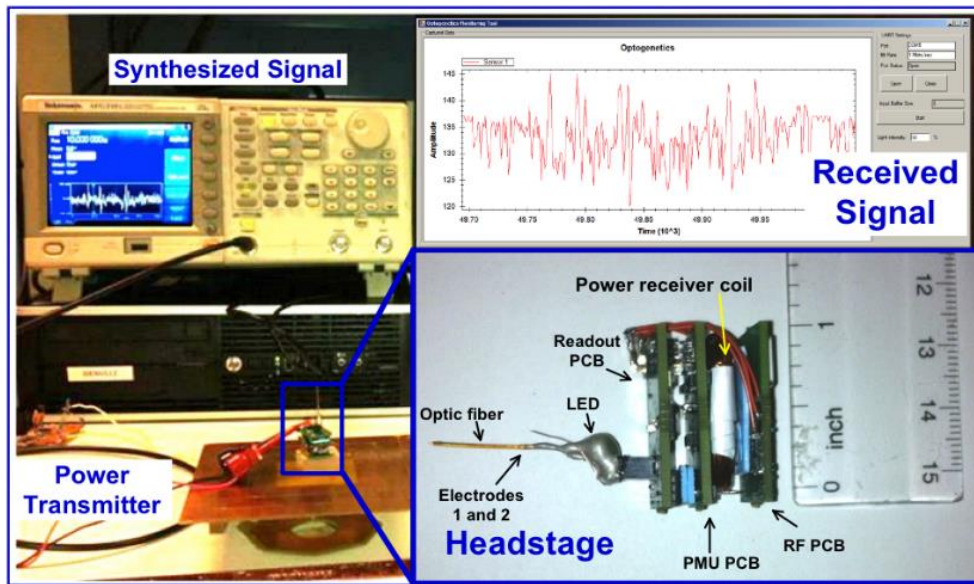


Figura 54 - Dispositivo para optogenética com ativação e aquisição de biopotencial (AMELI *et al.*, 2013)

A Figura 54 exibe um dispositivo sem fio dotado de ativação optogenética e aquisição de biopotencial. Com dimensões de 15x25x17 mm o dispositivo não utiliza bateria e possui um canal de excitação/inibição com LED com a entrega da luz através de fibra ótica e dois canais para aquisição de biopotencial. A resolução de aquisição é de 8 bits e a taxa de frequência pode chegar a 20kSps por canal. O dispositivo usa o ADC nativo do SoC (*System on a Chip*) da Texas Instruments, modelo CC430, e é alimentado através de 4 bobinas indutivas tendo o consumo total medido de 114.52-474.52 mW. O Controle luminoso do LED é feito através de PWM derivado do próprio microcontrolador interno ao CC430, um MSP430, e acionado através de um driver transistorizado.

Dentre diversos trabalhos, alguns deles se destacam na literatura pela extrema qualidade do dispositivo, ultraminiaturização (YANG *et al.*, 2021), com entrega de luz com precisão e potência necessária, em diversas possíveis partes do corpo dos animais.



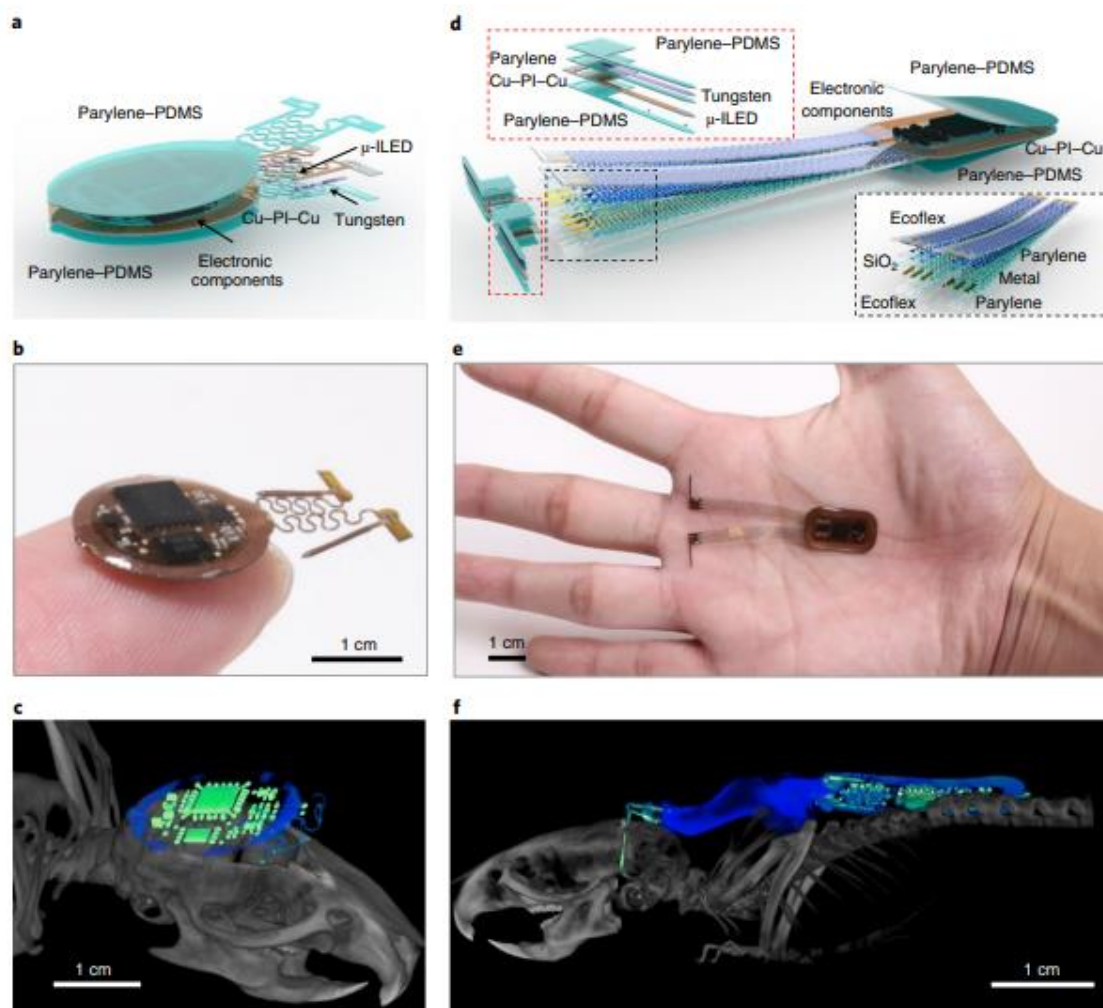


Figura 55 - Dispositivo Implantável ultraminiaturizado da empresa NeuroLux Inc. (YANG *et al.*, 2021)

A Neuralux, empresa responsável pela criação do dispositivo implantável, foi fundada em 2015 especialmente focada no desenvolvimento de ferramentas para optogenética. A empresa é fruto da colaboração, que se iniciou em 2011, entre dois grupos de pesquisa, um do departamento de ciência dos materiais e engenharia da Universidade de Illinois (UIUC) (Prof. J. Rogers) e outro da Universidade de Washington (Prof. R Gereau e Prof. M. Bruchas). O trabalho se iniciou seis anos após a criação da técnica de optogenética justamente para buscar soluções tecnológicas que resolvessem as limitações dos sistemas baseados em lasers e fibras óticas (Até então bastante utilizadas no laboratório do Prof. Bruchas para estudos optogenéticos). O objetivo de criar um dispositivo totalmente implantável, biocompatível, energizado sem fio, com entrega precisa de luz, gerou trabalhos extremamente relevantes (KIM *et al.*, 2013;

MICKLE *et al.*, 2019; SHIN *et al.*, 2017; WON *et al.*, 2021; YANG *et al.*, 2021) em revistas importantes como Nature, Science, Cell Press, IOP Science, etc..

A tecnologia que propiciou a criação da empresa utiliza transmissão de energia sem fio para os implantes por meio de acoplamento indutivo ressonante (*resonant inductive coupling*). O transmissor RF gera um sinal de 13.56 MHz de frequência transmitida através de um par de bobinas ao redor de uma gaiola projetada para os experimentos (30x30 cm). Em alguns modelos do dispositivo implantável, para funcionar de maneira constante, a energia recebida é retificada e utilizada para alimentar o módulo e ao mesmo tempo carregar um par de supercapacitores (3.3 V, 80mF) criando um banco de energia para suportar o sistema durante instabilidades na entrega da energia por conta da movimentação do animal dentro da gaiola. Esses capacitores podem suportar a alimentação do dispositivo por até 30 segundos sem depender da transmissão (MICKLE *et al.*, 2019).

Com a capacidade de entregar luz de maneira precisa, leve e confiável de forma sem fio e sem bateria, os pesquisadores que fundaram a empresa desenvolvem e publicam trabalhos trazendo inovações na aquisição de dados fisiológicos integrados, fazendo o uso da mesma tecnologia base inicial com acréscimo de outras tecnologias como bluetooth e sensores para realizar aquisição dos dados fisiológicos.

A Figura 56 exibe a apresentação do dispositivo, que realiza a leitura do volume da bexiga do rato, utilizando uma cinta perimetral baseada em extensômetro.

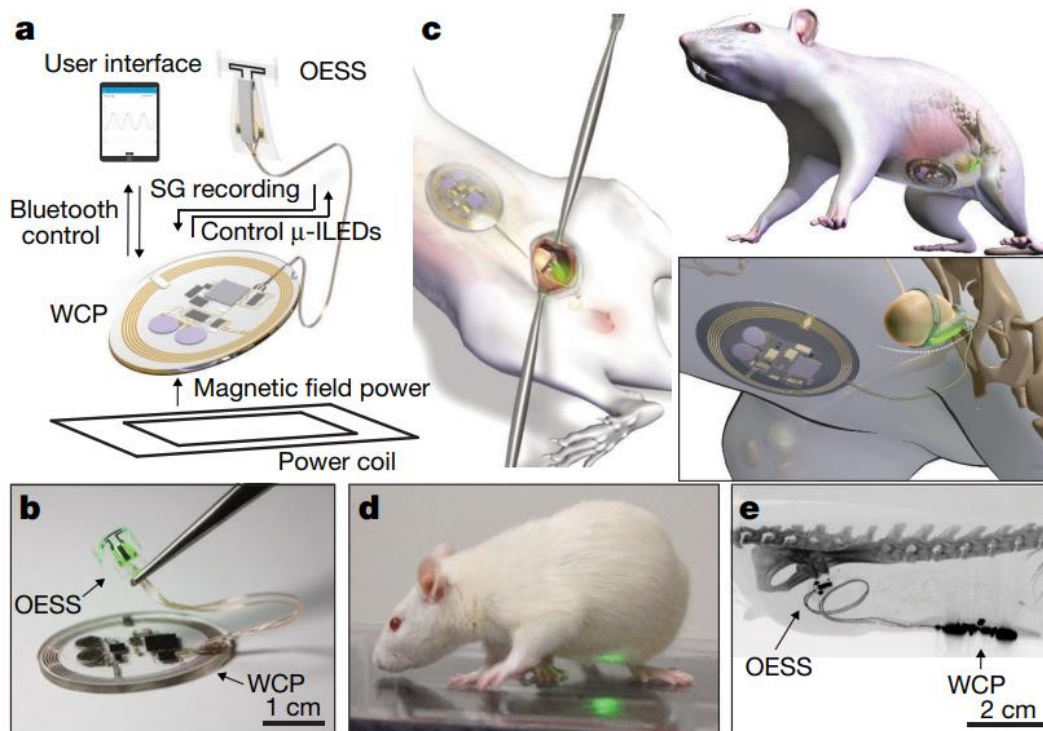


Figura 56 – Dispositivo ultraminiaturizado, desenvolvido por pesquisadores da Neuralux, com capacidade de detecção do volume da bexiga de um rato. (a) arquitetura do sistema, (b) foto do sistema com proporção do tamanho, (c) ilustração do acesso cirúrgico para controle do volume da bexiga, (d) foto do animal em livre movimentação durante o experimento e (e) tomografia computadorizada do dispositivo ressaltando a posição do optrodo (OESS – Optoelectronic stimulation and sensing) e da interface principal (WCP – Wireless Control and Power) (MICKLE *et al.*, 2019)

Esta mesma cinta, possui um  $\mu$ led de 540 nm com  $44 \pm 11 \mu\text{W}$  de potência luminosa que excita a parede da bexiga do rato a fim de estimular o nervo sacral, para tratar casos de bexiga hiperativa, incontinência urinária e cistite intersticial, também conhecida como síndrome da dor na bexiga. Apesar de em partes do trabalho utilizarem a tecnologia de entrega de energia sem fio, para aquisições e aplicações mais exigentes, baterias foram utilizadas (MICKLE *et al.*, 2019).

#### 4 Desenvolvimento da interface sem fios para optogenética

A instrumentação médica é definida como a ciência que estuda, desenvolve e aplica instrumentos de medição, monitoramento, atuação e controle de processos ou parâmetros para a área médica. Uma **medição de um parâmetro médico** consiste na comparação de uma grandeza com um determinado padrão ou referência.

A instrumentação médica pode ser um simples instrumento de medição direta de uma quantidade física, como por exemplo um termômetro de mercúrio que mede a temperatura e exibe essa informação através do nível do mercúrio que possui uma régua lateral calibrada milimetricamente, ou até um instrumento médico de aquisição de potencial elétrico, mede de forma segura a diferença de potencial entre dois pontos de um corpo.

Com a evolução da eletrônica digital, diversos novos componentes foram desenvolvidos para atender especificações cada vez mais exigentes. Além disso, com o surgimento de novas formas de comunicação, transmissões sem fio são cada vez mais comum na área médica em diversos padrões.

Diversos trabalhos desde 2005 (BOYDEN *et al.*, 2005) utilizam uma série de ferramentas que dão suporte na atuação óptica e leitura de biopotenciais e outros bio-sinais em experimentos com animais. São Lasers (ou LEDs), drivers de chaveamento, sistemas de aquisição, eletrodos, optrodos, softwares de aquisição/atuação e softwares de análise de biopotenciais. A maioria dos hardwares utilizados nessas pesquisas são dispostos em racks devido ao tamanho, complexidade, potência, número de canais, taxa de amostragem, resolução, etc. Com os instrumentos dispostos em racks, é necessário na maioria das vezes o envio e recepção dos sinais via cabos (elétricos e/ou fibras óticas). Em experimentos *in vivo* com animais não anestesiados, a presença de cabos conectados pode gerar um estresse no animal e alterar ou impactar nos resultados dos estudos alvo.

Com o avanço tecnológico eminente, tecnologias de transmissão sem fio estão cada vez mais poderosas, com menos consumo energético e disponíveis a um

baixo custo. Os sistemas de amplificação e conversão analógica seguem o mesmo fluxo, alcançando cada vez mais qualidades altíssimas em semicondutores comerciais de prateleira (*off the shelf* - OTS) totalmente integrados em minúsculos encapsulamentos SMD (*surface-mount device*).

Este trabalho tem como um dos objetivos iniciais o levantamento de especificações desejadas para a construção de uma interface sem fio para optogenética, com atuação e aquisição das respostas elétricas e de outros biossinais. Com isso, espera-se desenvolver um instrumento totalmente wireless e vestível ou até implantável que tenha um conjunto de ferramentas de alto rendimento, propiciando seu uso em diversas aplicações.

#### 4.1 Normas para dispositivos médicos e aplicações de optogenética em humanos

A instrumentação médica pode ser utilizada em diversos campos. Alguns dos campos mais comuns são o campo de **pesquisa** e o campo **clínico**. Para utilização no campo clínico, cada país possui sua regulamentação para validar e permitir a comercialização e uso dos dispositivos médicos garantindo segurança e desempenho essencial. Para padronizar e garantir a qualidade, normas técnicas vêm sendo desenvolvidas ao longo dos anos em diversas áreas de aplicação, desde segurança elétrica, compatibilidade eletromagnética, até normas que regulam o gerenciamento de risco. Organizações e Associações como a ISO (Organização Internacional de Normalização), AAMI (Associação para o Avanço da Instrumentação Médica) e ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), são algumas das entidades responsáveis por criar, traduzir, discutir, debater, evoluir e/ou padronizar conceitos, formas, medidas, processos e procedimentos diversos. Na área médica, essas normas vêm sendo utilizadas para criar requisitos gerais ou específicos, principalmente voltados para segurança básica e desempenho essencial dos produtos.

No Brasil, o órgão que regula o registro de dispositivos médicos é a **ANVISA** (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Quando se faz necessário os ensaios de segurança e desempenho essencial, a ANVISA delega aos órgãos certificadores o poder de analisar e definir quais normas se aplicam a cada dispositivo e analisar os relatórios desses ensaios emitindo certificados de conformidades para cada caso quando conveniente.

Órgãos como **INMETRO** (Instituto Nacional de Metrologia) e **ANATEL** (Agência Nacional de Telecomunicações) regulam os ensaios, determinando quais normas e edições devem ser aplicadas e acreditam Organismos Certificadores e Verificadores que poderão auxiliar diretamente as empresas, analisando as documentações de registro e homologação no Brasil. Semelhantemente nos EUA, o FDA (Foods and Drug Administration) e o FCC (Federal Communications Commission) são os principais órgãos que regulam o registro de equipamentos médicos e de telecomunicação e exigem de forma muito semelhante os ensaios e homologações.

Para o uso comercial de dispositivos com tecnologia sem fio, é essencial utilizar módulos homologados. Isso garante que a tecnologia utilizada não fere, nem interfere em outros sistemas. No Brasil a ANATEL tem o papel de homologar todos os dispositivos comerciais que emitem e recebem radiofrequência.

Dispositivos inovadores enfrentam dificuldades no momento dos registros para uso clínico, pois as normas específicas que deveriam ser aplicadas para trazer segurança e eficiência, ainda serão criadas conforme os primeiros dispositivos são desenvolvidos e registrados. Entretanto, normas mais gerais e particulares semelhantes podem ser aplicadas para auxiliar na verificação da segurança básica e desempenho essencial do produto.

Mesmo no caso de pesquisas clínicas, utilizar equipamentos que atendam as normas de segurança básica e desempenho essencial, facilitam a aceitação dos comitês de ética, pois auxiliam no controle dos riscos associados ao uso de novos equipamentos.

A Optogenética para uso clínico ainda é extremamente recente, entretanto estudos clínicos já são feitos se propondo tratar ou conhecer melhor algumas condições clínicas. Um dos casos mais conhecidos é o da Retinite Pigmentosa. Uma degeneração hereditária, rara, mas progressiva da retina, que diminui a capacidade visual do indivíduo, podendo chegar à cegueira legal. A proposta aqui é realizar a expressão das opsinas diretamente nas retinas para retomar a capacidade de sensibilidade à luz retomando a capacidade visual do indivíduo. (KENT, 2021) (NIH, 2022)(WHITE; MACKAY; WHITTAKER, 2020)

Além das aplicações para restaurar a visão nos casos das condições de Retinite Pigmentosa, outras aplicações estão em fase de pesquisa como implantes cocleares optogenéticos que se propõem a melhorar a experiência auditiva convertendo os sons ambientes em luz que são diretamente enviadas para os neurônios primários auditivos, os neurônios gânglios espirais – também conhecidos como cocleares (geneticamente modificados para serem sensíveis à luz). Se as pesquisas obtiverem sucesso, os implantes cocleares baseados em optogenética poderão converter informações auditivas em sinais luminosos que irão estimular o cérebro com pulsos sinápticos de maneira semelhante aos implantes cocleares elétricos convencionais. Entretanto, como a optogenética é mais precisa, por atingir apenas neurônios que contenham as opsinas, a experiência auditiva com este tipo de implante, poderá ter resultados mais ricos, uma vez que as estimulações elétricas por corrente não são precisas localmente, podendo até criar distúrbios e disparos em neurônios próximos que possuem outras finalidades causando possivelmente efeitos colaterais não desejados.(KENT, 2021)(WHITE; MACKAY; WHITTAKER, 2020)

Aplicações voltadas para Parkinson também estão sendo desenvolvidas, entretanto, estas aplicações possuem a finalidade de identificar regiões do cérebro relacionadas ao controle emocional e funções motoras, que geralmente são danificadas com a presença da síndrome e levam o desenvolvimento de sintomas como ansiedade e depressão. O uso da optogenética neste caso não tem o desfecho de curar, mas sim de entender as conexões, causas e efeitos entre a síndrome de Parkinson e os sintomas de ansiedade e depressões.(KENT, 2021)

Certamente, os maiores desafios para aplicações de optogenética em humanos são a natural falta de tecnologias implantáveis e seguras para entrega da luz diretamente nas regiões neuronais alvos, o próprio entendimento das conexões neuronais com causas e efeitos, e o desenvolvimento de vetores virais específicos para cada tipo de população neuronal afim de garantir precisão na entrega das opsinas. O cérebro é um órgão extremamente controlado e a alteração da temperatura local por um eventual sobreaquecimento causado pela dissipação de energia nos emissores de luz (como no caso dos LEDs) podem causar efeitos colaterais irreversíveis. Entretanto, com o avanço da tecnologia e das aplicações em pesquisa, estes desafios serão naturalmente contornados.

## 4.2 Levantamento de Requisitos e Arquitetura do Sistema

Não saber especificar corretamente o que um determinado sistema deverá fazer é muito comum e existem técnicas para auxiliar no levantamento de requisitos. O tempo e o custo são os principais parâmetros envolvidos. No caso do desenvolvimento de softwares, pequenos e médios erros podem ser corrigidos sem muito impacto no tempo. No caso de erros de projeto de hardware, o impacto é consideravelmente maior e mais doloroso. Por isso, é importante ter compreensão do domínio e conhecer de fato a finalidade de uso do sistema, pois um erro pode culminar na falha do desenvolvimento matando o projeto, principalmente quando se trata de projetos com prazos curtos e de grandes responsabilidades.

As ferramentas utilizadas atualmente para interface optogenética, tem como base a excitação/inibição com o uso de luz modulada temporalmente precisa. Mas interfaces mais complexas, além da ativação, também realizam em paralelo a aquisição de biopotencial para feedback da resposta cerebral para as excitações realizadas ou até leituras de outros biossinais que de forma indireta, demonstram ou comprovam a eficiência da atuação optogenética.



Como visto na seção 3.4.3, diversos trabalhos citam em seus materiais e métodos contemplando as formas de escrita e/ou leitura de biopotencial em optogenética, trabalhando com diversos elementos tecnológicos, sejam ligados através de fios ou de forma wireless (MONTGOMERY *et al.*, 2015). Entretanto, não foi encontrado até o momento na literatura nenhum trabalho – a não ser como sugestões pontuais de trabalhos futuros – que contemple de fato todas as características aqui planejadas em uma única solução que seja simples, prática, de baixo custo e que possa atender inclusive os emergentes centros de pesquisa que desejam trabalhar com optogenética em seus diversos universos e que ainda dispõem ou não de outros métodos de interface.

O sistema de interface sem fios para optogenética tem por definição inicial, os seguintes requisitos básicos:

- Ser um sistema microcontrolado embarcado, reutilizável, de baixo custo, baixo consumo e com uso de bateria;
- Ser uma tecnologia portátil, vestível ou até implantável;
- Ter conectividade sem fio de baixa energia para propiciar leitura e escrita de bio-sinais sem perdas;
- Aquisição analógica de biopotencial neuronal elétrico;
- Possibilidade de aquisição de outros sinais analógicos de origem fisiológica;
- Possibilidade de aquisição de dados inerciais (Acelerômetro, Giroscópio e Magnetômetro) para identificação de comportamento e movimentação dos animais;
- Ser capaz de executar de maneira precisa temporalmente ativação optogenética;
- Customização e troca prática de Optrodo;
- Software de interface, com programação de receitas, gerenciamento de optrodos, customização e seleção de receita para controle das excitações óticas, aquisição e gravação dos biopotenciais e outros bio-sinais em alta frequência e resolução.

O Desenvolvimento de uma interface sensorial sem fios para optogenética, com essas características básicas, criada sem um viés de um problema ou estudo específico, gera a necessidade de se projetar algo que seja completo, robusto, genérico e que ao mesmo tempo possa ser customizado especificamente para um propósito sem a perda de funcionalidades ou acréscimo de ruídos ou complexidades.

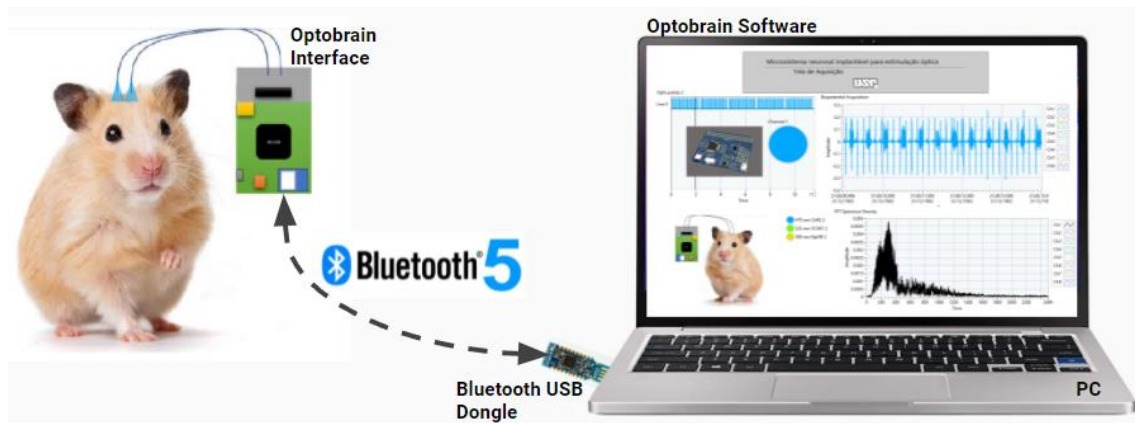


Figura 57 - Arquitetura geral com os componentes da solução.

A Figura 57 ilustra a arquitetura geral da solução. O hardware a ser desenvolvido para ativação e aquisição de biossinais sem fios será aqui referenciado como **Optobrain Interface**. O software para PC a ser desenvolvido, será chamado de **Optobrain Software**. Uma vez que nem todos os computadores possuem conectividade Bluetooth de alta velocidade, um receptor bluetooth USB representa e garante a conectividade entre o PC e a Interface sem fios para Optogenética.

Projetar uma interface sem fios para optogenética é por si só uma tarefa desafiadora, pois existem diversas considerações e restrições que se aplicam. As maiores restrições são a fonte de energia limitada e a necessidade de um formato pequeno para ser utilizado de forma portátil, vestível ou até implantável. As fontes de energia, se não transmitidas de forma sem fio, necessitam de pequenas baterias que entreguem a quantidade de tensão e corrente elétricas necessárias para entrega de luz na potência luminosa mínima ser alcançada. Além disso, para interfaces que se queiram realizar a aquisição de biossinais, como biopotenciais neuronais, trazem consigo desafios

de compatibilidade eletromagnética (EMC) e interferência eletromagnéticas que podem comprometer a qualidade dos sinais em aquisição. A presença de comunicação sem fio e transmissões seriais digitais em alta frequência, se próximas da interface de aquisição analógica, comprometem a imunidade trazendo ruídos ao sinal coletado degradando o desempenho na aquisição dos biopotenciais.

Na optogenética atual, existe uma diversidade de tipos de opsinas que possuem seu pico de ativação em distintos comprimentos de onda. Além disso, o número de canais os quais se deseja trabalhar depende do objetivo e da complexidade de controle. Devido a essa dificuldade, muito trabalhos precisam ser divididos em várias etapas (DEISSEROTH, 2014; JI; WANG, 2016) fazendo o uso de diferentes animais com diferentes posicionamentos da ativação optogenética. É certo que o desenvolvimento dos optrodos é chave e um desafio à parte, para que além de alcançar os locais com precisão espacial e temporal, não interfira no restante do sistema. (GONCALVES *et al.*, 2017)

Além disso, muitos estudos de optogenética são feitos com células ou animais anestesiados e em repouso, o que facilita o uso de soluções mais convencionais de bancada. Entretanto, com o avanço das pesquisas em optogenética a possibilidade de utilizar o sistema em animais em movimento, faz-se a necessidade de transformar a solução em algo vestível ou até implantável.

De acordo com os requisitos básicos listados, para se projetar a arquitetura do hardware da interface Optobrain, é necessário organizar as partes do sistema:

- Driver e fonte de luz para ativação optogenética;
- Leitura de Biopotenciais e demais biossinais;
- Processamento;
- Transmissão sem fio;
- Unidade Inercial;
- Gerenciamento de Energia;
- Conector multivias para interface;

Considerando as partes do sistema, a Figura 58 ilustra a representação dos componentes que farão parte da arquitetura do hardware da interface.

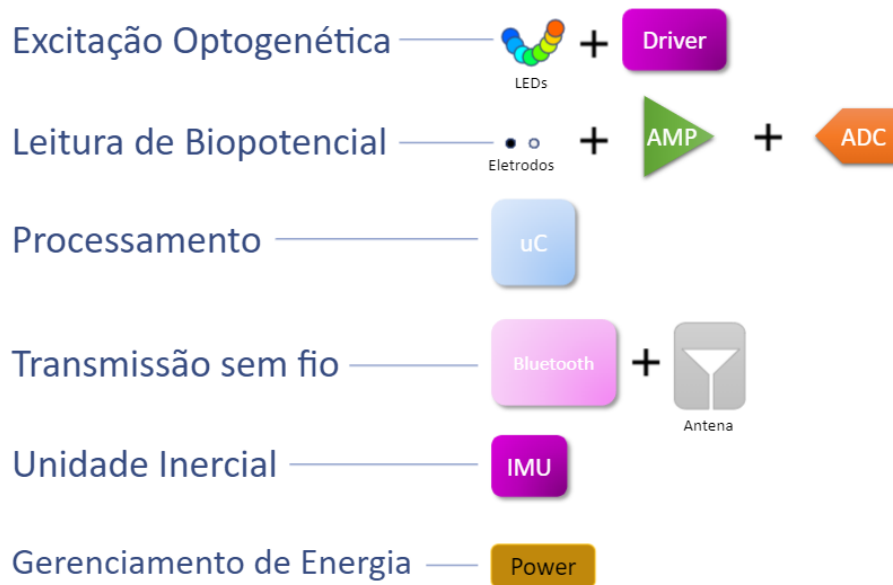


Figura 58 – Representação dos componentes elementares baseados nos requisitos para criação da arquitetura de hardware da interface

Considerando de maneira preliminar e linear a distribuição dos componentes, a Figura 59 traz uma primeira visão representativa para análise e discussão. Ainda sem especificar modelos, subsistemas e critérios de *design*, todos os componentes representados atendem os requisitos listados inicialmente.

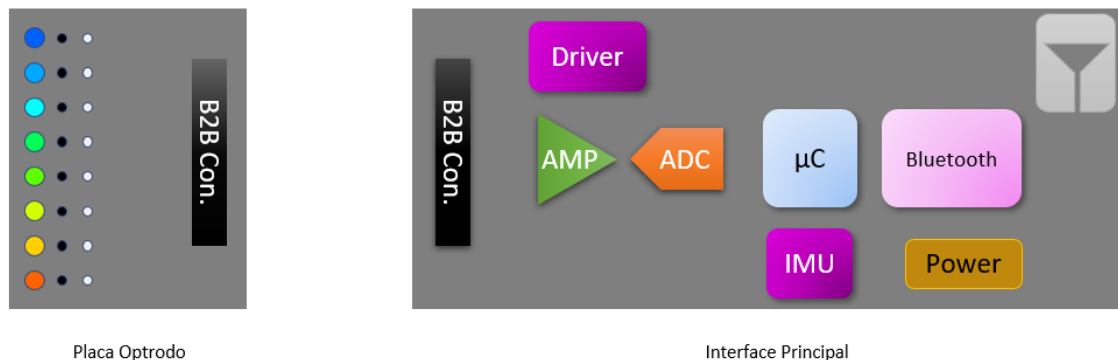


Figura 59 - Distribuição inicial dos componentes elementares planejados para a interface.

Pelo lado esquerdo, tem-se a representação da Placa Optrodo, que é composta por um conector de interface, a ativação optogenética representada

em parte pelas diferentes cores de LEDs, e a representação dos pares de eletrodos de aquisição de bio-sinais. Pelo lado direito, tem-se a representação da arquitetura da interface principal, composto pelo *driver* de controle dos LEDs, amplificadores operacionais, microcontrolador, transmissão bluetooth com antena, unidade inercial, gerenciamento de energia e conector de interface responsável pela conexão entre Optrodo e a Interface Principal.

Outra opção de arquitetura é, por exemplo, o deslocamento do *driver* de controle dos LEDs para a Placa do Optrodo. Esta simples decisão pode trazer diversos benefícios. São eles:

- Menor tamanho da interface principal;
- Menor corrente máxima necessária através dos conectores de interface para levarem potência individualmente para os canais de LEDs;
- Possibilidade de uso de outros drivers de atuação, que não apenas de luz, mas também de eletricidade, como no caso de dispositivos de estimulação elétrica profunda (*DBS – Deep Brain Stimulation*), exponencializando a capacidade de uso da interface principal;
- Aplicações sem necessidade de atuação, usando o conector apenas para conexão das leituras de bio-sinais, transformando o sistema em um sistema de aquisição de bio-sinais portátil, fazendo o uso do mesmo hardware principal;

O prejuízo, por outro lado, neste caso pode significar um aumento no custo das placas optrodos que precisarão sempre contar com um driver de controle de LEDs. Caso ambas as soluções tenham benefícios importantes, o projeto poderá contar com mais de uma versão final de hardware para propósitos distintos.

A placa optrodo, apesar de representar múltiplas entradas através dos eletrodos e saídas de luz, a depender das aplicações necessárias, seus requisitos podem ser customizados para cada tipo de aplicação.

O último dos requisitos básicos listados no início é a necessidade de um Software de interface, com programação de receitas, customização e controle das excitações óticas, aquisição e gravação dos biopotenciais e outros

biossinais em alta frequência e resolução. Atualmente no mercado, não existem softwares de prateleira e livres que possam atender as necessidades do projeto. Portanto, se faz necessário o desenvolvimento de um software específico que atenda, a partir dos requisitos básicos e do hardware a ser desenvolvido, as necessidades da interface e dê suporte para que o usuário possa ter a melhor experiência ao utilizar o sistema.

As seções 4.3 e 4.4, tratam especificamente do desenvolvimento do Hardware e do Software de Interface OptoBrain.

### 4.3 Desenvolvimento do hardware

A proposta de desenvolvimento da Interface Wireless para optogenética deve seguir em acordo com o levantamento de requisitos do sistema, contemplando todas as funcionalidades e validando de acordo com a evolução do desenvolvimento. Algumas considerações são relevantes para o sucesso do projeto.

A escolha de componentes eletrônicos comerciais de prateleira (*Off The Shelf - OTS*) se bem especificados, podem encurtar o tempo de desenvolvimento e evitar transtornos por terem diversas aplicações disponíveis e já validadas por seus fabricantes, muitas das vezes inclusive com bibliotecas de firmware e drivers prontos.

Os componentes eletrônicos comerciais mais críticos e complexos (Processadores, Conversores Analógicos Digitais etc.) geralmente possuem kits de desenvolvimento (Placas prontas contendo o componente e aptas ao uso) que facilitam a validação feita pelos desenvolvedores, evitando etapas iniciais de prototipação. Nestes kits, além do hardware, muitas das vezes também acompanham o firmware e o software para possibilitar os testes de maneira mais ágil e direta. Empresas como a Texas Instruments, Maxim, Silicon Labs, Analog Devices, Nordic Semiconductor, dentre tantas outras, se destacam na área de semicondutores com opções vastas de kits de

desenvolvimento para validação de seus principais componentes para uso em produtos.

Projetos de dispositivos implantáveis ou vestíveis, requerem um tamanho de eletrônica reduzida para o produto final. Entretanto as primeiras versões dos protótipos podem e devem ser feitas em maior escala dimensional para facilitar a validação dos esquemáticos projetados. Placas de circuito impresso rígidas são as mais comuns no mercado, entretanto, com o avanço na área de manufatura eletrônica, as placas híbridas ou totalmente flexíveis já são bastante adotadas, com capacidades para multicamadas, alta capacidade, montagem de componentes e possibilidade de manufatura, inclusive para fase de prototipação, em sites e fornecedores (em sua maioria chineses – PCBWay, Seeedstudio, PCBgogo) com altíssima qualidade e capacidade de entrega mundial com preços e prazos atraentes.

O uso de pontos de teste (*Test point – TP*) também é recomendado para acessar facilmente locais cujo se possam executar leituras, testes, análises de níveis lógicos, protocolos seriais ou de níveis de tensões elétricas pré-estabelecidas, seja para uso durante a fase de desenvolvimento ou até para testar placas durante a manufatura da placa ou montagem dos componentes no produto final. Esses pontos de teste podem ser impressos na própria placa, como *Teardrops* ou outros formatos de fácil acesso com uma ponteira de multímetro, ou até em forma de componentes, como resistores de 0 ohms que deixam o acesso fácil com uma ponteira.

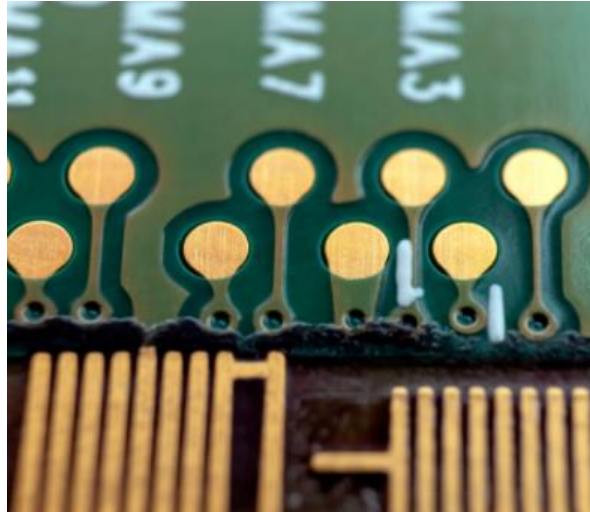


Figura 60 – Pontos de teste em formato de *Teardrops* em uma placa de circuito impresso.

A comunicação entre componentes eletrônicos como microcontroladores, conversores AD, memórias EEPROM e demais periféricos, atualmente são feitas em alta velocidade (kHz até GHz) através de protocolos seriais como SPI (*Serial Peripheral Interface*), I2C (*Inter-Integrated Circuit*), UART (*Universal asynchronous receiver/transmitter*). Estes protocolos e suas características geralmente são bem especificados nas folhas de dados dos componentes e precisam ser implementados via firmware nos microcontroladores. Fazer o uso de equipamentos analisadores lógicos de sinais, pode agilizar o tempo de desenvolvimento e validação da programação desses protocolos. A Figura 61 exibe um dos analisadores mais utilizados no mercado. Ele acompanha os cabos já com cores pré-definidas para diferenciar os canais, pequenos cliques de teste que podem ser presos diretamente em pequenos componentes para facilitar as análises e software de análise com decodificação para os principais protocolos seriais utilizados. Os modelos mais recentes, contam com leituras digitais e analógicas com até 16 canais e velocidades de leituras de até 500MS/s.(SALEAE, 2022)





Figura 61 - Analisador lógico Saleae. (SALEAE, 2022)

#### 4.3.1 Escolha dos componentes críticos

A escolha dos componentes eletrônicos de um projeto, é um processo minucioso e contínuo, que se inicia na fase de planejamento e acompanha o produto durante todo o seu ciclo de vida. Com a pandemia da COVID-19, o mercado de semicondutores vem sofrendo desde o início de 2020 uma escassez forte de componentes eletrônicos além do aumento dos preços de forma exorbitante. Causada inicialmente pela paralização ou desaceleração das fábricas de semicondutores (A maioria localizada na China), por conta do distanciamento social, com a lenta retomada, um grande gargalo vem ocorrendo por diversos motivos e efeitos em cascata, fazendo o preço subir consideravelmente e tempos de produção maiores do que de costume devido à alta procura.

Dentre todos os componentes eletrônicos utilizados em um produto, existem aqueles que são considerados críticos, seja pela importância ou especificação desejada para o projeto, seja pela complexidade de design e impacto direto no reprojeto caso haja necessidade de substituição, por escassez ou fim do ciclo

de vida daquele componente. Por isso a escolha destes componentes deve ser feita com atenção em diversos aspectos.

Uma vez que os requisitos e a arquitetura básica do sistema de optogenética foram levantados, se faz importante a definição dos componentes críticos do sistema a serem utilizados, pois será a partir deles que o restante do sistema será projetado.

O Primeiro componente utilizado no início do trabalho para o desenvolvimento do sistema foi um **Intel Edison**, lançado em 2014. Do tamanho de um cartão SD, o Edison é um SoC (*System on a Chip* - Sistema em um chip) e possui um processador Atom dual core de 500MHz e comunicação sem fio. Dotado de um conector de 70 pinos, o Edison possui 20 saídas digitais, incluindo 6 como PWM, comunicações seriais (UART, SPI, I2C, USB) e seis entradas analógicas, possui armazenamento de 4GB e memória de 1GB DDR3.

