

Ana Luísa Sepúlveda Linhares

DESENVOLVIMENTO DE SENSORES PARA REGISTO ELETROENCEFALOGRÁFICO BASEADOS NUM POLÍMERO DE PEDOT DOPADO COM NANOTUBOS DE CARBONO

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos
necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



FCTUC FACULDADE DE CIÊNCIAS
E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ana Luísa Sepúlveda Linhares

Desenvolvimento de sensores para registo eletroencefálico baseados num polímero de PEDOT dopado com nanotubos de carbono

*Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra
para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção
do grau de Mestre em Engenharia Biomédica*

Orientadores:

Prof. Dr. Albano Augusto Cavaleiro Rodrigues de Carvalho (DEM-UC)
Prof. Dr. José Carlos Magalhães Duque da Fonseca (DEMM-UP)

Coimbra, 2016

Este projeto foi desenvolvido em colaboração com:

Departamento de Engenharia Mecânica da Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade de Coimbra



Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Faculdade de
Engenharia da Universidade do Porto



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

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

Agradecimentos

Aos meus orientadores, Professor Doutor Albano Cavaleiro pela orientação e oportunidade de trabalhar num projeto tão interessante e ao Professor Carlos Fonseca, por tudo o que me ensinou, pela paciência, pelo entusiasmo e pela dedicação.

Às instituições que tornaram possível o sucesso deste trabalho: o Centro de Engenharia Mecânica da Universidade de Coimbra, o Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Faculdade de Engenharia do Porto e um especial agradecimento ao Departamento de Física, por ser uma casa para todos os alunos.

Ao Ricardo Serra pela disponibilidade e contribuição para este trabalho.

Ao Patrique Fiedler pelos conhecimentos transmitidos acerca do processamento de sinal através do *Matlab*.

Às colegas de laboratório, Beatriz e Stéphanie, que tão bem me acolheram.

Aos meus colegas de curso, por fazerem de Coimbra um sítio tão especial.

Aos meus amigos de sempre por todo o apoio, incentivo, amizade e pelas memórias que vamos criando há tantos anos.

À minha família, por sonharem mais alto que eu e por acreditarem em mim.

A todos, obrigada!

Ana Luísa Linhares

“A thinker sees his own actions as experiments and questions - as attempts to find out something. Success and failure are for him answers above all.”
— Friedrich Nietzsche

Resumo

O Eletroencefalograma (EEG) emergiu como uma técnica para o registo de atividade elétrica do cérebro. A sua natureza não invasiva torna-a uma técnica ideal para aplicações clínicas. O registo de sinais neuronais é uma das técnicas mais utilizadas no estudo da função e distúrbios do sistema nervoso. Sendo utilizado para o diagnóstico da epilepsia, perturbações do sono tais como narcolepsia, monitorização da atividade cerebral durante a administração de anestesia, durante cirurgia cerebral, e muitas outras áreas. Apesar de todos os avanços tecnológicos, o registo eletroencefálico continua a ser um desafio tecnológico importante, devido à transmissão do sinal na interface eletrodo-pele.

Os métodos de EEG tradicionais utilizam eletrodos de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl), que geralmente necessitam de gel eletrólito para formar uma interface condutora entre o eletrodo e a pele. As suas maiores vantagens são: a biocompatibilidade, a confiabilidade, a excelente razão sinal-ruído e a reprodutibilidade do potencial elétrico. No entanto, nas últimas décadas, surgiram várias novas abordagens acerca dos eletrodos para EEG, devido a algumas limitações inerentes aos eletrodos tradicionais.

Os polímeros condutores são um dos materiais mais interessantes devido à transmissão de carga altamente eficaz na interface pele-eletrodo. Um dos principais objetivos dos polímeros condutores é melhorar a razão sinal-ruído e a estabilidade do sensor.

O poli(3,4-etilenodioxitiofeno) (PEDOT) é um dos polímeros mais promissores devido à sua elevada condutividade elétrica, boa estabilidade térmica e química. Os nanotubos de carbono têm propriedades elétricas, físicas e térmicas extraordinárias, tornando-o um material interessante para conjugação com os polímeros condutores.

A presente dissertação descreve o desenvolvimento de um sensor para o registo EEG combinando dois materiais: PEDOT e nanotubos de carbono. O PEDOT funciona como um material condutor melhorando a interação biológica enquanto os nanotubos de carbono criam uma estrutura condutora tornando o compósito menos vulnerável à degradação.

Os objetivos deste projeto são: o desenvolvimento de um eletrodo reproduzível e robusto consistindo num compósito de PEDOT-CNT depositado numa superfície de ouro; a caracterização eletroquímica, mecânica, morfológica, química e de suscetibilidade ao ruído elétrico dos eletrodos desenvolvidos; comparação do registo electroencefálico *in-vivo* entre os novos eletrodos de PEDOT-CNT e os eletrodos tradicionais de Ag/AgCl.

A caracterização eletroquímica e adesão do filme ao ouro comprovaram a boa performance do eletrodo PEDOT-CNT relativamente ao eletrodo de Ag/AgCl, obtendo-se um sensor estável e com baixa impedância na interface eletrodo-pele. As imagens obtidas por SEM e AFM mostraram uma boa incorporação dos nanotubos na matriz polimérica. Para densidades de corrente mais elevadas aplicadas no processo de eletropolimerização, as superfícies são mais porosas e têm consequentemente maior área superficial efetiva. Através de ensaios de ruído mostrou-se que os eletrodos são pouco suscetíveis ao ruído. Nos ensaios *in-vivo* a maior componente de ruído elétrico se deve à pele. Por fim, os ensaios *in-vivo* em adultos saudáveis comprovaram a fiabilidade dos eletrodos PEDOT-CNT, para o registo electroencefálico.

Palavras-chave: nanotubos de carbono, PEDOT, eletropolimerização, sensor, registo EEG.

Abstract

Electroencephalography emerged as a technique for recording electrical activity of the brain. Its noninvasive nature makes it an ideal technique for clinical applications. Recording of neuronal signals is one of the most widely used techniques towards a better understanding of function and disorders of the nervous system. EEG is currently used for epilepsy diagnosis, sleep disorders such as narcolepsy, monitor brain activity while a person is receiving anesthesia, and many other areas. Despite all the technological advances, electroencephalographic recording remains an important technological challenge, because of the signal transmission at the electrode-skin interface.

The traditional EEG methods rely on silver/silver chloride electrodes which generally use electrolytic gel to form a conductive interface between the electrode and the skin, because of their main advantages: biocompatibility, reliability, excellent signal to noise ratio and electric potential reproducibility. However, in recent decades, there have been several different approaches on electrodes for EEG, due to some limitations of silver/silver chloride electrodes.

Conducting polymers emerged as a field of interest for materials for EEG electrodes due to their highly effective charge transmission over the skin-electrode interface. One main goal with the introduction of conducting polymers is to improve stability.

Poly (3, 4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) is one of the polymers receiving more attention because of its high electrical conductivity, good thermal and chemical stability. Due to extraordinary electrical, physical and thermal properties of carbon nanotubes, polymer-carbon nanotubes composites are one of the most reliable candidates for electrode materials.

The present dissertation describes the development of a biosensor for EEG recording combining two materials: PEDOT and carbon nanotubes. PEDOT will work as a conductive material improving the biological interaction while carbon nanotubes will create an integrated conducting structure making the material less vulnerable to degradation.

This project aims to: develop a reproducible and robust method to deposit PEDOT-CNT composite onto gold surfaces; characterize electrochemical, mechanical, morphological, chemical and electrical noise properties of all electrodes; compare *in-vivo* recording of the new electrode to silver/silver chloride electrodes.

Electrochemical and mechanical characterization proved good performance for PEDOT-CNT electrodes, yielding a stable and low impedance electrode-skin interface. SEM and AFM images showed good incorporation of carbon nanotubes. At higher current densities during electropolymerization, obtained surfaces have higher effective surface area being more porous. Through noise experiments was demonstrated that electrode have low susceptibility to noise. And, *in-vivo* tests proved that the major noise component component is due to the skin.

Finally, *in-vivo* experiments in healthy adults proved the reliability of the PEDOT-CNT electrodes for EEG recording.

Keywords: carbon nanotubes, PEDOT, electropolymerization, sensor, EEG recording.

Índice de Símbolos e Siglas

Simbologia

Ag/AgCl – prata/cloreto de prata

V_{th} - Ruído térmico

k – constante de Boltzmann

T – temperatura

B – Largura de banda

R – Resistência elétrica

f – Frequência

m – Massa de polímero produzido por eletropolimerização

z – Número de elétrons gerados por monômero

M – Massa molar

F – Constante de Faraday

i_d - Corrente de deposição

t_d - Tempo de deposição

Q_d – Carga transferida

j_d – Densidade de corrente

Z – Impedância elétrica

Siglas

EEG - Electroencefalograma

AVC - Acidente Vascular Cerebral

SNC - Sistema Nervoso Central

SNP - Sistema Nervoso Periférico

SNS – Sistema Nervoso Somático

SNA – Sistema Nervoso Autônomo

PPS- potencial pós-sináptico

PPSE- potencial pós-sináptico excitatório

PPSI- potencial pós-sináptico inibitório

SHE –Standard Hydrogen Electrode

HCP – Half Cell Potential

REF – Referência

GRD- Ground

SNR - Signal-to-noise ratio

PPy – polipirrole

PTh – politiofeno

PEDOT- poli (3,4-etilenodioxitiofeno)

EDOT - 3,4-etilenodioxitiofeno

NaPSS - poliestireno sulfonato de sódio

PEDOT:PSS - poli (3,4-etileno-dioxitiofeno):poliestireno sulfonato de sódio

CNT - Carbon Nanotube

SWCNT – Single Wall Carbon Nanotube

MWCNT - Multiwall Carbon Nanotube

MWCNT-COOH - Carboxylic acid functionalized multiwall carbon nanotube

SCE - Saturated Calomel Electrode

CV - Cyclic Voltammetry

EIS - Electrochemical Impedance Spectroscopy

SEM - Scanning Electron Microscopy

EDS - Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy

AFM - Atomic Force Microscopy

RMS - Root Mean Square

RMSD – Root Mean Square Deviation

DFT - Discrete Fourier Transform

FFT - Fast Fourier Transform

PSD - Power Spectral Density

Índice de Figuras

Figura 1.1. Sinais representativos dos ritmos das ondas cerebrais: Beta, Alfa, Teta e Delta e a respetiva gama de frequências.(Viscambio, 2016)	7
Figura 1.2. Representação da aquisição de sinal dos sinais eletroencefálicos. (Lopez-Gordo, Sanchez-Morillo, & Pelayo Valle, 2014)	11
Figura 1.3. Posições dos elétrodos relativas ao sistema 10-20 no plano frontal (A) e no plano lateral (B). (Klem, Luders, Jasper, & Elger, 1999)	12
Figura 2.1. Estrutura química do (a) PPy e do (b) PEDOT.	17
Figura 2.2. Funcionalização dos nanotubos de carbono com ácido carboxílico.(Filho & Fagan, 2007)	19
Figura 2.3. Sensor PEDOT-CNT desenvolvido para o registo eletroencefálico.	20
Figura 3.1. Imagens das células eletroquímicas usadas para a eletropolimerização do fio de Au revestido com (A) PEDOT e (B) PEDOT-CNT. (C) Fio de ouro polimerizado com um filme de PEDOT-CNT	23
Figura 3.2. Reação de eletropolimerização dos filmes de PEDOT:NaPSS.	24
Figura 3.3. Imagem da célula eletroquímica usada nos ensaios de caracterização dos elétrodos: EIS e CV.	28
Figura 3.4. Esquema explicativo sobre a radiação incidente na amostra, a interação entre os eletrões e a amostra e a radiação resultante. (Departamento de Física., 2009)	30
Figura 3.5. Equipamento Fei Quanta 400 FEG ESEM/EDAX Genesis X4M situado no Centro de Materiais da Universidade do Porto.	32
Figura 3.6. Microscópio de Força Atómica: modelo di Innova da empresa Veeco situado no Centro de Engenharia Mecânica da Universidade de Coimbra.	33
Figura 3.7. Montagem experimental utilizada nos testes <i>in-vivo</i>	37

Figura 3.8. Exemplo da Transformada de Fourier. (A) Três ondas cosseno com 40 amplitudes A1, A2 e A3 combinam-se para formar um sinal composto com amplitude A1+A2+A3. (B) A Transformada de Fourier da onda composta representada na figura A.