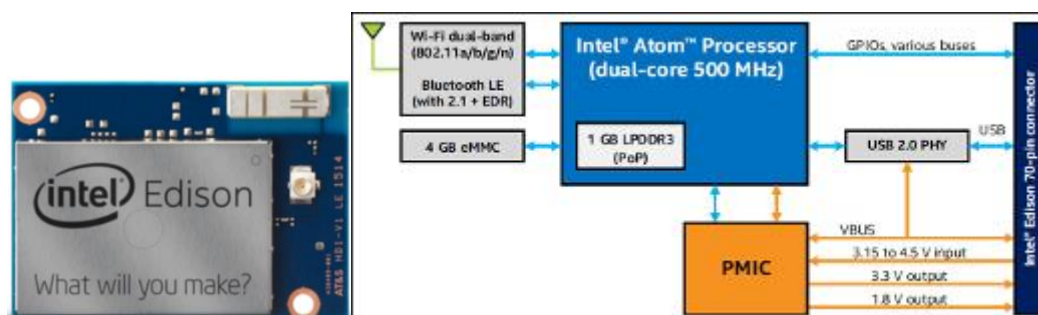


Figura 62 - Placa Intel Edison e sua arquitetura interna (Intel, 2014)

Com comunicação e programação totalmente wireless, a arquitetura da Intel é dotada de comunicações Wi-Fi (802.11a/b/g/n) e Bluetooth LE (com 2.1 +EDR). Aumentando a robustez e permitindo a configuração do protocolo de comunicação de acordo com a necessidade.

O motivo da escolha inicial, se deu pelo potencial do produto, suas especificações arrojadas e por ser fabricado por uma das maiores empresas de semicondutores do mundo. O desenvolvimento foi iniciado fazendo o uso dessa plataforma, que possui comunicação digital (SPI por exemplo) em nível lógico de 1.8V e um software foi desenvolvido para validar a taxa de transmissão desejada e funcionou atendendo aos requisitos de transmissão através de comunicação UDP com controle de perdas por software.

Entretanto a Intel surpreendentemente descontinuou seus produtos na área de sistemas embarcados de maneira abrupta em Junho de 2017, inclusive cortando todo o suporte ao produto em seu site, dificultando a continuação do projeto utilizando este componente. Pensando nisso, para a escolha dos componentes críticos do projeto, além de atender os requisitos técnicos, é importante se atentar para outras informações para evitar o risco de obsolescência de um componente, ou atendimento a atualizações de normas regulatórias, por exemplo.

Por se tratar de um projeto de pesquisa que se tem intenção de se transformar em um produto a ser manufaturado, a falta de disponibilidade de um componente crítico ao longo da vida útil do produto coloca em risco a cadeia de suprimentos. Além disso, o tempo e custo para alterar o projeto considerando a substituição de um componente pode inviabilizar financeiramente o produto se não rastreado em tempo hábil. A maioria dos fabricantes e distribuidores de componentes eletrônicos no mercado, informam o ciclo de vida dos seus produtos em seus sites e documentos.

#### 4.3.1.1 Processamento e comunicação sem fio

Com a obsolescência do Intel Edison, foi realizado uma pesquisa de SoCs com tecnologia *bluetooth* que pudessem suportar um processamento de sinal e taxas de transferência altas que atendam os requisitos de aquisição de biopotencial, pois outros modelos de sistemas com tecnologia Wi-Fi, apesar de possuírem altas taxas de transmissão, possuem maiores dimensões e maior consumo de energia.

Os dispositivos *bluetooth* são classificados de acordo com sua potência e alcance em três classes, onde duas delas foram selecionadas para a busca inicial:

- Classe 1: 100m – 100 mW – 20 dBm

- Classe 2: 10 m – 2.5mW – 4dBm

A transferência máxima possível de dados e o consumo de corrente dependem da versão bluetooth utilizada e do hardware.

Uma pesquisa foi realizada no ano de 2017 comparando as principais marcas do mercado e seus módulos disponíveis para o consumidor.



Figura 63 - Principais marcas pesquisadas de fabricantes de módulos bluetooth

A Tabela 7 mostra o resultado da comparação entre diversos módulos Bluetooth, onde pode-se perceber um mercado bastante variado com produtos com propósitos distintos.

De acordo com a necessidade de aplicação, um destaque é dado para módulo BMD-350 da u-blox (modelo pertencente anteriormente à Rigado) que utiliza o SoC nRF52832 da família nRF52 da Nordic Semicondutores e antena interna.

Tabela 7 - Tabela comparativa de módulos bluetooth

	CYBLE-212019-00	KC-21	TI CC2540/CC2541	Texas Instruments CC256x	Texas Instruments CC256x	Nordic Semiconductor nRF51822	Nordic Semiconductor nRF8001	Dialog Semiconductor DA14580	Cypress Semiconductor PSoC 4 BLE / PROG BLE	Qualcomm CSR1013	SPBTL- 1S	Nordic nRF52832 (BMD-390)	Silicon Labs BLE112-A- v1	Power Input (V)
Power Input (V)	1.8 - 5.5	3.3	2 - 3.6	2 - 3.6	1.8 - 3.8 V	1.8 - 3.6	1.9 - 3.6	0.9 - 3.6	1.9V / 5.5	1.8 - 4.4	1.7 to 3.6	1.7 to 3.6	2 to 3.6	Power Input (V)
Power ddm	+ 3 dbm		0 dbm	0 dbm	+4 dbm	+4 dbm	0 dbm	+3 dbm	+3 dbm	Up to +9dbm	+5 dbm	+4 dbm	+ 4 dbm	Power ddm
Distance up to (m)	20	20	0 dbm	0 dbm								100	150	Distance up to (m)
Data Throughput (Mbps)	1 Mbps	3 Mbps	2 Mbps	2 Mbps	1 Mbps	1 Mbps	1 Mbps	1 Mbps	1 Mbps	1 Mbps	1 Mbps	2Mbps	12 Mbps	Data Throughput (Mbps)
Current Consumption	16.4/15.6 mA	25 / 11 mA	17.9 / 18.2 to 14.7 / 14.3 mA	-	59mA	14.6/12.7mA	4.9 / 4.9mA	15.6 / 16.4mA	16mA	7.7 / 15 mA	6 / 7 mA	25 / 27 mA	25 / 27 mA	Current Consumption BLE (RX/TX)
Udli Board Size	14.52 x 19.2 x 2 mm	26.9 x 15.2 x 2.5mm	6 x 6 mm	6 x 6mm	6 x 6mm	5 x 5 mm	48.6 x 6 x 0.9 mm		2.43 x 2.56 x 0.35mm	11.5 x 13.5 x 2.0 mm	6.4 x 8.65 x 1.5 mm	16.1 x 12.05 x 2.3 mm	16.1 x 12.05 x 2.3 mm	Udli Board Size
Dev Kit			SensorTag		nRF51 DK				Starter Development Kit and			BMD-350 Dev-Kit		Dev Kit
Mode	Single Mode BLE v4.1	Bluetooth v2.1 + EDR	Single Mode v4.0	Dual Mode Classic + BLE/ANT	Single Mode BLE v4.1	Single Mode v4.0	Single Mode BLE v4.2	Single Mode BLE v4.1	Single Mode BLE v4.1	Single Mode BLE v4.1	Single Mode BLE v4.2	Single Mode BLE v5	Single Mode v4.0	Mode
Integrated Processor	32-bit processor	-	8051	No - External	Cortex-M3	Cortex-M0	Cortex-M0	Cortex-M0	Cortex-M0	16-bit RISC	Cortex-M0	Cortex M4	8051	Integrated Processor
Flash	256kB	8Mbit	128kB/256kB	None	128kB	128kB / 256kB	32kB OTP	128kB / 256kB	64kB	160 kB	160 kB	512kB	128 kB	Flash
RAM	32kB	-	8kB	None	20kB	16kB / 32kB	42kB + 8kB	16kB / 32kB	64kB	24kB	24kB	64kB	8kB	RAM
GPIO		12	23	21	10, 15, 31	Up to 31	12, 22, 32	Up to 36	12			20		GPIO
Interfaces	I2C, SPI, or UART	UART, USB, SPI	2x UART	2x USART	2x SSI	I2C, UART, SPI	2x UARTS SPI I2C	2x Comm Blocks	UART I2C/SPI	UART I2C/SPI	UART SPI I2C			Interfaces
ADC	12-bit 1-Mbps			12-bit	12-bit 200ksp/s	10-bit	10-bit	12-bit 1Mbps	10-bit					ADC
Other			USB	USB	I2S, RTC, Sensor Controller	Quadrature Decoder	Quadrature Decoder, Keyboard Controller	CapSense Sensor Controller	PWM			AN1, NFC Tag, PWM and Debug SW/D		Other

O SoC é dotado de conectividade **Bluetooth 5.0**, com processador de 64 MHz ARM Cortex M4F com funções de DSP, memória flash de 512kB e memória RAM de 64kB. Possui comunicações digitais, SPI, I2C, UART, com conversor DC-DC embutido em um encapsulamento extremamente pequeno (**6.4x8.65x1.5mm**). Todos os pinos desde SoC podem ser reconfigurados, o que facilita a adaptação e reaproveitamento de códigos. Através de uma arquitetura de firmware e bibliotecas bem documentadas e exaustivamente atualizada, possui taxa de transferência útil máxima de **1426 kbps**.



Figura 64 - Módulo Bluetooth BMD-350 da Rigado (Rigado, 2018)

A Tabela 8 exibe as especificações resumidas do módulo.

Tabela 8 - Tabela resumida do módulo BMD-350

<b>Alimentação</b>	1.7V – 3.6V
<b>Tx Power</b>	+4 dBm @ 7.5mA, 0 dBm @ 5.3mA
<b>Rx Sensitivity</b>	-96 dBm @ 5.4mA
<b>Pinos</b>	32 GPIO (8 analog inputs)
<b>Interfaces</b>	UART / I2C / SPI / PWM / I2S / NFC
<b>Memória</b>	512kB Flash / 64 RAM
<b>Dimensões</b>	6.4mm x 8.65mm x 1.5mm
<b>Temperatura de Operação</b>	-40°C até +85°C

### BMD-300 Bluetooth 4.2 Low Energy SoC Module

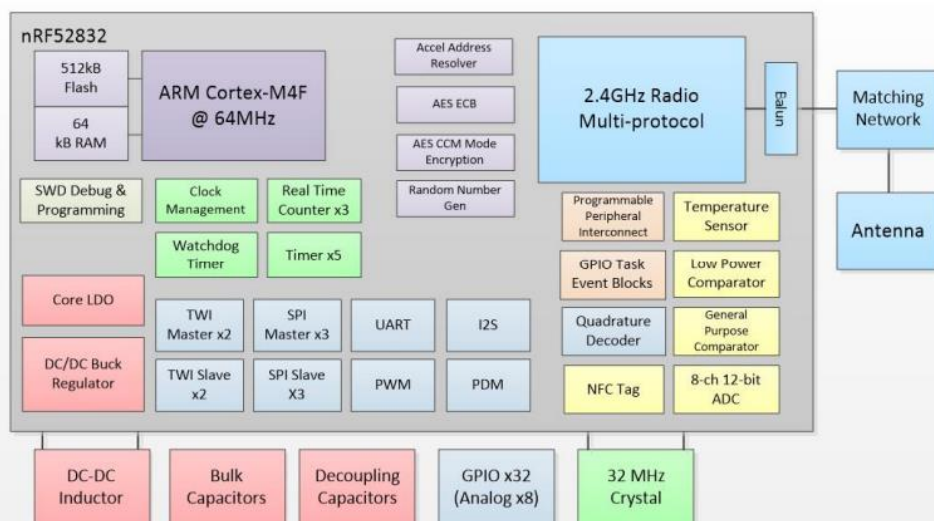


Figura 65 - Diagrama de Blocos dos módulos da Série BMD-300 da Rigado baseados no SoC nRF52832 (Rigado, 2018)

A Figura 65 mostra o diagrama de blocos do módulo. Os itens, dentro do retângulo cinza, demonstram o SoC da família nRF52 e os componentes externos compõem o módulo ilustrado na Figura 64. Todas as interfaces necessárias para a comunicação com os componentes internos da placa a serem descritos a seguir, assim como as especificações elétricas foram revisados e são compatíveis.

#### 4.3.1.2 Conversor Analógico Digital

Apesar do processador escolhido conter oito canais de conversão analógica-digital, o conversor utilizado internamente é do tipo Aproximação Sucessiva (SAR), com 12 bits de resolução e, portanto, suas características não atendem os requisitos mínimos para aquisição de biopotencial. Com isso, um estudo foi realizado no ano de 2017 comparando as especificações de diversos conversores Analógico-Digital externos comerciais. A Tabela 9 mostra uma comparação entre os 5 componentes mais relevantes do estudo. Os componentes ADS1299 (Texas Instruments, USA) e RHD2000 (Intan Technologies, USA) se destacam perante os demais por serem indicados para aquisições eletrofisiológicas. O ADS1299 foi escolhido como componente a ser validado para o produto.

Tabela 9 - Tabela comparativa entre ADCs

	ADS1299	RHD2000	AD7193	ADS1263	AD7770
Temperatura de operação	-40 até 85 °C	-	-40 até 105 °C	-40 até 125 °C	-40 até 125 °C
Impedância de entrada DC	1000 MΩ	1300 MΩ	-	1000 MΩ	-
Ruído de entrada	1μVpp (70-Hz BW)	2.4μVRMS	-	7nVRMS	12μVRMS
Canais	8	16, 32 ou 64	4	11	8
Daisy-Chain	Sim	Não	Não	Não	Não
Resolução do ADC	8 x 24 bits	1 x 16 bits	1 x 24 bits	1 x 32 bits , 1 x 24 bits	8 x 24 bits
Frequência de amostragem	250 SPS até 16 kSPS	30 kSPS	4.8 kSPS	38 kSPS	32 kSPS
Largura de banda em -3 dB	65 to 4193 Hz	0.02 to 1000 Hz	Not found	1.1 to 7740 Hz	1.5 to 2000 kHz
Ganho	1, 2, 4, 6, 8, 12 or 24	96x2	1 até 128	1 até 32	1 até 8
CMRR	-110 dB	82 dB	110 dB	130 dB	-110 dB
Unipolar ou Bipolar	Ambos	16 bipolar 32 unipolar 64 unipolar	Bipolar	Ambos	Ambos
Sensor de Temperatura	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
Alimentação Analógica	4.75 to 5.25 V	3.2 – 3.6 V	3 to 5.25 V	4.75 to 5.25 V	3.3 V
Alimentação Digital	1.8 to 3.6 V	3.2 – 3.6 V	2.7 to 5.25 V	2.7 to 5.25 V	1.8 to 3.6 V
Amplificador BIAS Drive	Sim	Não	Não	Não	Não
MUX BIAS	Sim	Não	Não	Não	Não
Detecção Lead-Off	Sim	Não	Não	Sim	Não
Oscilador embutido	Sim	Não	Sim	Não	Não
Interface	SPI	SPI	SPI	SPI	SPI
Tamanho	12 mm x 12 mm	4.8 mm x 4.1 mm	5 mm x 5 mm	9.7 mm x 4.4 mm	9 mm x 9 mm
Referência Interna ou Externa	Ambos	Interno	Externo	Ambos	Ambos



Ainda de acordo com a tabela, o ADS1299 possui diversas vantagens de configuração como a presença de BIAS, oito canais diferenciais com resolução máxima de 24 bits, amplificadores com ganhos programáveis de até 24 vezes, conversores AD exclusivos para cada canal, multiplexação com combinações de referências e bias configurável separadamente para cada canal como mostra a Figura 66.

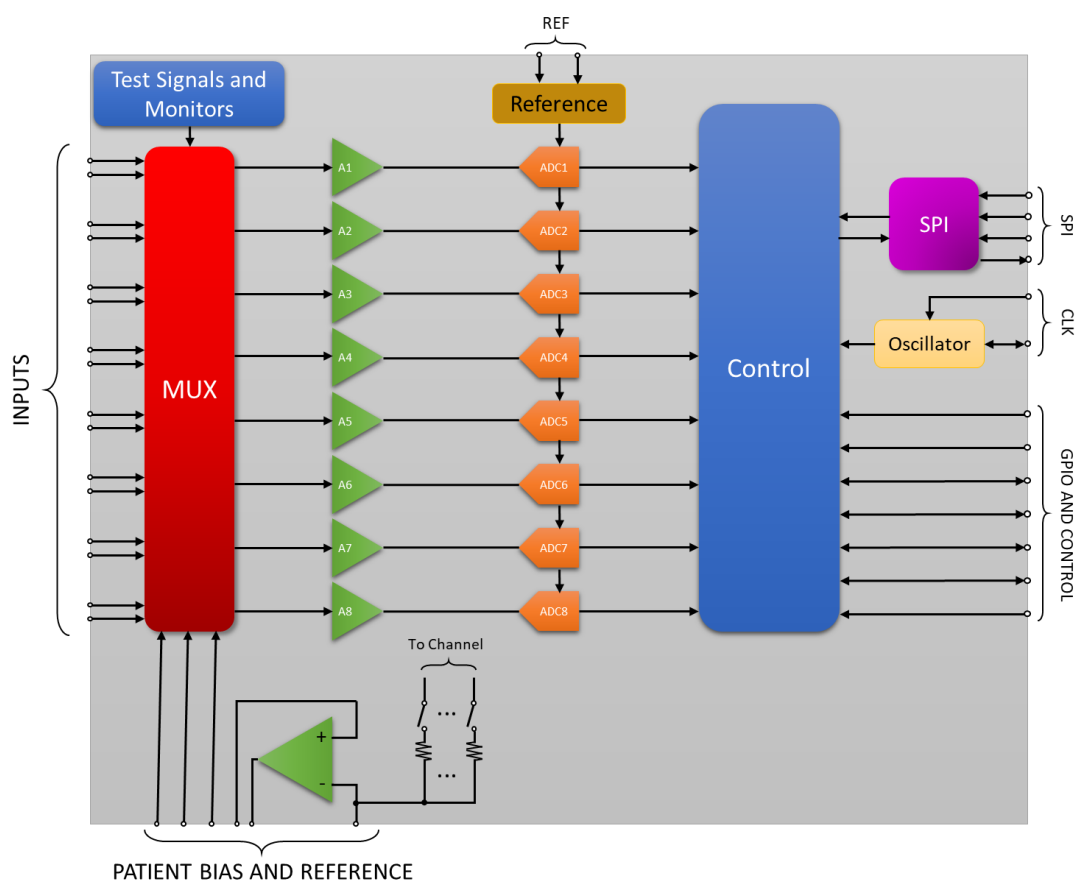


Figura 66 - Diagrama de blocos do ADS1299 (TEXAS INSTRUMENTS, 2017b)

Tabela 10 - Comportamento do ADS1299 de acordo com os ganhos (1 e 2) para as frequências de amostragem. (TEXAS INSTRUMENTS, 2017b)

DR BITS OF CONFIG1 REGISTER	OUTPUT DATA RATE (SPS)	-3-dB BANDWIDTH (Hz)	PGA GAIN = 1					PGA GAIN = 2				
			$\mu\text{V}_{\text{RMS}}$	$\mu\text{V}_{\text{PP}}$	DYNAMIC RANGE (dB)	NOISE-FREE BITS	ENOB	$\mu\text{V}_{\text{RMS}}$	$\mu\text{V}_{\text{PP}}$	DYNAMIC RANGE (dB)	NOISE-FREE BITS	ENOB
000	16000	4193	21.70	151.89	103.3	15.85	17.16	10.85	75.94	103.3	15.85	17.16
001	8000	2096	6.93	48.53	113.2	17.50	18.81	3.65	25.52	112.8	17.43	18.74
010	4000	1048	4.33	30.34	117.3	18.18	19.49	2.28	15.95	116.9	18.11	19.41
011	2000	524	3.06	21.45	120.3	18.68	19.99	1.61	11.29	119.9	18.60	19.91
100	1000	262	2.17	15.17	123.3	19.18	20.49	1.14	7.98	122.9	19.10	20.41
101	500	131	1.53	10.73	126.3	19.68	20.99	0.81	5.65	125.9	19.60	20.91
110	250	65	1.08	7.59	129.3	20.18	21.48	0.57	3.99	128.9	20.10	21.41
111	n/a	n/a	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

A Tabela 10 exibe as informações de largura de banda, ruído, intervalo dinâmico e resolução efetiva de acordo com a frequência de amostragem e ganho (1 e 2).

Apesar de poder contar com no máximo oito canais, o ADS1299 pode funcionar em modo *Daisy-Chain*, onde ele pode ser ligado em cascata com outros ADS1299 aumentando o número de canais disponíveis, se necessário. O ADS possui placa de avaliação que será utilizada para validação do conversor e desenvolvimento inicial do sistema.



Figura 67 - Placa de avaliação do ADS1299, Texas Instruments. (TEXAS INSTRUMENTS, 2017b)

### 4.3.1.3 Driver para Atuação Ótica

O Driver escolhido para atuação óptica precisa ser capaz de excitar de forma independente e precisa os canais disponíveis, com capacidade de corrente constante necessária para os comprimentos de onda distintos.

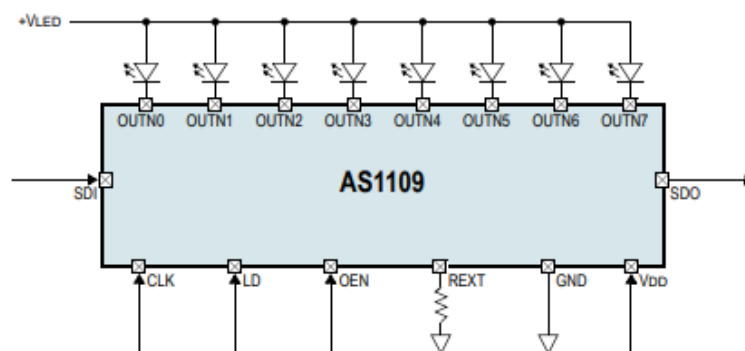


Figura 68 - Diagrama Principal do Driver AS1109 (AMS - AS1109)

O driver AS1109 da empresa AMS é uma boa opção a ser validada para chaveamento dos canais ópticos pois além de seu pequeno tamanho (16 pinos QFN 4x4mm), possui comunicação serial rápida com até 8 saídas, com corrente máxima de 100 mA por canal e caso necessário, pode ser usado em cascata com outros drivers de mesmo modelo aumentando o número de canais se necessário. A corrente dos canais pode ser regulada por um resistor externo customizável.

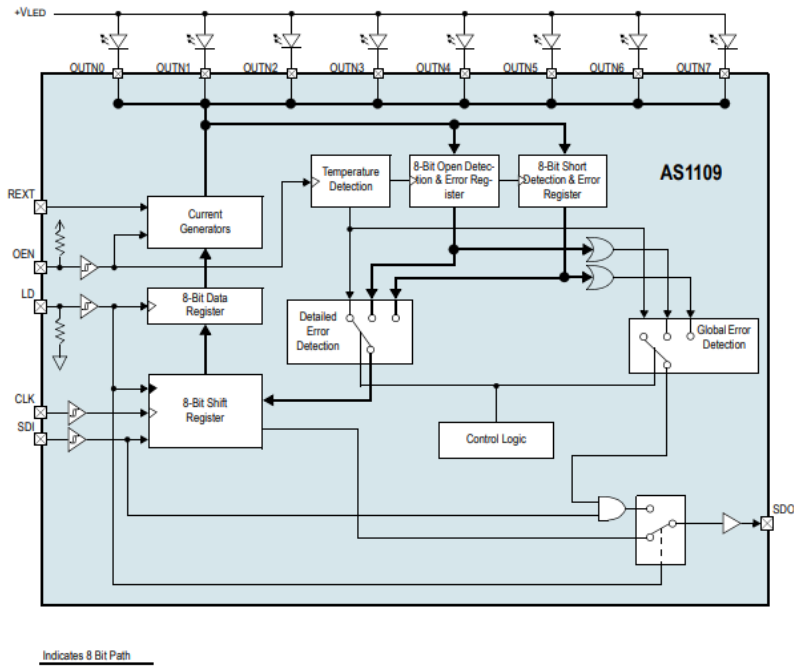


Figura 69 - Diagrama de blocos com o esquemático interno do Driver (AMS - AS1109)

Sua tensão de alimentação pode ir de 3 até 5.5 V e suporta tensão de alimentação dos LEDs de até 15 V. A frequência máxima de chaveamento deste das saídas pode chegar até 50 MHz. Essas configurações podem trazer maior capacidade de adaptação à diferentes tipos de LEDs.



Figura 70 - Placa de Desenvolvimento do AS1109

O AS1109 possui placa de desenvolvimento que será utilizada para validação do chip e desenvolvimento do sistema em suas fases de prototipação se necessário.

#### 4.3.1.4 Conector de Interface entre Módulo Principal e Optrodo

Os conectores de interface entre o módulo principal e o optrodo devem ser escolhidos a fim de garantir a troca fácil de optrodo. Os sinais que serão transmitidos são mistos e de baixa tensão, considerando dados analógicos, digitais, alimentação contínua e terra. Com o objetivo de ser vestível ou implantável, o tamanho do conector, seja em comprimento, largura ou altura, deve respeitar a ordem de grandeza da placa.

Dos componentes críticos até agora listados, o ADS1299 é aquele que possui maior dimensão (12x12x1.2mm). Para a versão final da placa principal, é importante escolher um conector cujo comprimento e espessura não extrapole o tamanho do ADC para que a miniaturização possa ser feita para fins de vestir ou implantar o dispositivo. Mesmo que para as primeiras versões da placa principal não se use o conector aqui listado, o mesmo poderá ser validado em versões mais avançadas do projeto.

A quantidade de pinos necessários para a conexão entre o módulo principal e o optrodo deve atender no mínimo o número de conexões necessárias entre ambos. O optrodo será responsável por poder excitar os LEDs e fazer a leitura do biopotencial e de outros biossinais a serem lidos pelo conversor ADS1299.

Como o ADS possui oito canais diferenciais e outras 6 entradas/saídas opcionais, esses (22) pinos deverão ser levados até o optrodo.

Para acionar os LEDs, o driver para atuação óptica poderá acionar até oito LEDs, e dependendo da escolha durante o desenvolvimento, o driver pode estar presente na placa principal, ou até na placa de desenvolvimento, portanto o conector de interface poderá transmitir o chaveamento direto para os LEDs, ou até levar a interface serial para que o driver seja comandado externamente. De uma forma ou de outra, uma estimativa de que mais 12 pinos são necessários para atender os requisitos, pois a depender da corrente máxima permitida para cada pino do conector, sinais que exijam maiores capacidade de corrente, poderão ser divididos entre dois ou mais pinos.

Com a possibilidade de se alimentar sensores externos, como sensores de pressão, tensões de excitação contínua estáveis (+2.5V e -2.5V) serão necessárias. O gerenciamento de energia da placa principal já irá ter ambos os sinais que serão necessários para criar as referências para o ADS1299.

Com esses requisitos, estima-se que um conector de 40 vias será o suficiente para atender as demandas.

Atualmente existem diversos fabricantes e tipos de conectores. Como o intuito é conectar duas placas, existe uma categoria de conectores específica para este fim. Os conectores *board-to-board* (*b2b* – placa-para-placa) possibilitam a conexão entre placas distintas com opções de dezenas e até centenas de pinos. Geralmente os conectores de cada extremidade são diferentes e são chamados de *Headers* e *Receptacles*. Os *Headers* são de menor tamanho e se encaixam dentro dos receptáculos. A empresa Hirose é uma das principais fornecedoras de b2b e muito utilizada na indústria de eletrônicos, inclusive com aplicações médicas.

A Tabela 11 mostra o levantamento de diferentes famílias de conectores b2b da Hirose de 40 pinos como referência.

Um destaque precisa ser dado para o número de ciclos máximo de encaixe entre os conectores. Das oito famílias selecionadas, apenas metade delas possui mais de 10 ciclos de encaixe. Como um dos requisitos do produto é permitir a troca do optrodo, quanto maior o número de ciclos, maior a vida útil do produto.

Tabela 11 - Tabela comparativa entre conectores B2B da fabricante Hirose.

Model	Mounting Pitch	Contact Pitch	Connector Length	Connector Width	Connector Height	Mating/Unmating Cycles	Mated Height (STEP)
<b>BK13C</b>	0.4	0.35	9.25	2	0.55	10	0.6
<b>BM20B</b>	0.4	0.4	10.48	2.3	0.6	10	0.6
<b>BM28C</b>	0.35	0.35	9.8	1.9	0.6	10	0.6
<b>DF12N</b>	0.5	0.5	12.1	4.1	3	50	3
<b>DF30</b>	0.9	0.4	10.22	4.56	0.9	50	0.9
<b>DF40</b>	0.4	0.4	12.5	3.3	1.5	30	1.5
<b>DF40Shield</b>	0.4	0.4	12.5	3.3	1.5	10	1.5
<b>ER8</b>	0.8	0.8	22	5.6	10	100	7

A família com maior número de ciclos é a ER8, com 100 ciclos. Entretanto, a altura mínima do conjunto é de 7 mm, além do comprimento de 22 mm

extrapolar a largura planejada da placa final. A segunda família listada com maior número de ciclos, é a DF12, com 50 ciclos. Entretanto suas dimensões também são incompatíveis com o tamanho planejado da placa.

A família DF40 possui dois modelos, um com *shield* e outro sem. O modelo com *shield* de proteção, seria uma opção interessante, caso fosse necessário diminuir o ruído causado pela exposição do conector, entretanto, por possuir apenas 10 ciclos de conexão será desconsiderado. Já a versão sem *shield*, possui 30 ciclos de encaixe determinados pela folha de dados do fabricante e até poderia ser uma opção interessante.

A Família DF30 foi selecionada dentre as restantes por contar com até 50 ciclos de conexão e por possuir dimensões dentro do planejado. Além disso, possui mecânica de clique tátil, o que facilita a percepção do usuário com relação à conexão e desconexão do b2b. Apesar do número de 50 ciclos parecer pequeno, é comum para esse perfil de conector e acredita-se que para a aplicação desejada será suficiente perante as outras limitações encontradas em famílias próximas. A Figura 71 ilustram os modelos de conectores b2b da Hirose à título de design. Os tamanhos e proporções podem não representar comparativamente entre eles a partir da montagem das figuras.



Figura 71 - Imagens dos modelos selecionados de conectores B2B da fabricante Hirose. *Header* (Esq.) e *Receptacle* (Dir.)

#### 4.3.1.5 Módulo Inercial

O módulo inercial será utilizado para capturar informações de movimentação do animal cujo sistema estiver incorporado. O módulo selecionado é uma unidade inercial de 9 graus de liberdade. O modelo escolhido é o LSM9DS1 da ST Microelectronics, composto internamente por sensor acelerômetro de 3 canais, sensor angular de 3 canais e 3 canais de campo magnético. Com resolução de 16 bits para cada canal, com taxa de amostragem de 14.9 até 952 Hz e comunicação SPI ou I2C. O motivo da escolha se deu pelo fato de o componente já ter sido utilizado e validado anteriormente em projetos e produtos desenvolvidos pelo grupo.



#### 4.3.1.6 Bateria

De todos os componentes, talvez o mais complexo de ser definido seja a bateria. Tipo, formato mecânico, capacidade em mAh, ciclos de recarga, corrente de carga e descarga são os principais requisitos a serem determinados na escolha. Baterias de Lítio são amplamente utilizadas atualmente e possuem diversos modelos, capacidades e formato mecânicos disponíveis.

Fabricantes que possuam baterias ou células certificadas pela UL, garantem que os critérios de segurança, eficiência e confiabilidade de seus produtos, sejam seguidos durante o projeto, manufatura e vida útil. Entretanto é importante que o desenvolvedor de um produto médico que use bateria, garanta que seu projeto siga e respeite os limites estabelecidos pelo fabricante das baterias e deve validar também que estas baterias atendam os requisitos do seu projeto. Problemas como superaquecimento, vazamento de química e até explosões podem ocorrer caso algum destes critérios não sejam respeitados.

O modelo ICP621333PA-01 da fabricante Renata foi inicialmente escolhido, por além de atender todos os critérios de segurança, possuir tamanho e capacidades que possam atender ao projeto. De acordo com a Tabela 12, a bateria de lítio polímero possui capacidade nominal de 240 mAh e 3.7 V de tensão, pensando apenas 5.5 gramas. Suas dimensões são de 35 mm de comprimento, 6.7 mm de espessura e 13 mm de largura.



Figura 72 - Bateria modelo ICP621333PA-01 da fabricante Renata SA.

Tabela 12 - Especificações da bateria ICP621333. (Renata batteries, Suíça)

SPECIFICATION	
<b>Renata Type</b>	ICP621333
<b>Nominal Voltage</b>	3.7V
<b>Nominal Capacity</b>	240 mAh
<b>Minimum Capacity</b>	230 mAh
<b>Charging Voltage</b>	4.2 V
<b>Current Normal</b>	0.5 C CC – 120 mA
<b>Max. Charging Current</b>	1.0 C CC – 240 mA
<b>Temperature at Charging</b>	0 °C .... 45 °C
<b>Cut off Voltage</b>	3.0 V
<b>Max Discharge Current</b>	2.0 C – 480 mA (for non continuous discharge) 1.0 C – 240 mA ( for continues discharge )
<b>Temperature during Discharge</b>	-20 °C ... 60 °C
<b>Storage Temperature</b>	( 0 °C ... 30 °C recommended in case of storage for more than 3 months)

Com capacidade de 240 mAh, corrente de descarga nominal de 240mA e máxima de 480 mA, e dimensões de 35x13x6.7mm, esse modelo possui potencial de atender os requisitos gerais, mesmo que neste momento não se saiba o consumo total estimado do produto.

Levando-se em consideração que experimentos de optogenética costumam ser de curta duração, para casos típicos, onde se estima um uso de até 2 canais de ativação com 100mA máximo para cada LED, seria possível a utilização contínua por mais de duas horas.

Um conector de troca rápida poderá ser considerado na placa caso se queira realizar a substituição rápida. Se o objetivo for economizar espaço na placa, pode fazer mais sentido a bateria ser soldada na placa, ou até mesmo externalizar o conector através de um chicote.

### 4.3.2 Desenvolvimento do módulo principal - Optobrain Interface

Uma vez determinados todos os principais componentes, é necessário levantar a área ou o tamanho mínimo necessário para a construção da placa. Fazendo o uso do módulo BMD-350, módulo de aquisição de biopotencial ADS1299, driver para o LED AS1109, unidade inercial LSM9DS1 e conectores para a bateria e optrodo considerando um espaço extra para componentes passivos, conversores de tensão e trilhas, o tamanho inicial previsto para a placa é de 22mm de largura por 33 mm de comprimento.

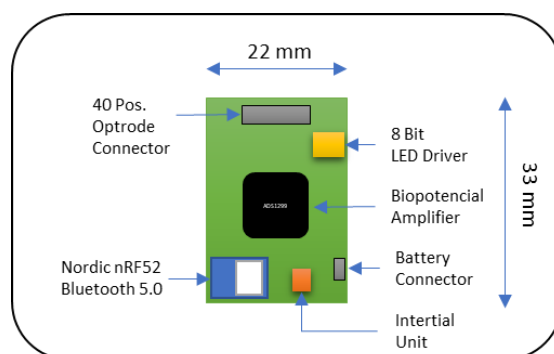


Figura 73 – Concepção inicial da disposição dos componentes e tamanho planejado da interface

A Figura 73 mostra a concepção inicial da placa de interface para optogenética wireless considerando os componentes em validação em uma visão mais integrada e simplificada onde o *driver* do LED estaria presente na placa. A moldura que envolve a figura em seu tamanho original, representa o tamanho de um cartão de crédito. Á título de ordem de grandeza, o tamanho da interface chega a ser mais de seis vezes menor quando comparado aos cartões plásticos tão presentes em nosso dia a dia.

O conversor analógico digital ADS1299 para aquisição de biopotenciais é o componente que mais necessita de cuidados, tanto no esquemático elétrico, quanto no projeto PCB. A Texas Instruments, através do datasheet ADS1299, demonstra alguns cuidados necessários para o posicionamento dos componentes e planos de terra como pode ser visto na Figura 74. Manter

distantes e separados a parte analógica da parte digital reduz a possibilidade de interferências. Manter planos de terra com uma possível separação entre eles, também aumenta a blindagem contra ruídos.

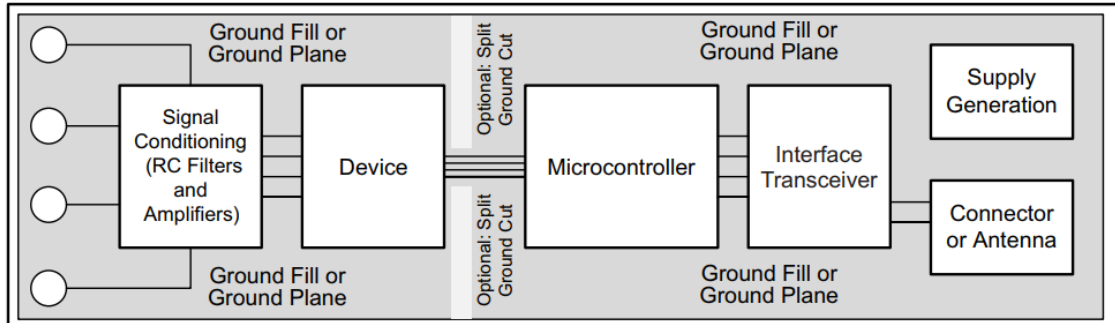


Figura 74 - Layout proposto com posicionamento dos componentes (TEXAS INSTRUMENTS, 2017a)

De acordo com a fabricante do ADS, as tensões de alimentação analógicas para o dispositivo podem ser unipolar (5V) ou Bipolar ( $\pm 2.5V$ ) e a alimentação digital pode ser de 1.8 a 3.3V. Aqui será escolhida a alimentação Bipolar por permitir valores negativos e positivos na entrada analógica e alimentação digital de 3.3V para mais fácil compatibilidade à partir do gerenciamento de energia e dos demais componentes propostos, como o próprio bluetooth.

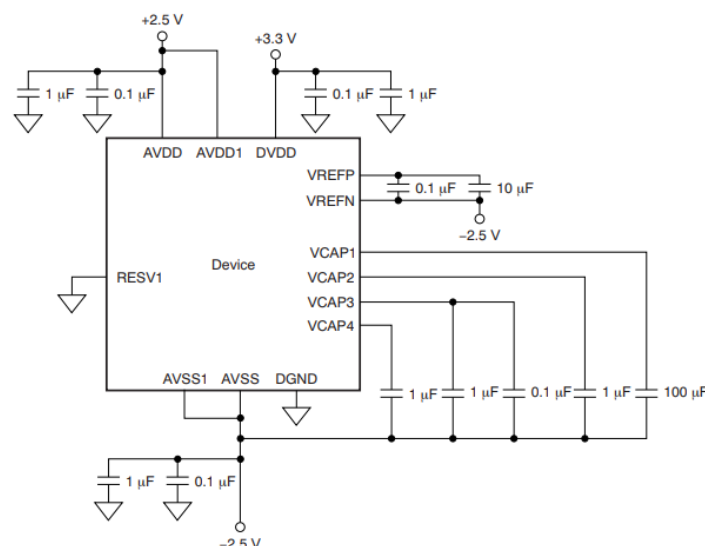


Figura 75 - Esquemático de alimentação recomendada em modo Bipolar (TEXAS INSTRUMENTS, 2017a)

A Figura 75 mostra o esquemático de alimentação recomendada pelo fabricante para alimentação bipolar, com alimentação da entrada digital a 3.3V. Aqui pode-se perceber que o componente possui cinco entradas distintas de alimentação. AVDD, AVDD1, DVDD, AVSS1, AVSS. As entradas AVDD1 e AVSS1 são responsáveis por alimentar internamente os blocos de *charge pump* e com isso podem carregar transientes derivados na frequência de clock. Por isso, se faz necessário a instalação de capacitores cerâmicos, conforme indicado no diagrama, mais próximos da entrada para desacoplar e atenuar o ruído, tanto da entrada, quanto daqueles gerados internamente pela *charge pump*.

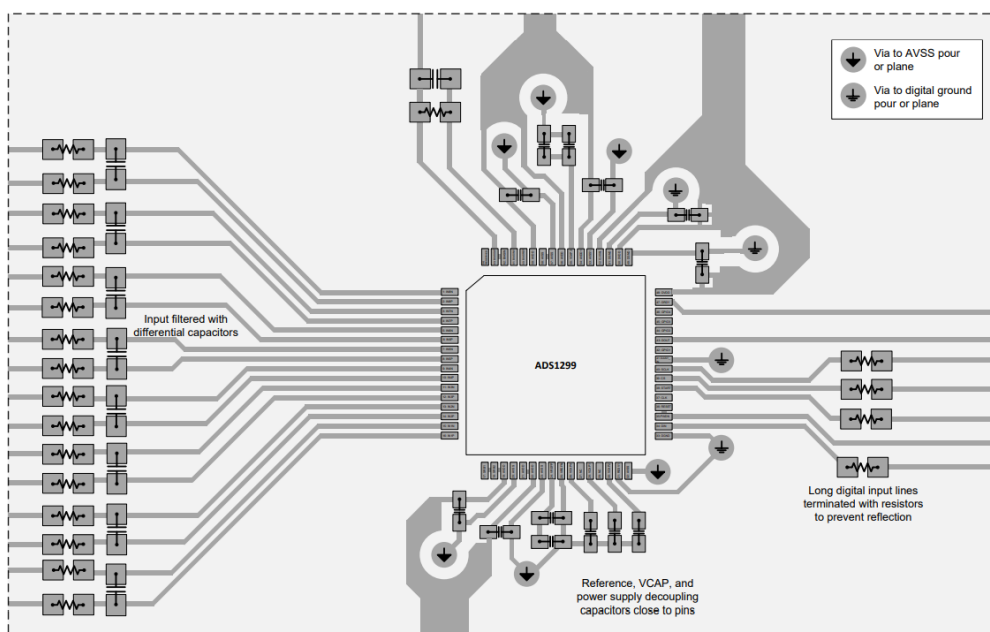


Figura 76 - Layout recomendado pela Texas Instruments para aquisição diferencial (TEXAS INSTRUMENTS, 2017b).

De acordo com a Figura 76, para conexões diferenciais nas entradas analógicas, recomenda-se o uso de capacitores cerâmicos de alta qualidade do tipo COG (NPO), dispostos diferencialmente nos canais para atenuar os ruídos de entrada. Cada entrada, antes de chegar aos capacitores, deverão ter resistores de precisão para se criar filtros passivos passa-baixa, com frequência de corte a depender do tipo de aplicação. Portanto, pode ser interessante aqui dispor dos capacitores e resistores na placa do optrodo.

O sistema será alimentado através de uma pequena bateria de LiPO 3.7V recarregável inicialmente externamente. Além da conversão para a tensão de

3.3V, será necessário a conversão para as tensões de 2.5 e -2.5V para a entrada analógica do ADS1299 conforme informado acima.

Um regulador do tipo LDO da Texas, modelo TLV70233DBVR será utilizado inicialmente para regular a tensão de alimentação em 3.3V. O LDO possui corrente máxima de saída de 300 mA. Para a regulação dos  $\pm 2.5V$  referente às entradas bipolares analógicas para leituras diferenciais do ADS1299 o componente da Texas LM27762DSST, uma *charge pump* com LDO foi escolhido e possui corrente de saída máxima de  $\pm 250mA$  e a tensão pode ser ajustada para  $\pm 2.5V$  ajustando os resistores R1, R2, R3 e R4, conforme a equação abaixo:

$$V_{Out+} = 1.2 \times V_{IN} \times \frac{(R_1 + R_2)}{R_2}$$

$$V_{Out-} = -1.2 \times V_{IN} \times \frac{(R_3 + R_4)}{R_4}$$

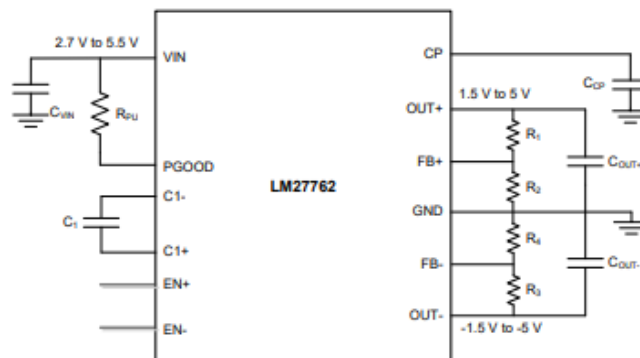


Figura 77 - Esquemático simplificado do componente LM27762 da Texas Instruments

### 4.3.2.1 Optobrain Interface - Hardware V1.0

A primeira versão do *hardware* principal do projeto Optobrain tem o objetivo de validar os esquemáticos com as ligações projetadas entre os componentes principais do circuito, em uma placa relativamente pequena, mas que tenha conectores de fácil uso e acesso para testes e validações.

O esquemático exibido na Figura 78 é referente ao gerenciamento de energia da interface. Nele, o intuito nesta versão de placa é permitir que a partir de uma bateria externa de 3.7 V o sistema tenha condição de converter as tensões elétricas para valores estáveis e necessários de 3.3V e  $\pm 2.5V$ . A tensão de 3.3V é o nível responsável por alimentar praticamente todos os componentes da placa. O  $\pm 2.5V$  será exclusivo para inicialmente alimentar a parte analógica do ADS1299. Além do conector da bateria e da chave on/off, um conector externo de oito pinos foi inserido para facilitar os testes das tensões geradas. Todos os níveis de tensão receberam proteção contra descargas eletrostáticas (ESD).

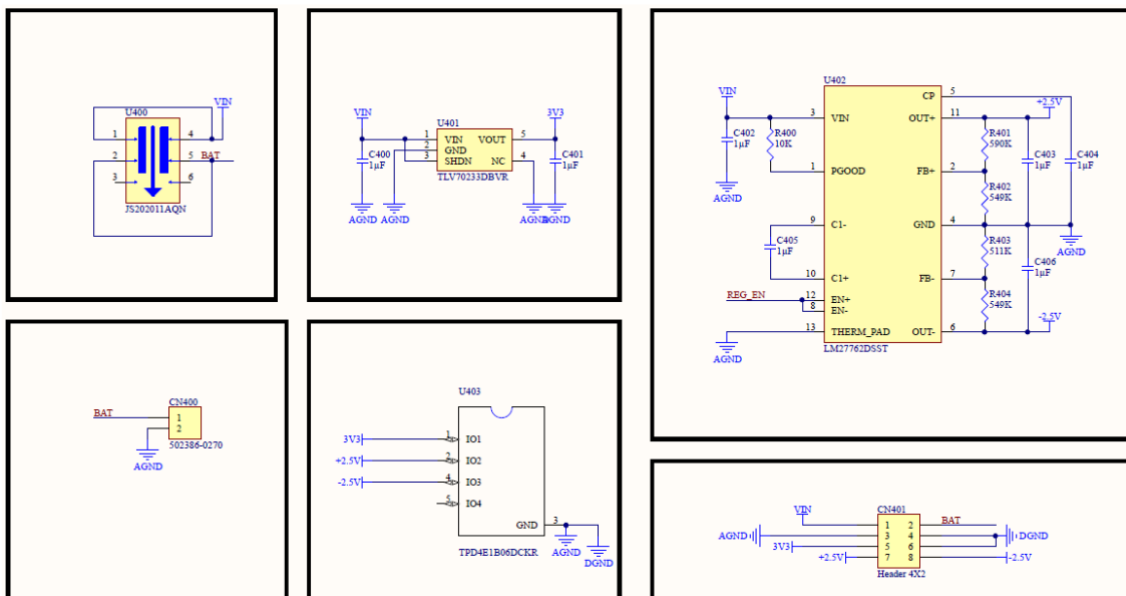


Figura 78 - Esquemático de gerenciamento de energia da Optobrain Interface versão 1.0





A Figura 80 traz o esquemático do módulo bluetooth BMD-350 (U200) junto com seu conector CN200 para gravação de firmware. Será através dele que inicialmente o programa do firmware será transferido para o processador do módulo.

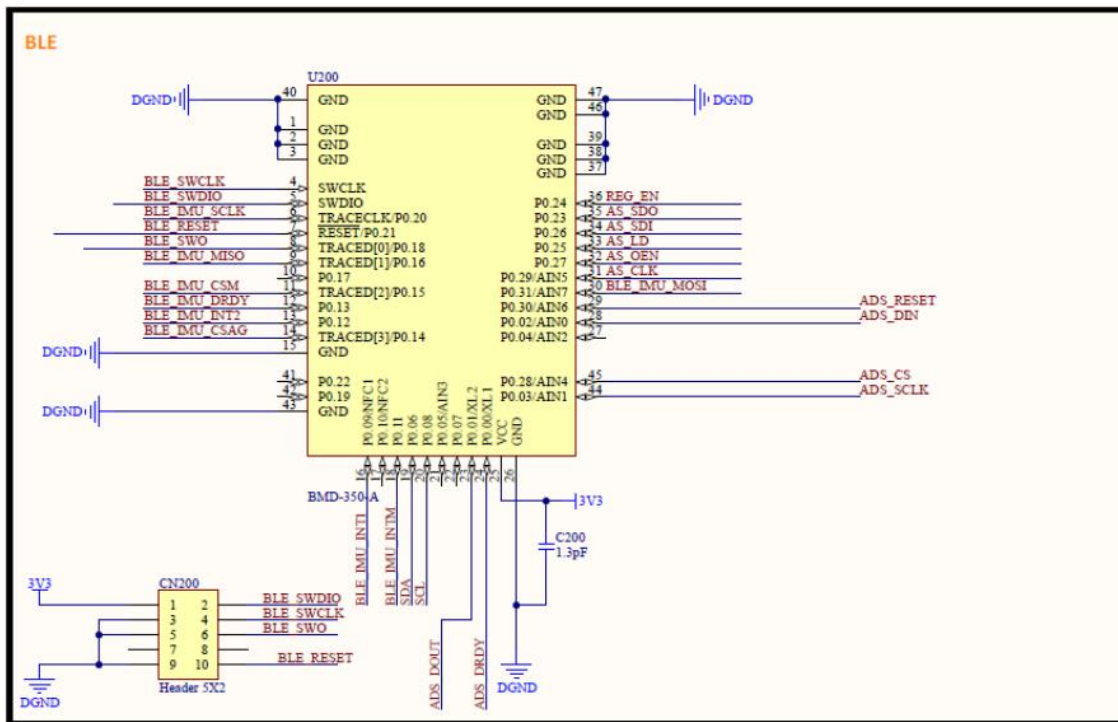


Figura 80 - Esquemático projetado para o módulo bluetooth da Optobrain Interface versão 1.0

As demais conexões do módulo bluetooth junto aos demais componentes da placa são feitas através das TAGS em vermelho. Isso auxilia a organização do esquemático.

A Figura 81 mostra por fim as últimas páginas dos esquemáticos desta primeira versão da placa. Módulo inercial IMU e conector de interface do optrodo são dispostos com suas devidas conexões. Para esta versão da placa, o conector de interface leva para fora, além de praticamente todas as conexões externas do ADS, todas as alimentações elétricas, terras e vias de comunicação SPI e I2C para comunicação do microcontrolador com dispositivos externos como memórias e o AS1109 que será validado através de sua placa de desenvolvimento. Não houve um critério específico para a escolha da ordem dos sinais no conector, além da organização por proximidade e funcionalidade.

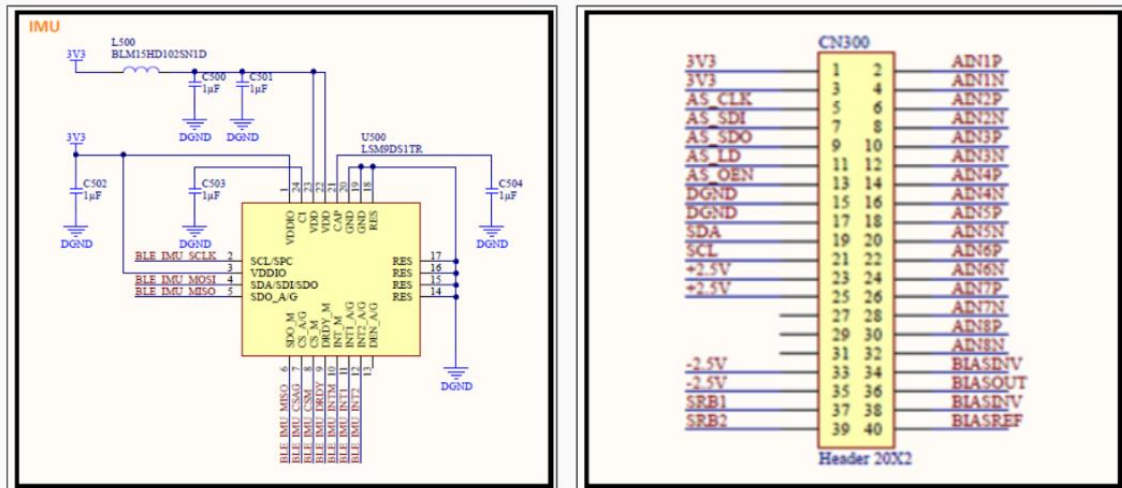


Figura 81 - Esquemáticos do módulo inercial e do conector de interface com o optrodo

Após todos os esquemáticos serem revisados, o projeto da PCB foi feito organizando os conectores, na parte superior o conector CN300 responsável pela interface externa com o optrodo, pela parte direita com os conectores CN201 e CN200, gerenciamento de energia e gravação de firmware respectivamente. O ADS1299 (U100) ficou mais centralizado na placa. O módulo bluetooth (U200), a chave on-off (U400) e o conector da bateria (CN400) ficaram na parte inferior da placa. Optou-se nesta primeira versão a disposição de todos os componentes do topo da placa para facilitar a montagem e os testes.

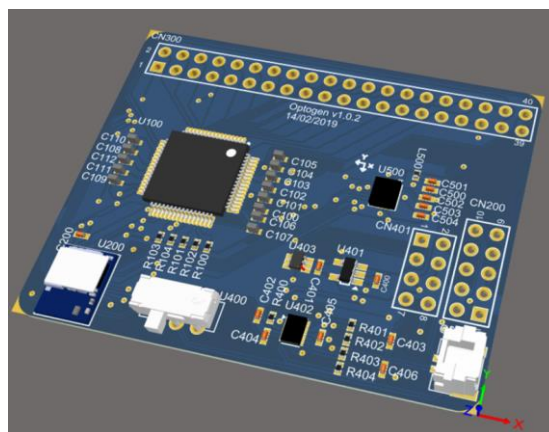


Figura 82 - Projeto da PCB Optobrain Interface v1.0

Como se pôde perceber, de fato foi decidido por não levar inicialmente o driver do LED para ser validada na placa. Por isso optou-se por validar a atuação do LED fazendo o uso da placa de desenvolvimento do AS1109.

O roteamento da placa foi feito manualmente, dando preferência inicial para as trilhas que saem do módulo bluetooth devido ao menor tamanho dos pads inferiores do módulo. A PCB foi projetada com 4 camadas evitando roteamentos complexos e criando zonas de blindagem com terra para evitar *crosstalk* sempre que possível. O ADS1299 foi orientado a ficar com as saídas analógicas direcionadas para o conector CN300 e as saída digitais para o módulo bluetooth. O gerenciamento de energia ficou organizado entre a chave on-off e os conectores da parte inferior direita. O módulo inercial ficou o mais longe possível na região mais livre da placa, para que seus sensores (magnetômetro por exemplo) sofressem menor influência possível dos componentes próximos.



Figura 83 - Foto da PCB versão 1.0.2 montada e pronta para iniciar os testes

A Figura 83 traz um exemplar da primeira versão da PCB Optobrain Interface v1.0. Foram fabricadas 20 unidades, mas apenas 5 delas foram montadas com os componentes para a realização dos primeiros testes e validações. Pela baixa quantidade, as montagens dos componentes foram feitas manualmente

com uso de ferro de solda, soprador ou forno. Os resultados dos testes e validações desta versão da placa poderão ser conferidos no capítulo de resultados.

#### 4.3.2.2 Optobrain Interface Hardware V2.0

Apesar do sucesso nos testes e validações da primeira versão da Optobrain, a segunda versão da placa trouxe revisões consideráveis. Uma vez que a maioria dos componentes e esquemáticos elétricos iniciais foram validados, a versão 2.0 se propõe a chegar mais próximo do objetivo final da aplicação. Poder ser vestível ou até implantável. Para isso, pensar uma PCB rígido-flexível permitirá reduzir a área total necessária para a placa dobrando partes da placa.

Algumas limitações foram percebidas na primeira versão da placa e serão discutidos no capítulo de resultados. Talvez a maior delas tenha sido o baixo alcance de transmissão do bluetooth. Distâncias maiores que dois metros sem barreiras, faziam o dispositivo perder muitos pontos na comunicação pela queda de potência na transmissão. Essa queda foi comprovada quando comparado a eficiência de transmissão entre a Optobrain e a placa de desenvolvimento do BMD-350.

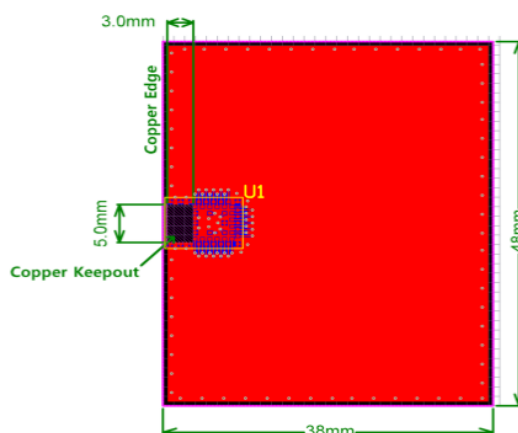


Figura 84 – *Layout* recomendado pelo fabricante do módulo BMD-350 (U1) contendo plano de terra (área em vermelho) mínimo para maior eficiência RF.

Como a Figura 84 mostra, apesar do tamanho e do espaço para o posicionamento do BMD-350 serem extremamente pequenos, o módulo requer uma área de PCB lateralmente maior para servir de plano de terra para a antena interna ao módulo. Já a Figura 85 mostra uma visão das camadas da Optobrain v1.0. Nessa visão, é possível ver o retângulo vermelho representando a posição do módulo BMD-350, e uma grande área branca onde não foram inseridos planos de terra. A ausência, mesmo que mediana, do plano de terra, impactou negativamente na potência de transmissão do sinal, pois a antena interna do módulo usa o plano de terra como parte de sua antena.

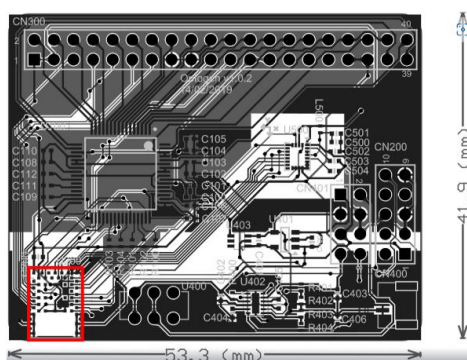


Figura 85 - Visão das camadas da placa de circuito impresso explicitando o plano de terra (Cinza escuro) e as áreas sem plano de terra (Branco)

Com o objetivo de se miniaturizar mais a placa, optou-se por buscar outros *layouts* ou até outros módulos que utilizassem algum bluetooth da família nrf52

e que no total demandasse menor área de PCB sem necessitar de antena externa ou de um plano de terra de grandes proporções. A própria fabricante do BMD-350 possui diversos outros modelos com características próximas.

Tabela 13 - Tabela de comparação de módulos bluetooth da u-blox contendo antena interna.

	<b>BMD-300</b>	<b>BMD-350</b>	<b>ANNA-B112</b>	<b>NINA-B112</b>	<b>NINA-B302</b>
<b>MCU</b>	nrf52832	nrf52832	nrf52832	nrf52832	nrf52840
<b>GPIOs</b>	32	32	25	19	38
<b>x (mm)</b>	9.8	6.4	6.5	10	10
<b>y (mm)</b>	14	8.65	6.5	14	15
<b>z (mm)</b>	1.9	1.5	1.2	3.8	3.8
<b>Internal antenna</b>	chip	chip	internal or external	PIFA	PIFA

A Tabela 13 mostra uma comparação feita para auxiliar na busca por outras opções de módulos bluetooth disponíveis. O modelo NINA-B302 da U-blox, foi o escolhido. Apesar do módulo NINA-B302 ocupar quase 3 vezes mais área de PCB e sua altura ser mais que o dobro, por possuir antena do tipo PIFA (*Planar Inverted F antenna*), exigindo menos espaço total da placa. A Figura 86 mostra o novo módulo bluetooth escolhido, dando destaque para sua antena planar em forma de F invertido e seu gráfico de potência de transmissão. As opções restantes foram descartadas, seja pelo número de portas disponíveis (GPIOs) serem inferiores ou terem o mesmo desafio do plano de terra.

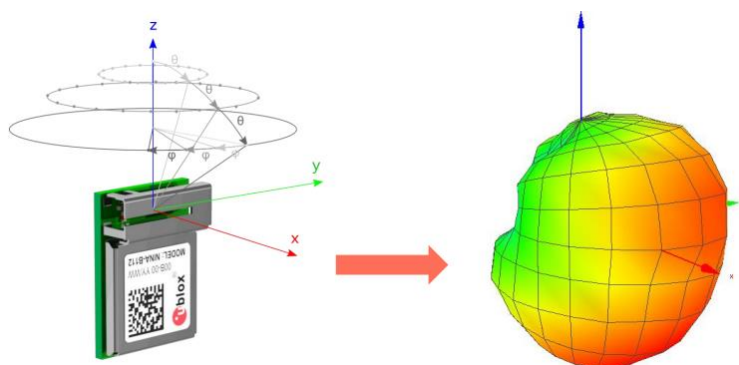


Figura 86 - Módulo Bluetooth NINA-B302 da fabricante u-blox e seu gráfico de potência de transmissão de acordo com sua antena tipo PIFA. (U-blox, USA)

O NINA-B302 possui um chip nrf52840, muito parecido com o nrf52832 contido no BMD, onde não serão necessárias grandes alterações no projeto do firmware que é compatível entre os modelos. Ambos possuem um processador ARM cortex M4F de 64MHz. As principais diferenças entre os chips, são o aumento da memória RAM (de 64kB para 256kB) e da memória Flash (de 512kB para 1MB e interface USB 2.0. A novidade na interface fica pela agora presente interface USB, que poderá permitir no futuro inclusive utilizar o Hardware Optobrain com conexão USB 2.0 para uso em bancada, propiciando o uso de altas taxas de amostragens permitidas pelo ADC sem se preocupar com banda de transmissão, por ora limitada pela conexão bluetooth. A potência máxima de transmissão do rádio bluetooth aumentou de +4dBm para +8dBm, podendo chegar a um alcance máximo de 1400 metros no modo *long range*. A Figura 87 mostra o esquemático para o novo módulo bluetooth. Pontos de teste foram adicionados no esquemático para permitir acesso à interface USB e uma porta genérica configurável (GPIO).

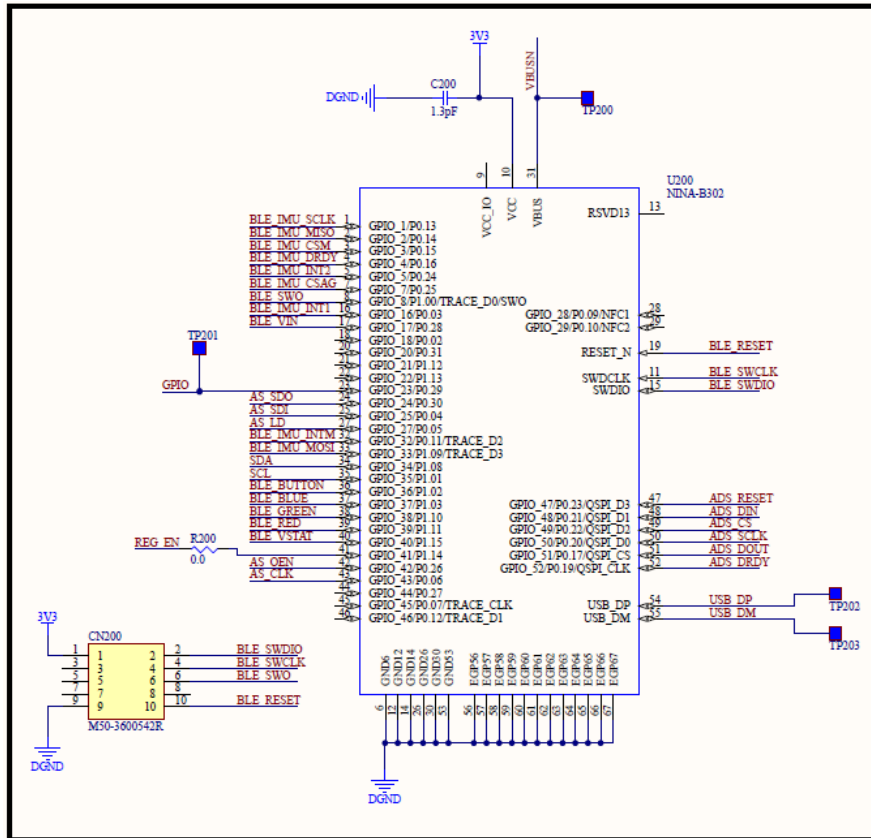


Figura 87 - Esquemático do módulo bluetooth NINA-B302 da U-Blox.

Para o esquemático do ADS1299, algumas alterações interessantes foram consideradas. Diferente da versão anterior, agora foi inserido um filtro passa baixa pouco acima dos 16kHz e uma proteção contra descargas eletrostáticas em cada canal analógico de entrada do ADS. Um oscilador externo agora provê um *clock* mais preciso que o oscilador interno anterior. Enquanto o oscilador interno possui uma frequência de 2048 MHz que pode variar até 5% para mais ou para menos de acordo com a temperatura, o oscilador externo agora presente possui erro de  $\pm 50$ ppm. Isso significa uma menor variabilidade (1000 vezes menos) e maior precisão temporal no trigger de leitura dos canais.

A Figura 88 mostra o esquemático que conta com diversos pontos de teste referentes à comunicação digital do ADS e portas de entrada e saída genéricas. Uma previsão de cobertura metálica (*shield*) foi feita para ser apto a proteger o chip contra interferências que possam surgir pela proximidade entre os componentes agora com a nova versão da PCB. Além disso, para as



entradas analógicas (esquerda do esquemático), filtros passa baixa com valores de corte próximo dos 16kHz foram inseridos juntos com dispositivos de proteção contra ESD, todos em modo diferencial.

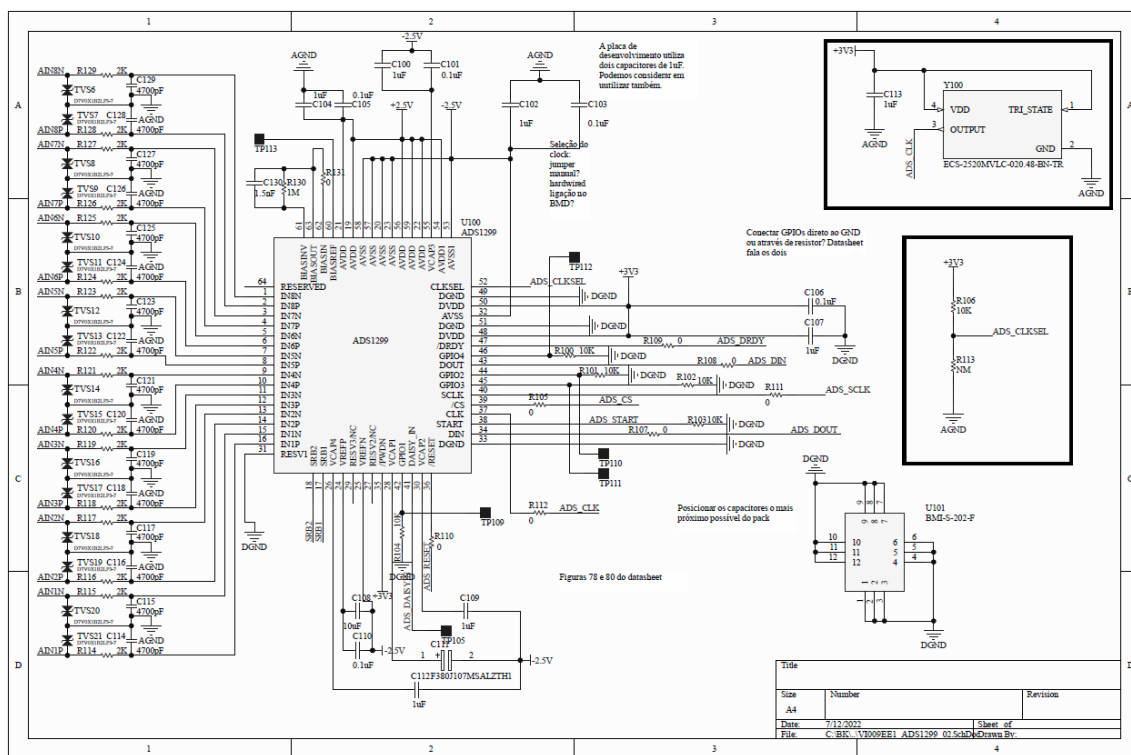


Figura 88 - Esquemático de ligação do ADS1299 na versão 2.0 da Interface.

A Figura 89 traz à esquerda, uma parte da folha de dados do conector *board-to-board* com informações referente a forma de atribuir os sinais nos pinos do conector de forma a reduzir o *crossstalk*, alternando pinos de terra entre os pares dos canais analógicos. À direita na figura, uma tabela com a proposição de atribuição para o conector do optrodo. Com o texto na cor preta, estão os terras, em laranja, os pares e demais sinais analógicos do ADS1299, em vermelho, as tensões disponíveis na placa para alimentação dos módulos e em verde e azul, comunicação I2C e SPI, respectivamente, para memória EEPROM e atuador ótico AS1109, ambos possibilidades externas a serem projetadas na placa optrodo ou conectados através das placas de desenvolvimento.

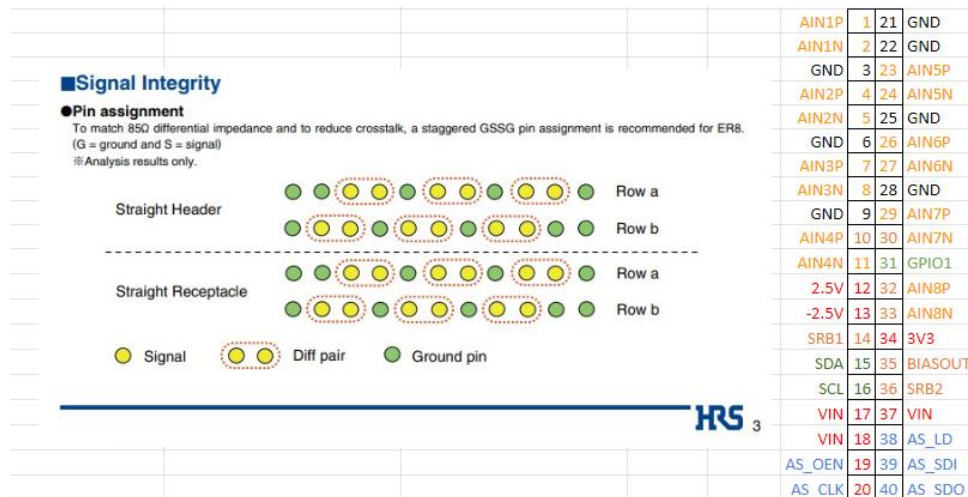


Figura 89 - Sugestão de atribuição dos pinos do board-to-board para melhor integridade do sinal feita pelo fabricante (Esquerda) e proposta final para o conector board-to-board de 40 pinos (Direita). (Hirose, Japão).

A Figura 90 mostra o esquemático do conector board-to-board. Diferente da primeira versão, agora o conector possui a ordem das conexões planejadas para evitar interferência entre os sinais analógicos e digitais que são levados até o optrodo. Mais uma vez se optou por deixar o *driver* de acionamento dos LEDs ausente da placa, pois além de maior necessidade de espaço, o número de vias necessários do conector é menor do que levando os 16 pares necessários para a ligação de no máximo 8 LEDs.

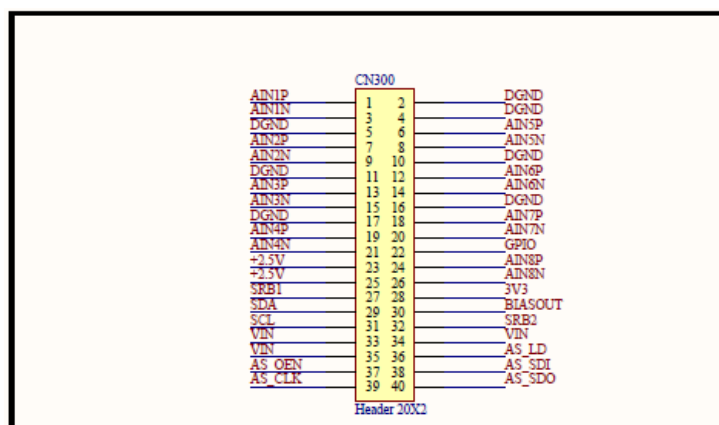


Figura 90 - Esquemático do conector board-to-board de interface com o optrodo seguindo a atribuição recomendada.

O esquemático do gerenciamento de energia da segunda versão também trouxe novas implementações quando comparada à primeira. Um sistema de carregamento da bateria foi incluído para maior autonomia da placa e a possibilidade de funcionar ligado a fontes externas através de conexão USB tipo C. A Figura 91 mostra o esquemático do gerenciamento de energia, onde também é possível ver LEDs para indicação da tensão de 3.3V e do status de carregamento da bateria. Esses novos componentes darão a possibilidade de carregar a bateria do dispositivo enquanto se o usa, semelhante ao funcionamento do carregamento dos celulares. Entretanto será importante medir o ruído do sistema quando ligado ao USB, pois poderão aparecer ruídos devido ao 60Hz da rede.

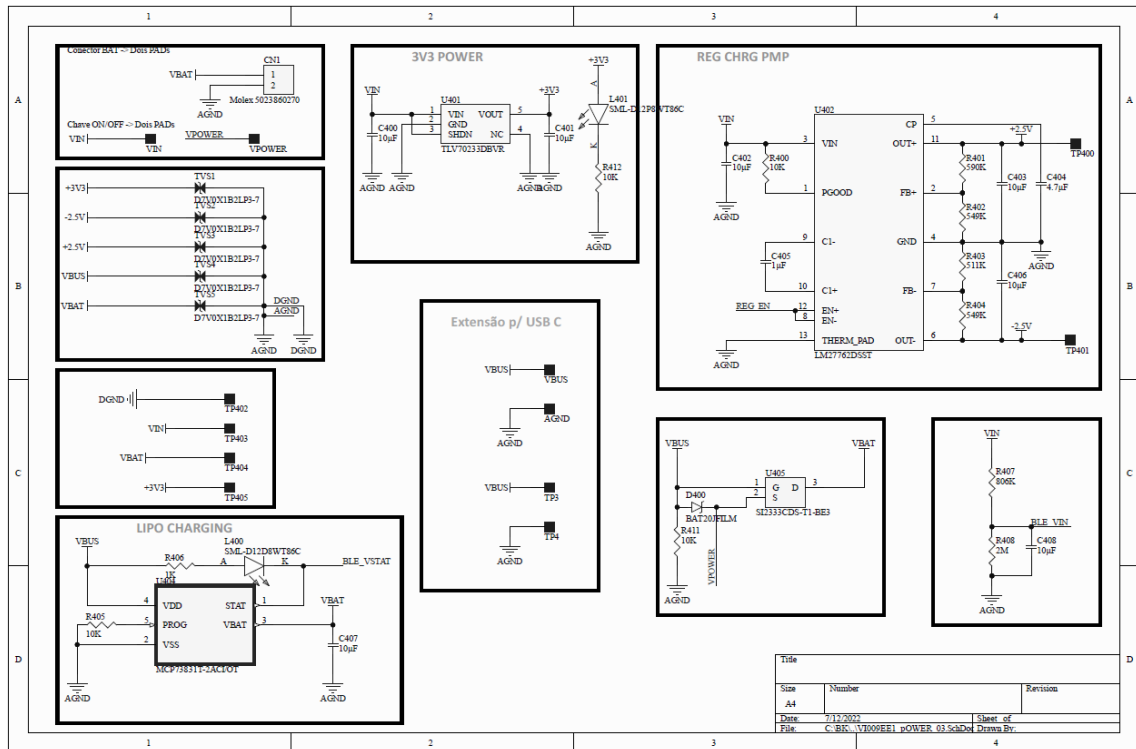


Figura 91 - Esquemático referente ao gerenciamento de energia da Optobrain Interface v2.0

Apesar do esquemático do módulo inercial não ter sofrido alterações, para esta nova versão da placa, a Figura 92 mostra esquemáticos adicionais de interface com o usuário, contendo um LED RGB e uma entrada para inserção de botão de interface externo para possibilitar realizar o pareamento bluetooth de forma manual, além de possíveis outros comportamentos.



Figura 92 - Esquemáticos da interface contendo um LED RGB (Esquerda) e dois pontos para a solda de um botão externo (Direita) em modo *pull-up*.

Falando da forma da placa, com o objetivo inicial de miniaturizar para ser vestível ou implantável, projetou-se a PCB de forma rígido flexível, para que a placa possa se dobrar e virar um sanduiche.

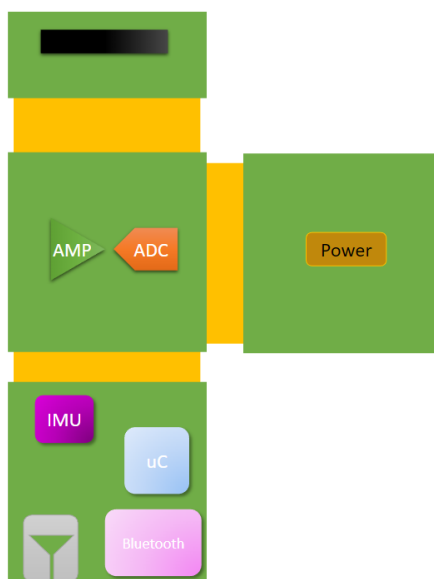


Figura 93 – Desenho inicial da nova versão da placa e distribuição planejada dos componentes críticos

A Figura 94 traz de forma espelhada, ambos os lados da PCB, onde as quatro áreas em verde são rígidas com espessura total de 0.4 mm e as partes amarelas são flexíveis (espessura de 0.1 mm) e, portanto, podem ser dobradas, permitindo que seja feito um sanduíche entre as partes rígidas. Das quatro estruturas rígidas, três são quadradas (20x20 mm) e a menor é retangular (20x09 mm).

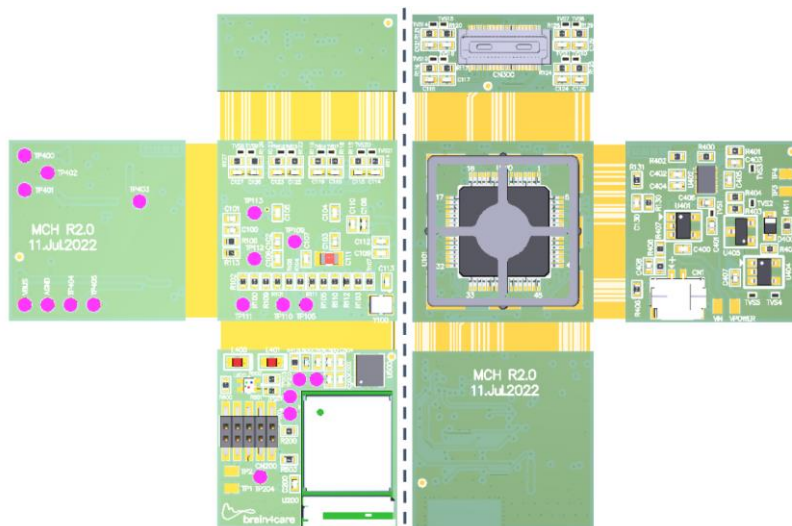


Figura 94 - Projeto PCB Rígido-Flexível espelhado, mostrando ambas as faces da placa (Esquerda-Fundo da placa, Direita-Topo da placa).

A organização projetada dos componentes internos, propõe *clusters* empilháveis. O cluster onde o bluetooth está localizado, contém o sensor inercial, o conector de gravação, assim como a interface com os LEDs RGB e pads para o botão. Pela eficiência da transmissão do bluetooth e visibilidade dos LEDs, os componentes nesse cluster foram colocados na região do fundo da placa, que ao se dobrar, ficará voltada para cima logo acima do ADS.

No cluster central, se encontra o ADS1299 (topo) e todos seus principais componentes (ao fundo). Acima do ADS pode-se perceber a carcaça interna do *shield* de proteção contra interferências eletromagnéticas. Esse *shield* é relativamente alto, o que significa que nos casos em que se queira dobrar o circuito, o *shield* não deverá ser instalado. Na lateral, o gerenciamento de energia está organizado com todos os componentes ao topo, pois ao se dobrar, ele ficará abaixo do ADS1299 e lado oposto ao bluetooth.

Na parte superior, temos o conector *board-to-board* junto aos filtros e proteção ESD. Nesta parte, a depender da construção da placa optrodo, pode-se optar por dobrar ou não a placa do conector, para obter melhor desempenho.

Todos os pontos de testes, foram colocados ao mesmo lado da placa aberta para facilitar os testes e validações e não existe possibilidade de haver colisão entre componentes com as dobras sendo feitas conforme o projetado.

Não foram projetados fixadores mecânicos para montar os sanduiches. Essa fixação poderá ser feita com materiais isolantes dotados de adesivo de dupla face ou algo semelhante.

As dobras flexíveis possuem comprimentos de 4, 4 e 6 milímetros. A dobra do cluster do optrodo possui comprimento maior para que seja possível fazer o sanduiche, contemplando as dobras já feitas entre o cluster do ADS1299 e o cluster do gerenciamento de energia.

Em relação à distribuição das trilhas e planos de sinais e alimentação, devido à baixa espessura da placa, as camadas intermediárias (2 e 3) tiveram seus planos dedicados ao 3V3 e ao Terra. Além da função de diminuir ruídos e *crosstalks*, os planos facilitam a distribuição desses dois sinais de alimentação que são empregados em praticamente toda a placa. A Figura 95 mostra os planos.