Figura 4.1. (A,B) Diagrama de Bode do espectro de impedâncias relativos à 44 superfície 1CNT_1S_i200 e 1CNT_1S_i50, respectivamente. (C,D) Voltamogramas Cíclicos relativos à superfície 1CNT_1S_i200 e 1CNT_1S_i50, respectivamente. Para todas as figuras é possível comparar as alterações induzidas pelos diferentes métodos de limpeza do material.

Figura 4.2. Registo do potencial do eléctrodo durante o processo de 46 eletropolimerização para as superfícies 2CNT_1S_i200, 2CNT_1S_i100, 2CNT_1S_i50 e 0CNT_1S_i200, com a legenda: PEDOT/CNT $j=200 \mu A/cm^2$, PEDOT/CNT $j=100 \mu A/cm^2$, PEDOT/CNT $j=50 \mu A/cm^2$ e PEDOT.

Figura 4.3. Diagrama de Bode do espectro de impedâncias relativos à superfície 47 0CNT_1S_i200 e ao fio de Au sem revestimento.

Figura 4.4. Diagrama de fase do espectro de impedâncias relativos à superfície 48 0CNT_1S_i200 e ao fio de Au sem revestimento.

Figura 4.5. Diagrama de Bode do espectro de impedâncias do fio de Au sem 49 revestimento e das seguintes superfícies: 2CNT_1S_i200, 2CNT_1S_i100 e 2CNT_1S_i50.

Figura 4.6. Diagrama de Fase do espectro de impedâncias do fio de Au sem 49 revestimento e das seguintes superfícies: 2CNT_1S_i200, 2CNT_1S_i100 e 2CNT_1S_i50

Figura 4.7. Representação do terceiro ciclo da CV de diferentes materiais: Au sem 51 revestimento e 0CNT_1S_i200.

Figura 4.8. Representação do terceiro ciclo da CV de diferentes superfícies: 51 0CNT_1S_i200, 2CNT_1S_i200, 2CNT_1S_i100 e 2CNT_1S_i50.

Figura 4.9. Morfologia de várias superfícies: (A) 0CNT_1S_i200; (B) 1CNT_1S_i200; (C) 1CNT_1S_i100; (D) 1CNT_1,5S_i200; (E) 2CNT_1S_i50 56

Figura 4.10. (A,B) Torção do fio polimerizado com PEDOT-CNT para observação da resistência do filme e para medição da espessura com diferentes ampliações: 500x e 2 000x, respectivamente. (C) Visualização das falhas e medição da espessura do filme (516,9 nm). 57

Figura 4.11. Análise EDS: elementos presentes na superfície representada pela imagem SEM. 57

Figura 4.12. Imagens topográficas (A), de amplitude (B) e a três dimensões das superfícies (C): 0CNT_1S_i200, 1CNT_1S_i200, 1CNT_1S_i100, 1CNT_1S_i50 59

Figura 4.13. (A) Representação do valor RMS da rugosidade da superfície (S_a) em nanômetros e (B) da área de superfície efetiva, para as seguintes superfícies: 0CNT_1S_i200, 1CNT_1S_i200, 1CNT_1S_i100 e 1CNT_1S_i50. 60

Figura 4.14. (A, B) Diagramas de Bode das superfícies: PEDOT e PEDOT-CNT (C,D) Voltamogramas Cíclicos das superfícies: PEDOT e PEDOT-CNT, respectivamente. Para as superfícies de PEDOT: a – antes da aplicação da fita-cola, b – após a aplicação da fita-cola. Relativamente às superfícies de PEDOT-CNT: a – superfície 1CNT_1,5S_i50 antes da aplicação da fita-cola, b - superfície 1CNT_1,S_i50 após a aplicação da fita-cola, c – superfície 2CNT_1S_i200 antes da aplicação da fita-cola, d - superfície 2CNT_1S_i200 após a aplicação da fita-cola. 61

Figura 4.15. Representação dos valores RMS e do declive médio de: (a,b) PEDOT e PEDOT-CNT 2CNT_1S_i200, 2CNT_1S_i100 e 2CNT_1S_i50; (c,d) PEDOT e PEDOT-CNT 1CNT_1S_i200, 1CNT_1S_i100e 1CNT_1S_i50; (e,f) PEDOT e PEDOT-CNT 1CNT_1,5S_i100, 1CNT_1,5S_i200e 1CNT_1,5S_i50, respectivamente. 62

Figura 4.16. Densidade espectral de potência do ruído para as diferentes superfícies: (a) PEDOT e PEDOT-CNT 2CNT_1S_i200, 2CNT_1S_i100 e 2CNT_1S_i50, (b) PEDOT e PEDOT-CNT 1CNT_1S_i200, 1CNT_1S_i100e 1CNT_1S_i50 e (c) PEDOT e PEDOT-CNT 1CNT_1,5S_i100, 1CNT_1,5S_i200e 1CNT_1,5S_i50. 63

- Figura 4.17.** Diagrama de Bode (A) e de Fase (B) para os eléttodos em contacto com a pele. (Voluntário 1) 65
- Figura 4.18.** Diagrama de Bode (A) e de Fase (B) para os eléttodos em contacto com a pele. (Voluntário 3) 65
- Figura 4.19.** PSD obtido para os ensaios *in-vivo* (Voluntário 1) para o eléttodo Ag/AgCl (A) e PEDOT-CNT (B), sendo: (a) ruído do amplificador, (b) ruído *in-vivo*, (c) ruído *in-vitro* e (d) ruído térmico calculado a partir da EIS 66
- Figura 4.20.** PSD obtido para os ensaios *in-vivo* (Voluntário 1) para o eléttodo Ag/AgCl (A) e PEDOT-CNT (B), sendo: (a) ruído do amplificador, (b) ruído *in-vivo*, (c) ruído *in-vitro* e (d) ruído térmico calculado a partir da EIS 67
- Figura 4.21.** Gráfico de Barras que representa o valor RMS do ruído do amplificador, térmico e *in-vivo*, para os dois eléttodos: Ag/AgCl e PEDOT-CNT, para os voluntários 1 e 3. 67
- Figura 4.22.** Segmento dos sinais eletroencefálicos registados com olhos abertos e olhos fechados para os eléttodos com uma montagem: Ag/AgCl vs. PEDOT-CNT. (Voluntário 3) 68
- Figura 4.23.** Segmento dos sinais eletroencefálicos registados com olhos abertos e olhos fechados para os eléttodos com uma montagem: Ag/AgCl vs. Ag/AgCl. (Voluntário 3) 69
- Figura 4.24.** Segmento dos sinais eletroencefálicos registados com olhos abertos e olhos fechados para os eléttodos com uma montagem: Ag/AgCl vs. PEDOT-CNT. (Voluntário 4) 69
- Figura 4.25.** Segmento dos sinais eletroencefálicos registados com olhos abertos e olhos fechados para os eléttodos com uma montagem: Ag/AgCl vs. Ag/AgCl. (Voluntário 4) 69

Figura 4.26. Densidade espectral de potência dos sinais EEG registados, na zona 71 occipital do encéfalo, do ensaio Ag/AgCl vs. PEDOT-CNT: (a)Ag/AgCl – olhos abertos, (b) PEDOT-CNT – olhos abertos, (c) Ag/AgCl – olhos fechados, (d) PEDOT-CNT – olhos fechados. (Voluntário 3)

Índice de Tabelas

Tabela 3.1. Condições de eletropolimerização para a obtenção de um filme com 0,5 25
µm de espessura.

Tabela 3.2. Concentração dos reagentes químicos das diferentes soluções e que dão 26
origem a diferentes tipos de superfícies.

Tabela 4.1. Propriedades eletroquímicas dos diferentes materiais: Au, PEDOT e 52
PEDOT-CNT. Indicam-se os valores de impedância e capacidade para as diferentes
superfícies assim como o pico da curva de polimerização.

Tabela 4.2. RMS, RMSD, Correlação de Spearman e SNR calculados para os 70
elétrodos de Ag/AgCl e PEDOT-CNT nos dois ensaios realizados: Ag/AgCl vs.
PEDOT-CNT e Ag/AgCl vs. Ag/AgCl.

Índice de Conteúdos

Capítulo I

Conceitos fundamentais acerca do registo da atividade cerebral

1.1.	O Eletroencefalograma: história e evolução	1
1.2.	O Sistema Nervoso	2
1.2.1.	Estrutura e organização do Sistema Nervoso	3
1.2.2.	Células do Sistema Nervoso	3
1.2.3.	Geração e transmissão de sinais elétricos	4
1.2.4.	Classificação das ondas cerebrais	6
1.3.	Aquisição dos sinais eletroencefálicos	7
1.3.1.	Bioelétrodos para o registo de sinais	8
1.3.2.	Funcionamento do eletrodo	8
1.3.3.	Tipos de eletrodos	10
1.3.4.	Técnica de aquisição do sinal	10
1.3.5.	Sistema de posicionamento dos eletrodos	12
1.4.	Ruído presente nos sinais eletroencefálicos	13
1.4.1.	Ruído de origem não-biológica	13
1.4.2.	Ruído de origem biológica	14

Capítulo II

O novo sensor: ideia e desenvolvimento

2.1.	Eletrodos metálicos: vantagens e limitações	15
2.2.	O revestimento dos eletrodos metálicos com um compósito de polímeros condutores e nanotubos de carbono	16
2.3.	O sensor	19

Capítulo III

Materiais e Métodos

3.1.	Os Materiais	21
3.2.	Preparação das soluções	21
3.3.	Limpeza dos fios de ouro	23
3.4.	Método de eletropolimerização dos filmes	24

3.5.	Técnicas de caracterização eletroquímica dos elétrodos	26
3.5.1.	Espectroscopia de Impedância	26
3.5.2.	Voltametria Cíclica	29
3.6.	Análise da superfície e ensaio de adesão mecânica do filme	30
3.6.1.	Microscopia Eletrônica de Varrimento	30
3.6.2.	Espectroscopia por dispersão de energia	31
3.6.3.	Microscopia de Força Atômica	32
3.6.4.	Ensaio de adesão do filme: teste da fita-cola	33
3.7.	O ruído elétrico dos elétrodos	34
3.8.	Determinação do ruído elétrico presente no sinal eletroencefálico	34
3.9.	Testes de aquisição de sinais eletroencefálicos	35
3.9.1.	Os elétrodos, a montagem e o registo	35
3.9.2.	Processamento do sinal	37

Capítulo IV

Apresentação e Discussão de Resultados

4.1.	Limpeza dos fios de ouro	43
4.2.	Eletropolimerização dos filmes	44
4.3.	Caracterização eletroquímica dos filmes	47
4.3.1.	Espectroscopia de Impedância	47
4.3.2.	Voltametria Cíclica	50
4.4.	Morfologia da superfície	53
4.4.1.	Microscopia Eletrônica de Varrimento	53
4.4.2.	Microscopia de Força Atômica	58
4.5.	Adesão do filme: teste da fita-cola	61
4.6.	Caracterização dos elétrodos <i>in-vitro</i>	62
4.7.	Escolha da superfície para os elétrodos	64
4.8.	Ensaio <i>in-vivo</i>	64
4.8.1.	Análise das propriedades elétricas dos elétrodos <i>in vivo</i>	64
4.8.2.	Determinação da componente de ruído presente no sinal registado	66
4.8.3.	Registo eletroencefálico	68