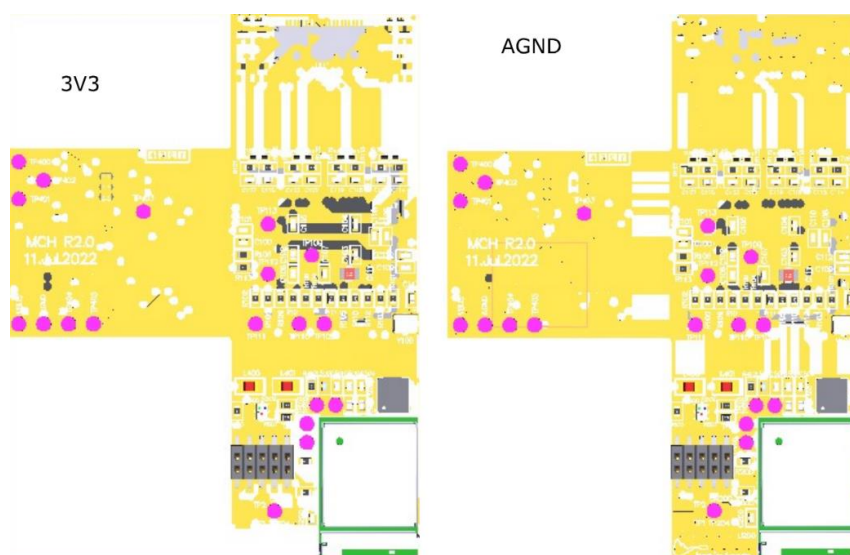


Figura 95 - Planos de 3V3 e AGND nas camadas 2 e 3 da PCB

À esquerda da mesma figura, temos o plano de tensão 3V3 e à direita o plano de terra AGND. As partes amarelas possuem cobre projetado na espessura de

2 Oz (aproximadamente 70  $\mu\text{m}$ ). As partes em branco são exceções aos planos, onde estão passando outros sinais que fazem vias com outras camadas, superiores ou inferiores.

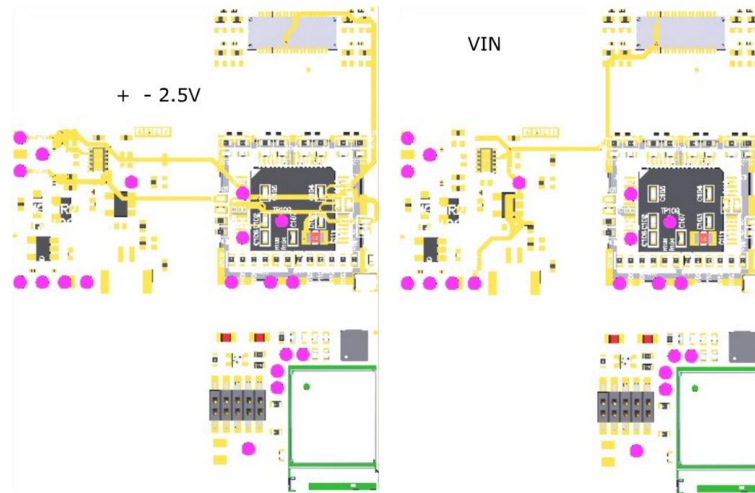


Figura 96 - Destaque para as trilhas de alimentação de  $\pm 2.5\text{V}$  e VIN

Outra preocupação é referente aos sinais de  $\pm 2.5\text{V}$  e VIN (Tensão de entrada da bateria). A Figura 96 faz um destaque das trilhas, onde à esquerda, temos as trilhas da tensão diferencial  $\pm 2.5\text{V}$  que serve para alimentar o ADS e ainda é levado ao conector do optrodo para possíveis utilizações com sensores de pressão. A tensão VIN (direita) que vem diretamente da bateria, também é levada ao conector do optrodo através de três pinos, pois existe a possibilidade de ela alimentar o AS1109 para fornecer corrente para os LEDs do optrodo. Cada pino do conector *board-board* suporta até 300mA de acordo com o fabricante. Para garantir a corrente necessária, além da espessura dos trilhos de 70 $\mu\text{m}$ , a largura da trilha VIN precisa ter mínimo de 1.37 mm para ter uma eficiência sem perdas consideráveis de potência ou queda de tensão devido ao aumento de temperatura (projetado para no máximo 1°C em temperatura ambiente).



### 4.3.3 Optrodos

Devido ao potencial da optogenética e do hardware em desenvolvimento, o desenvolvimento de um único tipo de optrodo fixo que consiga atender a todos os propósitos de estudos na área se torna impossível.

Este trabalho busca por definição ser compatível e facilmente adaptável com diversos estudos optogenéticos, desde que as especificações máximas necessárias atendam o estudo alvo, como número de canais, taxa de aquisição, potência de emissão luminosa etc. Por isso, o hardware Optobrain Interface foi projetado com um conector board-to-board, cujo através deste, será possível conectar a placa do Optrodo.

Com o conceito onde a Optobrain Interface possua este conector *board-to-board* será possível desenvolver em trabalhos paralelos e futuros diversas *shields* optrodos distintas que possam conter o *driver* de acionamento e os LEDs acoplados às fibras e os eletrodos (extra ou intracelulares) que serão encaminhados ao sistema nervoso do animal, ou mesmo os eletrodos extracelulares e LEDs presos no próprio optrodo que entra em contato direto com o cérebro. A configuração e quantidade de canais de leitura e ativação do optrodo pode e deve ser customizado para cada aplicação, com LEDs diretos ou acoplados via fibra ótica. Além disso, para miniaturização da placa principal, é interessante, como foi visto nos capítulos anteriores separar a eletrônica responsável pela ativação dos LEDs para ser parte da placa do Optrodo. O que possibilitaria no futuro inclusive utilizar a placa principal para outros tipos de aplicação como as de estimulação cerebral profunda.

Para este trabalho aqui documentado, não é o objetivo o desenvolvimento de um optrodo com todos os componentes, mas a especificação inicial dos principais componentes como o *driver* do LED e alguns modelos de LED e acoplamentos diretos ou até com fibra. Para isso, é importante selecionar e ter acesso aos LEDs para que se possa montar optrodos de testes.

### 4.3.3.1 Escolha dos LEDs

Uma busca e comparação foi feita em opções de LEDs de marcas já utilizadas em outros estudos optogenéticos. Um foco foi dado para os comprimentos de onda próximo do 470 nm, para uso com ChR2. A Tabela 14 traz a comparação entre os modelos selecionados.

Tabela 14 - Comparação entre modelos específicos de LEDs para aplicação em optogenética.

Fabricante	Modelo	Tamanho	Comprimento de onda típico (nm)	Corrente (mA)	Luminous Intensity (mW)	Foward Voltage (V)
Cree	DA2432	0.24x0.32x0.14	470	20	18.7 @99mA	3.1
Cree	CLM3A-BKW-CUAVA453	2.7x2.0x1.3	470	20	10.4 @10.0mA	3.1
Dialight	598-8091-107F	1.6x0.8x0.7	473	20	5.15 @19.6mA	3.2
Dialight	597-3601-207F	3.5x2.8x1.9	465	20	1.7 @20mA	3.5
Roithner	B5B-437-IX		468	30	10.6 @30mA	3.2

Um destaque aqui é feito para o modelo DA2432 da fabricante Cree (Cree LED, USA). Os  $\mu$ LEDs são extremamente pequenos com uma altíssima intensidade luminosa.

### 4.3.3.2 Fibras e Cânulas

Para aquelas aplicações onde não se queira ou não seja possível o uso direto do LED, fibras através de cânulas são boas alternativas para aplicação.

Um exemplar de cânula da fabricante Thorlabs (Thorlabs, USA) foi cedido ao grupo para o desenvolvimento dos optrodos. Outra alternativa foi a tentativa de construção de uma cânula fazendo uso de fibra ótica convencional. A Figura 97 traz a imagem contendo cânulas, pela esquerda a fabricada pelo

grupo, fazendo o uso de uma fibra de 0.24mm e pela direita a cânula da fabricante Thorlabs de 0,26mm.



Figura 97 - Cânulas para construção do optrodo. Cânula impressa em 3D (Esquerda) e Cânula da fabricante pela THORLABs

A Figura 98 também traz o detalhe do acabamento das fibras que formam ambas as cânulas. Percebe-se claramente que a amostra de fibra usada pela cânula impressa em 3D não está com um bom acabamento. O que certamente trará perdas luminosas.



Figura 98 - Detalhes das pontas das fibras convencional e da usada na cânula da THORLABS.

#### 4.3.3.3 Fabricação dos Optrodos

O grupo conseguiu 8 unidades do modelo DA2432 para testes. A Figura 99 mostra uma placa de acrílicos contendo um papelão com uma fita adesiva branca onde os 8  $\mu$ LEDs foram armazenados

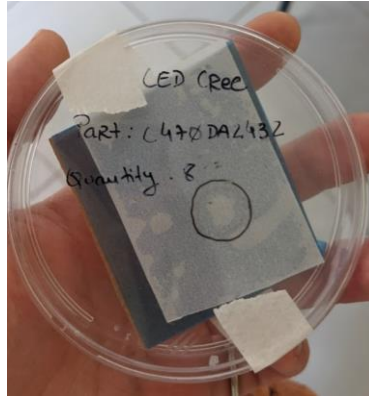


Figura 99 – Oito exemplares de  $\mu$ LEDs modelo DA2432 dentro da área circulado em preto.

Além de ser extremamente pequeno, seu catodo e anodo possuem uma área extremamente pequena contendo apenas um gap de 60  $\mu\text{m}$  entre eles, tornando a solda manual um desafio.

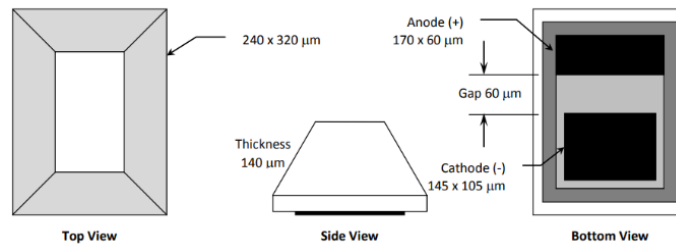


Figura 100 - Dimensões do  $\mu$ LED modelo DA2432 da Fabricante Cree.

Uma placa de circuito impresso contendo *pads* com distâncias pequenas, foi utilizada para a tentativa de solda dos LEDs. Durante a tentativa, alguns LEDs infelizmente foram perdidos no processo.

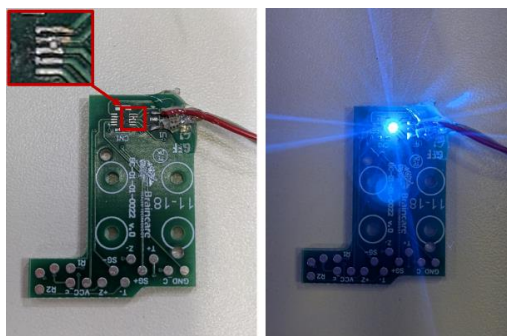


Figura 101 - Placa de circuito com o uLED soldado entre dois pads.

A Figura 101 mostra uma placa de circuito impresso onde foi possível pela primeira vez soldar e testar o  $\mu$ LED.

As cânulas foram posicionadas manualmente acima do  $\mu$ LED e pela Figura 102 é possível ver a diferença luminosa entre a cânula protótipo (esquerda) e a cânula de optogenética (direita).

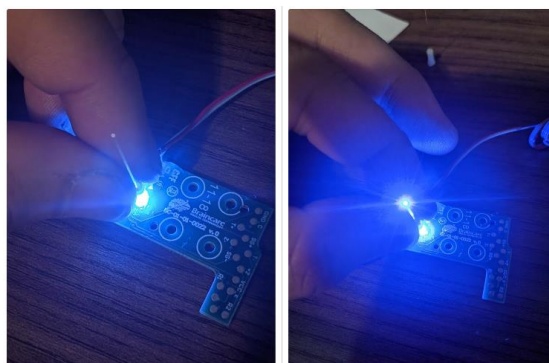


Figura 102 - Comparação da luminosidade emitida pelas cânulas.

O setup utilizado para testar os optrodos é mostrado na Figura 103. Nela é possível ver a placa de avaliação do AS1109, junto com uma placa de desenvolvimento da Nordic, usada para enviar a comunicação serial ao AS1109. Um potenciômetro foi utilizado para controlar a corrente externamente.

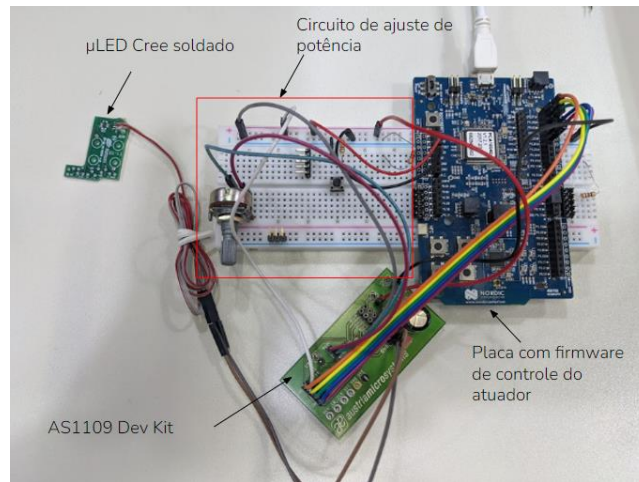


Figura 103 - Setup inicial de teste do AS1109 com LEDs Cree.

Como primeiro protótipo, o LED Cree soldado na placa de teste demonstrou capacidade de potência luminosa, entretanto, seu formato não facilita para aplicações em animais. Além disso, a conexão com fibras e cânulas, demonstrou alta capacidade de perda luminosa, devido à falta de experiência prática na construção de interfaces com as cânulas. Por isso, uma nova versão de placa optrodo foi desenvolvida pelo grupo, para ser possível a solda do LED na ponta da PCB que poderá ser implantável diretamente na região de aplicação. Ela foi projetada para receber o  $\mu$ LED da Cree, assim como os LEDs maiores, com pequenas adaptações.

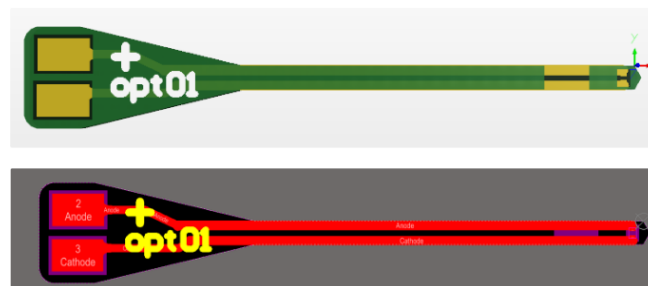


Figura 104 – Primeiro projeto PCB customizado de optrodo criado pelo grupo.

Apesar do optrodo ter sido feito para ser compatível com o  $\mu$ LED da Cree, as amostras disponíveis se acabaram e foi necessário soldar um modelo maior de LEDs para teste. O Modelo Dialight 598-8291-107F foi o utilizado.

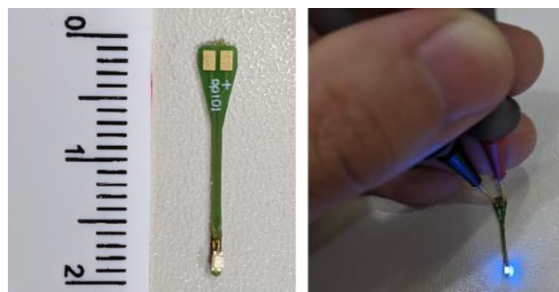


Figura 105 - Primeiro optrodo fabricado pelo grupo com LED soldado.

O optrodo fabricado pelo grupo possui 19 mm de comprimento, tamanho pensado para aplicações diretas em ratos, dispondo do LED na ponta. As potências luminosas alcançadas em testes de bancada tiveram valores máximos de 17.2 mW para os LEDs da Cree e 5.15 para o optrodo com o Dialight quando utilizado. Para aumentar a potência luminosa do optrodo, outro LED Dialight foi colocado em paralelo e uma cobertura de PDMS foi feita na tentativa de concentrar e focar a luz dos LEDs.

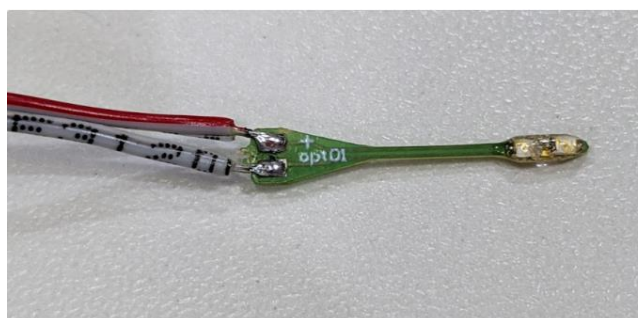


Figura 106 - Visão final do optrodo 01 com dois LEDs da Dialight e cobertura com PDMS.

## 4.4 Desenvolvimento do software e dos firmwares

Uma vez descrito e documentado a evolução do hardware para interface optogenética sem fio, esta seção traz o projeto e desenvolvimento do software e dos firmwares que compõem o sistema.

A aquisição e gravação dos sinais coletados precisam ser realizadas com segurança e fidelidade, sem perda de dados, de forma contínua. Além disso, a apresentação e processamento dos sinais, além da atuação ótica, necessita ser customizadas para cada tipo de estudo.

O desenvolvimento de uma plataforma que permita customizar as excitações de maneira fácil e programável além de gravar e processar as informações é desejado.

Diversas linguagens de programação existentes atualmente podem propiciar este desenvolvimento seja para o software, seja para os firmwares. Além da robustez e rapidez de processamento, a interface com o operador precisa ser intuitiva e objetiva.

A comunicação entre o software e os firmwares necessita de um protocolo de comunicação bem definido, onde seja possível a rápida troca de mensagens com as interfaces em uso.

Assim como o software, o firmware deverá ser capaz de administrar e dar suporte para o correto funcionamento do hardware de forma leve e concisa.

### 4.4.1 Arquitetura geral do sistema

A arquitetura do sistema envolve, em uma visão inicialmente macro, a estruturação das partes (componentes) do sistema e a forma como essas partes são organizadas. Além disso, na arquitetura também são planejados os comportamentos que essa estrutura deve atender e a forma com a qual os componentes devem se comportar com os demais na realização de conjuntos



específicos de funções que precisam ser bem definidas. Uma arquitetura bem planejada e com seus componentes e funções bem definidas, são fundamentais para garantir uma boa qualidade, performance, e futuras evoluções no projeto, incluindo escalabilidade, manutenções etc.

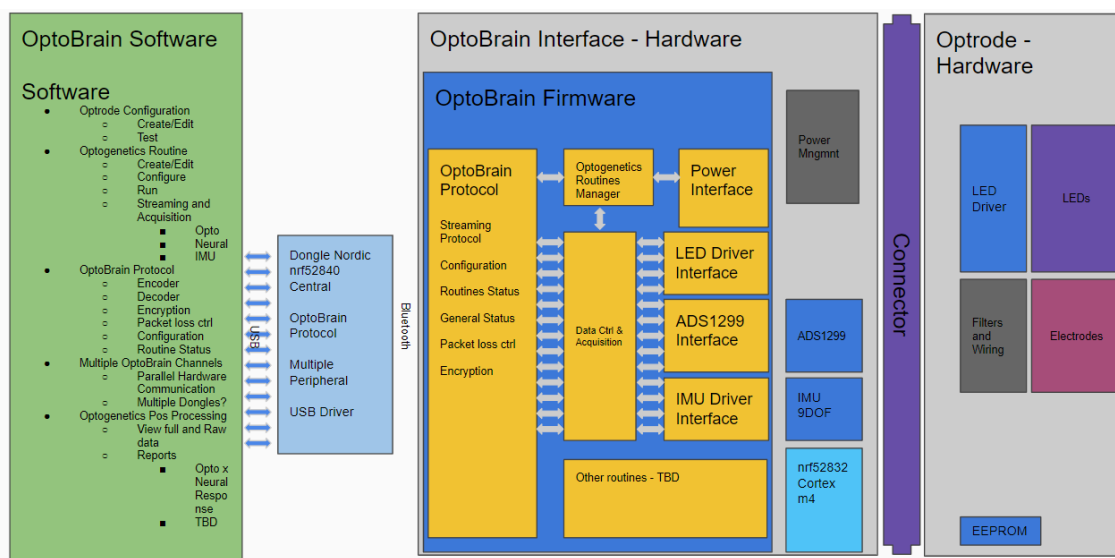


Figura 107 - Arquitetura geral detalhada do sistema

A Figura 107 traz a Arquitetura geral original detalhada do sistema. Na parte esquerda em verde, estão os componentes do software, de acordo com as funcionalidades previstas. Logo após à direita, no retângulo azul claro, estão os componentes do firmware do receptor *dongle*, que fará a comunicação dos computadores, através de protocolo bluetooth, com as interfaces Optobrain. Mais à direita, dentro do retângulo cinza, estão os componentes do firmware da Optobrain Interface (retângulos amarelos), assim como os componentes físicos ou subsistemas mais críticos do sistema. E por último à direita, no outro retângulo cinza, estão os componentes físicos previstos para o optrodo.

#### 4.4.2 Desenvolvimento do software

Para o desenvolvimento do software, foi escolhido a linguagem gráfica LabVIEW. O LabVIEW é um software de interface gráfica desenvolvido pela National Instruments, NI. Ele é um software de engenharia de sistemas criado especificamente para aplicações de teste, medição e controle, com rápido acesso ao hardware e às informações obtidas a partir dos dados. O motivo da escolha se dá pela facilidade de criação de interfaces de aquisição de dados e processamento e pela experiência dos envolvidos no projeto com a linguagem por mais de 14 anos.

Para atender os requisitos do sistema, o software deverá ser capaz de realizar as seguintes funções:

- Gerenciamento de optrodos, contendo configuração, criação e edição de memórias de optrodos;
- Programação, gerenciamento e execução de receitas de rotinas optogenéticas para controle das excitações óticas;
- Tela de monitorização para execução dos experimentos, executando as rotinas de optogenética e realizando a aquisição dos biopotenciais.
- Tela de configuração geral;
- Tela de análise dos dados coletados;

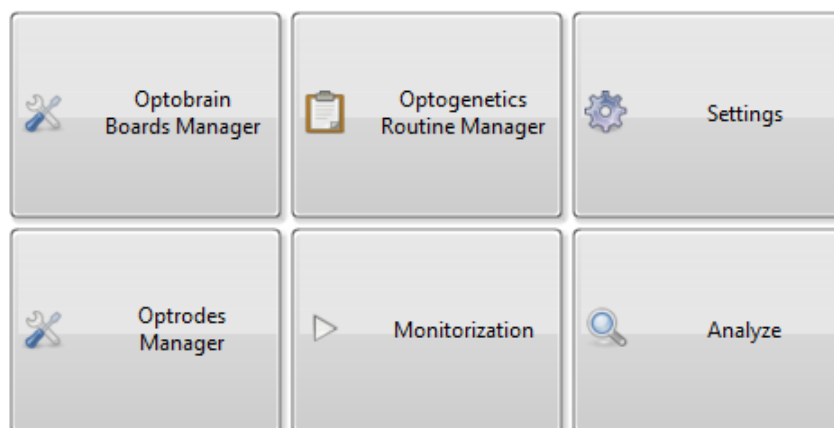


Figura 108 - Botões da tela inicial contendo as principais funções do Optobrain Software

A Figura 108 traz os botões do menu principal contendo as principais funções planejadas do software.

- **Optobrain Boards Manager** – O gerenciador de placas Optobrain, tem por função o gerenciamento da conexão bluetooth com as interfaces utilizadas e seus optrodos conectados;
- **Optrodes Manager** – O gerenciador de optrodos é o responsável por criar e editar as propriedades dos optrodos, para fácil conexão e configuração durante seu uso. As propriedades de cada optrodo, será salva em memória eeprom dedicada para cada tipo de optrodo;
- **Optogenetics Routine Manager** – Gerenciamento de rotinas optogenéticas é a parte do software a ser designada para criação das receitas de ativação optogenética, fazendo uso de optrodos pré-selecionados, é possível criar e testar as rotinas, com ativação dos LEDs e leitura dos biossinais;
- **Monitorization** – Tela de streaming, com aquisição e registro de dados e execução das rotinas optogenéticas configuradas;
- **Settings** – As configurações gerais do software possuem informações acerca do módulo bluetooth, permitindo o gerenciamento dos dongles, assim como demais configurações;
- **Analyze** – Tela para análise básica dos dados salvos e capacidade de exportação para demais formatos.

Os subcapítulos seguintes trazem mais informações referentes às principais funcionalidades e interfaces com o usuário.

#### 4.4.2.1 Gerenciamento dos Optrodos

Os optrodos a serem desenvolvidos, precisam ter capacidade de receber em sua memória, suas configurações, como a quantidade de LEDs e suas respectivas configurações, como o comprimento de onda e potência máxima por exemplo, assim como a quantidade e tipo de canais de aquisição de biossinais e suas configurações. Todas essas informações serão organizadas em memórias EEPROM para que na troca do optrodo, as informações sejam recarregadas pelo sistema, sem a necessidade de configuração pelo usuário a cada troca.

#### 4.4.2.2 Gerenciamento de Rotinas de Optogenética

Os experimentos podem conter uma ou mais rotinas de ativação ótica (*Opto\_Routines*). As rotinas podem conter padrões de ativação óticas (*Opto\_Patterns*) e tempos de espera (*Wait*), com ciclos de repetição entre eles, caso necessário.

- Opto\_Experiments
  - Opto\_Routines
    - Opto\_Patterns
    - Waits
      - Wait\_ON ( $\mu$ second scale)
      - Wait\_OFF ( $\mu$ second scale)

Os padrões de ativação de luz (*Opto\_Routines*) são sequências temporizadas onde a ativação de luz será realizada. As configurações possíveis para essas rotinas são:

- Opto\_Pattern

- Pattern\_Config
  - Type of Pattern
    - *Square (Amplitude)* – 0 to 100%, *increment of 1*;
    - *SawTooth (Amp\_Init, Amp\_End)* – 0 to 100%, *increment of 1*;
  - *Delay* ( $\mu\text{s}$ ) – Atraso para início da ativação;
  - *Width* ( $\mu\text{s}$ ) – Comprimento do tempo de ativação;
  - *Interval* ( $\mu\text{s}$ ) – Intervalo entre as ativações;
  - *Pulse Number* (N) – Número de pulsos do trem;
  - *Repeat Interval* ( $\mu\text{s}$ ) – Intervalo entre as repetições;
  - *Repeat Number* (N) – Número de repetições;

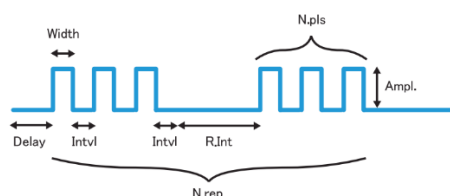


Figura 109 - Padrão de acionamento de luz.

Para o gerenciamento das rotinas de ativação de luz para a optogenética, a Figura 110 mostra as configurações de rotina possíveis. Ao lado direito, após a inserção dos valores, o operador poderá validar a rotina com o simulador.

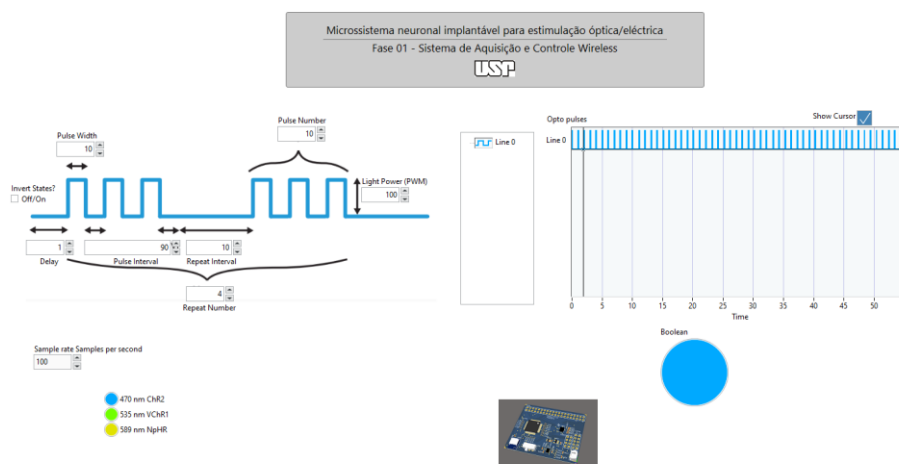


Figura 110 - Tela de gerenciamento de rotinas de optogenética.

A Tabela 15 mostra as possíveis configurações de cada padrão de ativação a ser criado na receita.

Tabela 15 - Configurações da receita de rotina optogenética. Cada padrão poderá receber as seguintes configurações.

<b>Code</b>	<b>Description</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b>Unit</b>
D	Delay	0	1E9	µs
PW	Pulse Width	0	1E9	µs
PI	Pulse Interval	0	1E9	µs
PN	Pulse Number	1	1E9	times
RI	Repeat Interval	0	1E9	µs
CY	Cycles	1	1E9	times
LI	Light Init Power	0	100	%
LE	Light End Power	0	100	%

### 4.4.3 Monitorization - Streaming e log de Dados

Uma vez que a Optobrain Interface esteja corretamente configurada e com seu optrodo instalado, a tela mais relevante do sistema é a de streaming e log dos dados. A Figura 111 mostra um *mockup* de tela de aquisição, onde é possível acompanhar o streaming de dados em tempo real, inclusive com a rotina de ativação dos LEDs, assim como possíveis análises do dado como uma análise de densidade espectral com transformação rápida de Fourier (FFT).

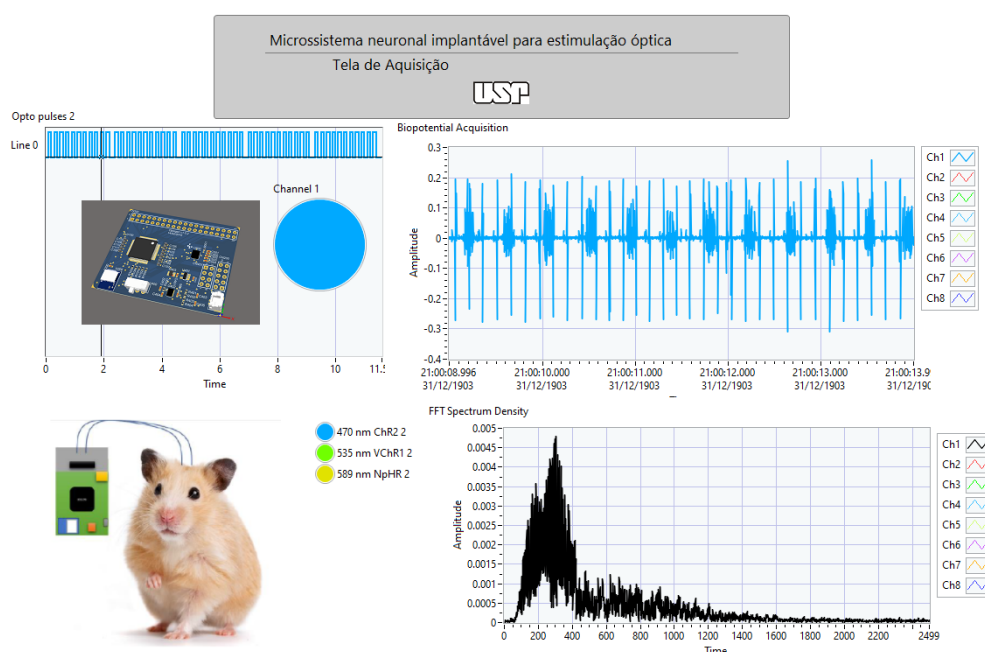


Figura 111 - Proposta inicial de tela de streaming dos dados.

Os dados serão salvos em formato TDMS, padrão desenvolvido pela própria NI para reunir e atender diversos requisitos em um único formato. Ele une a permutabilidade encontrada nos arquivos ASCII e XML, ocupa pouco espaço em disco assim como os arquivos binários, pesquisável como as bases de dados e transmissão em alta velocidade como os arquivos binários.

	ASCII	Binary	XML	Database	TDMS
Exchangeable	✓		✓		✓
Small Disk Footprint		✓			✓
Searchable				✓	✓
Inherent Attributes			✓		✓
High-Speed Streaming		✓			✓
NI Platform Supported	✓	✓	✓	✓*	✓

Figura 112 - Imagem da Tabela contendo a comparação do formato TDMS junto aos principais tipos de arquivos existentes para log de dados. \* As bases de dados podem exigir ferramentas extras no LabVIEW. (NI, 2022)

A característica mais relevante sobre o formato TDMS é sua organização hierárquica inerente. Ele possui três níveis de hierarquia interna como mostrado na Figura 113. Arquivos, Grupos e Canais são os níveis de hierarquia disponíveis para se organizar os dados. Esse formato é compatível para ser lido por diversos softwares como Microsoft Excel®, Origin®, Matlab®, dentre outros.

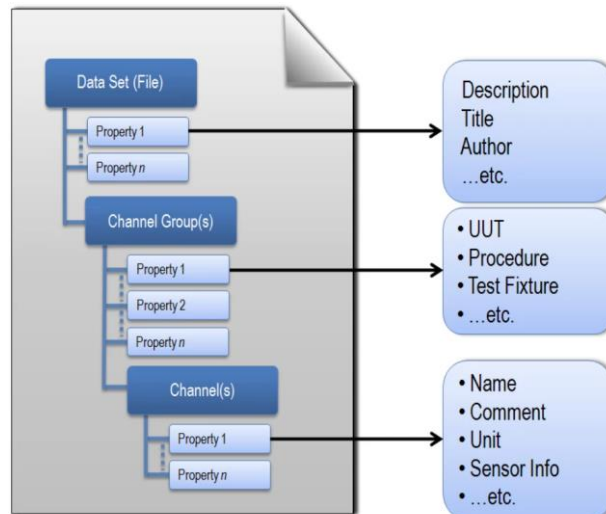


Figura 113 - Organização do formato TDMS. (NI, 2022)



#### 4.4.4 Desenvolvimento do firmware

O desenvolvimento do firmware é realizado de forma customizada fazendo uso da linha nRF52 de SoCs da Nordic Semi®. O Fabricante dispõe de kits de desenvolvimento de software (SDK – *Software Development Kit*), provendo um rico ambiente de desenvolvimento, contendo uma grande seleção de drivers, bibliotecas, exemplos, SoftDevices e protocolos sem fio, como o bluetooth.

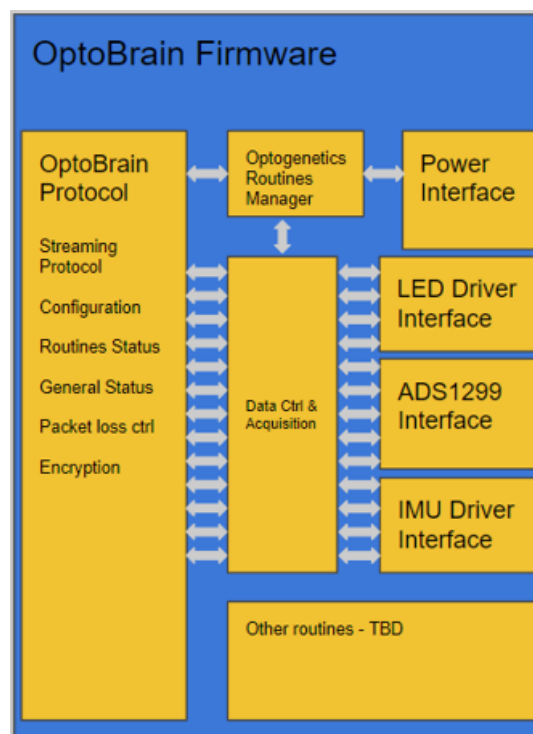


Figura 114 - Arquitetura do Firmware Optobrain

A Figura 114 traz o aspecto geral da arquitetura do firmware, que contempla os drivers para comunicação com os principais componentes de hardware, um gerenciador de rotinas optogenéticas, que será responsável por interpretar as rotinas criadas pelo usuário e reproduzir com fidelidade pelo dispositivo, lendo as aquisições e atuando com o driver de LED. As interfaces com o gerenciamento de energia, Driver de LED, ADS1299 e Drivers do IMU foram implementadas garantindo o controle e aquisição dos dados de forma concisa e com acesso aos registradores de todos esses componentes através do

protocolo de comunicação Optobrain para que seja facilmente configurado através do Software Optobrain.

O protocolo Optobrain é o responsável por realizar a troca de mensagens de maneira eficiente entre o software e o dispositivo através do bluetooth. Maiores detalhes sobre o desenvolvimento do software e do firmware serão abordados em trabalhos futuros do grupo.

#### 4.4.4.1 Protocolo Optobrain

O Protocolo Optobrain é um acordo de comunicação sem fio especialmente desenvolvido para comunicação Bluetooth LE entre o módulo de interface e possíveis aplicativos supervisores. Ele é organizado de forma que possa ser implementado em diversos sistemas ao mesmo tempo e não depende de garantia de entrega de pacotes, trabalhando com comunicação serial, fazendo uso de marcador de começo e fim de mensagem.

O Protocolo possui diferentes tipos de pacotes de mensagens com características distintas: **Dados, Configuração, Status, Evento e Comando**.

O pacote de **dados** é responsável por enviar os dados de aquisição de sinais analógicos, como os biopotenciais por exemplo. A Figura 115 traz a estrutura do pacote de dados do Optobrain protocol. No *Header*, 2 bytes são responsáveis por definir o tipo de pacote e um número sequencial que ao ser desempacotado no software, poderá ser utilizado para controle de perda de pacote de dados. No *Payload*, para os dados derivados do ADS por exemplo, é possível definir quais dos oito canais analógicos estão ativos, assim como a precisão (número de bytes enviados por canal) do dado. Ao final do pacote, um vetor com todos os dados daquele instante concatenados é enviado e pode conter até 24 bytes de informação (0 até 8 canais contendo de 1 a 3 bytes de dados em cada conversão. Isso permite uma maior eficiência no tamanho do pacote, que dependerá da quantidade de dados úteis a serem enviados.

Optobrain protocol - Multichannel data									
SOH	Header				Payload			EOF	
1 byte	Message type	Seq. number	Reserved	Ack	Data ID	Active chs	Precision	Channel data	
	2 bytes				1 byte	1 byte	1 byte	0-24 bytes	1 byte

Figura 115 - Estrutura do pacote do protocolo proprietário Optobrain protocol

O pacote de **configuração**, é responsável por efetuar a leitura ou escrita de valor de um determinado parâmetro apto à configuração. Por exemplo, a maioria das configurações do ADS1299 e do módulo inercial, possuem configurações específicas, cujo módulo bluetooth pode receber e enviar via SPI a requisição de leitura ou escrita e assim retornar ao destinatário a resposta referente à solicitação de configuração.

O pacote de **status**, pode carregar características essenciais processadas do dispositivo, para serem recebidas por um ou mais dispositivos e serem enviadas periodicamente. O pacote de **evento**, é gerado e enviado para cada evento pré-determinado que ocorre no módulo. O pacote de **comando**, é gerado pelo sistema de origem para que o módulo execute alguma ação correspondente, retornando uma resposta de sucesso ou de falha.

Sem dúvidas, o pacote que exigirá maior taxa de transferência, será o pacote de **dados**. Falando em percentual de dados úteis, pacotes de dados que contenham menos canais, terão menor percentual de dados úteis. A Tabela 16 traz os extremos de dados úteis para o mínimo e máximo de bytes possíveis para o pacote de dados. Para um byte, que significa ter um canal com 8 bits de resolução, apenas 12.5% do pacote é aproveitado. Para 8 canais ou 24 bytes de resolução, esse percentual de dados úteis chega a 77.4%.

Tabela 16 - Percentual de dados úteis com relação ao número de bytes enviados por pacote.

Channel data (bytes)	Headload (bytes)	Dados úteis (%)
1	7	12.5
24	7	77.4

De acordo com a Tabela 4, os bytes correspondentes ao ATT Payload, é a parte útil do protocolo bluetooth. E para maximizar o percentual de dados úteis, deve ser maximizado para que os cabeçalhos representem uma menor parte dos dados transferidos. A Tabela 17 compara o percentual de dados úteis

Tabela 17 – Percentual de dados úteis teóricos comparados às características de tamanho dos conteúdos internos aos dados transmitidos pelo protocolo Bluetooth

PHY	ATT Payload (bytes)	Headload (bytes)	Dados úteis (%)
1M	20	17	54.1
1M	244	17	93.5
2M	20	18	52.6
2M	244	18	93.1

O *throughput* máximo atingido está relacionado ao *Payload*. Entretanto, para saber a carga útil máxima ou *throughput* útil máximo, se faz necessário considerar o protocolo proprietário – Optobrain protocol – de envio dos dados relacionados à aquisição de biopotenciais. A Figura 115 do capítulo de desenvolvimento do Firmware, trouxe a estrutura do pacote relacionada ao protocolo Optobrain. Nele, assim como na estrutura do bluetooth é possível simular para distintos tamanhos de pacote, qual a carga útil máxima. Mesclando e expandindo as informações da Tabela 16 e da Tabela 17, a Tabela 18 traz que é possível usar até 71.5% de dados úteis do pacote de dados.

Tabela 18 – Percentual de dados úteis relacionados com as configurações do bluetooth e do ADS1299

Num. de canais ativos	Resolução (bytes)	Channel data (bytes)	Dados úteis (%)	Bytes inutilizados
1	1	1	11.6	4
1	3	3	27.9	4
8	1	8	49.6	4
8	3	24	71.5	27

Essas informações nos mostram que a eficiência da taxa de transmissão total baseada neste protocolo, não depende apenas da taxa de transmissão bluetooth, e sim das configurações do pacote de dados, uma vez que o protocolo define o envio de separado das conversões analógicas.

O protocolo ainda garante o controle contra distorções causadas pela provável perda de pontos na transmissão sem fio. No *Header* das mensagens, cada tipo de mensagem possui um *Sequence Number*. Isso significa que ao ser recebido pelo software, cada tipo de mensagem deverá chegar com um número sequencial que pode variar entre 0 e 255. A chegada de um número de pacote fora da ordem ou a ausência de um pacote, poderá ser percebida e aquele tipo de informação poderá receber um identificador de NaN (Not a Number) nos pacotes ausentes, preenchendo os espaços vazios para que não se distorça a quantidade original de dados, recompondo o vetor original. Essa função é útil para se garantir que filtros digitais e demais processamentos de sinais não sejam distorcidos pela ausência de pontos daquelas aquisições.

## 5 Materiais e Métodos

### 5.1 Protocolos de testes de bancada

Para evoluir o ciclo de desenvolvimento, após a especificação e desenvolvimento da Interface é importante verificar se os requisitos levantados foram implementados e validar se seu funcionamento desejado foi alcançado. Para isso, alguns protocolos de testes a serem executados em bancada serão descritos abaixo, com objetivo de caracterizar o sistema em desenvolvimento, validando tanto as qualidades dos sinais, quanto as características intermediárias/finais do sistema.

#### 5.1.1 Protocolo de testes do gerenciamento de energia

Sabe-se que um sistema de aquisição de dados necessita de um gerenciamento de energia que tenha condições de prover uma alimentação estável e sem ruídos ou interferências que possam ser prejudiciais ao funcionamento ideal do sistema, além disso, entender quanto de corrente cada perfil de uso do sistema exige é importante para projetar a autonomia do sistema. Por isso a caracterização do gerenciamento de energia nesta tese será feita basicamente avaliando dois importantes itens. A presença de ruídos na alimentação e os perfis de consumo da interface em condições distintas.

A Figura 116 traz o esquema do gerenciamento de energia da placa na versão 2.0 da Interface. Essa versão, diferente da versão 1.0, traz a possibilidade de realizar o carregamento da bateria dentro da própria interface, entretanto os testes realizados, serão feitos considerando a primeira versão da placa e portanto, o fluxo de energia que chega da bateria, segue diretamente para o VIN e que dali reencaminha para o restante da placa que executa os condicionamentos de tensões (3.3V e  $\pm 2.5V$  em verde) a serem utilizadas na placa. O Condicionamento ainda conta com um divisor de tensão no VIN para que se possa ler a tensão do VIN (BLE\_VIN em amarelo) pelo próprio microcontrolador através de uma entrada analógica.

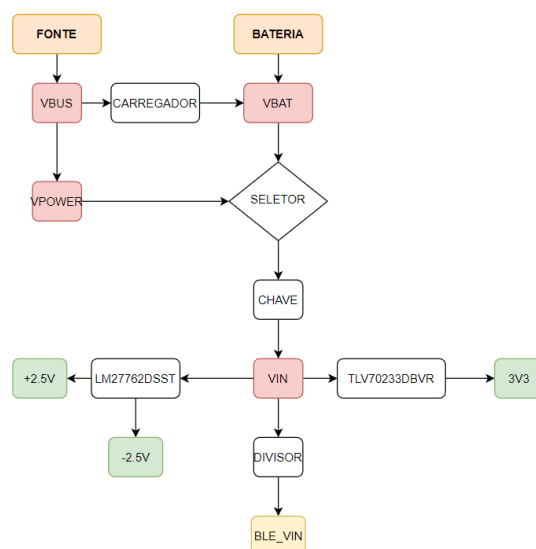


Figura 116 - Fluxograma contendo o esquema de gerenciamento de energia da PCB Optobrain Interface 2.0

Em testes iniciais, foi visto que as tensões e correntes de entrada e saída de todos os componentes estão dentro do previsto pelos fabricantes dos chips (LM27762 e TLV70233). Entretanto é necessário entender melhor o comportamento do gerenciamento de energia em termos de ruído e dos perfis de consumo de energia.

#### 5.1.1.1 Protocolo de teste de análise de ruído na alimentação

O protocolo de teste de análise de ruído na alimentação foi proposto no decorrer da tese durante os ensaios piloto da placa, pois foi percebido que em algumas aquisições analógicas executadas, foram encontrados ruídos que poderiam ser provenientes da alimentação, uma vez que a percepção do ruído somente ocorreu em aquisições cujo sinais eram dependentes da fonte interna de alimentação.

Para realizar este teste, cinco diferentes topologias de alimentação serão utilizadas para alimentar um divisor de tensão que será conectado diretamente

em um canal do ADS1299. O divisor de tensão foi utilizado para ajustar o nível de entrada compatível com a leitura analógica. São elas:

1. VIN com -2.5V
2. 3.3V com -2.5V
3.  $\pm 2.5V$
4. Bateria externa com -2.5V
5. Bateria externa com GND

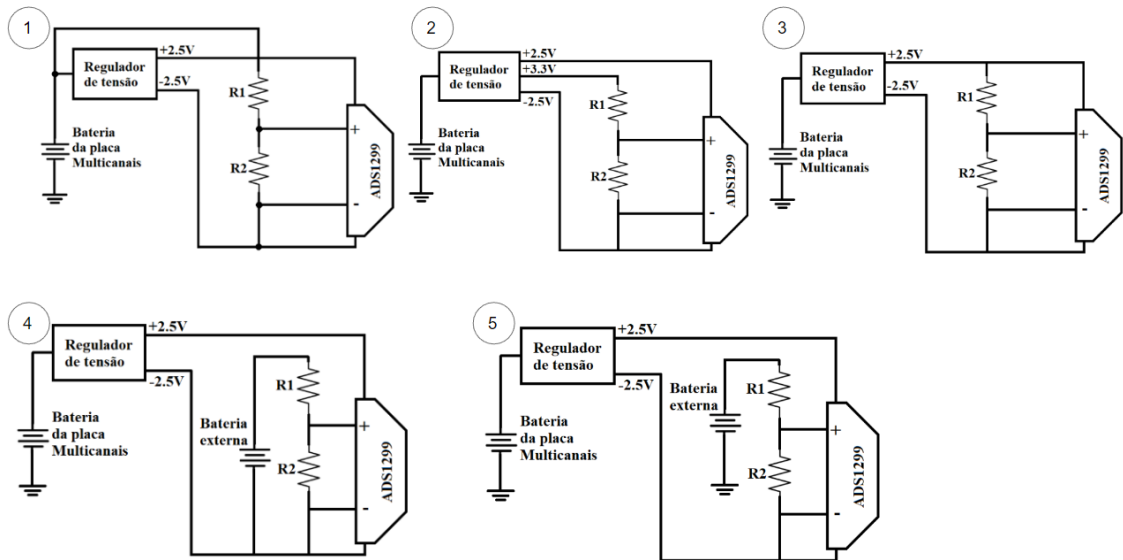


Figura 117 - Cinco topologias de testes de influência da alimentação.

As topologias levam em consideração, tipos diferentes de alimentações que normalmente podem ser utilizadas para alimentar sensores. Pelo fato de a interface poder ser conectada com sensores externos, como sensores de pressão, estes são dependentes de uma tensão de entrada. Ou seja, quanto maior o ruído na entrada, maior pode ser o ruído percebido no sinal do sensor.

A análise a ser feita aqui é encontrar as maiores amplitudes e frequências desses ruídos através de análises FFT e comparar os níveis de ruídos entre as topologias.



### 5.1.1.2 Protocolo de testes de análise de perfil de consumo de energia

Entender o perfil de consumo da Interface é de extrema importância para buscar não conformidades de consumo e entender o tempo de autonomia da Interface nas diversas circunstâncias. Por isso serão determinados diferentes perfis de uso para que se possa medir o consumo imediato de corrente, potência, energia consumida e autonomia do sistema.

Sabe-se que a interface, pode apresentar perfis de uso distintos durante o seu funcionamento. A lista abaixo descreve o tipo de uso a ser caracterizado pelo seu consumo:

1. *Standby* – Condição em que o *bluetooth* realiza *advertising*, apto a se conectar a algum outro sistema, entretanto sem aquisição e leitura dos dados via ADS1299 ou sensor inercial, nem ativação de nenhum LED.
2. Aquisição de dados ADS1299 – Condição semelhante a 1, com adição do uso do ADS1299 em 4 configurações:
  - a. Um canal a 250 sps;
  - b. Oito canais a 250 sps;
  - c. Um canal a 2000 sps;
  - d. Oito canais a 2000 sps;
3. Leitura e transmissão de dados do ADS1299 – Condição de leitura e envio via bluetooth em configurações:
  - a. Um canal a 250 sps;
  - b. Oito canais a 250 sps;
  - c. Um canal a 2000 sps;
  - d. Oito canais a 2000 sps;
  - e. Um canal a 250 sps com sensor de pressão invasiva;
  - f. Um canal a 250 sps com sensor piezoelétrico;
4. Leitura e transmissão de dados do ADS1299 e do sensor inercial IMU:
  - a. Um canal a 250 sps + IMU;

- b. Oito canais a 2000 sps + IMU;
5. Leitura ADS1299 e IMU, transmissão dos dados e acionamento de LEDS
- a. Um canal a 250 sps do ADS + IMU e acionamento de um LED a 100mA;
  - b. Oito canais a 250 sps do ADS + IMU e um LED de 100mA;
  - c. Um canal de 250 sps do ADS + IMU e dois LEDs de 100mA cada;

Para fazer a leitura dos parâmetros, uma placa baby-sitter, que possui a capacidade de ler tensão, corrente e calcular a potência, será utilizada para registrar os dados em um arquivo CSV. Serão considerados os valores médios para se calcular a quantidade de energia consumida integrando o produto da potência pelo intervalo de tempo. As autonomias gerais dos perfis serão calculadas considerando uma bateria de 200mAh.

Para alguns perfis, algumas estimativas poderão ser feitas, utilizando os dados disponíveis no datasheet como seguem abaixo:

- Corrente de CPU: 3.7 mA;
- Corrente de recepção bluetooth: 5.4 mA;
- Corrente de transmissão bluetooth: 7.5 mA;
- Corrente média ADS1299: 7.14 (analógico) e 1 (digital) = 8.14 mA;
- Corrente IMU: 4.6 mA;

### 5.1.2 Protocolos de testes de Aquisição analógica

Para validar as características da Optobrain Interface referente à etapa de aquisição dos sinais analógicos, alguns protocolos de testes serão levantados a seguir. Testes para caracterizar o ruído, erros e acurácia da conversão, tanto em valores analógicos e acurácia temporal de conversão, erros de offset e ganho, CMRR, Interferências entre os canais, resposta em frequência e linearidade.

### 5.1.2.1 Protocolo de testes de análise de ruído na entrada do ADS

O ADS1299 possui características relacionadas ao ruído muito bem definidas pelo fabricante, e indica que é possível otimizar a *performance* relacionada ao ruído apenas ajustando a frequência de leitura dos dados e o ganho do amplificador programável. A diminuição da frequência de aquisição, aumenta o tempo médio onde cada leitura é feita. Por consequência, a média da leitura daquele instante tende a ser mais estável e menos susceptível aos ruídos de entrada quando comparado a uma leitura mais rápidas. Por outro lado, aumentar o ganho de amplificação pode contribuir para reduzir o efeito do ruído de entrada (*Input-referred noise*).

Ainda assim, todo componente do mundo real, traz ruídos relacionados ao processo de amplificação e aquisição. Por isso, saber seus valores e impactos na aquisição de sinais analógicos é fundamental para entender se o ruído, sinal não desejado, pode impactar na variável e ser medida, sinal desejado.

Para a execução de testes relacionados ao ruído de entrada, cada canal diferencial em avaliação deve ser colocado em curto. Os dados serão coletados durante 10 segundos, conforme também executado pelo fabricante, para os específicos ganhos e taxas de amostragem abaixo:

- Ganhos: 1, 2, 4, 8, 12 e 24V/V;
- Taxas de amostragem: 250, 500, 1000 e 2000 amostras por segundo;

Esses valores serão transmitidos para um computador em tempo real fazendo o uso do *dongle bluetooth*. Não serão utilizadas taxas de amostragens maiores devido à limitação de throughput do sistema no momento dos ensaios.

Para a medição do ruído entrada, serão considerados todos os pontos da amostra durante os 10 segundos de coleta para garantir no mínimo 1000 amostras. Os valores máximos e mínimos dentro dessa janela serão considerados para cálculo do pico-a-pico ( $\mu V_{PP}$ ) e para o valor RMS ( $\mu V_{RMS}$ ) será calculado através do desvio padrão de todo conjunto de pontos.

Para comparação, serão utilizados os mesmos parâmetros associados ao ruído fornecidos pelo datasheet (TEXAS INSTRUMENTS, 2017b) do fabricante. São eles:

- **Input-referred noise** ( $\mu V_{RMS}$  e  $\mu V_{PP}$ );
- **Dynamic range** (dB);
- **Noise-free bits**;
- **Effective number of bits** (ENOB).

A Fabricante do ADS1299 traz de maneira muito bem descrita, as tabelas com os valores do ruído capturado pelo seu conversor, assim como as fórmulas de cálculo dos parâmetros.

$$\text{Dynamic Range} = 20 \times \log \left( \frac{V_{REF}}{\sqrt{2} \times \text{Gain} \times V_{RMS}} \right)$$

$$\text{ENOB} = \log_2 \left( \frac{V_{REF}}{\sqrt{2} \times \text{Gain} \times V_{RMS}} \right)$$

$$\text{Noise free bits} = \log_2 \left( \frac{FSR}{\text{Gain} \times V_{PP}} \right), \text{ onde } FSR = \frac{2 \times V_{REF}}{\text{Gain}} = \frac{9}{\text{Gain}}$$

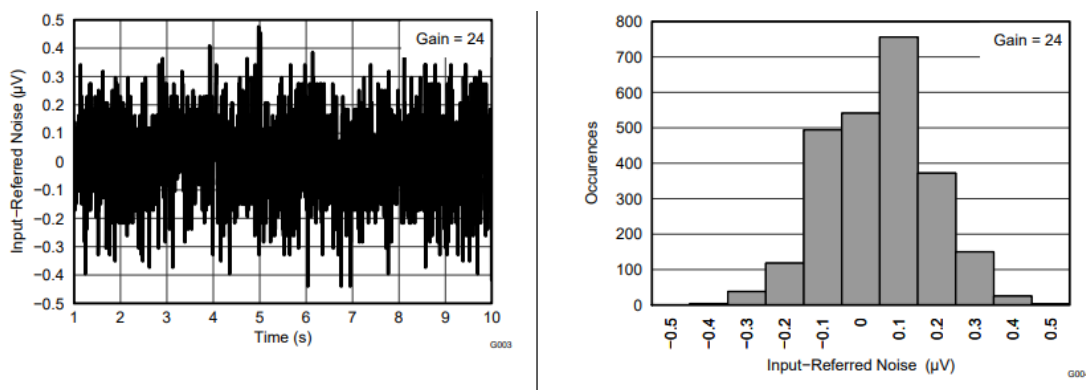


Figura 118 - Gráficos relacionado ao ruído de entrada disponibilizado no datasheet do ADS1299. Ruído de entrada pelo tempo (Esquerda) e Histograma de Ruído (Direita) para a taxa de amostragem de 250 Hz.

Para os valores encontrados na placa Optobrain, uma tabela comparativa será feita contra os valores disponíveis no datasheet, assim como os gráficos de ruído pelo tempo e em formato de histograma.

### 5.1.2.2 Protocolo de testes de precisão da taxa de amostragem

Aquisições feitas por conversores analógicos necessitam de osciladores de frequência, para temporizar os intervalos entre as conversões. A versão 1.0.2 da Optobrain Interface, utiliza o oscilador interno do ADS1299 e, portanto, passível de maiores erros temporais na conversão dos dados. Com isso, o objetivo deste teste é verificar se há constância temporal no intervalo entre os pontos capturados na aquisição e seu erro médio.

Para realizar o teste, o analisador lógico Saleae será utilizado para medir o intervalo de tempo cujos dados ficam disponíveis no ADS1299. Essa medição será feita através do pino de *Data Ready* (ADS\_DRDY), conforme mostrado pela Figura 119.

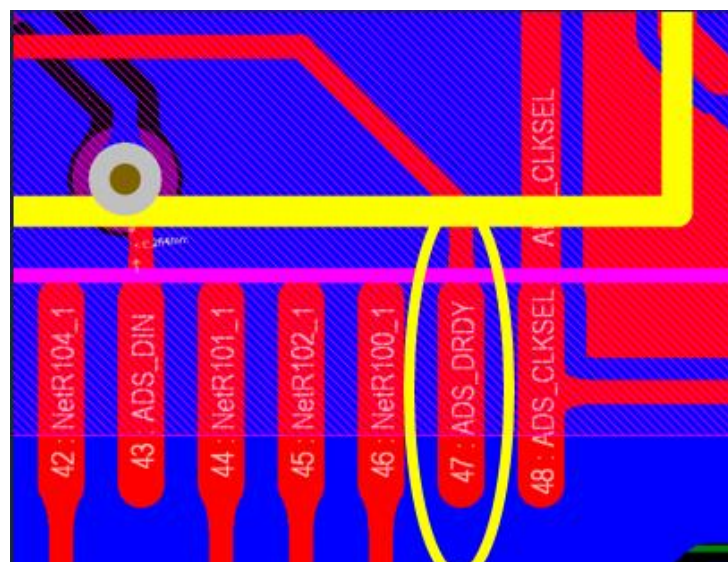


Figura 119 - Parte do esquemático da Optobrain Interface com destaque para o pino ADS\_DRDY.

Diferentes placas com diferentes taxas de amostragem deverão ser testadas a fim de se obter os intervalos para se calcular o erro percentual e comparar com os valores do datasheet.

### 5.1.2.3 Protocolo de teste de offset e ganho

Para medir o offset e a variação dele com relação ao ganho, as entradas de todos os oito canais serão colocadas em curto-circuito. Aquisições simultâneas nos oito canais serão feitas durante 3 a 4 segundos para cada ganho, iniciando por 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 V/V, com taxa de amostragem de 250 Hz. A comparação entre os valores médios para cada canal/ganho permitirá o entendimento sobre o comportamento do nível DC inicial de cada entrada.

Para medir a variação do ganho entre os canais do ADS1299 foi aplicada uma mesma tensão constante de 0,15 V para seis dos canais (os canais 2 e 8 ficaram fora por apresentarem instabilidade em seu funcionamento). Esse valor de tensão foi escolhido de modo que o ganho igual a 24 V/V não sature o amplificador. Em seguida, foram analisados os níveis de tensão para cada ganho. Para esse teste, o sinal foi dividido pelo valor do ganho.

Para calcular o desvio de ganho entre os canais, será utilizado o caso em que o ganho é 24 V/V para realizar a comparação, pois esse é o caso em que o offset influencia menos. O parâmetro utilizado será o desvio percentual de determinado canal ( $V_i$ ) em relação ao primeiro canal ( $V_1$ ):

$$desvio(\%) = \frac{|V_i - V_1| \times 100}{V_1}$$

O valor a ser considerado no final deverá ser o máximo desvio.

#### 5.1.2.4 Protocolo de teste de taxa de rejeição de modo comum - CMRR

Um amplificador ideal deve amplificar apenas sinais diferenciais na sua entrada e ignorar os sinais que estão presentes nas duas entradas ao mesmo tempo (modo comum). Porém, devido a imperfeições do circuito que constitui o amplificador, o sinal de modo comum aparece na saída do amplificador com um ganho pequeno em comparação com o sinal diferencial. A razão entre o ganho do sinal diferencial e o ganho do modo comum define a taxa de rejeição de modo comum (CMRR). Para medir a CMRR, se faz necessário colocar novamente todas as entradas do ADS em curto e aplicar uma tensão nas entradas. Essa tensão aplicada pode ser de nível DC ou AC.

Para a entrada DC, serão aplicados três níveis de tensão. 0.2, 2 e 3.8V. A aquisição será feita com uma taxa de amostragem de 2000 amostras por segundo durante 10 segundos para os seguintes ganhos: 1, 2, 4, 12 e 24V/V.

$$CMRR = -20 \times \log_{10} \left[ \frac{|V_{i2} - V_{i1}|}{|V_{m2} - V_{m1}|} \right]$$

onde  $V_{i1}$  e  $V_{i2}$  são os valores de tensão DC lidos do canal 1 e  $V_{m1}$  e  $V_{m2}$  são as médias dos pontos coletados para o modo comum nas entradas correspondentes.

Para entradas AC, será aplicada uma senoide com amplitude média de 2.5V de forma a abranger o máximo possível do fundo de escala sem saturar o amplificador. As frequências de 1 e 100 Hz serão utilizadas, em aquisições com taxas de amostragem de 250, 500, 1000 e 2000 amostras por segundo. Neste caso, a CMRR deverá ser calculada dividindo a amplitude da componente principal do sinal em modo diferencial pela amplitude da maior harmônica do sinal em modo comum, obtidas através de FFT.

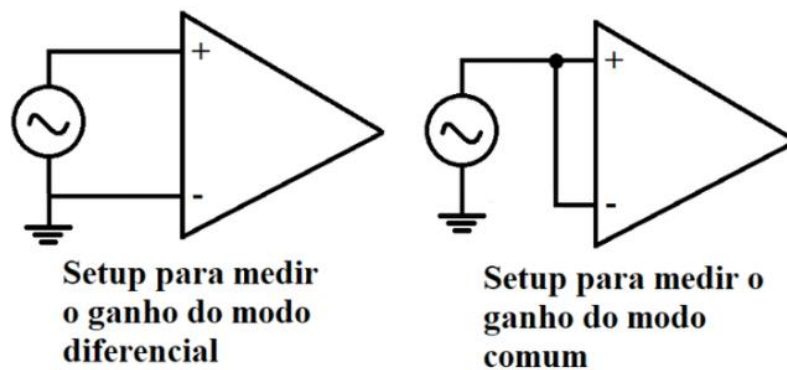


Figura 120 - Configurações de testes de CMRR modo AC. Diferencial à esquerda e Comum à direita.

### 5.1.2.5 Protocolo de teste para análise da interferência entre os canais

O ADS1299 possui oito canais paralelos contendo conversores analógicos-digitais dedicados para cada canal. Com o uso geral da placa, é possível que cada um dos canais receba tipos de sinais distintos, com amplitudes e comportamento dinâmico com diferentes ordens de magnitude para cada canal. Com isso, é fundamental que se conheça o *crosstalk*, ou seja, a interferência indesejada entre canais. Por não se conhecer internamente o chip e o efeito do posicionamento das trilhas, este protocolo tem o objetivo de testar e medir a interferência entre os canais do ADS1299.

Para medir a interferência entre os canais, será aplicada uma onda senoidal de amplitude próxima a 2.5V de forma que não sature o amplificador de entrada dos canais do ADS. Essa senoide será testada em todos os canais disponíveis da placa com frequências de 1 e 100 Hz. Nos demais canais, será aplicada uma tensão constante DC de 1V para que não fiquem flutuando.

Para a aquisição, a taxa de amostragem será configurada para 2000 amostras por segundo, com ganho de 1 V/V, possibilitando a máxima excursão da tensão de entrada. Para medir a rejeição à interferência entre os canais (*crosstalk*), a seguinte fórmula será utilizada:



$$crosstalk(x, y) = 20 \times \log_{10}\left(\frac{V_{o_y}}{V_{i_x}}\right)$$

Onde o  $crosstalk(x, y)$  representa a interferência que o canal  $y$  sofre do canal  $x$  em dB,  $V_{i_x}$  é a amplitude da primeira harmônica no espectro da frequência do canal  $x$  e  $V_{o_y}$  é a amplitude da maior harmônica entre as 10 primeiras do sinal no canal  $y$ . Para medir as amplitude, serão calculados as FFTs dos sinais.

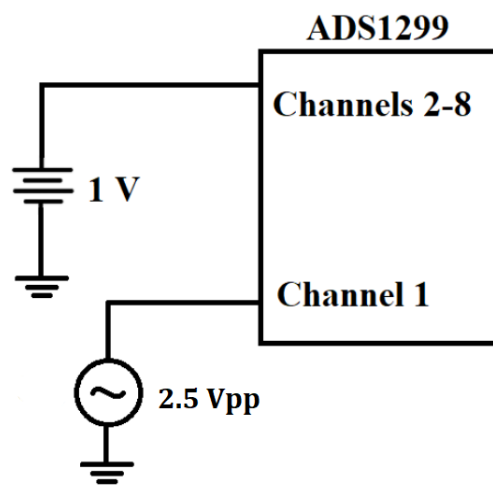


Figura 121 - Esquema de montagem do teste de crosstalk.

#### 5.1.2.6 Protocolo de teste para análise da resposta em frequência

Uma característica importante de qualquer circuito de aquisição é a presença e o comportamento dos filtros do sistema. Ligado a isso, é necessário conhecer a resposta em frequência do circuito para que a aquisição não distorça o sinal desejado. No datasheet do ADS1299 não é citado sobre nenhum filtro *notch* ou filtros configuráveis de entrada. Porém é apresentado o filtro de decimação, que está ligado à aquisição do sistema. Para que não haja *aliasing* (serrilhado) na aquisição, esses filtros do tipo *sinc* de terceira ordem são utilizados. Para analisar o comportamento do sistema para esse tipo de filtro, serão realizados alguns testes, os quais serão documentados abaixo.

O objetivo desses testes é obter o espectro de frequência para o filtro de decimação do ADS1299. Para isso, foi aplicada uma onda senoidal de aproximadamente 1,6 V no canal 1 e com ganho 1 V/V. A taxa de amostragem foi de 2000 sps, para obter o maior espectro possível. A frequência da senoide deverá variar de 1 Hz a 1 kHz. Para cada frequência, deverá ser realizada uma aquisição de 10 segundos de dados. Após coletar todos os sinais, será calculado o espectro de magnitude em frequência para cada sinal a fim de obter a frequência e amplitude. A amplitude do sinal de 1 Hz será utilizada como referência para o cálculo do ganho, o qual será calculado dividindo a amplitude do sinal na FFT de uma determinada frequência pela amplitude da componente de 1 Hz.

#### 5.1.2.7 Protocolo de teste para análise da linearidade

Este teste busca caracterizar a curva de transferência do ADS1299. Todo conversor no mundo real possui erros de conversão associados (*offset*, ganho, linearidade, ruído intrínseco) que podem causar diferenças entre o valor lido e o valor real de entrada.

Serão aplicadas tensões variando de 0 a 4,5V, com passos de 0,25V, no primeiro canal do ADS1299. Caso haja distorções, a realização nos demais canais deverão ser feitas. O ganho foi mantido em 1 V/V de forma que não ocorra saturação referente ao valor de entrada. A taxa de amostragem utilizada é de 2000 amostras por segundo com duração de 10 segundos para cada nível. A tensão deverá ser ajustada fazendo uso de um divisor de tensão com potenciômetro, usando um multímetro calibrado e com resolução de  $\pm 100 \mu\text{V}$  para ajuste, com e sem a presença de filtro RC na entrada. Uma média para cada passo de 10 segundos deverá ser feita para compor uma tabela comparativa.

### 5.1.2.8 Protocolo de teste para análise da resistência DC de entrada

Quando um instrumento de medição é conectado a dois pontos de qualquer circuito para se medir a tensão, ocorre o efeito de carga, que basicamente é a alteração da tensão devido à conexão de outra impedância no local. Isso faz a impedância equivalente daquele ponto diminuir, levando à diminuição da tensão medida. Para reduzir esse efeito, os instrumentos de medição devem possuir alta impedância de entrada. Com isso é fundamental conhecer a impedância DC de entrada dos canais do sistema. O datasheet do ADS consta que a resistência DC de entrada dos canais é superior a 1 G $\Omega$ . Para essa verificação será utilizada uma placa multímetro modelo PXI-4071 da *National Instruments* (NI, USA) que é capaz de ler até 5 G $\Omega$  de impedância. As impedâncias serão lidas por 10 segundos e os valores médios de cada canal serão dispostos em uma tabela para se comparar com o valor mínimo garantido pelo fabricante. Como o *datasheet* apenas mostra valores DC de impedância, análises em resposta da frequência não serão feitas por não se ter valores de referência.

### 5.1.3 Protocolo de testes de transmissão de dados sem fio

A taxa de transferência (*throughput*) de transmissão sem fio, é a quantidade de dados transferidos de um lugar ao outro em um determinado tempo. Saber essa taxa é uma informação importante, pois permite saber a capacidade máxima de transferência de dados de um sistema. No caso da placa Optobrain Interface, saber o *throughput* útil máximo é relevante para se conhecer a limitação de quantos canais, quais resoluções e quais taxas de aquisição de biopotenciais através do ADS1299 podem ser configuradas de forma a obter a melhor performance sem perda de dados, uma vez que a capacidade máxima do ADS extrapola a máxima taxa de transferência teórica do bluetooth.

A Figura 122 mostra a configuração de dispositivos utilizada para obter o máximo de informações dos testes. Pela esquerda temos uma protoboard contendo a placa Optobrain Interface v1.0.2 (Multicanais). Acima dela (ainda na protoboard) a placa de avaliação do AS1109 com uma bateria e pela esquerda uma placa de desenvolvimento BMD, responsável por fazer a gravação e atualização de firmware na Optobrain Interface. Ao lado direito da figura, uma outra placa BMD, responsável por receber os pacotes bluetooth e enviar informações via serial ao computador. Ao centro, uma outra placa BMD contendo um software de *sniffer*, responsável por monitorar o tráfego de dados entre a placa Optobrain e o BMD que estava recebendo os dados.

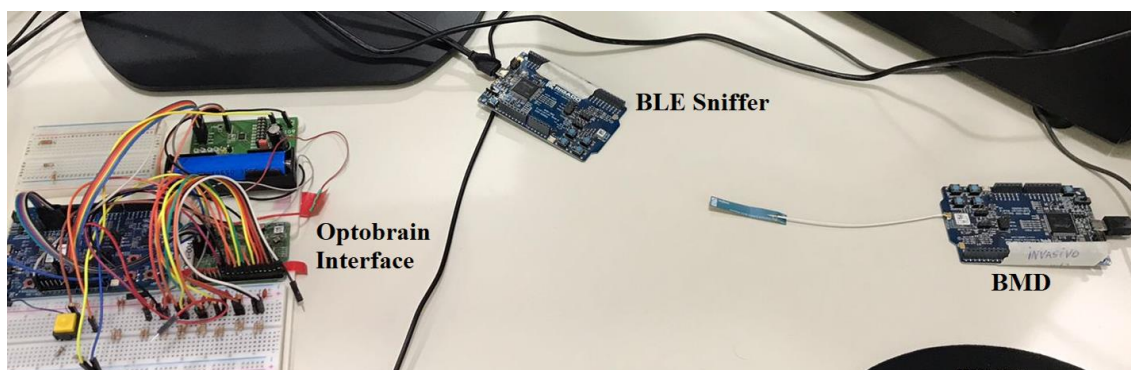


Figura 122 - Setup de equipamentos para ensaio de taxa de transferências

Para a execução do teste da máxima taxa de transmissão, o *firmware* da placa OptoBrain Interface foi customizado, a fim de desativar todas as demais funcionalidades diferentes daquela responsável pela transmissão sem fio dos dados.

Um software em LabVIEW foi desenvolvido para receber via comunicação serial com a placa BMD será utilizado entre o transmissor e o receptor para ser responsável pela recepção dos tamanhos dos pacotes e seus tempos de chegada.

Para fazer a função de *sniffer*, a placa central será gravada com um firmware *sniffer* da fabricante Nordic Semi, e o software *Wireshark* será utilizado no computador para analisar os parâmetros do BLE da transmissão e identificar os fatores que podem alterar a taxa de transmissão.

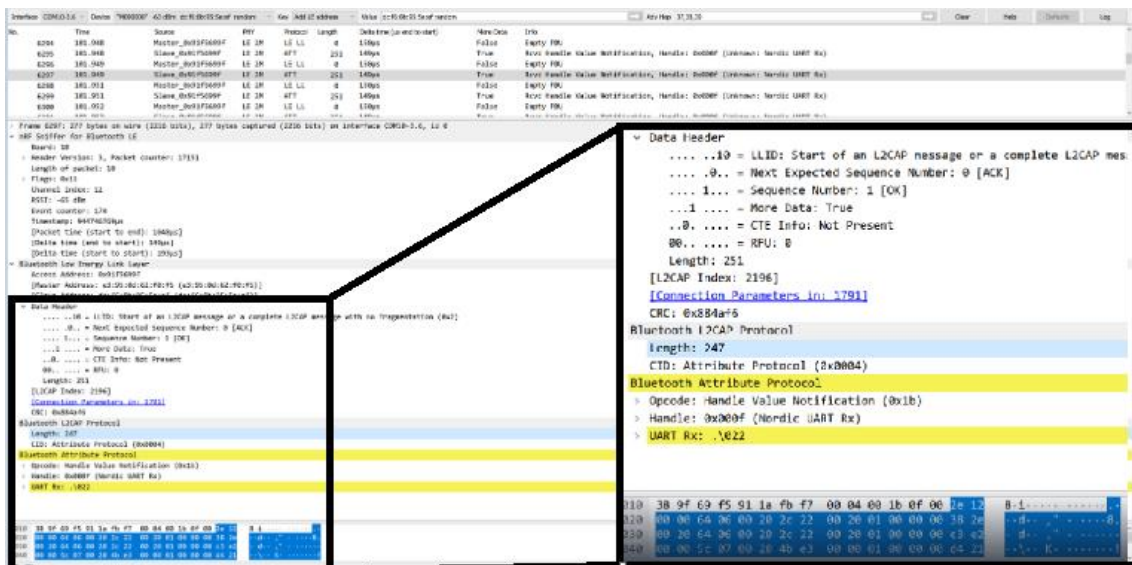


Figura 123 - Tela do software *Wireshark*, responsável por capturar informações dos pacotes BLE transmitidos entre as placas. Destaque para informações referentes aos atributos do protocolo do bluetooth

O objetivo deste teste é encontrar a máxima taxa de transferência possível através da placa Optobrain Interface versão 1.0.2, alterando-se as características do protocolo bluetooth, entendendo o impacto dessas configurações na alteração da taxa. O objetivo secundário do teste é através dessa máxima taxa, considerando o protocolo proprietário *Optobrain protocol*, descobrir o percentual de carga útil de transmissão para distintas configurações de aquisição.

As características do protocolo bluetooth a serem alteradas são:

- PHY: 1Mbps e 2Mbps
- Tamanho dos pacotes: 20 e 244 bytes
- Intervalo de conexão: 7.5, 50, 100, 200 e 400 ms;
- Duração do evento de conexão: 62.5, 87.5, 100, 125 e 500 ms;
- Distância aproximada entre transmissor e receptor: 1, 30 e 100 cm;
- Presença de obstáculos entre os dispositivos: Com e sem obstáculo
- Potência de transmissão: -40, -20, -8, 0 e 4 dBm.

### 5.1.4 Protocolo de testes de aquisição de dados de pressão

Para demonstrar a capacidade do sistema de realizar a aquisição de sinais de pressão, um simulador chamado SIMP (SIMulador de Pressões), desenvolvido e patenteado pela empresa brain4care, é capaz de criar dinamicamente em bancada, ondas de pressão com capacidade de customização da morfologia e seleção de seus valores médios e amplitudes, podendo chegar até 300mmHg, com frequências de 200 BPM.

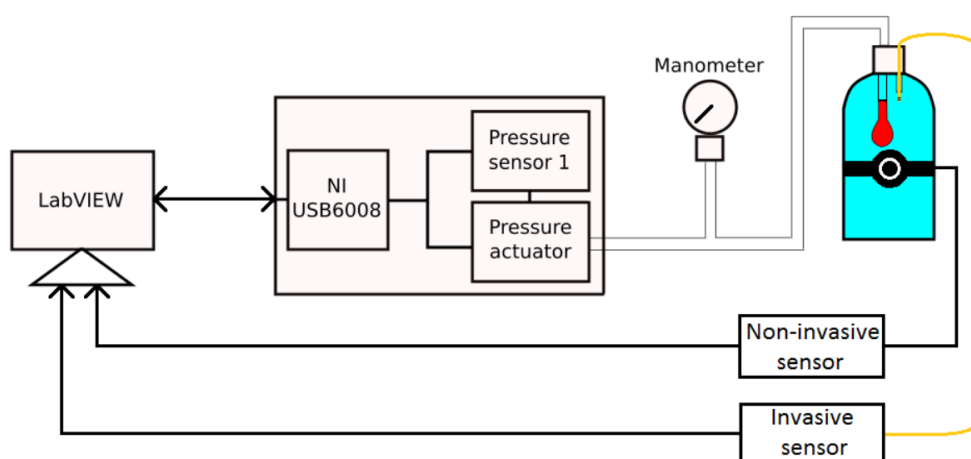


Figura 124 - Arquitetura do SIMP (brain4care, Brasil).

A Figura 124 traz a arquitetura geral do sistema SIMP, onde dentro de um reservatório, uma bexiga conectada a um atuador de pressão em malha fechada simula a complacência arterial com variações controladas de pressão comandadas através de um software proprietário. A diferença de pressão gerada dentro da bexiga, de acordo com a complacência da garrafa, altera o volume da bexiga, que ao aumentar o volume, aumenta o volume interno da garrafa que por estar estanque, tem sua pressão também aumentada dinamicamente. No SIMP é possível realizar testes com sensores invasivos e sensores não invasivos de pressão.

Fazendo o uso do SIMP, serão testados a aquisição de dois tipos de sensores de pressão simultâneos. Um sensor de pressão intracraniana invasivo, modelo Codman Microsensor, e um protótipo de sensor não invasivo brain4care. Diferentes desenhos de morfologias e níveis de offset serão coletados pela Optobrain Interface. O Sensor invasivo, necessita de alimentação de excitação. Para isso será utilizado o  $\pm 2.5V$  e a saída será lida pelo canal 3 da Interface. O Sensor protótipo não invasivo brain4care também necessita de alimentação para seu circuito amplificador de carga e utilizará a alimentação  $+2.5V$  com GND e utilizará o canal 1 da interface. A aquisição será feita a 2000 amostras por segundos com 24 bits de resolução em cada canal. Os outros seis canais da placa estarão curto-circuitados internamente. Com isso, quatro testes distintos serão feitos, sendo três coletas contendo morfologias distintas e uma delas uma mesma morfologia alterando o nível de pressão:

1. Morfologia 1 com 40 mmHg de pressão basal e amplitude de 30mmHg durante 20 segundos a 60 BPM;
2. Morfologia 2 com 40 mmHg de pressão basal e amplitude de 30mmHg durante 20 segundos a 60 BPM;
3. Morfologia 3 com 40 mmHg de pressão basal e amplitude de 30mmHg durante 20 segundos a 60 BPM;
4. Morfologia 1 com amplitude de 30 mmHg iniciando a pressão basal em 40 mmHg, aumentando 5 mmHg a cada 30 segundos até chegar em 65 mmHg e depois retornando a 40 mmHg nas mesmas condições e 60 BPM.

As condições acima, serão setadas para que o atuador de pressão crie através de malha fechada essas morfologias dentro do circuito da Bexiga. Entretanto, diferentes valores de amplitude e valor basal de pressões serão percebidas dentro da garrafa por conta da complacência do sistema da Bexiga e do reservatório como um todo. Alterações na morfologia original poderão e deverão ser vistas nas pressões da garrafa. Entretanto a característica das morfologias e níveis basais dos sensores invasivos e não invasivo deverão ser semelhantes em uma análise com dois eixos, uma vez que o sensor não invasivo não possui valor absoluto, mas é fidedigno à morfologia do pulso de pressão.

A Figura 125 mostra os desenhos das três morfologias que possuem três picos característicos sequenciais (P1, P2 e P3) que trazem relações P2/P1 distintas.

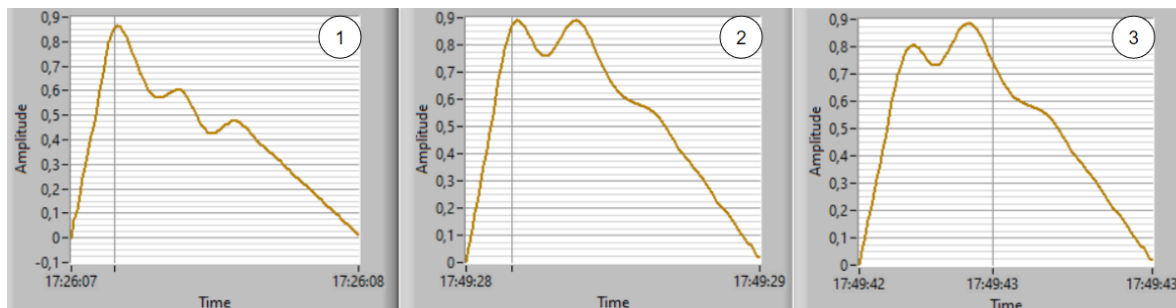


Figura 125 - Três morfologias de ondas de pressão distintas em suas alturas de Picos P1 e P2. - (1) Morfologia 1 com  $P1 > P2$ , (2) Morfologia 2 com  $P1 = P2$  e (3) Morfologia 3 com  $P2 > P1$ .