<i>Conclusão</i>	73
<i>Referências</i>	75
<i>Apêndices</i>	
<i>Apêndice A: Curvas de Eletropolimerização</i>	A1
<i>Apêndice B: Diagramas de Bode e Diagramas de Fase</i>	A3
<i>Apêndice C: Voltamogramas Cíclicos</i>	A7
<i>Apêndice D: Densidade espectral de potência do ruído para o fio de ouro sem revestimento</i>	A9

Capítulo I

Conceitos fundamentais acerca do registo da atividade cerebral

1.1. O Eletroencefalograma: história e evolução

O Eletroencefalograma (EEG) é o registo de potenciais elétricos produzidos pelo cérebro, geralmente menores que 300 μV . (Lopez-Gordo et al., 2014)

É, na atualidade, a técnica de imagiologia cerebral mais utilizada devido às várias vantagens que apresenta quando comparada a outras tecnologias como, por exemplo: excelente resolução temporal da atividade cerebral, tecnologia barata e que não requer muito espaço. O EEG é uma ferramenta útil no diagnóstico de epilepsia, no acompanhamento do paciente após um Acidente Vascular Cerebral (AVC), assim como muitas outras condições que podem afetar a função cerebral. Algumas áreas mais recentes de aplicação do EEG incluem o diagnóstico de distúrbios do sono, funções cognitivas como processos cerebrais envolvidos na tomada de decisão e interfaces cérebro-computador. Apesar dos vários avanços, ao longo dos anos, o registo de sinais eletroencefálicos constitui um importante desafio tecnológico, particularmente devido à transmissão do sinal na interface eletrodo-pele. (Mota et al., 2013)

Para além do diagnóstico de certas patologias já referidas, o EEG é uma ferramenta útil na monitorização do efeito de fármacos na atividade cerebral, como por exemplo, fármacos anestésicos. (Rampil, 1998)

O registo da atividade cerebral é alvo de estudo há muitas décadas. Em 1875, antes de existirem amplificadores eletrónicos adequados, Richard Caton publicou o primeiro documento acerca do registo de atividade elétrica cerebral espontânea, a partir do córtex cerebral de animais (coelhos e macacos). (Teplan, 2002) Apesar das suas conquistas, quem ficou conhecido como o inventor da eletroencefalografia foi Hans Berger. Em 1924, realizou o primeiro registo eletroencefalográfico em humanos tendo sido a primeira pessoa a utilizar o termo Eletroencefalograma para descrever os

potenciais cerebrais registados. Berger conseguiu medir atividade elétrica cerebral irregular e relativamente baixa (50 a 100 μ V). Observou os padrões resultantes e a sua variação no tempo. Notou que estas ondas cerebrais não eram totalmente aleatórias, comprovando a existência de periodicidades e regularidades. Sugeriu corretamente que a atividade cerebral varia consoante o estado do indivíduo, tal como certas condições patológicas. Estes estudos de Berger e o seu artigo original foram ignorados até que experiências similares foram realizadas e validadas, mais tarde, por investigadores britânicos. (Bronzino, 2000)

O conceito de ondas cerebrais não era aceite nem o estudo da atividade eletroencefálica. Tudo mudou, em Cambridge, após a publicação do artigo de Adrian e Matthews, em 1934, no qual verificavam as descobertas de Berger. Identificaram oscilações regulares entre 10 e 12 Hz a que chamaram: ritmo alfa. Descobriram que este ritmo desaparecia no estado de alerta ou quando o sujeito atentava num objeto. (Bronzino, 2000)

Apenas em 1949, com Moruzzi e Magoun, se formulou a base fisiológica para estes resultados: a influência de estímulos externos no córtex. Demonstrou-se a existência de vias distribuídas nos núcleos da formação reticular, no tronco cerebral, que podem ter uma influência ativadora no córtex cerebral. Este sistema de ativação reticular está envolvido em ações como: o ciclo de sono, o despertar, distinção entre estímulos relevantes e irrelevantes, sendo a sua principal função a ativação do córtex. (Bronzino, 2000; Teplan, 2002)

1.2. O Sistema Nervoso

O Sistema Nervoso é um dos mais complexos do organismo humano. Através de estruturas altamente organizadas e complexas está envolvido na maioria das funções orgânicas. Estas funções complexas incluem o processamento de informação, o reconhecimento de objetos, a comunicação, a locomoção e o desenvolvimento de processos cognitivos como a memória e a aprendizagem. É o sistema nervoso que permite a interação entre organismos e destes com o ambiente envolvente, através de complexas redes neuronais. (Brodal, 2010)

1.2.1. Estrutura e organização do Sistema Nervoso

O Sistema Nervoso é subdividido anatomicamente em Sistema Nervoso Central (SNC) e Sistema Nervoso Periférico (SNP) e funcionalmente em Sistema Nervoso Somático (SNS) e Sistema Nervoso Autónomo (SNA). O SNC é constituído pelo cérebro e pela medula espinhal, órgãos responsáveis pelo processamento e integração de informação. O SNP transporta mensagens neuronais entre o SNC e os recetores sensoriais e órgãos efetores através dos neurónios motores e sensoriais.

Pertencentes ao SNP, o SNS consiste nas estruturais neuronais responsáveis pelo controlo voluntário dos músculos e o SNA é composto pelas estruturas neuronais responsáveis pelo transporte e processamento dos estímulos sensoriais provenientes dos órgãos viscerais (por exemplo, sistema digestivo e cardiovascular). O SNA subdivide-se em sistema simpático e parassimpático, que permitem a adaptação do corpo humano a situações comuns e diárias. O sistema simpático, quando ativado, prepara o corpo para situações de emergência, enquanto o parassimpático regula o repouso e as funções vegetativas. (Brodal, 2010)

1.2.2. Células do Sistema Nervoso

O Sistema Nervoso é constituído por neurónios e células não neuronais. Os neurónios recebem estímulos e conduzem potenciais de ação. As células não neuronais são designadas por neuróglia, nevróglia ou células gliais e dão suporte e proteção aos neurónios. (Tate, Seeley, & Stephens, 2003)

Os neurónios são as unidades estruturais fundamentais do sistema nervoso, sendo constituídos pelo corpo celular onde ocorrem os processos necessários à sobrevivência e funcionamento da célula, por dendrites que recebem os estímulos e pelo axónio que transmite o impulso nervoso a outras células. Estes sinais alertam-nos para uma variedade de estímulos internos e externos e permitem ao organismo responder-lhes. (Asplund, Nyberg, & Inganas, 2010; Tate et al., 2003)

A nevróglia é bastante mais numerosa que os neurónios e constitui mais de metade do peso encefálico. Consiste no conjunto mais importante de células de suporte do SNC, participando na formação da barreira hematoencefálica (barreira de

permeabilidade entre o sangue e os neurónios), fagocitando substâncias estranhas, produzindo líquido cefalorraquidiano e formando bainhas de mielina em torno do axónio. Existem quatro tipos diferentes: astrócitos, células endoteliais, microglia e oligodendrócitos. (Tate et al., 2003)

1.2.3. Geração e transmissão de sinais elétricos

Os neurónios, quando ativados, geram correntes elétricas nas membranas celulares, variáveis no tempo. Existem dois tipos principais de ativação neuronal: a despolarização rápida das membranas celulares, que resultam num potencial de ação mediado pelas condutâncias iónicas dos iões e a ativação sináptica mediada por vários sistemas de neurotransmissores. O potencial de ação propaga-se ao longo da célula através do axónio e induz a libertação de neurotransmissores na sinapse para provocar a excitação do neurónio seguinte. (Asplund et al., 2010; Lopes da Silva, 2010)

Potencial de Ação e Potenciais Pós-Sinápticos

O potencial de ação consiste na rápida mudança do potencial membranar. O potencial intracelular passa de negativo a positivo e rapidamente (1 a 2 ms) retorna à negatividade intracelular de repouso. Assim, um impulso é gerado e tem a capacidade de se propagar ao longo do axónio e dendrites sem perder amplitude.

Relativamente aos potenciais pós-sinápticos (PPS), dois tipos devem ser distinguidos: o potencial pós-sináptico excitatório (PPSE) e o potencial pós-sináptico inibitório (PPSI), que dependem do tipo de neurotransmissor e recetor correspondente e das suas interações com canais iónicos específicos e/ou mensageiros intracelulares secundários.

Geralmente, ao nível da sinapse, no caso do PPSE, a corrente consiste no fluxo de iões positivos para o interior da célula. No caso do PPSI, são iões negativos para o interior da célula ou iões positivos para fora da célula. Assim, a corrente elétrica positiva é direcionada para o meio intracelular no caso de um PPSE e é direcionada do interior do neurónio para o exterior no caso de um PPSI. Em consequência dessas correntes sinápticas, um sorvedouro ativo é gerado no meio extracelular, no nível de

uma sinapse excitatória, enquanto no caso de uma sinapse inibitória ocorre uma fonte ativa.

Sendo que não existe acumulação de carga no meio, as correntes transmembranares que fluem para o interior ou exterior do neurónio, nos locais sinápticos ativos, são compensadas por correntes que fluem na direção oposta noutro local da membrana neuronal. Pode concluir-se que a atividade sináptica num determinado sítio da membrana do neurónio cria uma configuração fonte-sorvedouro no meio extracelular à volta dos neurónios. (Lopes da Silva, 2010)

Sincronização de sinais

Em condições normais, potenciais de ação conduzidos através de neurónios, no meio cortical, contribuem muito pouco para o potencial de superfície total. Os campos elétricos gerados por um único neurónio são difíceis de detetar devido à distância até ao escalpe e devido à pequena amplitude dos sinais. (Lopes da Silva, 2010; Rampil, 1998)

Existem muitos axónios no córtex com várias orientações relativamente à superfície e os potenciais de ação nestes neurónios são assíncronos e de curta duração. Consequentemente, a sua influência espacial e temporal para o potencial na superfície é insignificante.

No caso do o neurónio pós-sináptico atingir o limiar de despolarização, um potencial de ação é gerado. Contudo são os potenciais pós-sinápticos, e não os potenciais de ação em neurónios corticais, os responsáveis pela maioria da a atividade elétrica registada no escalpe. Tal deve-se à sua longa duração, por envolverem grandes áreas de superfície de membrana, por ocorrerem quase simultaneamente em milhares de células piramidais corticais e por existirem particularmente nas dendrites das células piramidais que são perpendiculares à superfície cortical. Estas propriedades permitem que todos os potenciais pós-sinápticos se somem efetivamente para serem detetáveis. Os potenciais de ação, não contribuem para o registo de potenciais do EEG de superfície, exceto durante eventos síncronos fisiológicos do sono ou anormais como, por exemplo, durante crises epiléticas.

As células piramidais do córtex cerebral têm orientação vertical, com as suas longas dendrites apicais posicionadas paralelamente. Mudanças de potencial numa parte

da célula relativamente a outra parte criam um campo de potencial e diferenças de potencial podem ser medidas na superfície cortical. A influência de um PPS específico depende do seu sinal: excitatório ou inibitório, e da sua distância relativamente ao eletrodo de registo. As ondas captadas no EEG são causadas pelo fluxo de corrente devido à soma da atividade dos PPSE e PPSI. (Clark, 2010)

É registada a diferença de potencial à superfície, que é uma medida da queda de potencial resultante entre o local da superfície e um eletrodo de referência posicionado numa zona não afetada pelo sinal que se quer medir. Se todos os corpos celulares e dendrites, das células corticais, estivessem dispostos aleatoriamente no meio cortical, a influência das correntes sinápticas seria zero. Assim, qualquer mudança elétrica registada na superfície, deve-se à organização e simetria de um conjunto de células localizadas no córtex. (Lopes da Silva, 2010)

1.2.4. Classificação das ondas cerebrais

A forma das ondas cerebrais é geralmente sinusoidal. Normalmente, são medidas pico-a-pico e variam entre 0,5 e 100 uV em amplitude - cerca de 100 vezes menor que os sinais electromiográficos. As ondas cerebrais foram caracterizadas em quatro grupos (Teplan, 2002) :

- Beta (>13Hz)
- Alfa (8-12Hz)
- Teta (4-8Hz)
- Delta (0,5-4Hz)

Podem observar-se os padrões característicos de cada tipo de ondas cerebrais na **Figura 1.1.**

Dependendo da região do cérebro identificam-se ritmos cerebrais diferentes. Tal significa que diferentes áreas do cérebro emitem ondas cerebrais com frequências diferentes. O sinal de EEG entre dois eletrodos posicionados no escalpe consiste em várias ondas com diferentes características.(Teplan, 2002)

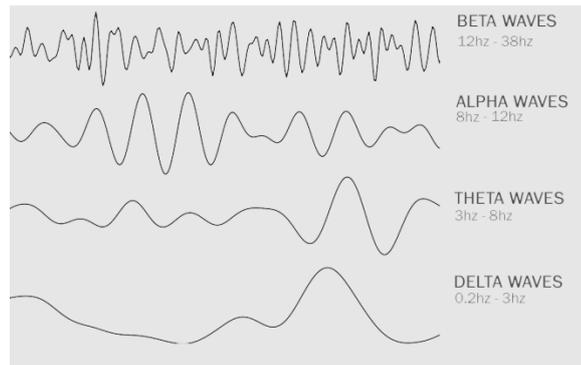


Figura 1.1. Sinais representativos dos ritmos das ondas cerebrais: Beta, Alfa, Teta e Delta e a respectiva gama de frequências. (Viscambio, 2016)

O ritmo alfa é um dos ritmos mais fáceis de registar sendo observável num sujeito acordado com os olhos fechados. Tem sido usado como uma medida indireta da ativação cerebral pois um aumento da atividade na sua gama de frequências pensa-se que está relacionado com uma diminuição da atividade funcional do córtex. Como este ritmo também só está presente em indivíduos acordados, é usado para estudar as primeiras fases do sono. (Goldman, Stern, Engel, & Cohen, 2012)

1.3. Aquisição dos sinais eletroencefálicos

A atividade elétrica registada provém maioritariamente da ativação dos neurónios piramidais no córtex cerebral, como já foi referido anteriormente. As diferenças nos potenciais elétricos são causadas pela soma dos potenciais pós-sinápticos, que provêm dos dipólos elétricos entre o corpo celular dos neurónios e as dendrites apicais.

Apenas grandes populações de neurónicos ativos podem gerar atividade elétrica suficiente para ser detetada e registada. Esses sinais elétricos de baixa amplitude são detetados pelos elétrodos. Posteriormente, são amplificados, processados e armazenados. (Teplan, 2002)

1.3.1. Bioelétrodos para o registo de sinais

Eléttodos extracelulares são uma das ferramentas mais importantes para estudar a função cerebral *in-vivo*. Os sinais neuronais registados fornecem muita informação valiosa acerca da função e comportamento cerebral. (Baranauskas et al., 2011)

A corrente é transportada, no interior do corpo humano, por iões e por eletrões nos dispositivos eletrónicos e nos cabos de ligação. O mecanismo de transferência de carga tem lugar na interface eléttodo-pele. Contudo, tanto a interface eléttodo-pele como a pele do próprio paciente originam potenciais e impedâncias que contribuem para a distorção do sinal ou afetam adversamente o procedimento eletroterapêutico. (Neuman, 2000)

A principal dificuldade na medição de sinais bioelétricos consiste no estabelecimento de um contacto bom e estável com a pele, que evita oscilações do potencial. Impedâncias mais elevadas conduzem à perda de energia do sinal. (Asplund et al., 2010)

1.3.2. Funcionamento do eléttodo

Quando um eléttodo metálico contacta com um eletrólito (em tecidos ou gel) ocorrem trocas ião-eletrão. Em condições de equilíbrio, a taxa a que os átomos metálicos perdem eletrões dando origem a iões que passam para a solução é balanceada pela taxa a que os iões metálicos em solução se depositam no eléttodo. A corrente numa direção é igual à corrente na direção oposta. Apesar da corrente efetiva através da interface do eléttodo ser zero, existe uma diferença de potencial entre o eléttodo e o eletrólito, que depende da posição do equilíbrio entre os dois processos.

O eléttodo padrão de hidrogénio (SHE – do inglês “*Standard Hydrogen Electrode*”) foi escolhido como sendo o eléttodo de referência universal. O seu potencial de meia-pilha (HCP – do inglês “*Half Cell Potential*”) é convencionalmente zero. Outros potenciais de interface metal-ião são medidos com base nesta referência.

Quando não flui corrente elétrica entre o eléttodo e a solução, o potencial observado deve ser o HCP. Se existir uma corrente, estes potenciais podem ser alterados.

A diferença entre o potencial de corrente zero e os potenciais medidos quando existe fluxo de corrente é conhecido como *over voltage* e é resultado de uma alteração na distribuição de cargas. Este efeito é conhecido como polarização e pode resultar numa diminuição da performance do eletrodo.

Nos eletrodos perfeitamente polarizáveis a corrente passa entre o eletrodo e a solução eletrolítica através da alteração da distribuição de cargas na solução junto ao eletrodo. Apesar destes materiais serem bons condutores, tornam-se polarizados e por isso é gerada uma voltagem inversa que é subtraída ao sinal real, diminuindo assim a voltagem observada e distorcendo o sinal. O movimento mecânico entre o eletrodo e o eletrólito reorganiza as cargas, gerando mudanças no potencial e ruído de baixa frequência. Assim, estes eletrodos não são adequados à transmissão de sinais eletroencefálicos de baixa frequência. Os eletrodos não-polarizáveis permitem a passagem livre de corrente através da interface eletrodo-eletrólito sem que haja alteração na distribuição de cargas na solução. Apesar de se descrever teoricamente estes eletrodos: polarizáveis e não-polarizáveis, não é possível produzi-los. É possível construir eletrodos cujas características se aproximam destes.

Eletrodos produzidos a partir de metais nobres, como a platina e o ouro, são frequentemente altamente polarizáveis. Se existir movimento do eletrodo relativamente à solução, a distribuição de cargas na solução adjacente ao eletrodo muda, induzindo uma alteração de potencial - artefacto de movimento no registo. Assim, para a maioria dos registos biomédicos, eletrodos não-polarizáveis têm preferência. Um exemplo de eletrodo não-polarizável é o eletrodo de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl).

Nos eletrodos metálicos revestidos com polímeros condutores formando filmes porosos a resposta à polarização é dependente da presença de uma capacidade de dupla camada. A rugosidade e porosidade da superfície oferecem vantagens valiosas consistindo num eletrodo inerte com uma baixa impedância na interface eletrodo-eletrólito. (E. McAdams, 2010)

1.3.3. Tipos de elétrodos

Os elétrodos distinguem-se em duas categorias: invasivos e não invasivos. Denominam-se invasivos quando são colocados em contacto direto com o córtex, e não invasivos quando são colocados no escalpe. Esta última categoria subdivide-se em elétrodos húmidos e secos.

Os elétrodos húmidos utilizam um gel eletrolítico que constitui um caminho condutor entre o eléctrodo e a pele. Os elétrodos secos consistem num metal benigno e não necessitam de gel entre o eléctrodo e a pele. (E. McAdams, 2010)

Vários tipos de materiais são usados na construção de elétrodos sendo maioritariamente produzidos por metais estáveis como: platina, ouro, irídio, titânio e aço inoxidável. Estes materiais são frequentemente aperfeiçoados através do revestimento com polímeros condutores e biocompatíveis. (Luo, Weaver, Zhou, Greenberg, & Cui, 2011)

O eléctrodo mais usado em aplicações de registos bioelétricos é o eléctrodo de Ag/AgCl. Quando em contacto com um eletrólito exibe um potencial de contacto estável e para eletrólitos contendo iões cloreto (como é o caso da maioria dos géis condutores), aproxima-se de um eléctrodo não-polarizável. Para além disso, é pouco suscetível ao ruído. (Huigen, 2001)

1.3.4. Técnica de aquisição do sinal

Os registos de atividade elétrica no escalpe consistem na medida de mudanças de potencial ao longo do tempo entre os dois elétrodos: o de registo e o referência (REF – do inglês “*Reference*”). Para além destes, é necessário um eléctrodo auxiliar auxiliares: o eléctrodo terra (GRD – do inglês “*Ground*”). (Lopez-Gordo et al., 2014)

A diferença de potencial é medida entre o eléctrodo de registo e o eléctrodo REF. O GRD subtrai a ambos o seu próprio potencial – prevenindo interferências comuns aos dois elétrodos. (Gamry, 2016c)

Na **Figura 1.2.** representam-se as correntes iónicas provenientes dos neurónios piramidais do córtex cerebral que são conduzidas até à superfície do escalpe e o amplificador diferencial. Os amplificadores devem fazer uma amplificação seletiva do sinal, rejeitando o ruído comum às duas entradas e sinais de interferência, garantindo a proteção de correntes de fuga do paciente do equipamento eletrónico. O processo biológico a ser monitorizado não deve ser influenciado pelo amplificador, em nenhum sentido. É importante que o sinal medido não seja distorcido, que esteja livre de interferências e de ruído. (Lopez-Gordo et al., 2014)

O computador é usado para o armazenamento dos sinais. Usando-se um conversor analógico-digital, cada amostra é convertida numa representação digital. A resolução do conversor é determinada pela amplitude mais baixa que pode ser amostrada. O recurso a filtros passa-banda ou *notch* é muito frequente no processamento anterior e posterior ao armazenamento do sinal, removendo frequências sem interesse. (Teplan, 2002)

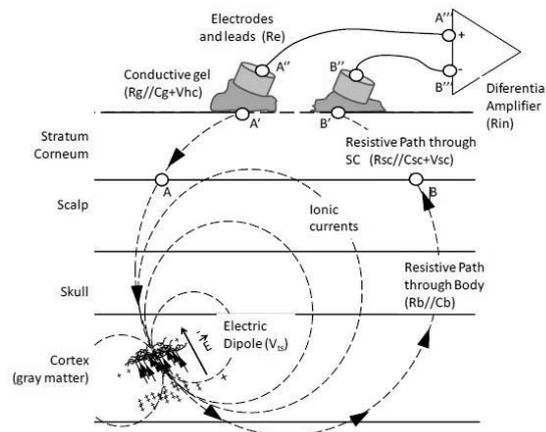


Figura 1.2. | Representação da aquisição de sinal dos sinais eletroencefálicos. (Lopez-Gordo et al., 2014)

1.3.5. *Sistema de posicionamento dos eléttodos*

Em 1958, a Federação Internacional de Eletroencefalografia e Neurofisiologia Clínica adotou um posicionamento padrão dos eléttodos: o Sistema de Posicionamento 10-20. (Klem et al., 1999)

Este sistema é baseado em meridianos que percorrem o escalpe baseados em posições-chave, dividindo o crânio em proporções de 10% e 20% do comprimento das distâncias entre essas posições: entre o *nasion* e *inion* para o plano lateral, e entre as orelhas direita e esquerda para o plano frontal. Na **Figura 1.3.**, pode observar-se as localizações do sistema que são classificadas de acordo com as áreas cerebrais: F (frontal), C (central), T (temporal), P (posterior) e O (occipital). (Teplan, 2002)

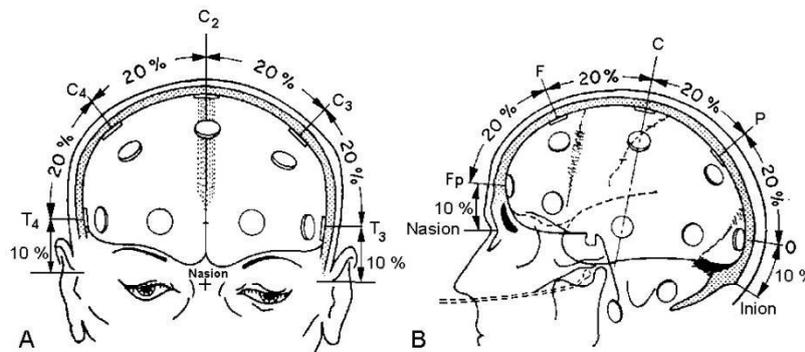


Figura 1.3. Posições dos eléttodos relativas ao sistema 10-20 no plano frontal (A) e no plano lateral (B). (Klem et al., 1999)