A Figura 126 mostra os detalhes do *setup* do teste:

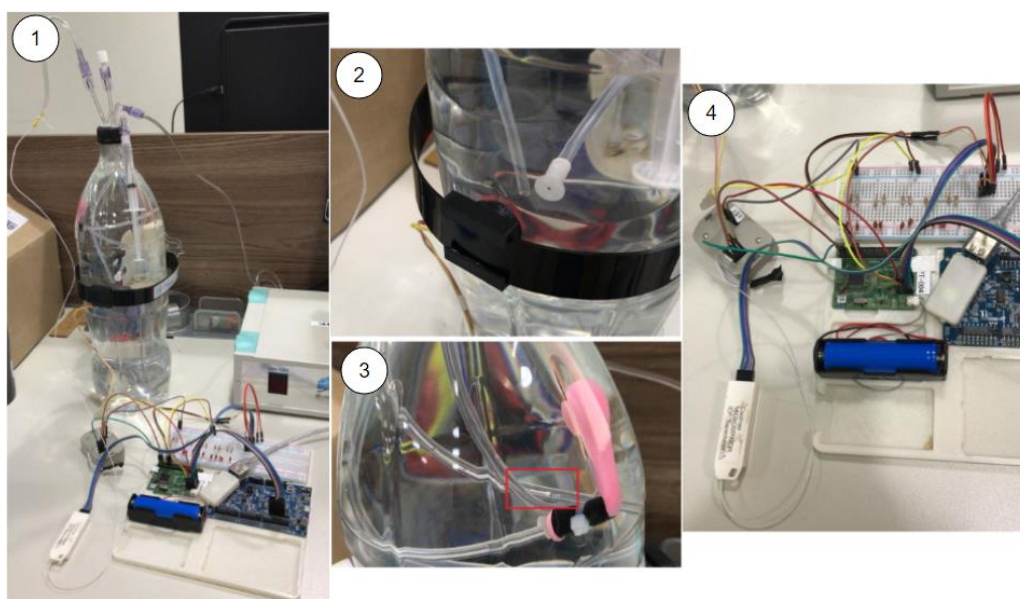


Figura 126 - Setup completo do experimento de validação da aquisição de sinais derivados de sensores de pressão – (1) Visão geral do experimento, contendo uma garrafa cheia de água, com vias de acesso estanques na tampa e sensores de pressão posicionados e a eletrônica de aquisição abaixo. – (2) Detalhe do posicionamento do sensor não invasivo de captura da pressão – (3) Detalhe no retângulo vermelho da posição do microsensor intraparenquimatoso da Codman, dentro de uma via com contato direto com o líquido e pressão interna – (4) Detalhe da eletrônica, contendo a Optobrain Interface alimentada por bateria com a conexão de ambos os sensores através do conector molex e o receptor dongle bluetooth próximo à interface.



## 5.2 Preparação de experimento piloto com optogenética em camundongo

A proposta deste primeiro experimento piloto de optogenética com a *Optobrain Interface* é avaliar o seu funcionamento na aquisição de biopotencial e ativação optogenética em camundongo expressando ChR2 no Vglut2. A *Interface* foi testada no laboratório do grupo NeuroBreath localizado no instituto de Ciências Básicas da USP em São Paulo, sendo utilizada em conjunto com o sistema de Optogenética proprietário do laboratório.

A Figura 127 mostra uma das mesas de procedimento experimental do laboratório dispendo dos equipamentos ao fundo e ao centro o estereotático onde a cânula é geralmente posicionada para aplicação da fonte de luz direcionada ao animal.

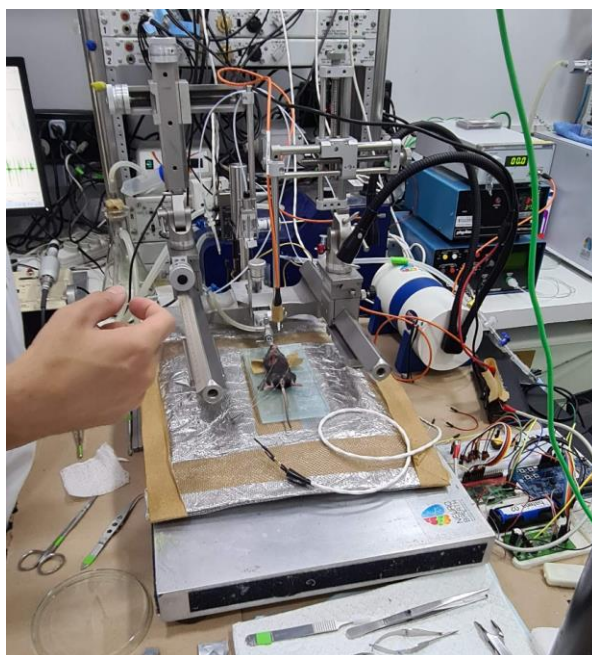


Figura 127 – Camundongo em preparação para o experimento piloto de optogenética na bancada do laboratório do grupo NeuroBreath.

Os experimentos foram conduzidos de acordo com as boas práticas para uso científico de animais sob o CEUA de nº 8713290519 do ICB da USP. Neste piloto, foram usados dois camundongos transgênicos (Vglut2-cre, Ai32) adultos

machos com 28 gramas de peso aproximado no qual o canal rodopsina-2 (ChR2) é expresso condicionalmente nos neurônios sensoriais do transportador de glutamato vesicular 2 (Vglut2).

Um par de eletrodos de prata foi posicionado na região intercostal para aquisição de EMG captando movimentações tanto da respiração quando das batidas do coração. A Figura 128 mostra o posicionamento do eletrodo na região intercostal do animal, assim como a aplicação das fontes de luz.

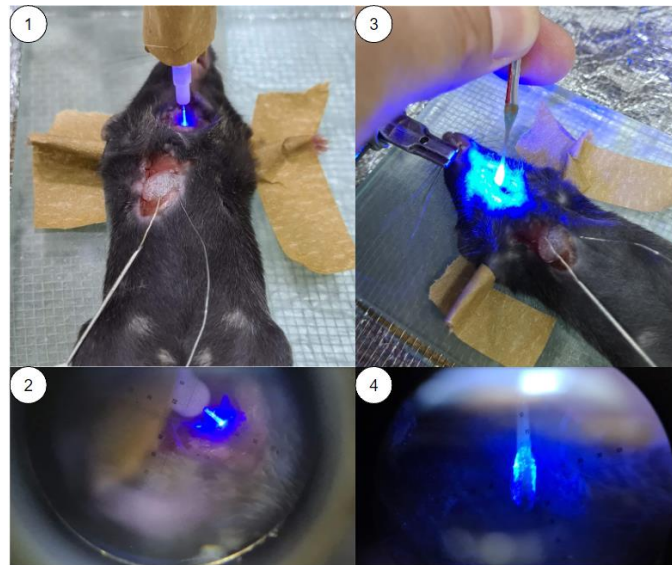


Figura 128 - Fontes de luzes sendo aplicadas na região de nervo vago no camundongo e posição do par de eletrodos de prata na região intercostal. (1) Aplicação do Laser através da cânula com fibra ótica; (2) Detalhe do posicionamento da fibra aplicando o laser de 473 nm; (3) Aplicação manual do optrodo desenvolvido na tese; (4) Detalhe da ponta do optrodo visto pelo microscópio.

As aplicações de luz foram feitas com frequência de disparo de 20 Hz com tempo de 10 ms de ativação em ambas as tecnologias. As fontes de luzes foram utilizadas para estimular o nervo Vago direito (X par de nervo craniano), onde existe expressão da ChR2 ao longo do nervo. Na figura acima, pelo lado da esquerda, as imagens 1 e 2 mostram com detalhes a aplicação do Laser através da cânula com fibra ótica de 200 $\mu$ m. Pela direita a aplicação do optrodo com os LEDs é vista também com detalhes. Ambas as luzes possuem 473 nm de comprimento de onda.

As aquisições de biopotenciais foram realizadas com a Optobrain Interface v1.0.2, utilizando o canal 3, com taxa de aquisição de 1000 pontos por segundo, com 24 bits de resolução e ganho de 24 V/V. Para proteger o par de

eletrodos, foi realizado a aplicação de silicone elastomérico sobre os eletrodos na região intercostal para evitar que movimentações do animal pudessem influenciar negativamente na captura do biopotencial.

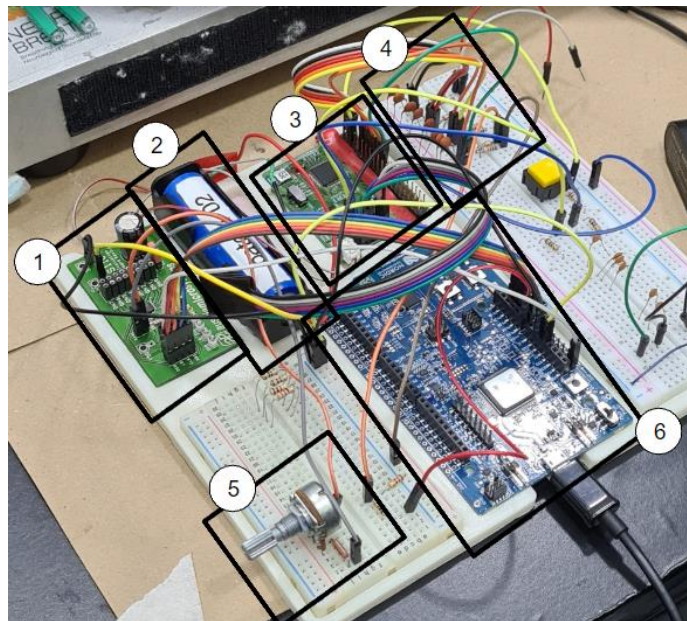


Figura 129 - Setup em protoboard para validação da Optobrain Interface. (1) Placa de Desenvolvimento do AS1109 para ativação do Optrodo; (2) Bateria para alimentar a Interface; (3) Optobrain Interface v1.0.2; (4) *Front-End* Analógico com filtro passa baixa em protoboard; (5) Potenciômetro para ajuste de potência do LED na saída do AS1109; (6) Microcontrolador para envio de comando ao driver AS1109 em paralelo;

A fim de se comparar os resultados caso necessário, as aquisições de Biopotenciais também foram feitas utilizando os equipamentos do laboratório. A Figura 130 mostra o setup que geralmente é utilizado pelo grupo Neurobreath para aplicações em optogenética. À esquerda da figura, se encontram os amplificadores diferenciais modelo 1700 (A-M Systems, USA) (1) e a interface de aquisição de dados modelo 1401 (2) (CED, USA), de 16 bits de resolução, por onde são feitas as coletas dos Biopotenciais com taxa de aquisição configurada em 5000 amostras por segundo. À direita da figura, se encontra o estimulador de onda da Grass Technologies (3) e a fonte de laser de 473 nm (ThorLabs, USA) (4).



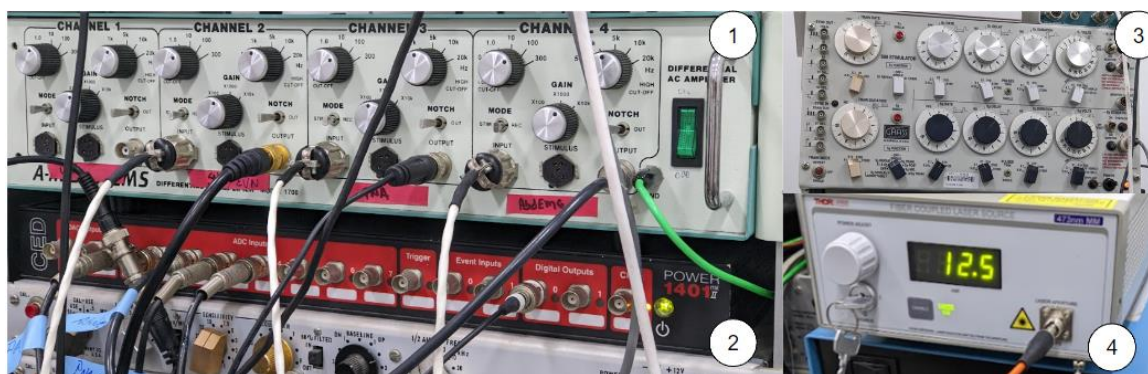


Figura 130 – Equipamentos de aquisição e ativação optogenética. (1) Pré Amplificador Diferencial de Biopotencial A-M Systems modelo 1700; (2) Interface de aquisição de dados CED modelo 1401; (3) Estimulador de onda, modelo S88 da Grass Techonlogies, USA; (4) Fonte de Laser (473 nm) com fibra acoplada da ThorLabs, USA, com potência ajustada em 12.5 mW.

O amplificador (1) é responsável por receber o sinal do par de eletrodos, filtrar e amplificar antes de enviar à interface. Filtros entre 100 Hz e 5 kHz foram e um ganho de 1000 vezes foram aplicados ao sinal de EMG.

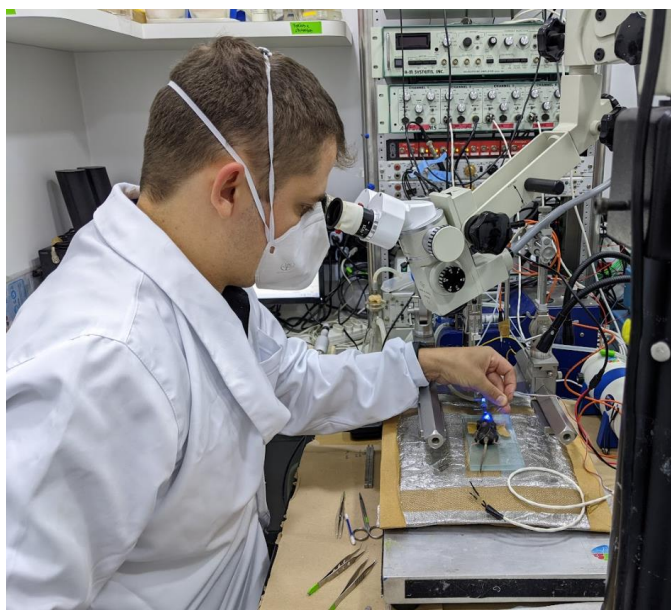


Figura 131 - Aplicação manual do optrodo feito com LEDs sem uso de estereotáxico.

A aplicação de ambas as fontes de luz foi feita de maneira livre por alguns minutos, acompanhando ao mesmo tempo as aquisições de Biopotenciais via software buscando o sucesso na ativação das opsinas. Os dados foram armazenados para análises e estão dispostos ao final do capítulo de resultados.

## 6 Resultados

Este capítulo dispõe dos resultados dos testes em bancada e do piloto feito em animais. Os protocolos dos testes estão dispostos no capítulo anterior.

### 6.1 Resultados dos testes de bancada

Os Resultados dos Testes de Bancada estão divididos entre Análise do gerenciamento de energia, testes de aquisição analógica, testes de transmissão de dados sem fio e testes de aquisição de dados de pressão.

#### 6.1.1 Análise do gerenciamento de energia

A análise do gerenciamento de energia foi dividida entre uma análise de ruído na alimentação e uma análise de perfil de consumo de energia.

##### 6.1.1.1 Análise de ruído na alimentação

Para cada topologia de ligação da fonte de energia na entrada do ADS, gráficos da aquisição pelo tempo e em frequência (FFT) são apresentados a seguir, assim como a tabela com a comparação da amplitude da principal componentes dos ruídos de cada topologia.

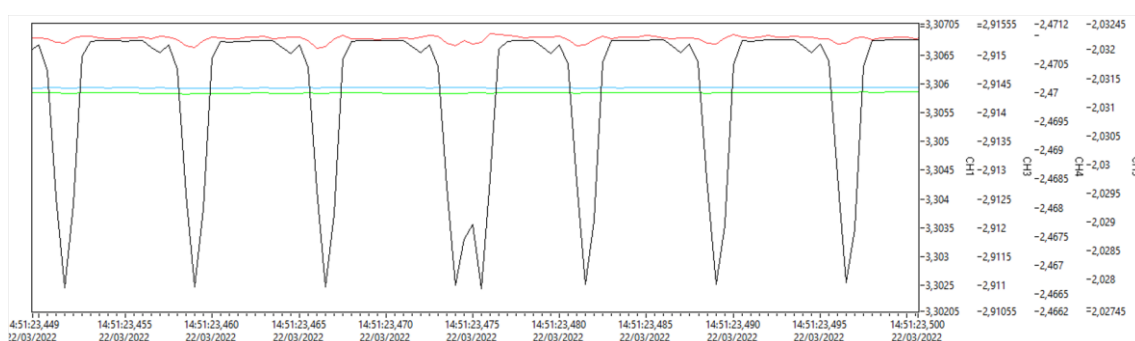


Figura 132 - Série temporal com janela de 50 ms mostrando o nível de interferência da alimentação nas quatro primeiras topologias.

Primeiramente, na Figura 132, é possível comparar relativamente entre as quatro primeiras topologias, o efeito do ruído de cada tipo de alimentação feita quando conectada diretamente nas entradas através de um divisor de tensão.

Contendo aproximadamente 100 pontos, cada canal teve seu eixo y ajustado em nível, mas mantido o mesmo delta de 5 mV para cada um dos canais, para suas intensidades serem comparadas visualmente. O canal 1 em cor preta é referente à topologia 01, o canal 03 em cor vermelha se refere à topologia 02, o canal 4 em cor verde se refere à topologia 03 e o canal 5 se refere à topologia 04.

Com a finalidade de entender visualmente a proporcionalidade da influência do ruído entre as topologias, a Figura 133 traz as topologias 2, 3 e 4, com um intervalo dos eixos fixado em 0.3 mV, sendo este intervalo 16 vezes menor do que o eixo do intervalo pico a pico que contempla a topologia 1.

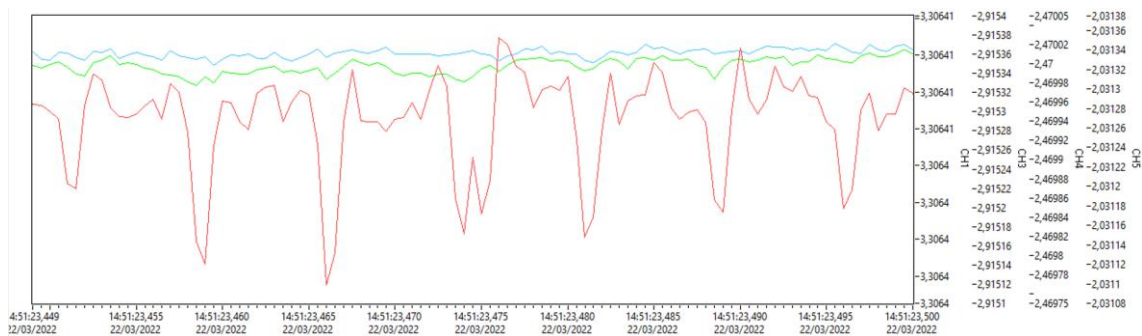


Figura 133 - Comparação entre as topologias 2, 3 e 4.

As topologias 3 e 4 também foram comparadas entre si e a Figura 134 mostra ambos os ruídos presentes na topologia, com intervalo de gráfico em 50  $\mu$ V, cerca de 60 vezes menor que a topologia 2 em valores pico a pico.

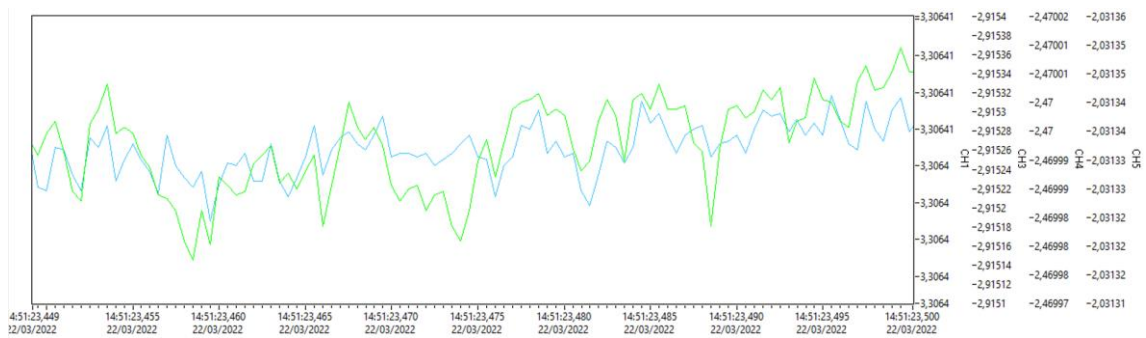


Figura 134 - Comparação do efeito do ruído da alimentação nas topologias 3 e 4.

Por fim, uma coleta extra foi feita para a topologia 5, que também usou o canal 5 da interface Optobrain e a Figura 135 traz a série temporal com janela de 700 ms. A amplitude pico a pico vista no gráfico está aproximadamente com 20  $\mu\text{V}$ , 40% menor quando comparado com a topologia 4 e 250 vezes menor que a topologia 1.

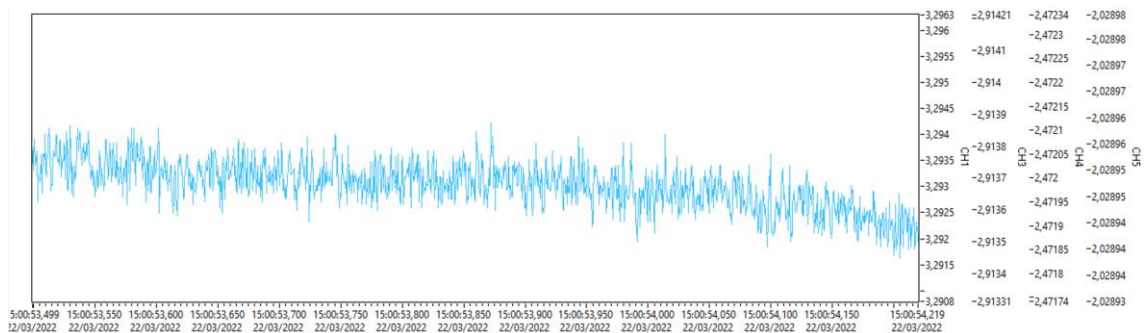


Figura 135 - Ruído da alimentação visto na topologia 5.

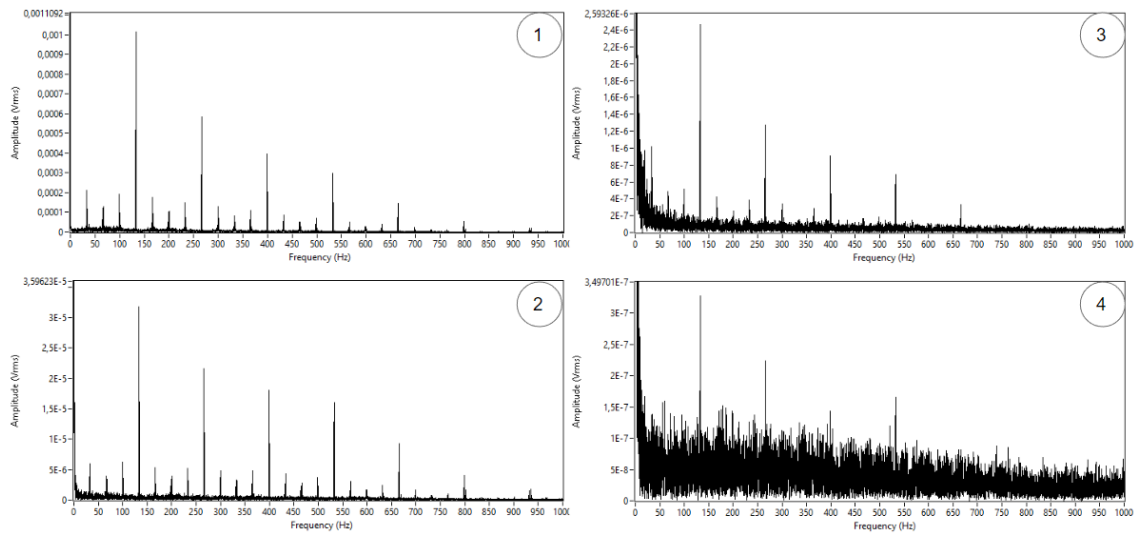


Figura 136 - Gráficos FFT para as topologias 1, 2, 3 e 4.

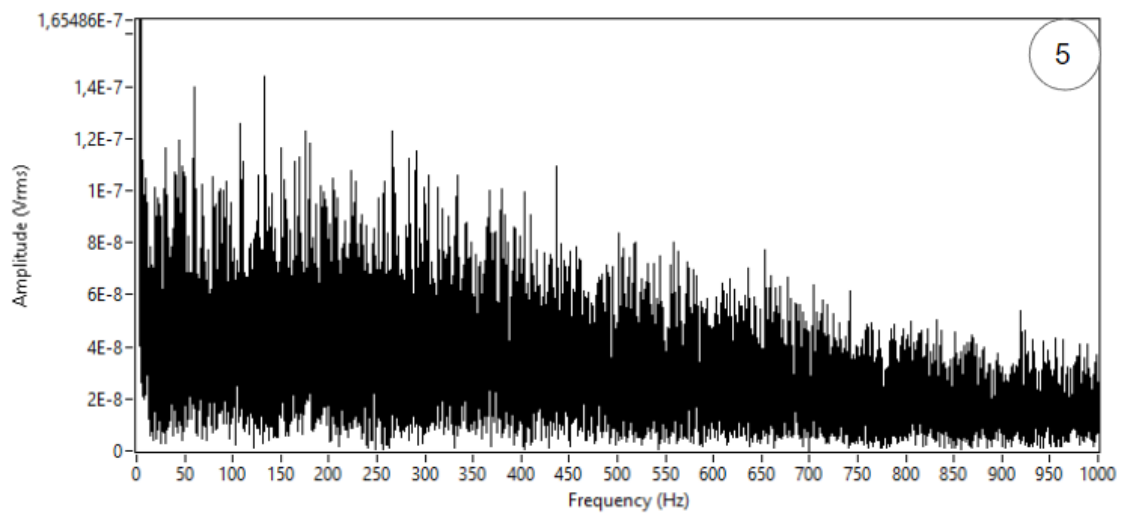


Figura 137 - Gráficos FFT para a topologia 5.

A Tabela 19 mostra a frequência e amplitude das componentes que mais se destacaram para a topologia 1:



Tabela 19 – Frequências, períodos e amplitudes das componentes de maior destaque do ruído da topologia 1.

Frequência (Hz)	Período de tempo (ms)	Amplitude (Vrms)
33.6	29.8	181.5 $\mu$
66.6	15.0	110.8 $\mu$
99.6	10.0	179 $\mu$
<b>133.1</b>	<b>7.5</b>	<b>863<math>\mu</math></b>
166.8	6.0	139 $\mu$
199.6	5.0	98.8 $\mu$
232.8	4.3	139 $\mu$
<b>266.2</b>	<b>3.8</b>	<b>574<math>\mu</math></b>
299.9	3.3	113 $\mu$
332.8	3.0	76.8 $\mu$
365.8	2.7	102 $\mu$
<b>399.3</b>	<b>2.5</b>	<b>377<math>\mu</math></b>

A Tabela 20 traz uma comparação entre as amplitudes da principal componente do ruído percebido de cada topologia.

Tabela 20 - Comparativo entre as amplitudes da principal componente do ruído percebido de cada topologia

Fonte de alimentação da entrada do ADS	Amplitude da principal componente
Bateria da Interface Optobrain (VIN) e GND	1mV RMS
3.3 V e -2.5V	33 $\mu$ V RMS
$\pm$ 2.5 V	2,5 $\mu$ V RMS
Bateria externa com referência em -2.5V	350 nV RMS
Bateria externa com referência em GND	150 nV RMS

Pelos resultados é possível notar que a fonte do ruído é a variação de tensão da bateria que está alimentando a interface Optobrain. Como a frequência fundamental (133 Hz) do ruído coincide com o intervalo de conexão do Bluetooth (7,5 ms), conclui-se que essa variação seja causada pela maior demanda de potência do Bluetooth a cada intervalo de conexão. Nota-se que o regulador de tensão atenua o ruído, mas não o suficiente para não ser percebido pelo ADS1299. No entanto, esse ruído aparece com uma amplitude

inferior ao LSB nos casos em que a alimentação ocorre com uma bateria externa. Portanto, conclui-se que o maior problema é utilizar a alimentação VIN da Interface Optobrain para alimentar outros sensores que sejam dependentes de tensão de excitação, mas é possível usar essa alimentação para a placa Interface sem afetar a leitura dos dados de maneira geral.

### 6.1.1.2 Análise de perfil de consumo de energia

Para a análise dos perfis de consumo de energia, a Tabela 21 traz o resultado da comparação entre os perfis, suas tensões medidas, correntes estimadas/medidas, potência, consumo de energia e autonomia. Para alguns perfis (4 e 5), usou-se de valores estimados, pois não foi possível coletar as informações com precisão no momento dos testes.

Tabela 21 - Perfis de consumo e suas características de energia

#	Perfil	Tensão medida (V)	Corrente estimada (mA)	Corrente medida (mA)	Potência (mW)	Consumo de Energia (mWh)	Autonomia (h)
1	Standby	4.051	12	12	49	177	16.7
2.a	1ch-250sps	4.059	-	14	56	201	14.4
2.b	8ch-250sps	4.050	-	25	100	362	8.1
2.c	1ch-2000sps	4.056	-	14	57	205	14.4
2.d	8ch-2000sps	4.048	-	25	101	361	8
3.a	2.a + tx	4.053	-	14	57	206	14.3
3.b	2.b + tx	4.044	25	25	101	363	8
3.c	2.c + tx	4.052	-	15	60	216	13.5
3.d	2.d + tx	4.044	25	29	117	422	6.9
3.e	1ch-250sps Sensor PIC	3.909	-	16	63	230	12.5
3.f	1ch-250sps Sensor PZT	3.958	-	14	54	193	14.7
4.a	3.a + IMU	-	(14+4.6) 18.6	-	-	-	10.8
4.b	3.d + IMU	-	(29+4.6) 33.6	-	-	-	6
5.a	4.a + 1 LED 100 mA	-	118.6	-	-	-	1.7
5.b	4.b + 1 LED 100 mA	-	133.6	-	-	-	1.5
5.c	4.a + 2 LEDs 100 mA	-	218.6	-	-	-	0.9

Os resultados são bastante úteis, pois mesmo com uma bateria de 200 mAh, obteve-se uma autonomia acima de oito horas para os perfis de leitura mais prováveis e mais de uma hora para o acionamento constante dos LEDs.

Percebeu-se uma diferença considerável no consumo de acordo com o número de canais (De 14 para 29 mA), entretanto o consumo não depende tanto da taxa de amostragem. O Sensor de PIC invasivo possui consumo maior quando comparado do PZT, pelo fato do sensor da PIC necessitar de alimentação de excitação do sensor.

Com relação aos LEDs, espera-se que com o ajuste de potência via controle PWM, a depender da frequência e tempo de ativação da rotina de optogenética, um aumento considerável na autonomia (tempo total) através da queda da corrente média consumida.

### 6.1.2 Resultados dos testes de aquisição analógica

Este capítulo traz os resultados dos testes relacionados à aquisição analógica realizadas fazendo o uso da placa Optobrain Interface versão 1.0.2.

#### 6.1.2.1 Análise de ruído na entrada do ADS

Os testes de ruído executados, tiveram as análises de parâmetros e seus cálculos de forma semelhante ao que foi disponível pelo *datasheet* do ADS1299 (TEXAS INSTRUMENTS, 2017b).

As Tabelas abaixo, são as comparações para cada valor de ganho (1, 2, 4, 8, 12 e 24) onde os valores “x.xx/y.yy” tem “y.yy” como valor que consta no *datasheet* e “x.xx” o valor medido nos testes. Valores em **negrito** são valores

que extrapolaram os valores do *datasheet*. Além disso, para cada valor extrapolado, gráficos do valor pico a pico pelo tempo e outro de distribuição das amplitudes são apresentados para melhor entendimento do comportamento do ruído.

Tabela 22 - Comparação ruídos para ganho 1 (Valor medido / Valor de referência)

Ganho	Taxa de amostragem	$\mu V_{RMS}$	$\mu V_{PP}$	Dynamic range (dB)	Noise-free bits	ENOB
1	250	0.99 / 1.08	6.97 / 7.59	130 / 129.3	20.4 / 20.18	21.6 / 21.48
	500	1.35 / 1.53	9.66 / 10.73	127 / 126.3	19.9 / 19.68	21.2 / 20.99
	1000	1.87 / 2.17	15.02 / 15.17	125 / 123.3	19.5 / 19.18	20.7 / 20.49
	2000	2.63 / 3.06	20.39 / 21.45	122 / 120.3	19 / 18.68	20.2 / 19.99

Tabela 23 - Comparação ruídos para ganho 2 (Valor medido / Valor de referência)

Ganho	Taxa de amostragem	$\mu V_{RMS}$	$\mu V_{PP}$	Dynamic range (dB)	Noise-free bits	ENOB
2	250	0.52 / 0.57	3.49 / 3.99	130 / 128.9	20.3 / 20.1	21.6 / 21.48
	500	0.7 / 0.81	4.83 / 5.65	127 / 125.9	19.9 / 19.6	21.2 / 20.99
	1000	0.98 / 1.14	7.24 / 7.98	124 / 122.9	19.4 / 19.1	20.7 / 20.49
	2000	1.39 / 1.61	<b>11.8</b> / 11.29	121 / 119.9	18.9 / 18.6	20.2 / 19.99

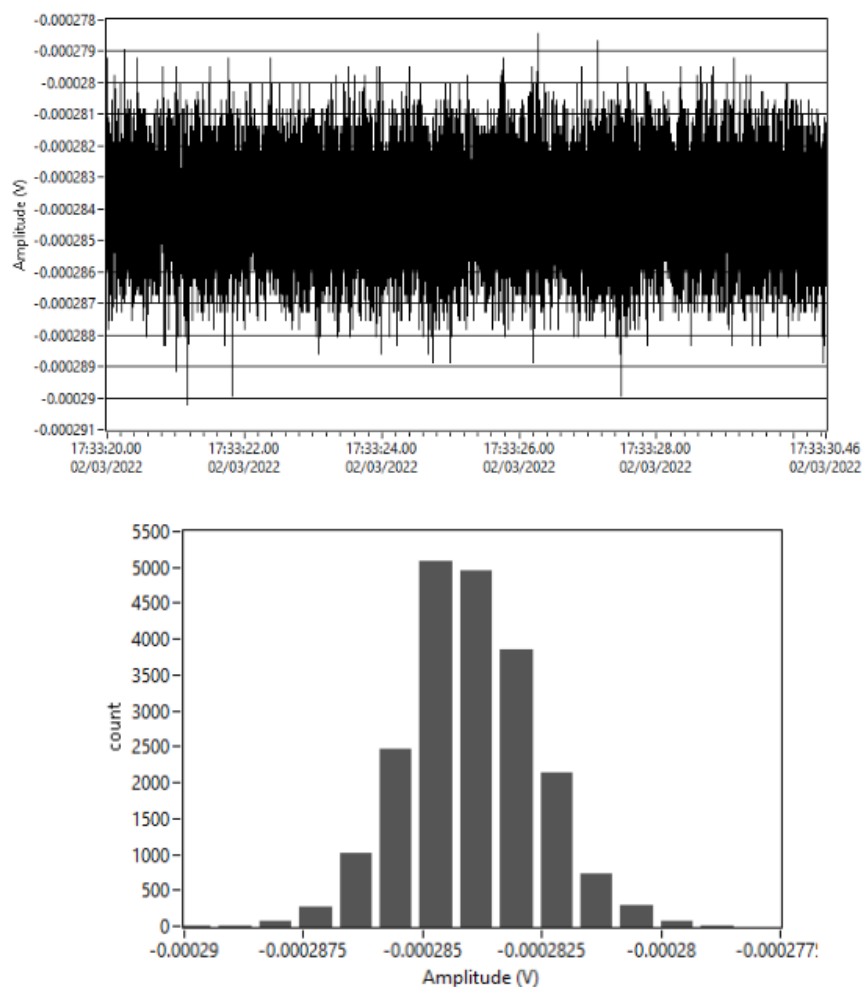


Figura 138 - Ruído na entrada para ganho 2 e taxa de amostragem de 2000 Hz

Tabela 24 - Comparação ruídos para ganho 4 (Valor medido / Valor de referência)

Ganho	Taxa de amostragem	$\mu V_{RMS}$	$\mu V_{PP}$	Dynamic range (dB)	Noise-free bits	ENOB
4	250	0.29 / 0.31	1.88 / 2.16	129 / 128.2	20.2 / 19.99	21.4 / 21.3
	500	0.39 / 0.44	2.68 / 3.07	126 / 125.2	19.7 / 19.49	20.9 / 20.79
	1000	0.56 / 0.62	4.16 / 4.34	123 / 122.2	19.2 / 18.99	20.4 / 20.29
	2000	0.78 / 0.88	<b>6.44 / 6.13</b>	120 / 119.2	18.7 / 18.49	20 / 21.3

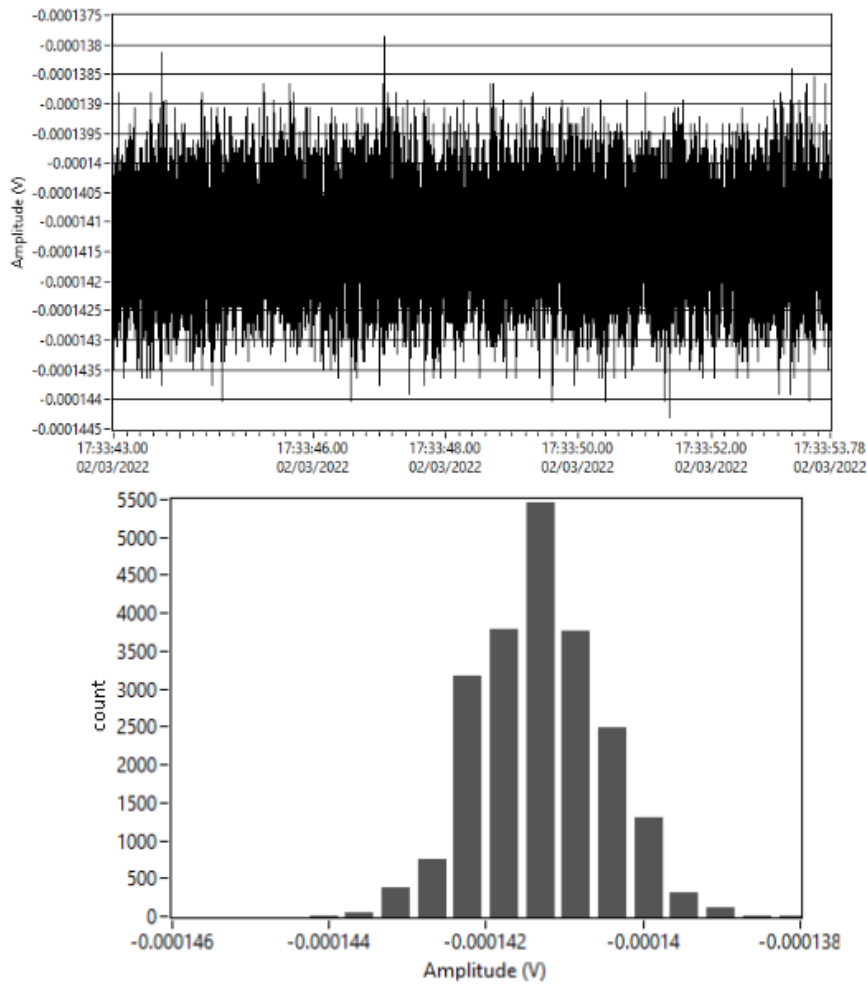


Figura 139 - Ruído na entrada para ganho 4 e taxa de amostragem de 2000 Hz

Tabela 25 - Comparação ruídos para ganho 8 (Valor medido / Valor de referência)

Ganho	Taxa de amostragem	$\mu V_{RMS}$	$\mu V_{PP}$	Dynamic range (dB)	Noise-free bits	ENOB
8	250	0.19 / 0.20	<b>1.48</b> / 1.38	127 / 126.1	19.8 / 19.64	21 / 20.95
	500	0.25 / 0.28	1.81 / 1.95	124 / 123.1	19.4 / 19.14	20.6 / 20.44
	1000	0.36 / 0.39	2.62 / 2.76	121 / 120.1	18.8 / 18.64	20.1 / 19.94

	2000	0.51 / 0.56	<b>3.96</b> / 3.90	118 / 117.1	18.4 / 18.14	19.6 / 19.44
--	------	-------------	--------------------	-------------	--------------	--------------

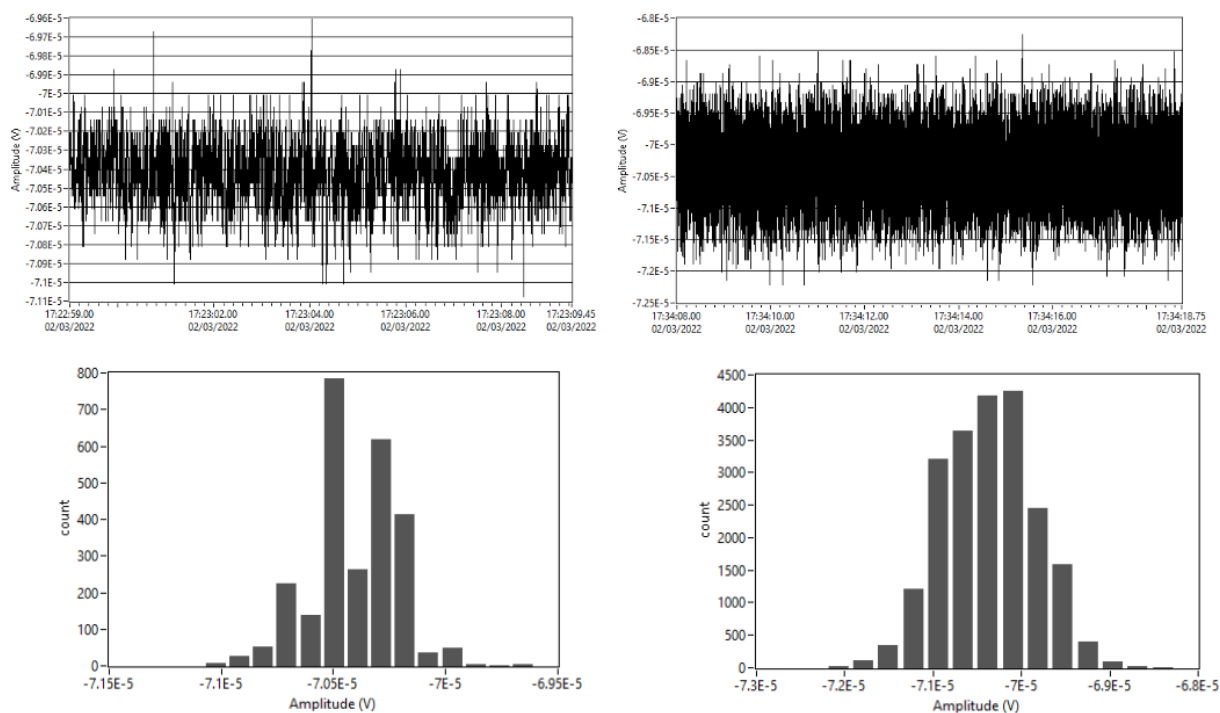


Figura 140 - Ruído na entrada para ganho 8 e taxas de amostragem de 250 e 2000 Hz