Sendo os potenciais elétricos definidos em relação ao eléttodo de referência, idealmente estes eléttodos devem ser afetados por alterações de voltagem da mesma forma que os eléttodos de registo, para que a atividade cerebral não específica seja subtraída ao sinal que se pretende registar. Para além disso, não devem registar sinais provenientes, por exemplo, da atividade cardíaca ou outro tipo de interferência pois seriam sinais subtraídos ao sinal registado nos eléttodos em estudo. Na literatura são descritas várias posições para o eléttodo REF: posição Cz, orelhas, ponta do nariz ou posição Fpz. Para o GRD a posição mais usada é a Fpz ou a orelha. (Teplan, 2002)

1.4. Ruído presente nos sinais eletroencefálicos

O registo de sinais, na superfície do corpo, contém uma componente de ruído substancial cuja magnitude varia entre 10-60 μV . Este ruído limita a obtenção de um sinal com boa qualidade, encontrando-se na gama de amplitudes dos sinais EEG (0,5-100 μV). (Huigen, Peper, & Grimbergen, 2002; Tautan et al., 2014; Teplan, 2002) A boa qualidade do eléctrodo extracelular expressa-se através da sua razão sinal-ruído (SNR - do inglês “*Signal-to-noise ratio*”), para a banda de frequências de interesse. (Baranauskas et al., 2011; Ludwig, Uram, Yang, Martin, & Kipke, 2006)

O ruído pode dividir-se em ruído de origem biológica ou origem não-biológica. O ruído de origem não-biológica inclui: o ruído fundamental do sistema elétrico, interferência eletromagnética e ruído externo. (Ludwig et al., 2006)

1.4.1. Ruído de origem não-biológica

Não é possível controlar o ruído fundamental inerente ao equipamento de registo. Contudo, é importante conhecer a influência que tem nos sinais. A interferência eletromagnética e o ruído externo podem ser mais controlados e reduzidos.

O ruído fundamental tem origem nos processos físicos inerentes ao processo de registo dos sinais, existindo três subtipos: ruído térmico, ruído de *shot* e ruído de Flicker. (Cutmore & James, 1999)

O ruído na interface electrodo-electrólito pode surgir de flutuações aleatórias dos transportadores de carga - electrões num material condutor ou iões num meio electrólito, que se denomina: Ruído Térmico. Estas flutuações podem ser causadas pelo efeito Browniano das partículas, reacções de oxidação/redução que ocorrem na interface eléctrodo-electrólito, pela deriva e difusão de iões carregados devido a gradientes de concentração. (Ludwig et al., 2006)

O ruído térmico (V_{th}) calcula-se através da Equação de Nyquist (**Equação 1.1.**):

$$V_{th}^2 = 4kTBR \text{ (V)} \quad \text{(Equação 1.1.)}$$

na qual, k é a constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} JK^{-1}$), T é a temperatura em Kelvin, B é a largura de banda em Hertz, e R é a resistência em Ohm. (Huigen et al., 2002)

O Ruído Térmico depende directamente da parte real da impedância da interface do eléctrodo. Esta impedância é inversamente proporcional à área do eléctrodo. Assim, quanto maior a área do eléctrodo, menor a parte real da impedância e consequentemente menor é o ruído térmico. (Baranauskas et al., 2011) Uma das implicações práticas deste ruído é a necessidade do arrefecimento dos componentes do sistema. Os amplificadores e o equipamento relacionado são normalmente acompanhados de sistemas de arrefecimento.

O Ruído de Shot é devido à presença de uma junção no circuito de registo na qual flutuações estocásticas de carga podem ocorrer. Tal junção existe entre o eléctrodo e a pele e entre vários componentes dos amplificadores. Geralmente, esta fonte de ruído é desprezível, abaixo de 1kHz. (Tautan et al., 2014) Conhecido também como ruído 1/f, o Ruído de Flicker varia inversamente com a frequência (f), particularmente abaixo de 1000 Hz. Os processos físicos envolvidos são fracamente entendidos. (Cutmore & James, 1999)

A interferência eletromagnética e o ruído externo têm origem em várias fontes de ruído que são resultado direto de sinais gerados no ambiente experimental. As fontes de ruído incluem: motores elétricos, fontes elétricas, equipamento informático, entre outros. Muitas destas fontes podem gerar impulsos transientes como por exemplo a interferência de 50 Hz e os respetivos harmónicos. Tipicamente, os sinais biológicos de interesse têm frequências abaixo dos 100 Hz assim interferências de na gama dos kHz não são um problema. Qualquer eléctrodo que se encontre mal conectado mas conectado ao amplificador pode atuar como uma antena para campos elétricos nos cabos que resultam em correntes magneticamente induzidas. (Cutmore & James, 1999)

1.4.2. Ruído de origem biológica

O ruído biológico consiste: no ruído térmico adicional gerado devido à impedância da pele e do tecidos cerebral, nos sinais neuronais de baixa amplitude emitidos por neurónios distantes o suficientes para não serem detetados como sinais, e por exemplo, na atividade muscular que gera ondas de elevada frequência. (Cutmore & James, 1999)

Capítulo II

O novo sensor: ideia e desenvolvimento

Ao longo dos anos e com a evolução da tecnologia desenvolveram-se vários tipos de elétrodos, para o estudo da atividade cerebral, desde dispositivos invasivos que penetram o tecido nervoso a elétrodos não-invasivos que apenas contactam com o escalpe. Uma das vantagens mais evidentes dos elétrodos invasivos é maior resolução do sinal devido à proximidade com as células nervosas. Contudo, a estes elétrodos está frequentemente associada a danificação dos tecidos nas proximidades do eléctrodo, como por exemplo, a formação de cicatrizes. Os elétrodos de superfície não contam com estas desvantagens. A amplitude dos sinais medidos é significativamente menor e por essa razão estão sujeitos a maior distorção e ruído eléctrico. Assim, é essencial estudar a performance dos materiais que constituem o eléctrodo, otimizando as suas características.

2.1. Elétrodos metálicos: vantagens e limitações

Um dos maiores desafios no registo eletroencefalográfico é a obtenção de sinais de baixa amplitude através da transmissão de sinais na interface eléctrodo/escalpe. (Mota et al., 2013) As superfícies dos elétrodos devem funcionar como uma interface com os neurónios, facilitando o transporte de carga do tecido iónico condutor para o eléctrodo. Para que se obtenham sinais com boa qualidade é necessário que o eléctrodo seja biocompatível, com baixa impedância eléctrica na interface com a pele e pouco suscetível ao ruído.

Os elétrodos Ag/AgCl são os elétrodos mais usados devido à sua performance: reprodutibilidade do potencial eléctrico, excelente razão sinal-ruído, confiabilidade e biocompatibilidade. (Mota et al., 2013)

Para além dos elétrodos de Ag/AgCl desenvolveram-se vários tipos de elétrodos de superfície à base de elementos metálicos como o ouro, a platina ou o titânio. O ouro é um material inerte bastante popular devido à sua elevada condutividade. (Arequeta-Robles, Woolley, Poole-Warren, Lovell, & Green, 2014)

Para melhorar as características dos elétrodos metálicos estudaram-se várias modificações na superfície do material. Nas últimas décadas, os polímeros condutores têm sido o foco de inúmeros estudos devido à sua excelente condutividade elétrica e iónica, facilidade de fabrico do revestimento através da eletropolimerização, elevada estabilidade e biocompatibilidade. (Gerwig et al., 2012; Kolarcik et al.)

2.2. O revestimento dos elétrodos metálicos com um composto de polímeros condutores e nanotubos de carbono

Os polímeros condutores mais populares são: o polipirrole (PPy), o politiofeno (PTh), e derivados do politiofeno como o poli(3,4-etilenodioxitiofeno) (PEDOT). A capacidade condutora destes materiais resulta das ligações duplas conjugadas assim como dos iões dopantes introduzidos na estrutura molecular. (Lota, Khomenko, & Frackowiak, 2004)

O PPy é o polímero condutor mais estudado para aplicações neuronais. Existem mais estudos realizados para confirmar a biocompatibilidade do PPy do que do PEDOT, apesar dos resultados relativamente ao PEDOT serem bastante promissores. A polimerização eletroquímica a partir de soluções aquosas também é facilitada para o PPy devido à solubilidade do monómero em água. (Asplund et al., 2010)

Contudo, a estrutura química do PPy apresenta defeitos na estrutura molecular obtendo-se uma estrutura desordenada, o que limita a resposta eletroquímica e tem como consequência a rutura do polímero em condições de oxidação excessiva. A estrutura do PEDOT confere ao polímero uma maior estabilidade. Foi demonstrado que o polímero PEDOT/PSS conservou 89% da sua atividade eletroquímica original após a aplicação de um potencial de 0,4 V durante 16 h enquanto o PPy/PSS perdeu 95% da sua atividade original. (Cui & Martin, 2003) Na Figura 2.1. representa-se a estrutura química do PPy e do PEDOT.

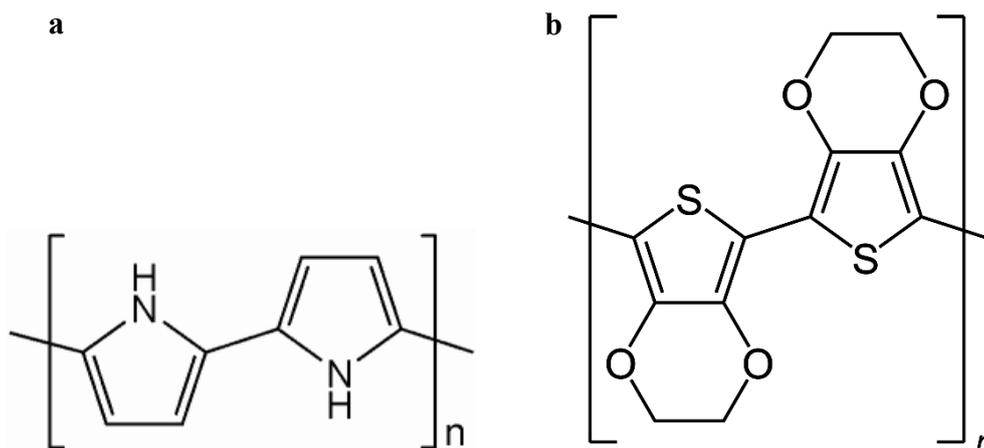


Figura 2.1. | Estrutura química do (a) PPy e do (b) PEDOT.

O PEDOT foi considerado um dos polímeros mais promissores nestas aplicações devido à sua organizada e bem definida estrutura química que conferem ao polímero elevada condutividade e estabilidade. Segundo a literatura, as propriedades elétricas dos eléctrodos podem ser melhoradas significativamente através do revestimento com PEDOT. (Castagnola et al., 2015; Cogan, 2008; Kolarcik et al.; Lota et al., 2004; Luo et al., 2011)

Os polímeros condutores revestem os metais por eletropolimerização. Neste caso, o objetivo é atingir o potencial de oxidação do monómero de interesse, que perde electrões formando-se radicais do monómero. Estes catiões são atraídos para a superfície do metal, aderindo a este. Os dopantes de carga negativa são incorporados no polímero durante o processo de crescimento da cadeia polimérica.

Quando se pretende que o material resultante seja apropriado para aplicações biomédicas, com algumas exceções, o solvente mais comum é a água. Se a solubilidade do monómero em água é muito baixa, como é o caso do 3,4-etileno-dioxitiofeno (EDOT), os surfatantes surgem como as opções mais viáveis para servir de contra-íão. Um surfatante bastante comum é o poliestireno sulfonato de sódio (NaPSS), e a sua presença facilita a eletropolimerização a partir de soluções aquosas. (Asplund et al., 2010) A natureza do contra-íão influencia as propriedades físicas do material formado, tais como: a rigidez, a estabilidade, a estrutura da superfície, a permeabilidade e a molhabilidade. O NaPSS é embebido no polímero de PEDOT formando um complexo de transferência de carga que resulta na oxidação do PEDOT e conseqüentemente numa

elevada condutividade elétrica, resultando numa redução significativa da impedância na interface eletrodo-pele. (Cogan, 2008)

Apesar da boa condutividade elétrica e capacidade elétrica, os polímeros condutores têm alguns pontos fracos devem ser colmatados: a baixa resistência mecânica, a estabilidade insuficiente e a fraca adesão do polímero a superfícies metálicas. Os nanotubos de carbono (CNTs – do inglês “*Carbon Nanotubes*”) constituem uma ótima solução devido às suas características. (Peng, Jin, & Cheng, 2007) Descobertos por Iijima e Ichihashi atraíram o interesse dos investigadores devido às suas aplicações no desenvolvimento de materiais avançados. Tal deve-se à sua estrutura única e propriedades mecânicas e elétricas. (Gerwig et al., 2012; Peng et al., 2007; Wu, Lin, & Liao, 2005)

Existem dois tipos principais de CNTs: de parede simples (SWCNTs – do inglês “*Single Wall Carbon Nanotube*”) que consistem numa folha de grafeno enrolada formando um tubo e de parede múltipla (MWCNTs – do inglês “*Multi Wall Carbon Nanotube*”) que são várias folhas de grafeno com diferentes diâmetros formando tubos concêntricos. As propriedades elétricas dos MWCNTs são semelhantes às dos SWCNTs pois a ligação entre os tubos é fraca. Devido ao preço reduzido, os MWCNTs são os nanotubos de carbono utilizados na maioria das aplicações. (Baughman, Zakhidov, & Heer, 2002)

Os CNTs são conhecidos pela sua extraordinária robustez, condutividade elétrica e estabilidade química. Portanto, poucos átomos e moléculas podem interagir diretamente com as suas paredes. Para além destas características, uma das vantagens dos MWCNTs é o seu tamanho reduzido que facilita a incorporação dos nanotubos em matrizes poliméricas sendo necessária apenas uma pequena quantidade de material. Assim, as excelentes propriedades mecânicas, elétricas e térmicas dos nanotubos de carbono fazem deste material um reforço ideal para compósitos de elevada performance. (Baughman et al., 2002; Kolarcik et al.; Luo et al., 2011)

As combinações com maior sucesso são polímeros condutores como o PEDOT e os CNTs. (Wu et al., 2005) Os compósitos PEDOT-CNT têm uma maior condutividade elétrica e estabilidade estrutural (menor delaminação), as propriedades elétricas dos eletrodos são melhores: maior capacidade e menor impedância, aumento substancial na

razão sinal-ruído (SNR) para os sensores de registo com CNTs. Castagnola et al. mostraram que os eléctrodos PEDOT-CNT melhoraram a SNR entre 0 e 250 Hz. Para além disso, os CNTs embebidos no polímero têm baixa toxicidade e não geram reacções imunitárias. (Arequeta-Robles et al., 2014; Kolarcik et al.) Para além disso, permite a diminuição do tamanho do eléctrodo pois formam uma estrutura porosa que aumenta a área efectiva sem aumentar a área geométrica do eléctrodo. (Keefer, Botterman, Romero, Rossi, & Gross, 2008; Mousavi, Bobacka, Lewenstam A., & Ivaska, 2009)

Os CNTs não funcionalizados são insolúveis em água. Recorre-se a MWCNTs funcionalizados com grupos carboxilo (MWCNT-COOH – do inglês “*Carboxylic acid functionalized multiwall carbon nanotube*”), como se representa na **Figura 2.2**. A funcionalização de CNTs tem sido bastante estudada para facilitar a adição de grupos químicos à superfície dos nanotubos através de ligações covalentes. Entre os vários grupos destaca-se o carboxílico devido à presença do átomo de carbono que se liga covalentemente aos átomos de carbono do nanotubo, tornando fácil a remoção do grupo OH se for necessário, podendo anexar-se outros grupos ou moléculas. (Filho & Fagan, 2007)

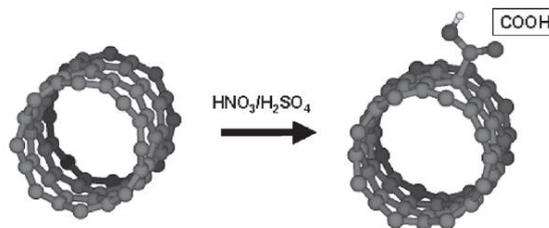


Figura 2.2. | Funcionalização dos nanotubos de carbono com ácido carboxílico. (Filho & Fagan, 2007)

2.3. O sensor

O novo sensor consiste num fio de ouro revestido com um polímero de PEDOT dopado com MWCNT-COOH: PEDOT-CNT, denominação escolhida para simplificação. Este fio é enrolado numa forma helicoidal, encaixando-se numa cápsula. Esta serve de reservatório para o gel que fará o contacto com a pele, como se observa na **Figura 2.3**.

O fio encontra-se protegido pela cápsula, prevenindo-se a danificação do polímero devido ao manuseamento. O gel fará a ponte entre o fio condutor e o escalpe

não havendo contacto entre estes. O posicionamento do sensor no escalpe é facilitado com auxílio de uma touca.

Todos os materiais usados para a construção deste sensor são biocompatíveis e estáveis, o que se aplica também ao gel usado para fazer o contacto entre o eléctrodo e o escalpe. Desta forma, em ensaios *in vivo*, estes sensores não comportam qualquer risco para o paciente, sendo capazes de contactar com o escalpe através do gel e consequentemente registar atividade cerebral.

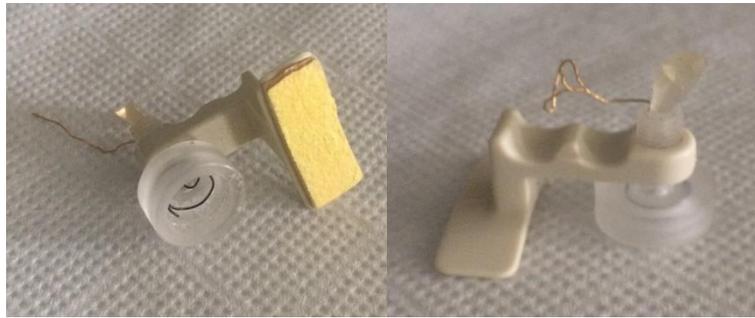


Figura 2.3. Sensor PEDOT-CNT desenvolvido para o registo eletroencefálico.

Capítulo III

Materiais e Métodos

Este capítulo é dedicado à descrição de todas as técnicas usadas no desenvolvimento do sensor, análise eletroquímica, mecânica, morfológica, topográfica, química, de ruído elétrico e ensaios *in vivo*.

3.1. Os Materiais

O ouro é um material inerte que permite a passagem de corrente sem que seja afetado por esta. Assim, é um material adequado a ensaios eletroquímicos.

A eletropolimerização dos fios de ouro com 330 μm de diâmetro (Goodfellow metals, referência: AU005145) ocorre quando estes são imersos numa solução que contém: o monômero de interesse - EDOT (Sigma-Aldrich, referência: 483028) -, o contra-íon -NaPSS (30 % em água) (Sigma-Aldrich, referência: 434574) - e nanotubos de carbono de parede múltipla funcionalizados com grupos carboxilo (MWCNT-COOH) (Sigma-Aldrich, referência: 755125), sendo o diâmetro e o comprimento médio de 9,5 nm e 1,5 μm , respectivamente.

A eletropolimerização dos fios de ouro é realizada usando-se uma célula eletroquímica convencional de três elétrodos sendo o fio de ouro o elétrodo de trabalho, o fio de platina com 600 μm de diâmetro o contra-elétrodo e um elétrodo saturado de calomelano (SCE – do inglês “*Saturated Calomel Electrode*”) o elétrodo de referência.

3.2. Preparação das soluções

As soluções preparadas têm como objetivo o revestimento de fios de ouro com um polímero de PEDOT e com um compósito de PEDOT-CNT. Este último com três concentrações diferentes de NaPSS, EDOT e MWCNT-COOH:

(O) 1% NaPSS, 10 mM EDOT

(A) 1% NaPSS, 10 mM EDOT e 2 mg/ml de MWCNT-COOH

(B) 1% NaPSS, 10 mM EDOT e 1 mg/ml de MWCNT-COOH

(C) 1,5 % NaPSS, 10 mM EDOT e 1 mg/ml de MWCNT-COOH

A escolha das concentrações de EDOT e NaPSS baseou-se no trabalho de Bobacka et al., enquanto a concentração de nanotubos no estudo de Castagnola et al. Variou-se a concentração de NaPSS e de MWCNT-COOH para avaliar o efeito dessas alterações nas propriedades do polímero e conseqüentemente na superfície. A concentração de EDOT manteve-se constante pois segundo Cui et al. é a maior concentração possível de EDOT em água à temperatura ambiente.

O EDOT foi dissolvido numa solução com água destilada, num agitador magnético, até se observar uma solução homogénea (aproximadamente durante 45 minutos). Os MWCNT-COOH e o NaPSS foram colocados durante 90 minutos num sonicador, mantendo-se a temperatura (25°C) com um banho de gelo, até se observar uma solução com boa dispersão dos nanotubos, como é descrito por Castagnola et al.

A sonicação consiste na irradiação de ondas ultrassónicas, com frequências superiores a 20 kHz, numa amostra imersa em água. As ondas sonoras propagam-se no líquido provocando ciclos de elevada e baixa pressão. A baixa pressão formam-se bolhas no líquido que colapsam violentamente durante períodos de elevada pressão, conseqüentemente aumentando a temperatura. (Royal Society of Chemistry, 2016)

Posteriormente, misturam-se as duas soluções sendo colocada a solução final num agitador magnético durante 5 minutos para homogeneizar. Para além destas três soluções, foi também preparada uma solução de EDOT e NaPSS sem MWCNT-COOH, que dá origem ao filme de PEDOT.

Na **Figura 3.1.** pode observar-se as células eletroquímicas usadas na eletropolimerização do fio de ouro com o polímero PEDOT (A) e com o compósito PEDOT-CNT (B). A imagem (C) corresponde ao fio de ouro revestido com o filme de PEDOT-CNT.

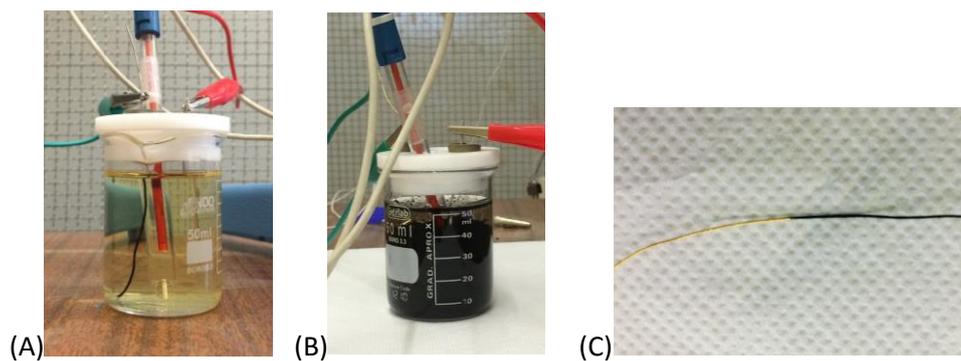


Figura 3.1. | Imagens das células eletroquímicas usadas para a eletropolimerização do fio de Au revestido com (A) PEDOT e (B) PEDOT-CNT. (C) Fio de ouro polimerizado com um filme de PEDOT-CNT

3.3. Limpeza dos fios de ouro

A limpeza eficiente dos fios de ouro garante uma boa adesão do polímero ao fio e influencia as propriedades do filme após a sua eletropolimerização, como por exemplo a resistência à delaminação.