Tabela 26 - Comparação ruídos para ganho 12 (Valor medido / Valor de referência)

Ganho	Taxa de amostragem	$\mu V_{RMS}$	$\mu V_{PP}$	Dynamic range (dB)	Noise-free bits	ENOB
12	250	0.16 / 0.16	1.03 / 1.13	125 / 124.3	19.5 / 19.34	20.7 / 20.65
	500	0.22 / 0.23	1.56 / 1.61	122 / 121.2	19 / 18.83	20.2 / 20.14
	1000	0.31 / 0.32	2.10 / 2.26	119 / 118.3	18.5 / 18.34	19.7 / 19.65
	2000	0.44 / 0.46	<b>3.49</b> / 3.20	116 / 115.2	18 / 17.84	19.2 / 19.14

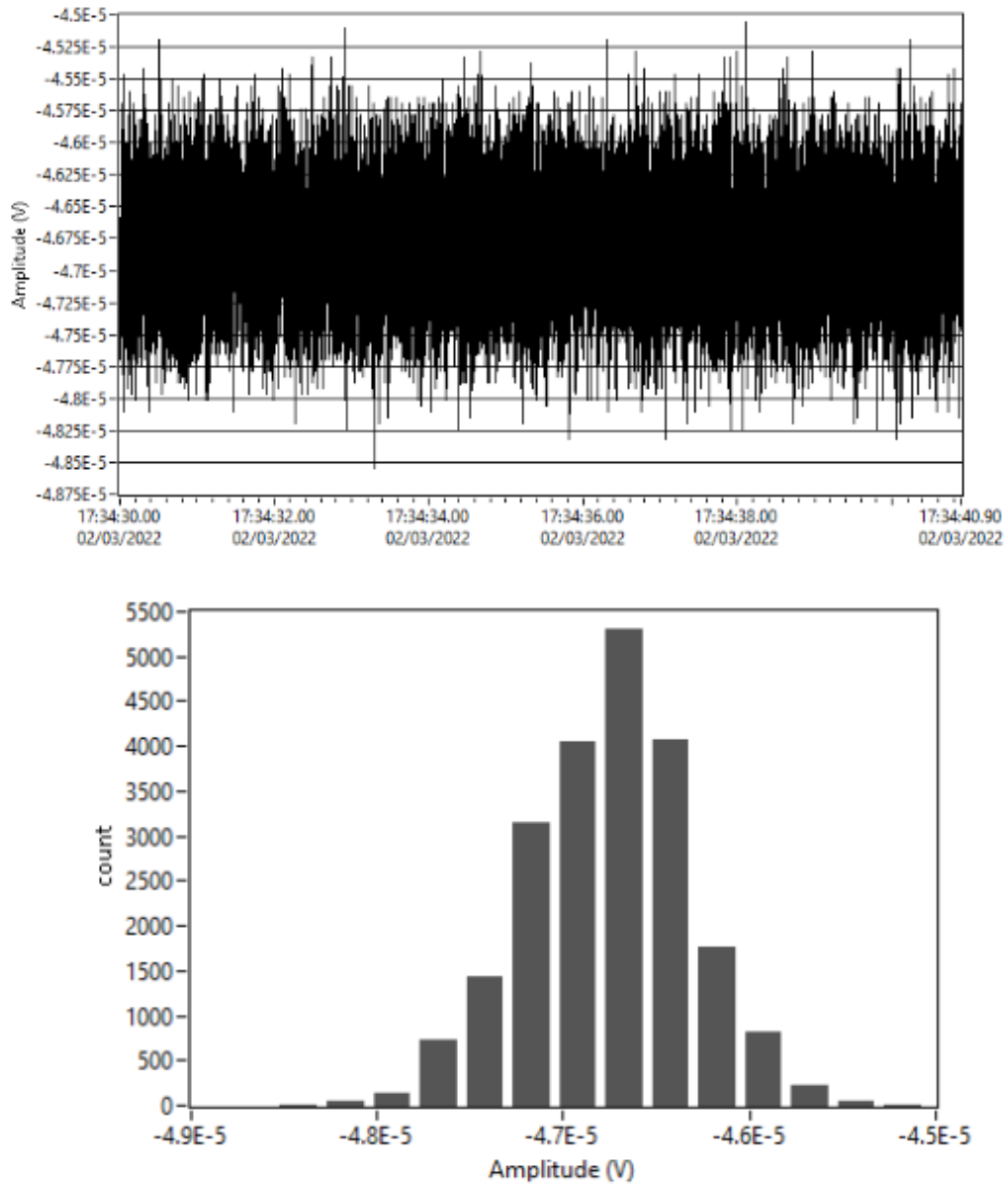


Figura 141 - Ruído na entrada para ganho 12 e taxa de amostragem de 2000 Hz

Tabela 27 - Comparação ruídos para ganho 24 (Valor medido / Valor de referência)

Ganho	Taxa de amostragem	$\mu V_{RMS}$	$\mu V_{PP}$	Dynamic range (dB)	Noise-free bits	ENOB
24	250	0.14 / 0.14	0.96 / 0.98	120 / 119.5	18.7 / 18.54	19.9 / 19.85
	500	0.19 / 0.20	1.30 / 1.39	117 / 116.5	18.2 / 18.04	19.4 / 19.35
	1000	0.27 / 0.28	<b>2.3</b> / 1.97	114 / 113.5	17.7 / 17.54	18.9 / 18.85



	2000	0.38 / 0.40	<b>2.97</b> / 2.79	111 / 110.4	17.2 / 17.04	18.4 / 18.35
--	------	-------------	--------------------	-------------	--------------	--------------

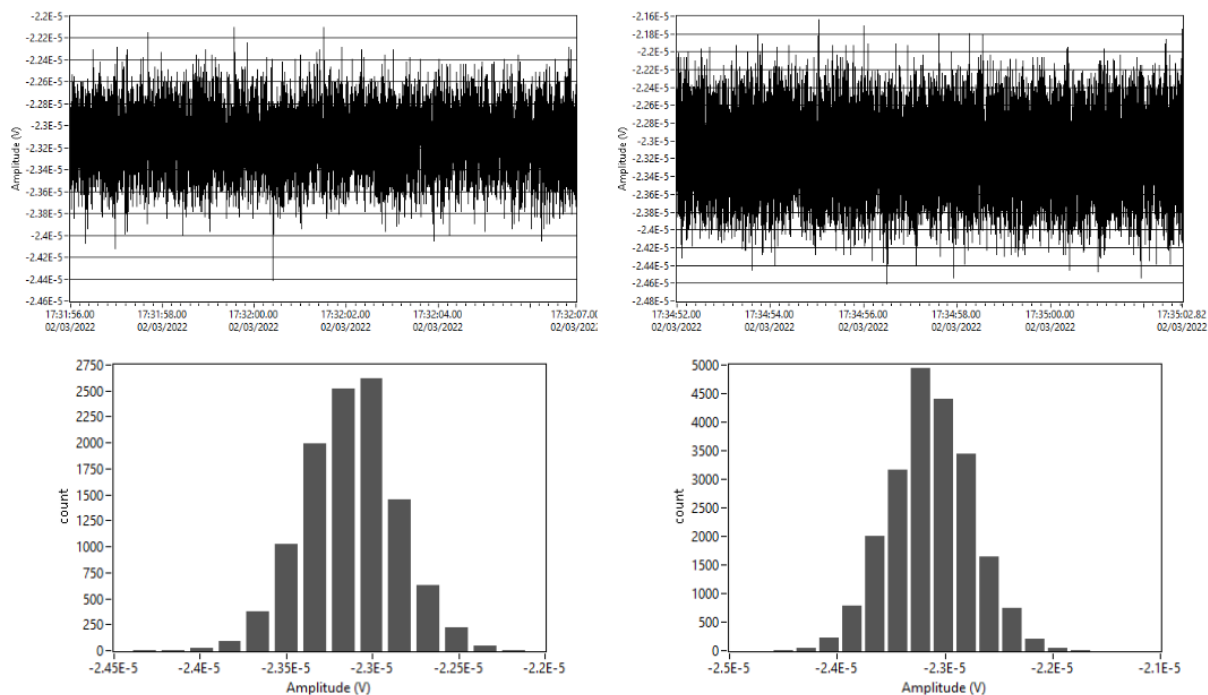


Figura 142 - Ruído na entrada para ganho 24 e taxas de amostragem de 1000 (Esquerda) e 2000 (Direita) Hz

Para quase todas as 120 medições/cálculos das quatro taxas de amostragem dentro dos seis ganhos distintos, o valor medido do ruído e os parâmetros calculados com base nessas medidas foram melhores ou iguais aos fornecidos pelo datasheet do ADS. Apenas **sete** valores específicos de ruído pico a pico foram maiores do que os descritos no datasheet. Isso provavelmente se deve ao fato de que a medição deste ruído foi feita com relação à toda a amostra de 10 segundos de cada coleta, diferente do datasheet que recomenda pegar apenas 1000 amostras, o que aumenta a possibilidade de capturar ruídos menos comuns de maiores amplitudes. As Figuras (entre cada tabela acima) referentes à cada valor excedido (negrito das tabelas), mostram a existência (mesmo que isolados e com poucas contagens) de ruídos com maior amplitude. Entretanto, pela baixíssima ocorrência, pode-se dizer que os resultados são bem satisfatórios e batem com o datasheet do fabricante.

### 6.1.2.2 Precisão da taxa de amostragem do ADS

Duas frequências de aquisição foram testadas, duas vezes para três placas diferentes (OPT001, OPT004 e OPT005). O pino ADS\_DRDY de cada foi monitorado por 5 segundos de aquisição após o sensor ter sido pareado com o receptor. A temperatura da sala no momento dos testes estava em 22°C.

A distância entre 2 zeros consecutivos foi computada, e os valores máximos e mínimos neste intervalo são mostrados na tabela abaixo. Também são mostrados sua frequência equivalente em parênteses e o percentual de desvio em relação à frequência configurada.

Tabela 28 - Análise de precisão da taxa de amostragem para 250 Hz.

Placa	Teste	Valor teórico Intervalo (s) (frequência (Hz))	Valor máximo Intervalo (frequência Hz) Desvio %	Valor Mínimo Intervalo (frequência Hz) Desvio %
OPT001	1	0,004 s (250 Hz)	0,003424 s (292,056075 Hz) 16,8%	0,003423 s (292,141396 Hz) 16,86%
OPT001	2		0,003425 s (292,197080 Hz) 16,9%	0,003423 s (292,141396 Hz) 16,86%
OPT004	1		0,003994 s (250,3755633 Hz) 0,15%	0,003992 s (250,501002 Hz) 0,20%
OPT004	2		0,00399225 s (250,4853153 Hz) 0,15%	0,00399125 s (250,5480739 Hz) 0,20%
OPT005	1		0,004002 s (249,875063 Hz) -0,05%	0,0040000 s (250,000000 Hz) 0%
OPT005	2		0,004002 s (249,875063 Hz) -0,05%	0,0040000 s (250,000000 Hz) 0%

Tabela 29 - Análise de precisão da taxa de amostragem para 500 Hz.

Placa	Teste	Valor teórico Intervalo (s) (frequência (Hz))	Valor máximo Intervalo (frequência Hz) Desvio %	Valor Mínimo Intervalo (frequência Hz) Desvio %
OPT001	1	0,002 s (500 Hz)	0,001713 s (583,771162 Hz) 16,75%	0,001711 s (584,453536 Hz) 16,89%
OPT001	2		0,001713 s (583,771162 Hz) 16,75%	0,001711 s (584,453536 Hz) 16,89%
OPT004	1		0,001997 s (500,7511267 Hz) 0,15%	0,001996 s (501,002004 Hz) 0,20%
OPT004	2		0,00199625 s (500,9392611 Hz) 0,19%	0,0019957 s (501,0773162 Hz) <b>0,22%</b>
OPT005	1		0,0020010 s (499,75012 Hz) -0,05%	0,0020000 s (500,000000 Hz) 0%
OPT005	2		0,0020010 s (499,75012 Hz) -0,05%	0,0020000 s (500,000000 Hz) 0%

O datasheet especifica que para a temperatura de 25°C o erro é de  $\pm 0,5\%$ . Para demais temperaturas entre -40 e +85°C esse erro por subir para +2.5% usando o oscilador interno. Com exceção da placa OPT001, que claramente estava com erros fora dos normais, todas as outras placas tiveram erros abaixo de 0,5%. A Tabela 30 ainda traz análises específicas para a placa OPT004 para frequências de 1000 e 2000 Hz

Tabela 30 - Análise de precisão da Placa OPT004 com taxas de amostragem de 1000 Hz e 2000 Hz.

Placa	Valor teórico	Valor máximo	Valor Mínimo
-------	---------------	--------------	--------------

	Intervalo (s) (frequência (Hz))	Intervalo (frequência Hz) Desvio %	Intervalo (frequência Hz) Desvio %
OPT004	0,001 s (1000 Hz)	0,00099815 s (1001,853429 Hz) 0,19%	0,0009978 s (1002,204851 Hz) <b>0,22%</b>
	0,0005 s (2000 Hz)	0,0004991 s (2003,606492 Hz) 0,18%	0,0004989 s (2004,409701 Hz) <b>0,22%</b>

Com todas essas medidas feitas e desconsiderando os resultados da placa OPT001, o erro máximo encontrado foi de 0,22%. Isso significa que para um tempo de coleta de 30 minutos, o erro máximo esperado de acordo com o datasheet seria de 9 segundos. Mas o valor medido da acurácia nas placas daria um desvio máximo de 3,96 segundos a mais de pontos se os dados fossem reconstruídos utilizando-se o intervalo de tempo teórico entre os pontos.

### 6.1.2.3 Análise de offset e ganho do ADS

O teste foi executado na placa OPT004. A Tabela 31 mostra o resultado da análise de offset.

Tabela 31 - Variação de offset na placa OPT004 variando canal e ganho.

<b>Ganho→ Canal↓</b>	<b>1 V/V</b>	<b>2 V/V</b>	<b>4 V/V</b>	<b>12 V/V</b>	<b>24 V/V</b>
<b>1</b>	-668 $\mu$ V	-658 $\mu$ V	-635 $\mu$ V	-635 $\mu$ V	-566 $\mu$ V
<b>2</b>	-540 $\mu$ V	-543 $\mu$ V	-544 $\mu$ V	-553 $\mu$ V	-563 $\mu$ V
<b>3</b>	-717 $\mu$ V	-700 $\mu$ V	-665 $\mu$ V	-597 $\mu$ V	-518 $\mu$ V
<b>4</b>	-511 $\mu$ V	-508 $\mu$ V	-515 $\mu$ V	-504 $\mu$ V	-476 $\mu$ V
<b>5</b>	-600 $\mu$ V	-595 $\mu$ V	-595 $\mu$ V	-581 $\mu$ V	-554 $\mu$ V
<b>6</b>	-795 $\mu$ V	-780 $\mu$ V	-745 $\mu$ V	-721 $\mu$ V	-720 $\mu$ V
<b>7</b>	-532 $\mu$ V	-536 $\mu$ V	-542 $\mu$ V	-575 $\mu$ V	-624 $\mu$ V
<b>8</b>	-551 $\mu$ V	-547 $\mu$ V	-542 $\mu$ V	-540 $\mu$ V	-543 $\mu$ V

É possível perceber que para alguns canais (1, 3, 4, 5, 6 e 8) o valor de offset aumentada conforme o ganho. Para os canais 2, e 7 é possível perceber uma diminuição no offset. A Figura 143 mostra em gráfico a variação do offset conforme o aumento do ganho.

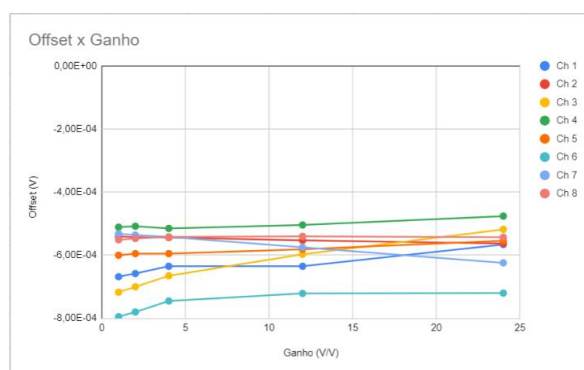


Figura 143 - Variação do offset relativo ao ganho da placa OPT004.

Para a análise referente ao efeito ganho dos canais na tensão de saída, os resultados dos testes de leitura das entradas fixas de 150 mV é mostrada na tabela abaixo:

Tabela 32 - Análise do efeito do ganho na tensão de saída para cada canal.

Canal→ Ganho↓	1	3	4	5	6	7
1 V/V	149,51 mV	149,55 mV	149,57 mV	149,48 mV	149,53 mV	149,64 mV
2 V/V	149,81 mV	149,88 mV	149,91 mV	149,88 mV	149,88 mV	149,97 mV
4 V/V	149,96 mV	150,02 mV	150,06 mV	150,05 mV	150,02 mV	150,10 mV
6 V/V	149,98 mV	150,03 mV	150,08 mV	150,09 mV	150,05 mV	150,11 mV
8 V/V	149,95 mV	150,01 mV	150,06 mV	150,07 mV	150,04 mV	150,09 mV
12 V/V	149,97 mV	149,99 mV	150,03 mV	150,09 mV	150,05 mV	150,06 mV
24 V/V	149,97 mV	149,99 mV	150,03 mV	150,12 mV	150,04 mV	150,07 mV

A Figura 144 ilustra o efeito do ganho na tensão de saída. Nota-se que as tensões tendem a se estabilizar conforme o ganho aumenta, variando consideravelmente entre os ganhos 1 e 2 com relação aos demais.

O ADS1299 apresentou valores de offset distintos para cada canal. Essa variação é pequena e pode ser corrigida através de calibração por *software*. Com relação ao ganho, o desvio máximo entre os canais máximo foi de 0,1% (visto entre o canal 1 e 5). Esse desvio é menor do que o especificado pelo *datasheet* de 0,2% do fundo de escala.

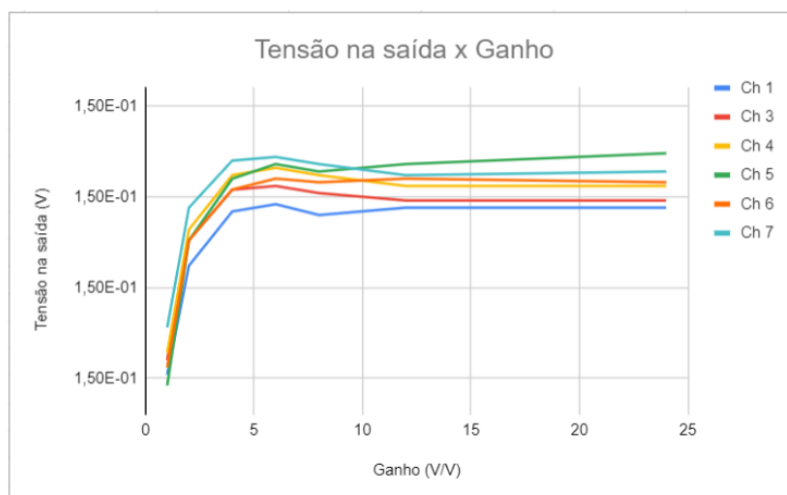


Figura 144 - Gráfico da relação da tensão de saída pelo ganho para seis canais.

#### 6.1.2.4 Análise da taxa de rejeição em modo comum - CMRR

Para as entradas DC, a Tabela 33 mostra os resultados das medidas e cálculos da CMRR considerando os três níveis de tensão aplicados, sendo  $V_1 = 0,2 \text{ V}$ ,  $V_2 = 2 \text{ V}$  e  $V_3 = 3,8 \text{ V}$ .

Tabela 33 - CMRR para entrada DC considerando os 3 níveis de tensão aplicados. ( $V_1 = 0,2 \text{ V}$ ,  $V_2 = 2 \text{ V}$  e  $V_3 = 3,8 \text{ V}$ )

Ganho (V/V)	CMRR considerando $V_1$ e $V_2$ (dB)	CMRR considerando $V_2$ e $V_3$ (dB)
1	-124,36	-116,23
2	-129,99	-117,99
4	-132,23	-120,92
12	-127,49	-119,58
24	-139,08	-122,83

Percebeu-se um pequeno aumento do valor absoluto da CMRR com o ganho. Esse aumento foi de 11,84% considerando V1 e V2 e de 5,68% considerando V2 e V3.

Para as entradas AC, a Tabela 34 mostra os resultados para frequências de entrada entre 1 e 100 Hz, com variação da taxa de amostragem entre 250 a 2000 amostras por segundo;

Tabela 34 - CMRR para entrada AC para frequências de entrada de 1 e 100 Hz, com variação da taxa de amostragem de 250 a 2000 sps.

<b>Frequência de entrada (Hz)</b>	<b>Taxa de amostragem (sps)</b>	<b>CMRR (dB)</b>
1	250	-143,11
	500	-141,22
	1000	-140,47
	2000	-143,30
100	250	-143,04
	500	-142,29
	1000	-143,34
	2000	-139,91

Com relação à variação da CMRR em relação à taxa de amostragem, não houve variação significativa (menos de 2,5%).

Em todos os casos a CMRR ficou acima de -116 dB. De acordo com o *datasheet* do ADS 1299, a CMRR varia entre -110 e -120 dB, portanto os resultados estão dentro do esperado.



### 6.1.2.5 Análise da interferência entre os canais

- Frequência de 1 Hz com ganho de 1V/V

Para alguns casos do teste de 1 Hz não houve picos representando as componentes no espectro de frequência. Nesse caso, foi considerado o nível do ruído como amplitude, fazendo com que o valor final na interferência aumentasse. A Tabela 35 mostra o resultado da interferência entre os canais para quando o sinal de entrada foi de 1 Hz com ganho de 1 V/V.

Tabela 35 – Crosstalk entre os canais com frequência de 1 Hz e ganho de 1 V/V

Canal de entrada\saída	Canal 1	Canal 3	Canal 4	Canal 5	Canal 6	Canal 7
<b>Canal 1</b>	-	-102,9 dB	-102,9 dB	-102,9 dB	-102,9 dB	-102,9 dB
<b>Canal 3</b>	-102,3 dB	-	-102,0 dB	-102,0 dB	-102,0 dB	-102,0 dB
<b>Canal 4</b>	-106,2 dB	<b>-101,2 dB</b>	-	-106,0 dB	-106,0 dB	-106,0 dB
<b>Canal 5</b>	-107,3 dB	-107,3 dB	-107,2 dB	-	-100,5 dB	-107,4 dB
<b>Canal 6</b>	-105,0 dB	-103,7 dB	-103,5 dB	-105,6 dB	-	-103,8 dB
<b>Canal 7</b>	-105,7 dB	-105,7 dB	-105,7 dB	-105,7 dB	-105,7 dB	-

- Frequência de 2 Hz com ganho de 1V/V

Para a frequência de 2 Hz de interferência e ganho 1 V/V, as componentes de FFT ficaram acima do ruído, principalmente a segunda harmônica (4 Hz).

Tabela 36 – Crosstalk entre os canais com frequência de 2 Hz e ganho de 1 V/V

Canal de entrada\saída	Canal 1	Canal 3	Canal 4	Canal 5	Canal 6	Canal 7
<b>Canal 1</b>	-	-117,6 dB	-118,6 dB	-113,3 dB	-112,9 dB	-117,1 dB
<b>Canal 3</b>	-117,2 dB	-	<b>-97,1 dB</b>	-118,1 dB	-116,6 dB	-114,1 dB
<b>Canal 4</b>	-119,6 dB	<b>-98,0 dB</b>	-	-120,5 dB	-119,5 dB	-116,5 dB
<b>Canal 5</b>	-114,4 dB	-121,4 dB	-122,5 dB	-	<b>-98,3 dB</b>	-121,4 dB
<b>Canal 6</b>	-111,7 dB	-116,6 dB	-117,8 dB	<b>-97,5 dB</b>	-	-116,5 dB
<b>Canal 7</b>	-118,5 dB	-115,9 dB	-117,0 dB	-119,6 dB	-118,2 dB	-

Nota-se uma variabilidade entre os canais. Alguns chegaram a atingir uma interferência maior (-97 dB) para os canais adjacentes ao canal de entrada, mas com exceção desses casos, todos os outros canais apresentar interferência menor que -110 dB, que é o especificado pelo datasheet.

- Frequência de 10 Hz com ganho de 1V/V

Tabela 37 – Crosstalk entre os canais com frequência de 10 Hz e ganho de 1 V/V

Canal de entrada\saída	Canal 1	Canal 3	Canal 4	Canal 5	Canal 6	Canal 7
<b>Canal 1</b>	-	-118,2 dB	-119,2 dB	-113,1 dB	-112,7 dB	-117,7 dB
<b>Canal 3</b>	-115,8 dB	-	<b>-96,1 dB</b>	-116,3 dB	-115,3 dB	-112,9 dB
<b>Canal 4</b>	-116,5 dB	<b>-95,8 dB</b>	-	-117,1 dB	-116,3 dB	-113,4 dB
<b>Canal 5</b>	-112,7 dB	-118,1 dB	-119,3 dB	-	<b>-97,5 dB</b>	-117,7 dB
<b>Canal 6</b>	-114,2 dB	-119,6 dB	-121,2 dB	<b>-99,5 dB</b>	-	
<b>Canal 7</b>	-117,7 dB	-115,0 dB	-116,2 dB	-118,3 dB	-117,2 dB	-

- Frequência de 10 Hz com ganho de 2V/V

Para o teste com alteração do ganho de 2 V/V, uma amplitude menor (1.2V) foi ajustada no gerador de funções para que se alcance uma amplitude alta sem saturar o amplificador.

Tabela 38 – Crosstalk entre os canais com frequência de 10 Hz e ganho de 2 V/V

Canal de entrada\saída	Canal 1	Canal 3	Canal 4	Canal 5	Canal 6	Canal 7
<b>Canal 1</b>	-	-114,2 dB	-114,9 dB	-108,5 dB	-107,8 dB	-112,8 dB
<b>Canal 3</b>	-114,3 dB	-	<b>-92,7 dB</b>	-115,5 dB	-114,2 dB	-110,6 dB
<b>Canal 4</b>	-113,2 dB	<b>-91,2 dB</b>	-	-113,8 dB	-112,7 dB	-109,8 dB
<b>Canal 5</b>	-108,3 dB	-114 dB	-115,7 dB	-	<b>-92,6 dB</b>	-114,1 dB
<b>Canal 6</b>	-109,2 dB	-114,7 dB	-117,0 dB	<b>-94,0 dB</b>	-	-114,8 dB
<b>Canal 7</b>	-113,2 dB	-110,1 dB	-111,9 dB	-114,1 dB	-113,0 dB	-

O datasheet do ADS fornece como valor de *crosstalk* -110 dB. A maioria das medidas extrapolou esse valor, excluindo os resultados de 1 Hz e 1 V/V, pois na maioria dos casos foi difícil encontrar a interferência naquela frequência.

Entretanto nota-se que há uma maior interferência entre os canais 3 e 4 e entre os canais 5 e 6. Isso poderia ser causado por diversos fatores, como uma maior proximidade entre os fios que estavam conectados nesses canais, mas essa hipótese foi descartada ao repetir os testes com a disposição dos fios de forma a separar ao máximo. O projeto da PCB também foi revisado buscando sem sucesso entender se o roteamento das trilhas pudesse ter causado esse crosstalk. Por esses motivos, entende-se que provavelmente existe internamente ao ADS1299 uma maior interferência entre estes canais. Um ticket de suporte será enviado ao fabricante para entender a causa dessa interferência.

De qualquer forma, uma rejeição de 100 dB no crosstalk representa uma atenuação de 100.000 vezes no sinal de interferência, já uma rejeição de 91 dB representa 35.000 vezes. Portanto, não é recomendado aplicar sinais AC com essa ordem de magnitude de diferença na amplitude simultaneamente nesses canais.

#### 6.1.2.6 Análise da resposta em frequência

O gráfico da figura a seguir mostra a curva do ganho em dB no domínio da frequência para a entrada do ADS1299:

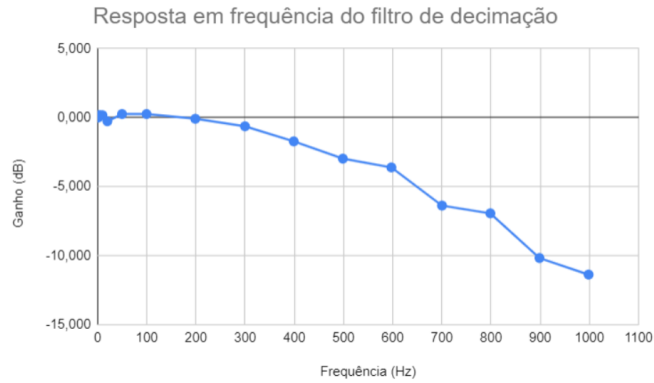


Figura 145 - Gráfico da resposta em frequência do filtro de decimação.

Normalizando a frequência de entrada pela frequência de aquisição (2000 Hz), obtém-se o gráfico abaixo:

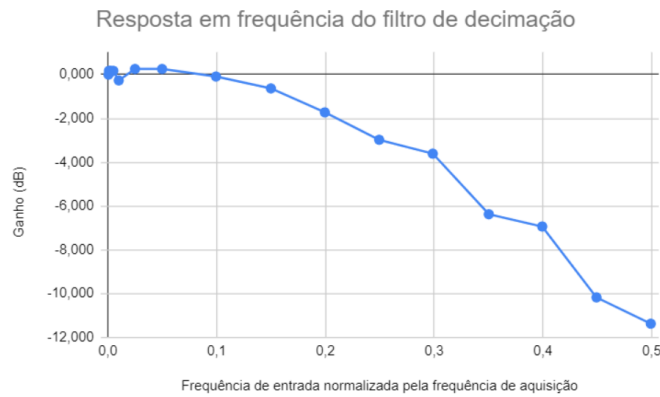


Figura 146 - Gráfico da resposta em frequência do filtro de decimação normalizado.

O datasheet fornece esse comportamento de filtro para o ADS1299, os quais são mostradas na Figura 147.

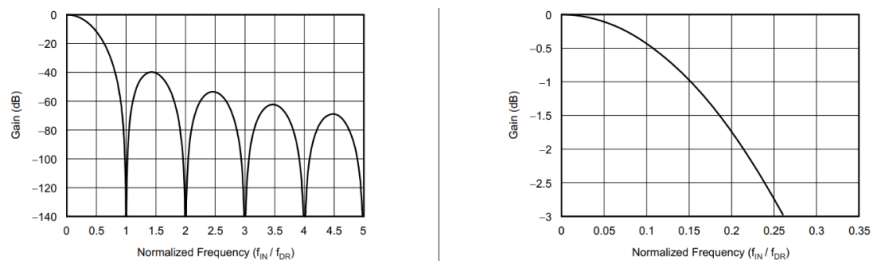


Figura 147 - Resposta em frequência informada pelo datasheet do ADS1299.

Comparando ambos os gráficos, percebe-se que o filtro de decimação caracterizado pelo teste é semelhante ao informado pelo fabricante. Próximo

de 25% da frequência de aquisição o ganho é de -3 dB e para 50% da frequência de aquisição, o ganho é de aproximadamente -11dB.

Com isso, os testes confirmaram o comportamento do filtro *sinc*, responsável por atenuar frequências que se aproximam da frequência de aquisição. A curva de resposta traz uma informação muito importante de que não basta realizar a aquisição de um sinal com uma frequência logo acima da frequência máxima desse sinal, mas é necessário levar em conta a atenuação existente, que começa a ser significativa (maior que 3 dB) a partir de 0,25 vezes a frequência de amostragem. Portanto, um cenário mais favorável seria **amostrar um determinado sinal com pelo menos 4 vezes a frequência máxima**.

#### 6.1.2.7 Análise de Linearidade

A Tabela 39 mostra os valores medidos para cada entrada e para a saída nas condições com e sem filtro RC.

Tabela 39 - Tabela do teste de linearidade.

<b>Entrada (V)</b>	<b>Saída sem filtro RC (V)</b>	<b>Saída com filtro RC (V)</b>
0,00	0,00	-
0,25	0,25	0,25
0,50	0,50	0,50
0,75	0,75	0,75
1,00	1,00	1,00
1,25	1,25	1,25
1,50	1,50	1,50
1,75	1,75	1,75
2,00	2,00	2,00
2,25	2,24	2,24
2,50	2,49	2,49
2,75	2,74	2,74
3,00	2,99	2,99
3,25	3,24	3,24
3,50	3,49	3,49
3,75	3,74	3,74
4,00	3,99	3,99
4,25	4,24	4,24
4,50	4,49	4,49

Os gráficos contidos na Figura 148 mostram o comportamento linear sem o uso e com o uso de filtro RC, com as funções de transferências praticamente iguais, obtendo uma diferença de  $-3\text{ mV}$ , diferença essa que pode ou não ter o multímetro como maior fonte de variabilidade.

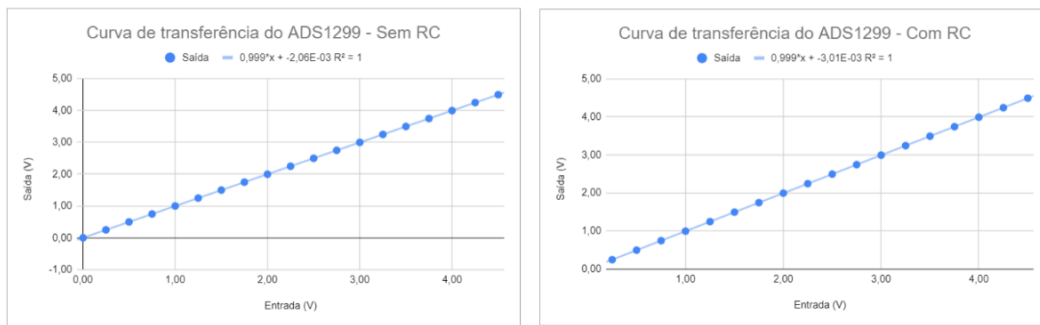


Figura 148 -Curvas de linearidade sem e com o uso de filtros RC.

A Figura 149 mostra o erro entre a leitura e o valor real para cada entrada e para o valor lido sem o filtro RC. Percebe-se que o erro aumenta em função do aumento da tensão de entrada. O maior erro ocorrido foi de  $-8.5\text{ mV}$ , o que equivale a  $0.2\%$  do fundo de escala. O datasheet do ADS especifica o erro máximo de  $0.5\%$ . Portanto, o erro obtido no teste está dentro da especificação fornecida pelo fabricante.

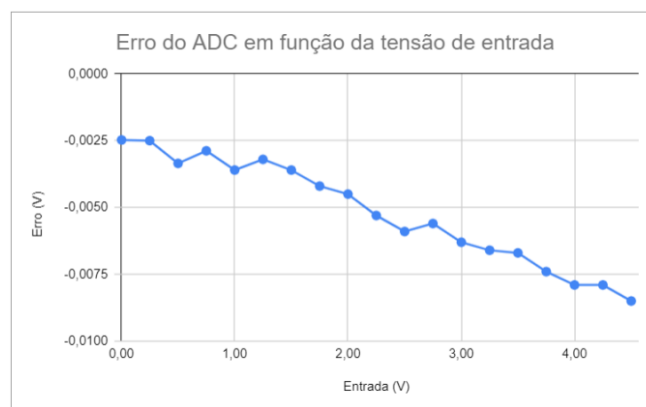


Figura 149 - Erro do ADC em função da tensão de entrada.

### 6.1.2.8 Análise de impedância de entrada

A análise das impedâncias de entrada dos canais disponíveis é mostrada na Tabela 40. Mais uma vez os canais 2 e 8 não foram incluídos por não estarem disponíveis.

Tabela 40 - Impedâncias de entrada dos canais sem filtro.

<b>Canal</b>	<b>Impedância de entrada medida (GΩ)</b>
1	1,393
3	1,400
4	1,401
5	1,462
6	1,462
7	1,465

Todos os canais medidos possuem impedância maior do que o mínimo especificado pelo fabricante. Entretanto é importante citar que efeitos de carga podem ainda ser aplicáveis caso as impedâncias do sistema a ser medido serem muito altas. Análises mais complexas podem ser feitas utilizando analisadores de impedância para respostas em frequências mais altas.

### 6.1.3 Resultados dos testes de transmissão de dados sem fio

Ao todo vinte e seis tipos de configurações de testes relacionados à taxa de transmissão de dados foram executados. A Tabela 41 traz a tabela com essas configurações e seus resultados dos testes contínuos e finitos.

Tabela 41 - Setups e resultados da taxa de transmissão

Setups									Resultados					
PHY (Mbps)	Data length (bytes)	CI (ms)	Event length (units)	Event length (ms)	Distance	Obstacles	TX power (dBm)	#	Throughput teórico (Kbps)	Throughput contínuo (Kbps)	Throughput finito (Kbps) Medida 1	Throughput finito (Kbps) Medida 2	Throughput finito (Kbps) Medida 3	Throughput finito (Kbps) Média
1	20	7.5	400	500	~1 cm	No obstacles	4	1	208.33	180	187	187	187	187.0
2	20	7.5	400	500	~1 cm	No obstacles	4	2	291.67	260	270	268	268	268.7
2	20	100	400	500	~1 cm	No obstacles	4	3	314.06	300	307	296	299	300.7
2	20	400	400	500	~1 cm	No obstacles	4	4	314.45	305	302	314	314	310.0
2	244	7.5	400	500	~1 cm	No obstacles	4	6	1016.67	945	1016	1015	1016	1015.7
2	244	50	400	500	~1 cm	No obstacles	4	7	1334.38	1215	1288	1289	1293	1290.0
2	244	100	400	500	~1 cm	No obstacles	4	8	1353.44	1240	1261	1334	1334	1309.7
2	244	200	400	500	~1 cm	No obstacles	4	9	1362.97	1260	1319	1321	1349	1329.7
2	244	400	400	500	~1 cm	No obstacles	4	10	1362.97	1280	1245	1362	1363	1323.3
2	244	100	50	62.5	~1 cm	No obstacles	4	11	-	1040	803	823	816	814.0
2	244	100	70	87.5	~1 cm	No obstacles	4	12	-	1160	1164	1164	1164	1164.0
2	244	100	80	100	~1 cm	No obstacles	4	13	-	1235	1334	1334	1334	1334.0
2	244	100	100	125	~1 cm	No obstacles	4	14	-	1240	1334	1334	1334	1334.0
2	244	100	400	500	~1 cm	No obstacles	4	15	-	1240	1321	1333	1333	1329.0
2	244	100	400	500	~30 cm	No obstacles	4	16	-	1000	822	705	807	778.0
2	244	100	400	500	~1 m	No obstacles	4	17	-	940	704	593	679	658.7
1	244	100	400	500	~30 cm	No obstacles	4	18	-	560	377	474	442	431.0
1	244	100	400	500	~1 m	No obstacles	4	19	-	520	401	386	360	382.3
2	244	100	400	500	~30 cm	No obstacles	4	20	-	1160	742	982	895	873.0
2	244	100	400	500	~30 cm	Obstacles	4	21	-	1050	682	620	542	614.7
2	244	100	400	500	~30 cm	No obstacles	-40	22	-	-	-	-	-	-
2	244	100	400	500	~30 cm	No obstacles	-20	23	-	160	411	325	334	356.7
2	244	100	400	500	~30 cm	No obstacles	-8	24	-	1020	664	637	628	643.0
2	244	100	400	500	~30 cm	No obstacles	0	25	-	1060	784	737	787	769.3
2	244	100	400	500	~30 cm	No obstacles	4	26	-	1060	814	779	806	799.7

A Figura 150 traz o gráfico que mostra que a taxa de transferência pelo intervalo de conexão. O gráfico mostra que para intervalos acima de 100 ms, não houve aumento significativo da taxa. O que é um ponto interessante, pois intervalos maiores, causam maiores latências e consequentemente maior perda de tempo caso haja falhas na transmissão, visto que a retransmissão ocorrerá apenas no próximo intervalo.