Foram testados três métodos de limpeza dos fios. O método mais simples consiste na limpeza cuidadosa e minuciosa do fio com um disco de lixa de carboneto de silício de granulometria 1000. Seguidamente, o fio é submetido ao processo de sonicação durante aproximadamente 10 minutos.

O segundo método caracteriza-se pela realização de 10 ciclos de Voltametria Cíclica (CV – do inglês “*Cyclic Voltammetry*”)¹ estando o eletrodo submerso numa solução 50 mM de ácido sulfúrico (H_2SO_4) (Sigma-Aldrich, referência: 320501). A voltametria cíclica foi efetuada através do potencióstato modelo G300 (Gamry, USA), utilizando o software PHE 200 (Gamry, USA). O potencial aplicado varia entre -0,4 e 1,6 V, com uma velocidade de varrimento de 100 mV/s. (Fischer et al., 2009)

O terceiro método consiste na preparação de uma solução piranha: 7 partes de ácido sulfúrico e 3 partes de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) (Sigma-Aldrich, referência: H1009). Estas soluções reagem violentamente com vários materiais orgânicos e devem ser manipuladas cuidadosamente e em condições adequadas. Os fios de ouro são

¹ Explicação aprofundada no subcapítulo 3.5.2.

colocados nesta solução durante 10 minutos. Quando retirados da solução passam-se várias vezes por água destilada. Posteriormente, são colocados numa solução de água destilada num sonicador durante 10 minutos.(Freitas et al., 2014)

3.4. Método de eletropolimerização dos filmes

A técnica mais comum para o revestimento de um metal com um polímero condutor é a eletropolimerização. É um método direto e simples para a obtenção de revestimentos condutores em substratos condutores, sendo o material resultante insolúvel em água. A corrente é conduzida através de um eletrodo imerso numa solução contendo os monómeros de interesse e um contra-íão, resultando numa acumulação de cadeias poliméricas no eletrodo de trabalho devido aos radicais que se formam e aderem ao substrato metálico. Os dopantes de carga negativa são incorporados no processo, no caso do PEDOT: o NaPSS (**Figura 3.2.**), e no caso do PEDOT-CNT: o NaPSS e o MWCNT-COOH. (Asplund et al., 2010)

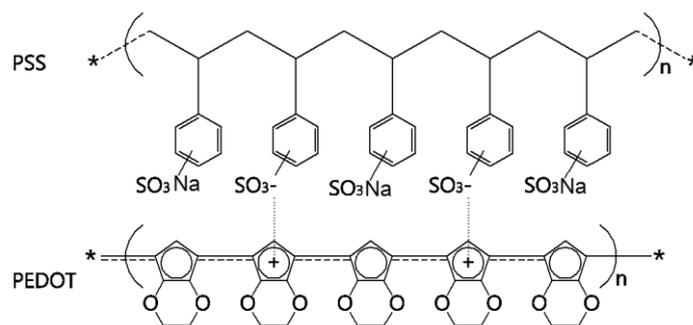


Figura 3.2. | Reação de eletropolimerização dos filmes de PEDOT:NaPSS.

Os filmes de PEDOT-CNT foram eletrodepositados em fios de Au usando um através do potencióstato G 300 e o software PHE 200. Uma célula convencional de três eletrodos sendo o eletrodo de referência o SCE, o fio de platina serviu de contra-eletrodo e o fio de ouro de eletrodo de trabalho, como foi referido.

A partir da literatura escolheu-se como espessura para os filmes produzidos: 500 nm. (Gerwig et al., 2012) Sabendo-se a densidade do polímero, o comprimento e a área do fio a revestir calcula-se a massa de polímero resultante.

A partir da Lei da Eletrólise de Faraday (**Equação 3.1.**), calculou-se a quantidade de carga transferida durante o processo de deposição eletroquímico (Q):

$$m(g) = \frac{Q M}{F z} \quad \text{(Equação 3.1.)}$$

na qual, m corresponde à quantidade de produto gerado em gramas, z ao número de elétrons gerados por monómero (2,25 elétrons/monómero), M é a massa molar do monómero (142,2 g/mol) e F é a constante de Faraday (96485 C/mol).(Jensen, 2012)

Os parâmetros a definir no processo de eletropolimerização são: corrente de deposição (i_d) e o tempo de deposição (t_d), para a mesma carga transferida calculada: $76,33 \text{ mC/cm}^2$.

As densidades de corrente aplicadas foram: 200, 100 e $50 \mu\text{A/cm}^2$.(Bobacka et al., 2000) Para maiores densidades de corrente, a corrente aplicada será maior e o tempo de deposição menor. Na **Tabela 3.1.** representam-se os valores de densidade de corrente aplicados, os tempos e correntes de deposição correspondentes a cada uma.

Tabela 3.1. | Condições de eletropolimerização para a obtenção de um filme com $0,5 \mu\text{m}$ de espessura.

Espessura (μm)	Massa (ug)	Q_d (mC/cm^2)	j_d ($\mu\text{A/cm}^2$)	t_d (s)	i_d (μA)
0,5	20,75	76,33	200	381	83
			100	763	42
			50	1526	21

Na **Tabela 3.2.** representam-se os diferentes tipos de superfícies obtidos a partir das soluções A, B e C com MWCNT-COOH, NaPSS e EDOT. A designação escolhida para as diferentes superfícies baseia-se na solução que lhes dá origem e à respetiva concentração dos reagentes, sendo a forma geral:

$$x(\text{Concentração de MWCNT - COOH})_y(\text{Concentração de surfactante})_z(\text{Densidade de corrente})$$

As superfícies para as diferentes densidades de corrente (200, 100 e 50 $\mu A/cm^2$) são as seguintes, para a solução:

- A: 2CNT_1S_i200, 2CNT_1S_i100 e 2CNT_1S_i50;
- B: 1CNT_1S_i200, 1CNT_1S_i100 e 1CNT_1S_i50;
- C: 1CNT_1,5S_i200, 1CNT_1,5S_i100 e 1CNT_1,5S_i50.

Tabela 3.2. | Concentração dos reagentes químicos das diferentes soluções e que dão origem a diferentes tipos de superfícies.

Superfície	Formulação Química			j_d ($\mu A/cm^2$)
	MWCNT-COOH (mg/ml)	NaPSS (%)	EDOT (mM)	
0CNT_1S_i200	0	1%	10	200
2CNT_1S_i200				200
2CNT_1S_i100	2	1%	10	100
2CNT_1S_i50				50
1CNT_1S_i200				200
1CNT_1S_i100	1	1%	10	100
1CNT_1S_i50				50
1CNT_1,5S_i200				200
1CNT_1,5S_i100	1	1,5%	10	100
1CNT_1,5S_i50				50

3.5. Técnicas de caracterização eletroquímica dos eletrodos

3.5.1. Espectroscopia de Impedância

A Espectroscopia de Impedância (EIS – do inglês “*Electrochemical Impedance Spectroscopy*”) é uma técnica que consiste na medição da impedância elétrica. A impedância é uma quantidade complexa que pode ser representada pela sua amplitude e pelo ângulo da fase.

Aplica-se um potencial de excitação sinusoidal de baixa amplitude, para que não se perturbe o sistema. A resposta a este potencial é um sinal de corrente. A impedância é a medida da capacidade que um circuito possui de resistir aos fluxos de corrente elétrica. (Gamry, 2016a)

À medida que a parte imaginária da impedância aumenta, o ângulo da fase aumenta. Para um condensador, a impedância tem parte imaginária. Contudo, numa resistência a impedância é real, estando a corrente e voltagem em fase. Um elevado ângulo de fase, que se aproxime de 90° , indica que a impedância é predominantemente capacitiva, enquanto para ângulos de fase pequenos próximos de 0° , a impedância é resistiva. (Xiao, Cui, & Martin, 2004)

A medição é normalmente feita entre 1 Hz e 10^4 Hz e a magnitude do sinal de excitação é suficientemente baixa: 5 mV. O sinal de corrente contínua manteve-se 0 V. (Cui & Martin, 2003)

Estes ensaios podem ser realizados *in-vitro* ou *in-vivo*, para ambos os elétrodos: Ag/AgCl e PEDOT-CNT.

A instabilidade do potencial do eletrodo de trabalho durante estas medições pode afetar os resultados. Assim, antes da realização de qualquer ensaio foi medido o potencial do eletrodo em circuito aberto garantindo assim a estabilização do potencial. (Mansfeld, Sun, Hsu C., & Nagiub, 2001)

In-vitro

Num ensaio de EIS obtêm-se diferentes valores de impedância e ângulos de fase ao longo de uma gama de frequências. Estes valores podem ser representados num Diagrama de Bode e de Fase. No Diagrama de Bode é possível identificar, para as gamas de frequência de interesse, o valor da impedância do sistema, sendo a representação feita em coordenadas polares: magnitude $\log(|Z|)$ em função de $\log(f)$. No Diagrama de Fase representam-se os ângulos de fase em função do logaritmo da frequência. (Gamry, 2016a)

A montagem experimental usada é semelhante à da eletropolimerização dos filmes. Consiste numa célula eletroquímica de três elétrodos: eletrodo de trabalho – o

fio de ouro revestido com o polímero de PEDOT ou PEDOT-CNT, contra-elédrodo – fio de platina e o elédrodo de referência – SCE. A célula eletroquímica está representada na **Figura 3.3.**



Figura 3.3. Imagem da célula eletroquímica usada nos ensaios de caracterização dos elétrodos: EIS e CV².

Estes ensaios foram realizados usando o potencióstato G300 e o software EIS 300 (Gamry, USA), aplicando-se um pequeno sinal sinusoidal com 5 mV de amplitude, sendo a gama de frequências entre 10 mHz e 10 kHz. A solução consistiu em 10 mM de NaCl. Antes do início de cada ensaio, mediu-se o potencial em aberto do circuito para garantir a estabilidade do potencial.

Aplicou-se a técnica a todos as superfícies descritas na **Tabela 3.2.** o que permitiu a análise da impedância ao longo do espectro de frequências tendo em conta as diferentes concentrações de reagentes em cada solução e a densidade de corrente aplicada durante a eletropolimerização dos filmes.

In-vivo

A partir dos ensaios *in-vitro* estuda-se a impedância elétrica ao longo da banda de frequência de interesse dos elétrodos Ag/AgCl e PEDOT dopado com MWCNT-COOH (PEDOT-CNT) numa solução salina, de NaCl. Os ensaios *in-vivo* incluem a contribuição da pele para a impedância elétrica.

Tal como nos ensaios *in-vitro*, são colocados três elétrodos sobre a pele: de trabalho (Ag/AgCl ou PEDOT-CNT), contra-elédrodo (Ag/AgCl) e referência

² Técnica definida no subcapítulo 3.5.2.

(Ag/AgCl). A região de colocação dos eletrodos é na zona anterior da perna sobre a tíbia, onde existe pouco músculo evitando-se ruído adicional proveniente de sinais eletromiográficos. Determina-se assim a impedância elétrica na banda de frequências estabelecida, para os eletrodos em contacto com a pele.