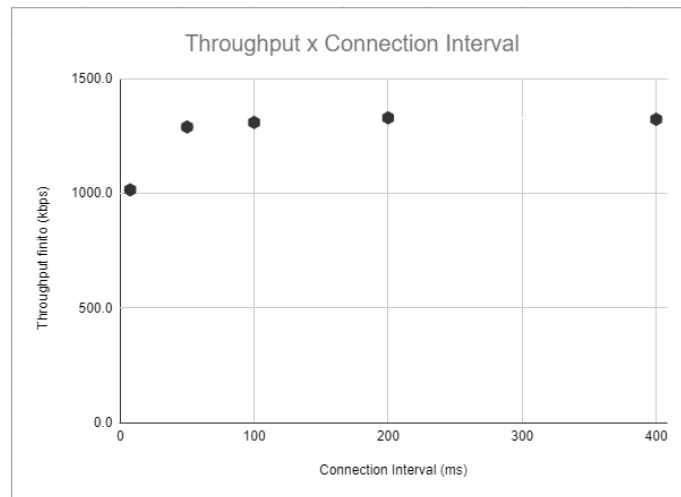


Figura 150 - Gráfico da taxa de transmissão pelo intervalo de conexão

A Figura 151 mostra o gráfico da comparação da taxa para diferentes potências de transmissão *bluetooth*. Quanto maior a potência, maior o gasto de energia terá a placa. Percebe-se pelo gráfico que a diferença entre 0 e 4 dBm não é significativa, o que permite manter a potência mais baixa a fim de obter uma maior economia de energia sem trazer grandes prejuízos para o *throughput*.

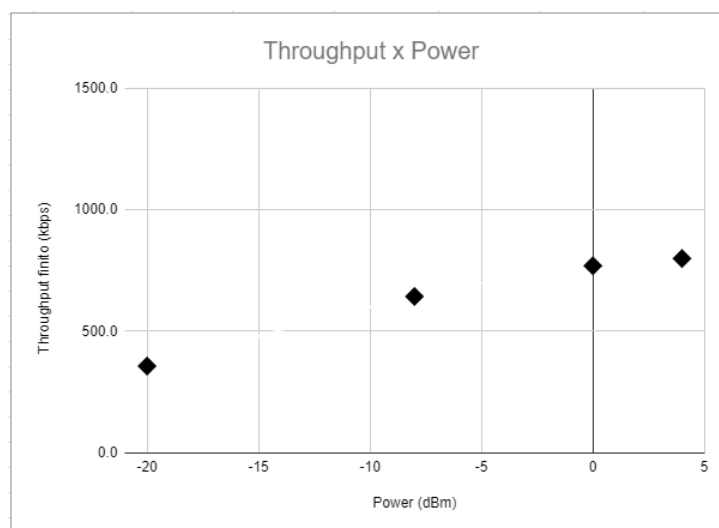


Figura 151 - Gráfico da taxa de transmissão pela potência de saída do módulo

A Figura 152 mostra o gráfico da taxa de transmissão relativa à duração do evento de conexão. Essa duração representa o tempo em que o módulo *bluetooth* dedica à transmissão e recepção de dados via *bluetooth*. Durante

este período, o SoC dedica menos processamento às demais atividades. Para um intervalo de conexão fixo em 100 ms, a duração do evento de conexão foi variada para entender o comportamento da taxa de transmissão. Como se pode perceber, as maiores taxas ocorreram quando a duração do evento de conexão foi igual ou superior ao intervalo de conexão.

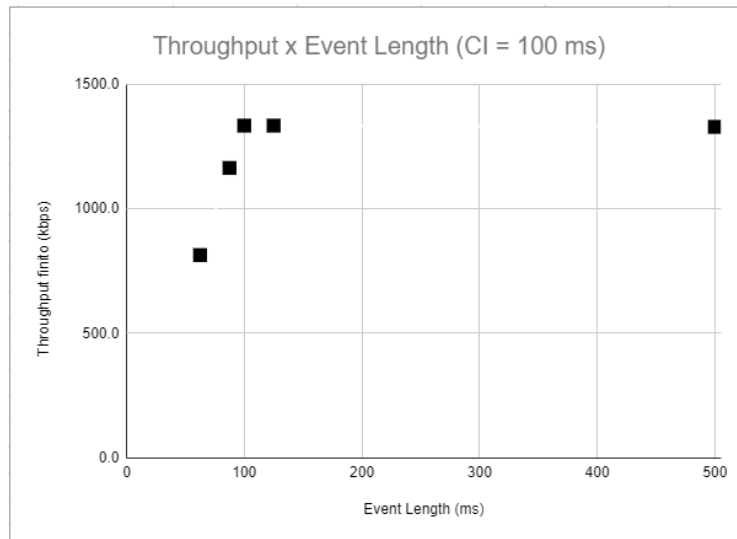


Figura 152 - Gráfico da taxa de transmissão pela duração do evento de conexão

De acordo com o cálculo teórico máximo, a taxa de transferência poderia chegar até o valor de 1362.97 kbps. Para os testes contínuos, o melhor resultado foi de **1280 kbps**. Para os testes com transmissões finitas, a taxa máxima de transferência foi de **1334 kbps**.

Os parâmetros do bluetooth que geraram maior taxa de transferência foram:

- Considerando a transmissão contínua:
  - **PHY:** 2Mbps;
  - **Tamanho dos pacotes:** 244 bytes;
  - **Intervalo de conexão:** 400 ms;
  - **Duração do evento de conexão:** 500 ms;
  - **Potência de transmissão:** 4 dBm;

- Considerando a transmissão finita:
  - **PHY:** 2M;
  - **Tamanho dos pacotes:** 244 bytes;
  - **Intervalo de conexão:** 100 ms;
  - **Duração do evento de conexão:** 100 ms;
  - **Potência de transmissão:** 4 dBm;

Obviamente as melhores configurações físicas para esses resultados foram com a distância aproximada de 1 cm e sem obstáculos. Entretanto, foi graças a este teste que se percebeu-se uma queda muito grande da taxa de transferência relacionado à distância entre os módulos. A partir daqui foi possível perceber a limitação da antena de transmissão da versão 1.0.2 da placa, por conta da ausência de terra ao redor do módulo bluetooth como abordado no capítulo de desenvolvimento da versão 2.0 da Optobrain Interface.

#### 6.1.4 Resultados dos testes de aquisição de dados de pressão

Os resultados dos testes de aquisição dos sensores de pressão invasiva e não invasiva são mostrados abaixo. O resultado gráfico do teste 1 é apresentado na Figura 153.

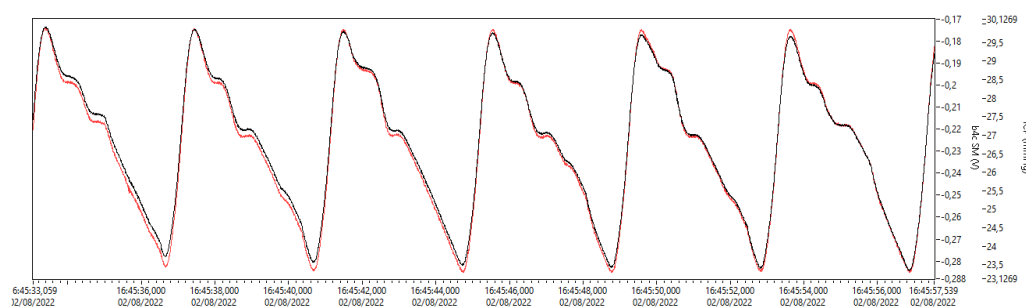


Figura 153 - Série temporal do teste 1 com a aquisição dos dois tipos de sensores de pressão.

A série temporal do teste 1 mostra ambas as curvas bem próximas à morfologia original configurada no software do SIMP. É possível ver claramente

como as curvas preta (brain4care) e vermelha (Codman) se confundem, tamanha similaridade após as escalas serem alinhadas manualmente.

Para o teste 2, a Figura 154 traz a série temporal contendo cinco pulsos. Apesar da curva escolhida ser de  $P2=P1$ , claramente se percebe que apesar do sistema ter executado a atuação da pressão conforme a receita, o efeito na garrafa trouxe o segundo pico levemente maior que o primeiro. O interessante é que ambos os sensores capturaram esse comportamento de forma idêntica.

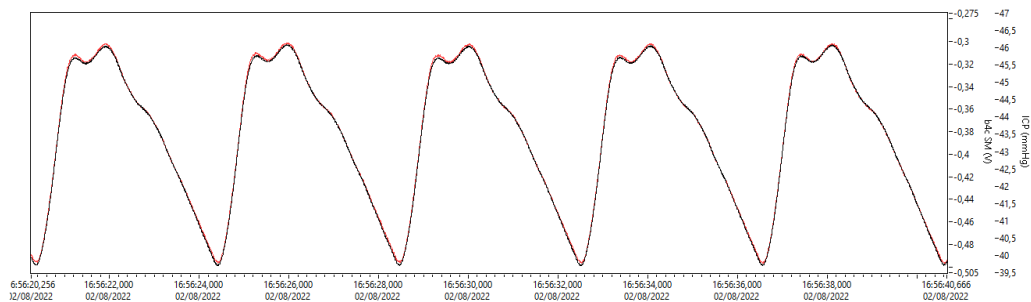


Figura 154 - Série temporal do teste 2 com a aquisição dos dois tipos de sensores de pressão.

No teste 3, uma morfologia com  $P2 > P1$  foi vista, conforme o configurado no software e mais uma vez as curvas estão bem semelhantes.

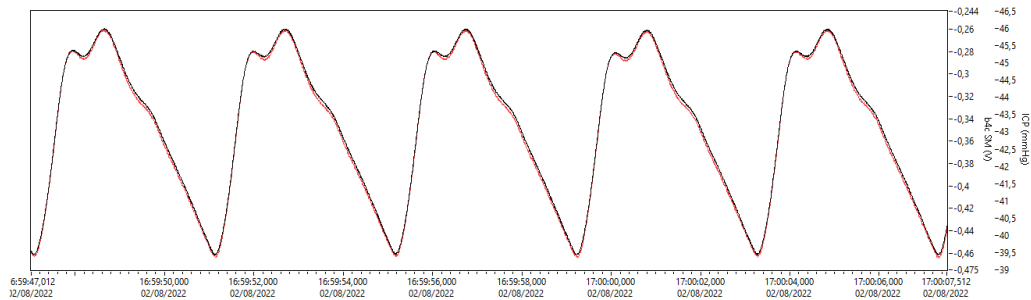


Figura 155 - Série temporal do teste 3 com a aquisição dos dois tipos de sensores de pressão.

Por fim, o resultado do teste 4 é exibido na Figura 156. Nele é possível ver os degraus em ambos os sensores e um destaque é feito no primeiro degrau em descida. Apesar da semelhança da morfologia, é interessante perceber que a característica de acomodação do sensor SM brain4care é visível em grandes

intervalos de tempo, entretanto para pequenos intervalos, se torna imperceptível.

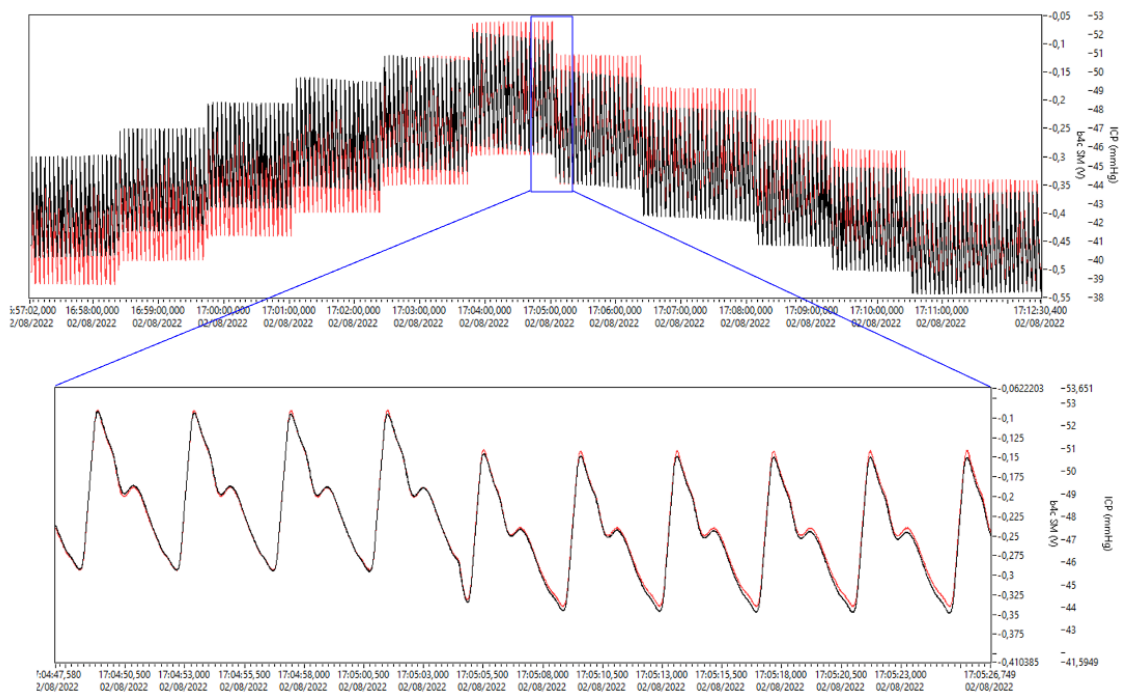


Figura 156 - Série temporal do teste 4 com destaque para o primeiro desnível mostrando as ondas de diferentes tecnologias, invasiva e não invasiva acompanhando a tendência.

O resultado destes testes demonstra a capacidade da Optobrain Interface em realizar aquisição de sinais derivados de sensores de pressão com extrema qualidade de morfologia e sem a necessidade de amplificadores externos, tornando o dispositivo, suficiente para experimentos relacionados com a hemodinâmica arterial e intracraniana.

## 6.2 Experimento piloto com optogenética em camundongo

Por ter seu espalhamento muito aberto, não se sabia se o optrodo desenvolvido na tese teria ou não potência suficiente para realizar a ativação do nervo vago.

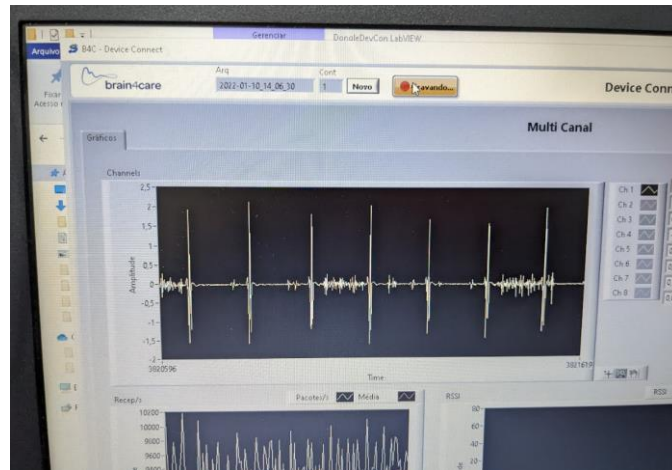


Figura 157 - Foto da tela do software de aquisição Optobrain realizando a coleta do biopotencial durante experimento piloto.

Para as coletas de EMG, a Optobrain Interface v1.0.2 foi capaz de registrar os sinais obtendo Biopotenciais derivados do batimento cardíaco e da movimentação respiratória. A Figura 157 exibe o registro feito via software da série temporal durante o experimento.

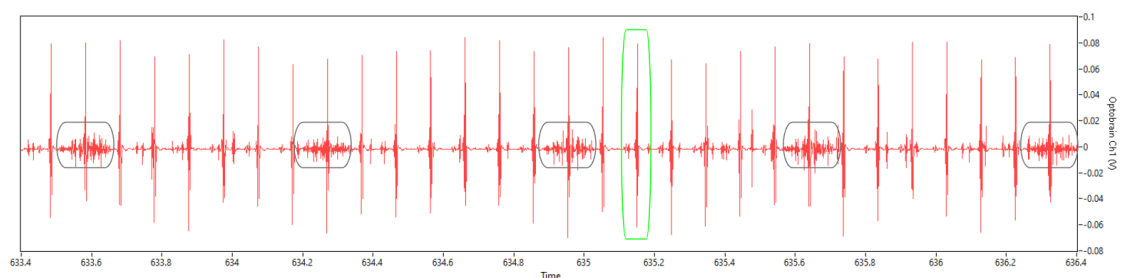


Figura 158 - Registro de aquisição de EMG podendo perceber o efeito da respiração nas seleções em cinza como o efeito da movimentação do diafragma e batimento cardíaco nos picos como o da seleção em verde.

Na Figura 158 é possível perceber os registros da respiração nas seleções em cinza, assim como o traçado do ECG na seleção em verde. A presença de

ambos os biopotenciais foram vistos em quase todo o experimento, onde o ECG foi mais evidente em todos os momentos. Conforme as fontes de luzes eram ativadas, os registros de biopotenciais eram acompanhados em tempo real, entretanto presencialmente era complexo de ser perceber alterações apenas com o gráfico dos sinais pelo tempo devido à alta frequência cardíaca do camundongo.

Realizando o pós processamento dos dados, pelo fato de estar mais presente em grande parte dos dados e ser mais fácil de identificar, optou-se por avaliar a frequência cardíaca através do ECG, identificando manualmente os picos R de cada pulso, eliminando picos de potências relativamente inferiores que provavelmente não originaram batidas.

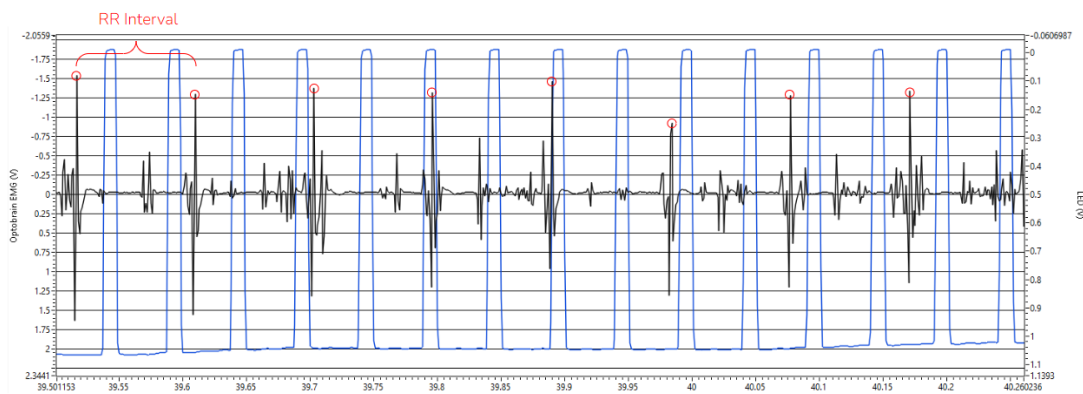


Figura 159 - Análise dos picos R para cálculo dos intervalos RR durante o experimento.

Um dos registros realizados com a placa Optobrain Interface foi selecionado buscando-se alterações na frequência cardíaca em locais onde o LED foi ativado. A Figura 160 mostra os resultados da análise. Ao todo foram avaliados 76 segundos de dados onde foram identificados manualmente mais de 475 pulsos. Os intervalos entre os picos R de cada batida foram calculados e a frequência de batimentos instantânea entre os pulsos foi registrada. O registro da ativação do LED também foi feito e está representado em azul.

Percebe-se no gráfico de cima da Figura 160 que o LED foi ativado entre os segundos 36 e 63. A frequência cardíaca inicial teve média de 638 BPM com desvio padrão de 6.55 até o segundo 48. A partir do segundo 48 se percebe o início da queda da frequência cardíaca chegando a 105 BPM como frequência

mínima. Em preto, o traçado original do EMG fica mais claro na região onde a ativação optogenética reduziu a frequência dos disparos.

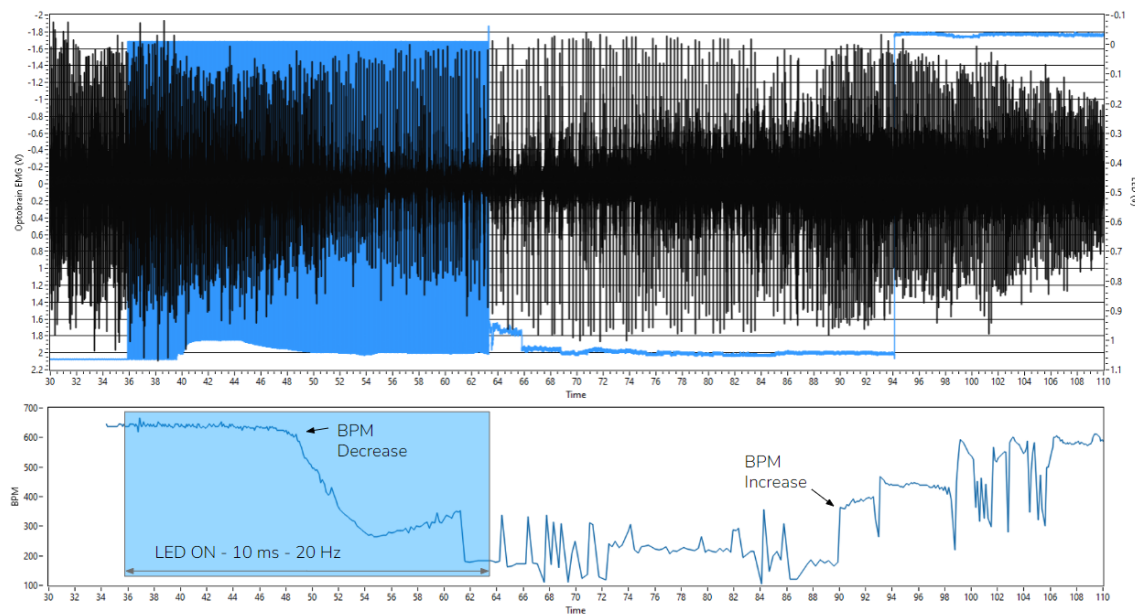


Figura 160 - Análise Optogenética - Queda evidente da frequência cardíaca do camundongo durante o período de estimulação ótica.

Percebeu-se que apesar do LED ter sido ativado aos 36 segundos, a queda da frequência cardíaca que era esperada inicialmente por conta da ativação optogenética, demorou mais de dez segundos. Esse atraso em parte pode se dar pelo fato de o posicionamento da fonte de luz ter sido feito manualmente, dependendo de o operador incidir a fonte de luz corretamente sobre o nervo vago incidindo a potência mínima necessária para realizar os disparos. O traçado do ECG foi sinusal em grande parte do traçado, se tornando instável com arritmias e outros comportamentos não sinusais em outros momentos, talvez na tentativa do próprio corpo de retomar o controle cardíaco. Após os 90 segundos percebeu-se um aumento da frequência cardíaca, retomando sua frequência original por volta dos 100 segundos.



## 7 Conclusões

Em uma análise mais global, esta tese conseguiu atingir os objetivos planejados com sucesso. O levantamento dos requisitos, a escolha dos componentes críticos e o desenvolvimento do sistema foram feitos e documentados com sucesso e de maneira suficiente para se comprovar a viabilidade de um dispositivo sem fio em realizar múltiplas aquisições simultâneas de bio-sinais e acionamentos de luz com potência suficiente e temporalmente precisa para realizar experimentos de optogenéticas em um tamanho relativamente pequeno. A transmissão dos dados via bluetooth foi feita e caracterizada de forma eficiente, sem perdas e com altas taxas de transferências, ainda que *low energy*, permitindo que bio-sinais mais dinâmicos possam ser coletados sem depender de cabos ou fontes de energia com alta capacidade. O ADS1299, mesmo sendo um componente de prateleira (*Off the shelf* – O.T.S.), se mostrou altamente eficiente em realizar aquisições de bio-sinais com altíssima qualidade e precisão.

Diversos percalços como a descontinuação de componentes, crise no setor de semicondutores por causa da pandemia da COVID-19, e demais alterações de componentes críticos, trouxeram atrasos para o desenvolvimento do projeto, que, contudo, foi possível não só finalizar a placa protótipo, quanto projetar e enviar para produção a nova versão apresentada.

O projeto foi pensado, planejado, executado e está em constante evolução, já em sua segunda versão de *hardware*, para que seja possível a utilização e escalabilidade, com capacidade evidente de ser implantável em animais de pequeno porte, com baixo custo para uso em demais pesquisas de optogenética, inclusive de outros grupos que porventura não tenham tecnologias acessíveis para implementar estudos envolvendo optogenética. A evolução do projeto não finaliza com este trabalho, que apenas teve o papel de iniciar os estudos no grupo relacionado à tecnologia de optogenética.

Foi possível ainda realizar com sucesso um piloto de experimento em optogenética em animais, sendo possível avaliar a diminuição da frequência

cardíaca através da ativação do nervo vago direito em camundongo que expressava a proteína de canal rodopsina 2 nas células VGLUT2.

A evolução do entendimento e validação de que é possível a utilização do sistema para pesquisas envolvendo a hemodinâmica, dá ao grupo uma potencial ferramenta para controle e auxílio no entendimento da dinâmica do sangue em animais, principalmente seus efeitos na neurofisiologia quantitativa e nos impactos das alterações da hemodinâmica na pressão e complacência intracraniana, tema de grande interesse do grupo e do autor desta tese.

Obviamente existem melhorias e evoluções a serem feitas na tecnologia em trabalhos presentes e futuros, como por exemplo:

- Desenvolvimento e evolução dos optrodos para aplicações desde básicas, até mais avançadas;
- Buscas por opsinas ou tipos de espécies de animais transgênicos que possuam neurônios sensíveis à luz relacionados ao controle da hemodinâmica que permitam novos experimentos;
- Confirmação da validação na nova versão do hardware, possibilitando o uso mais prático em experimentos com animais, simplificando as montagens e evitando ao máximo o uso de fios;
- Finalização do software, de acordo com a evolução do desenvolvimento do sistema, para de fato permitir atingir e evoluir como produto, os requisitos planejados e arquitetados nesta tese, trazendo a usabilidade e experiência dos usuários com as primeiras versões para o ciclo de desenvolvimento do software;
- Capacidade de uso de mais de uma Optobrain Interface no mesmo sistema, de forma a poder coletar e realizar experimentos simultâneos em mais de um animal ao mesmo tempo;
- Atualização do firmware da Interface através de DFU OTA (*Data Firmware Upgrade Over The Air*), permitindo evoluções e customizações de firmwares de maneira mais prática à distância aumentando a conectividade do sistema para receber atualizações;

- Aumentar a capacidade de transmissão útil de dados sem fios, otimizando ainda mais os protocolos sem fios, de acordo com as necessidades futuras;
- Possibilidade de explorar o hardware para demais aplicações e estudos que não só estejam relacionados com a optogenética, mas também sistemas de estimulação elétrica, ou simplesmente aquisição simultânea de Biopotenciais e bio-sinais de forma sem fio e *low energy*;

## 8 Referências

AMELI, R.; MIRBOZORGI, A.; NERON, J. L.; LECHASSEUR, Y.; GOSSELIN, B. A wireless and batteryless neural headstage with optical stimulation and electrophysiological recording. **Proceedings of the Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, EMBS**, p. 5662–5665, 2013.

AMUNTS, K.; ZILLES, K. Architectonic Mapping of the Human Brain beyond Brodmann. **Neuron**, v. 88, n. 6, p. 1086–1107, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2015.12.001>>.

AZEVEDO, F. A. C.; CARVALHO, L. R. B.; GRINBERG, L. T.; FARFEL, J. M.; FERRETTI, R. E. L.; LEITE, R. E. P.; FILHO, W. J.; LENT, R.; HERCULANO-HOUZEL, S. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. **Journal of Comparative Neurology**, v. 513, n. 5, p. 532–541, 2009.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso**. [s.l: s.n.]1016 p.

BLUETOOTH SIG. Bluetooth Core Specification Version 5.3. **Specification of the Bluetooth System**, v. 0, 2021. Disponível em: <<https://www.bluetooth.com/specifications/bluetooth-core-specification/>>.

BLUETOOTH SIG. **Bluetooth Profile Specification List**. Disponível em: <<https://www.bluetooth.com/specifications/specs/>>. Acesso em: 24 jan. 2022.

BOYDEN, E. S.; ZHANG, F.; BAMBERG, E.; NAGEL, G.; DEISSEROTH, K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. **Nature Neuroscience**, v. 8, n. 9, p. 1263–1268, 2005.

BRITT, J. P.; MCDEVITT, R. A.; BONCI, A. Use of Channelrhodopsin for Activation of CNS Neurons. *In*: **Current Protocols in Neuroscience**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2012. p. 1–25.

BUZSÁKI, G.; ANASTASSIOU, C. A.; KOCH, C. The origin of extracellular

fields and currents-EEG, ECoG, LFP and spikes. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 13, n. 6, p. 407–420, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrn3241>>.

CHEN, F. Y. B.; BUDGETT, D. M.; SUN, Y.; MALPAS, S.; MCCORMICK, D.; FREESTONE, P. S. Pulse-Width Modulation of Optogenetic Photo-Stimulation Intensity for Application to Full-Implantable Light Sources. **IEEE Transactions on Biomedical Circuits and Systems**, v. 11, n. 1, p. 28–34, 2017.

CORREIA, J. H.; CARMO, J. P. **Introdução à Instrumentação Médica**. [s.l.] Lidel, 2013. 262 p.

CZOSNYKA, M.; PICKARD, J. D. Monitoring and interpretation of intracranial pressure. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 75, n. 6, p. 813–821, 1 jun. 2004. Disponível em: <<http://jnnp.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jnnp.2003.033126>>. Acesso em: 8 mar. 2012.

DEISSEROTH, K. Controlling the brain with light. **Scientific American**, n. November, p. 48–55, 2010.

DEISSEROTH, K. Optogenetics. **Nature Methods**, v. 8, n. 1, p. 26–29, 2011.

DEISSEROTH, K. Circuit dynamics of adaptive and maladaptive behaviour. **Nature**, v. 505, n. 7483, p. 309–317, 2014.

DEISSEROTH, K. Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 9, p. 1213–1225, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nn.4091>>.

DEISSEROTH, K. **Stanford Optogenetics Material Request**. Disponível em: <[https://web.stanford.edu/group/dlab/optogenetics/request\\_dna.html](https://web.stanford.edu/group/dlab/optogenetics/request_dna.html)>. Acesso em: 21 mar. 2018.

DERHGAWEN, A. **Maximizing BLE Throughput Part 4: Everything You Need to Know**. Disponível em: <<https://punchthrough.com/ble-throughput-part-4/>>. Acesso em: 24 jan. 2022.

DUQUE PARRA, J. E. Cavum Septum Pellucidum: Hallazgo Mediante

Disección Neuroanatómica TT - Cavum Septum Pellucidum: Finding from Neuroanatomical Dissection. **Int. j. morphol**, v. 30, n. 4, p. 1508–1511, 2012.

FAN, B.; LI, W. Miniaturized optogenetic neural implants: a review. **Lab on a Chip**, v. 15, n. 19, p. 3838–3855, 2015.

FEHER, J. J. **Quantitative Human Physiology Textbook**. [s.l.] Elsevier Inc., 2012. 923 p.

FENNO, L.; YIZHAR, O.; DEISSEROTH, K. The Development and Application of Optogenetics. **Annual Review of Neuroscience**, v. 34, n. 1, p. 389–412, 2011. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-neuro-061010-113817>>.

GONCALVES, S. B.; RIBEIRO, J. F.; SILVA, A. F.; COSTA, R. M.; CORREIA, J. H. Design and manufacturing challenges of optogenetic neural interfaces: A review. **Journal of Neural Engineering**, v. 14, n. 4, 2017.

HAN, W.; TELLEZ, L. A.; RANGEL, M. J.; MOTTA, S. C.; ZHANG, X.; PEREZ, I. O.; CANTERAS, N. S.; SHAMMAH-LAGNADO, S. J.; VAN DEN POL, A. N.; DE ARAUJO, I. E. Integrated Control of Predatory Hunting by the Central Nucleus of the Amygdala. **Cell**, v. 168, n. 1–2, p. 311- 324.e18, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.027>>.

HASHIMOTO, M.; HATA, A.; MIYATA, T.; HIRASE, H. Programmable wireless light-emitting diode stimulator for chronic stimulation of optogenetic molecules in freely moving mice. **Neurophotonics**, v. 1, n. 1, p. 011002, 2014. Disponível em: <<http://neurophotonics.spiedigitallibrary.org/article.aspx?doi=10.1117/1.NPh.1.1.011002>>.

JI, Z. G.; WANG, H. ChR2 transgenic animals in peripheral sensory system: Sensing light as various sensations. **Life Sciences**, v. 150, p. 95–102, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2016.02.057>>.

KENT, C. Algae proteins and optogenetics: a vision of the future. **Pharmaceutical Technology**, 2021. Disponível em: <<https://www.pharmaceutical-technology.com/features/optogenetics-vision/>>.

KIM, T. II; MCCALL, J. G.; JUNG, Y. H.; HUANG, X.; SIUDA, E. R.; LI, Y.; SONG, J.; SONG, Y. M.; PAO, H. A.; KIM, R. H.; LU, C.; LEE, S. D.; SONG, I. S.; SHIN, G.; AL-HASANI, R.; KIM, S.; TAN, M. P.; HUANG, Y.; OMENETTO, F. G.; ROGERS, J. A.; BRUCHAS, M. R. Injectable, cellular-scale optoelectronics with applications for wireless optogenetics. **Science**, v. 340, n. 6129, p. 211–216, 2013.

KRAVITZ, A. V.; FREEZE, B. S.; PARKER, P. R. L.; KAY, K.; THWIN, M. T.; DEISSEROTH, K.; KREITZER, A. C. Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. **Nature**, v. 466, n. 7306, p. 622–626, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature09159>>.

LIN, J. Y. A User's Guide to Channelrhodopsin Variants. **Experimental Physiology**, v. 96, n. 1, p. 19–25, 2012.

MACHADO, A. Neuroanatomia Funcional 3ª Edição. 2004.

MATHWORKS, I. **BLE Channel Specification**. Disponível em: <<https://ww2.mathworks.cn/help/comm/ug/ble-channel-selection-algorithms.html>>. Acesso em: 23 jan. 2022.

MATSUNO-YAGI, A.; MUKOHATA, Y. Two possible roles of bacteriorhodopsin; a comparative study of strains of Halobacterium halobium differing in pigmentation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 78, n. 1, p. 237–243, 1977.

MICKLE, A. D.; WON, S. M.; NOH, K. N.; YOON, J.; MEACHAM, K. W.; XUE, Y.; MCILVRIED, L. A.; COPITS, B. A.; SAMINENI, V. K.; CRAWFORD, K. E.; KIM, D. H.; SRIVASTAVA, P.; KIM, B. H.; MIN, S.; SHIUAN, Y.; YUN, Y.; PAYNE, M. A.; ZHANG, J.; JANG, H.; LI, Y.; LAI, H. H.; HUANG, Y.; PARK, S. II; GEREAU, R. W.; ROGERS, J. A. A wireless closed-loop system for optogenetic peripheral neuromodulation. **Nature**, v. 565, n. 7739, p. 361–365, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41586-018-0823-6>>.

MONTGOMERY, K. L.; YEH, A. J.; HO, J. S.; TSAO, V.; IYER, S. M.; GROSENICK, L.; FERENCZI, E. A.; TANABE, Y.; DEISSEROTH, K.; DELP, S.

L.; POON, A. S. Y. Wirelessly powered, fully internal optogenetics for brain, spinal and peripheral circuits in mice. **Nature Methods**, v. 12, n. 10, p. 969–974, 2015.

MOTA, B.; HERCULANO-HOUZEL, S. Cortical folding scales universally with surface area and thickness, not number of neurons. **Science**, v. 349, n. 6243, p. 74–77, jul. 2015.

NAGEL, G.; OLLIG, D.; FUHRMANN, M.; KATERIYA, S.; MUSTI, A. M.; BAMBERG, E.; HEGEMANN, P. Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. **Science**, v. 296, n. June, p. 2395–2398, 2002.

NAGEL, G.; SZELLAS, T.; HUHN, W.; KATERIYA, S.; ADEISHVILI, N.; BERTHOLD, P.; OLLIG, D.; HEGEMANN, P.; BAMBERG, E. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 24, p. 13940–13945, 2003. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1936192100>>.

NI. **TDMS File**. Disponível em: <<https://www.ni.com/pt-br/support/documentation/supplemental/06/the-ni-tdms-file-format.html>>.

Acesso em: 1 jan. 2022.

NIH. **Clinical Trials list for Optogenetic Studies**. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=optogenetics&term=&cntry=&state=&city=&dist=>>>.

NORTHROP, R. B. **Non-invasive Instrumentation and Measurement in Medical Diagnosis**. [s.l.] CRC Press, 2018. 527 p.

OESTERHELT, D.; STOECKENIUS, W. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. **Nature New Biology**, v. 233, n. 39, p. 149–152, 1971.

OFFNER, F. F. Bioelectric potentials--their source, recording, and significance. **IEEE transactions on bio-medical engineering**, v. 31, n. 12, p. 863–8, 1984. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6396211>>.



PURVES, D.; AUGUSTINE, G. J.; FITZPATRICK, D.; HALL, W. C.; LA MANIA, A.-S.; WHITE, L. E. (ed.). **Neuroscience, Fifth Edition**. [s.l.] Sinauer Associates, INC, 2012. 750 p.

RANGEL, M. J.; BALDO, M. V. C.; CANTERAS, N. S. Influence of the anteromedial thalamus on social defeat-associated contextual fear memory. **Behavioural Brain Research**, v. 339, n. September 2017, p. 269–277, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.10.038>>.

SALEAE. **Saleae Logic Pro Analyzer website**.

SHIN, G.; GOMEZ, A. M.; AL-HASANI, R.; JEONG, Y. R.; KIM, J.; XIE, Z.; BANKS, A.; LEE, S. M.; HAN, S. Y.; YOO, C. J.; LEE, J. L.; LEE, S. H.; KURNIAWAN, J.; TUREB, J.; GUO, Z.; YOON, J.; PARK, S. II; BANG, S. Y.; NAM, Y.; WALICKI, M. C.; SAMINENI, V. K.; MICKLE, A. D.; LEE, K.; HEO, S. Y.; MCCALL, J. G.; PAN, T.; WANG, L.; FENG, X.; KIM, T. II; KIM, J. K.; LI, Y.; HUANG, Y.; GEREAU, R. W.; HA, J. S.; BRUCHAS, M. R.; ROGERS, J. A. Flexible Near-Field Wireless Optoelectronics as Subdermal Implants for Broad Applications in Optogenetics. **Neuron**, v. 93, n. 3, p. 509- 521.e3, 2017.

TEXAS INSTRUMENTS. **ADS1299 Datasheet**. Disponível em: <<http://www.ti.com/lit/ds/symlink/ads1299.pdf>>. Acesso em: 1 jan. 2018a.

TEXAS INSTRUMENTS. **ADS1299-x Low-Noise, 4-, 6-, 8-Channel, 24-Bit, Analog-to-Digital Converter for EEG and Biopotential Measurements**2017b.

THAKOR, N. V. Biopotentials and Electrophysiology Measurement. **Measurement, Instrumentation, and Sensors Handbook**, p. 64-1-64–18, 2014.

TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. **Principles of Anatomy and Physiology**. 14. ed. [s.l.: s.n.]1237 p.

WALZ, W. **Optogenetics : A Roadmap Series Editor**. [s.l.: s.n.]

WARDEN, M. R.; CARDIN, J. A.; DEISSEROTH, K. Optical Neural Interfaces. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 16, n. 1, p. 103–129, 2014.

Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-bioeng-071813-104733>>.

WHITE, M.; MACKAY, M.; WHITTAKER, R. G. **Taking Optogenetics into the Human Brain: Opportunities and Challenges in Clinical Trial Design.**

Disponível em: <<https://www.dovepress.com/taking-optogenetics-into-the-human-brain-opportunities-and-challenges--peer-reviewed-fulltext-article-OAJCT>>. Acesso em: 1 jun. 2022.

WON, S. M.; CAI, L.; GUTRUF, P.; ROGERS, J. A. Wireless and battery-free technologies for neuroengineering. **Nature Biomedical Engineering**, 2021.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41551-021-00683-3>>.

WOOLSEY, T. A.; HANAWAY, J.; GADO, M. H. **The Brain Atlas**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2017. 273 p.

YANG, Y.; WU, M.; VÁZQUEZ-GUARDADO, A.; WEGENER, A. J.; GRAJALES-REYES, J. G.; DENG, Y.; WANG, T.; AVILA, R.; MORENO, J. A.; MINKOWICZ, S.; DUMRONGPRECHACHAN, V.; LEE, J.; ZHANG, S.; LEGARIA, A. A.; MA, Y.; MEHTA, S.; FRANKLIN, D.; HARTMAN, L.; BAI, W.; HAN, M.; ZHAO, H.; LU, W.; YU, Y.; SHENG, X.; BANKS, A.; YU, X.; DONALDSON, Z. R.; GEREAU, R. W.; GOOD, C. H.; XIE, Z.; HUANG, Y.; KOZOROVITSKIY, Y.; ROGERS, J. A. Wireless multilateral devices for optogenetic studies of individual and social behaviors. **Nature Neuroscience**, v. 24, n. 7, p. 1035–1045, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41593-021-00849-x>>.

YIZHAR, O.; FENNO, L. E.; DAVIDSON, T. J.; MOGRI, M.; DEISSEROTH, K. Optogenetics in Neural Systems. **Neuron**, v. 71, n. 1, p. 9–34, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2011.06.004>>.

ZHANG, F.; GRADINARU, V.; ADAMANTIDIS, A. R.; DURAND, R.; AIRAN, R. D.; DE LECEA, L.; DEISSEROTH, K. Optogenetic interrogation of neural circuits: Technology for probing mammalian brain structures. **Nature Protocols**, v. 5, n. 3, p. 439–456, 2010.

ZHANG, F.; VIEROCK, J.; YIZHAR, O.; FENNO, L. E.; TSUNODA, S.;

KIANIANMOMENI, A.; PRIGGE, M.; BERNDT, A.; CUSHMAN, J.; POLLE, J.; MAGNUSON, J.; HEGEMANN, P.; DEISSEROTH, K. The microbial opsin family of optogenetic tools. **Cell**, v. 147, n. 7, p. 1446–1457, 2011.