3.5.2. Voltametria Cíclica

A Voltametria Cíclica (CV) consiste na aplicação de um potencial a um eletrodo de trabalho, que se encontra mergulhado numa solução salina (10 mM NaCl), em relação a um eletrodo de referência. Esta técnica realiza-se numa célula eletroquímica de três eletrodos: de trabalho (PEDOT ou PEDOT-CNT), contra-eletrodo (Platina) e referência (SCE). O potencial do eletrodo de trabalho é medido relativamente ao eletrodo de referência – SCE. Mede-se a corrente resultante que circula entre o eletrodo de trabalho e o contra-eletrodo. O potencial aplicado entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência pode ser considerado um sinal de excitação e a corrente resultante um sinal de resposta. (Cogan, 2008; Gamry, 2016e)

O potencial varia ciclicamente entre dois valores, conduzindo a reações no eletrodo de teste. Por isso, a CV permite a identificação da presença de reações eletroquímicas e dá informação acerca da sua reversibilidade, da quantidade de material eletroativo e da estabilidade do eletrodo. A CV depende da taxa de amostragem, da área geométrica do eletrodo e da rugosidade do material. Todos os parâmetros foram mantidos para os diferentes ensaios evitando a introdução de variáveis que comprometessem a comparação dos voltamogramas. (Cogan, 2008)

Estes ensaios foram realizados usando o potencióstato G 300 e o software EIS 300. O potencial aplicado variou entre -0,5 V e 0,5 V, sendo a taxa de amostragem 100 mV/s, medindo-se inicialmente o potencial de circuito aberto e iniciando o ciclo no sentido positivo. A capacidade é a grandeza que determina a capacidade de acumular energia elétrica. Para cada ensaio foi calculada através do integral no tempo de um ciclo completo. (Castagnola et al., 2015)

3.6. *Análise da superfície e ensaio de adesão do filme*

3.6.1. *Microscopia Eletrónica de Varrimento*

A microscopia eletrónica de varrimento (SEM – do inglês “*Scanning Electron Microscopy*”) permite a determinação da espessura de filmes finos, a análise da microestrutura, identificação de defeitos e impurezas, corrosão e fraturas.(Universidade do Minho, 2014)

Esta técnica consiste na interação entre um feixe de eletrões incidentes e a amostra resultando em diferentes tipos de sinais elétricos emitidos da superfície a partir dos quais se obtém informação acerca da morfologia e composição química, como se representa na **Figura 3.4.** (Swapp, 2016) (Universidade do Minho, 2014)

Os eletrões são acelerados por uma tensão de 10 kV colidindo com a amostra. Da interação eletrões-amostra resultam vários tipos de sinais elétricos que são coletados, processados e que permitem a formação de uma imagem descritiva da superfície do material.(Universidade do Minho, 2014)

Os sinais resultantes da interação eletrão-amostra são de vários tipos, sendo os eletrões secundários e eletrões retrodifundidos os sinais maior importância na técnica de SEM. (Swapp, 2016)

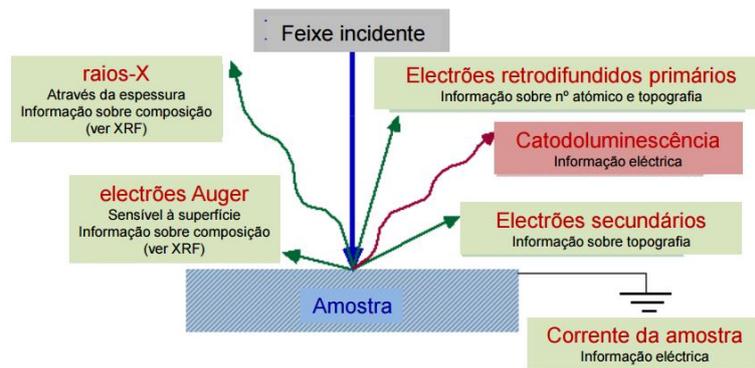


Figura 3.4. | Esquema explicativo sobre a radiação incidente na amostra, a interação entre os eletrões e a amostra e a radiação resultante. (Departamento de Física., 2009)

As amostras devem satisfazer as seguintes condições para serem caracterizadas por microscopia eletrónica: boa condutividade elétrica superficial, estabilidade física e química.(Universidade do Minho, 2014)

Em amostras não condutoras existe um aumento de cargas positivas na sua superfície devido à emissão de eletrões secundários. Estas cargas defletem os eletrões em direção ao detetor dando origem a uma imagem desfocada. Por essa razão, quando a amostra não é condutora deve ser revestida com um filme metálico, normalmente Au/Pd que torna a superfície condutora.(Departamento de Física., 2009)

Estes exames foram realizados utilizando o Microscópio Eletrónico de Varrimento, de alta resolução (Schottky): Fei Quanta 400 FEG ESEM/EDAX Genesis X4M. As amostras foram revestidas com um filme fino de Au/Pd, por pulverização catódica, utilizando o equipamento SPI Modulo Sputter Coater, durante 50 segundos e com uma corrente aplicada de 15 mA. A tensão de aceleração do feixe foi de 10 kV.

Esta caracterização permitiu a observação e a comparação das diferentes morfologias superficiais dos filmes assim como das suas secções transversais.

3.6.2. Espectroscopia por dispersão de energia

A técnica de espectroscopia por dispersão de energia (EDS – do inglês “*Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy*”) é realizada em combinação com o SEM e permite uma análise semi-quantitativa dos elementos químicos na superfície dos materiais. (Heath, 2015)

Quando os eletrões excitados retornam a níveis de energia mais baixos emitem raios X com um comprimento de onda específico que está relacionado com a diferença entre os níveis de energia dos eletrões dum determinado elemento. São produzidos raios X característicos de cada elemento. Para um determinado ponto da amostra é possível, portanto, identificar os elementos aí presentes e a sua quantidade relativa. (Heath, 2015; Swapp, 2016)

Estes ensaios foram realizados utilizando o mesmo equipamento que nos ensaios de SEM: Fei Quanta 400 FEG ESEM/EDAX Genesis X4M (**Figura 3.5.**).



Figura 3.5. Equipamento Fei Quanta 400 FEG ESEM/EDAX Genesis X4M situado no Centro de Materiais da Universidade do Porto.

3.6.3. Microscopia de Força Atômica

A Microscopia de Força Atômica (AFM – do inglês “*Atomic Force Microscopy*”) baseia-se no varrimento da amostra por um *cantilever* com uma ponta que interage com a amostra. A ponta é sensível a diferentes tipos de forças, o que permite a obtenção de informação acerca das propriedades físicas, mecânicas, magnéticas e elétricas das superfícies para além das imagens topográficas. (Binnig & Quate, 1986)

O *cantilever* é flexível e de massa desprezável e com o auxílio de um tubo piezoelétrico, a ponta consegue deslocar-se nas três direções do espaço. Um feixe laser que incide no *cantilever* é refletido para o detetor sendo possível medir as deflexões resultantes da variação das forças ao longo do varrimento. (Binnig & Quate, 1986; Schmitz, Schreiner, Friedbacher, & Grasserbauer, 1997)

Este microscópio pode funcionar em três modos: contacto, de não-contacto ou *tapping* ou intermitente. O primeiro consiste no contacto permanente entre a ponta e a amostra, medindo forças repulsivas. No modo de não-contacto existe uma distância entre a ponta e a amostra. O modo *tapping* foi o adotado para estes ensaios e consiste num contacto intermitente com a amostra, isto é, o *cantilever* oscila fazendo com que a ponte toque descontinuadamente a superfície da amostra. A amplitude de vibração é constante, por isso, sempre que há contacto entre a ponta e a superfície, a amplitude sofre um desvio que serve de sinal de *feedback*. (Schmitz et al., 1997)

Este modo permite a obtenção de imagens topográficas e de fase. Esta última permite a identificação de materiais diferentes presentes na amostra, pois resulta dos contrastes associados às diferenças de fase induzidas na oscilação da ponta devido à variação das propriedades dos materiais constituintes da superfície.

O equipamento utilizado foi o modelo di Innova (Veeco Instruments Inc, USA) (**Figura 3.6.**). Foram realizados varrimentos de $10 \times 10 \mu\text{m}$, $5 \times 5 \mu\text{m}$ e $2 \times 2 \mu\text{m}$ com resolução de 512 linhas e frequência variável 0,6 - 0,8Hz em modo intermitente. Os dados recolhidos foram analisados com recurso ao programa *Gwyddion*.



Figura 3.6. | Microscópio de Força Atómica: modelo di Innova da empresa Veeco situado no Centro de Engenharia Mecânica da Universidade de Coimbra.

3.6.4. Ensaio de adesão do filme: teste da fita-cola

Alguns autores provaram que os polímeros de PEDOT dopados com CNT exibiam uma maior adesão e estabilidade que os polímeros de PEDOT. (Arequeta-Robles et al., 2014; Gerwig et al., 2012) Assim, é relevante analisar mecanicamente a adesão do filme.

Colocou-se em ambos os fios polimerizados: PEDOT e PEDOT-CNT, um pedaço de fita-cola tradicional, posteriormente retirada. Não é exercida qualquer força na aplicação da fita-cola. Esta é retirada lentamente fazendo um ângulo de 45° com o fio.

Estudaram-se as características eletroquímicas de ambos através dos métodos de EIS e CV, antes e depois da aplicação da fita-cola.

3.7. O ruído elétrico dos elétrodos

É importante garantir a reprodutibilidade das superfícies com as mesmas características e estudar a sua suscetibilidade ao ruído. A partir do software Gamry ESA 410 Data Acquisition faz-se a medição do ruído entre dois fios polimerizados a partir da mesma solução e densidade de corrente. Usa-se uma solução de 10 mM de NaCl como eletrólito.

A partir de algoritmos desenvolvidos no Matlab, obtém-se o valor RMS, o declive médio, e a densidade espectral de potência (PSD – do inglês “*Power Spectral Density*”) do ruído para cada uma das superfícies. Assim, é possível analisar a suscetibilidade ao ruído para cada superfície.

3.8. Determinação do ruído elétrico presente no sinal eletroencefálico

Um registo fisiológico consiste numa série de voltagens. O ruído é definido como um conjunto de componentes não desejados num sinal, enquanto o sinal é um conjunto de componentes que se deseja isolar e quantificar. Dispositivos como os transdutores, elétrodos, amplificadores e outros equipamentos devem ser cuidadosamente estudados para garantir uma performance adequada. Assim, para além do registo eletroencefálico é necessário calcular o ruído total presente no sinal. (Cutmore & James, 1999)

Realizam-se vários ensaios de medição de ruído: do amplificador, *in-vivo*, *in-vitro* e ruído térmico (através do ensaio de EIS).

Através do curto-circuito das entradas do sistema de registo G 300 é possível medir o ruído do amplificador.

O ruído *in vitro* é medido provocando o curto-circuito, entre elétrodos do mesmo tipo, através da ligação pelo gel condutor numa tina. Utiliza-se o através o software ESA 410 Data Acquisition (Gamry, USA).

Para os ensaios *in-vivo*, a região de colocação dos elétrodos é na zona anterior da perna sobre a tibia, evitando-se ruído adicional proveniente de sinais eletromiográficos. Colocam-se dois elétrodos do mesmo tipo nesta região, a curta distância (2 cm) um do

outro, medindo-se o ruído através do software ESA 410 Data Acquisition. A limpeza da pele é feita com álcool e abradindo-se um pouco para retirar a gordura e camada de células mortas.

O ruído térmico é considerado ruído biológico, devido à resistência do corpo humano, e ruído não-biológico, pois também se associa aos componentes eletrônicos que constituem o sistema de medição. A partir das medições de EIS realizadas na perna do voluntário, descritas no subcapítulo 3.5.1., obtém-se o valor real da impedância e calcula-se o ruído térmico total.

Todos os ensaios de ruído são realizados no interior da gaiola de Faraday. Sabe-se que a repulsão eletrostática de cargas com o mesmo sinal leva à redistribuição de carga no exterior de um condutor, resultando num campo eletrostático neutro no condutor, ou seja, em qualquer espaço no interior do condutor. Assim, todo o ruído elétrico existindo no exterior da gaiola é desprezável. (Gamry, 2016b)

3.9. Testes de aquisição de sinais eletroencefálicos

Realizaram-se os ensaios na zona occipital do encéfalo (posição O2, do sistema 10-20). Tendo como objetivo a análise da performance e comparação dos dois elétrodos, no registo de sinais eletroencefálicos.

3.9.1. Os elétrodos, a montagem e o registo

Na aquisição EEG a preparação dos elétrodos e o seu posicionamento são processos que devem executados cuidadosamente para se garantir a fiabilidade dos resultados.

Os elétrodos de referência e o terra são elétrodos de Ag/AgCl, assim como o eléctrodo de trabalho que será comparado ao PEDOT-CNT. O potencial do eléctrodo de Ag/AgCl é determinado pela atividade do ião cloreto. O potencial do eléctrodo é bastante estável e baixo quando o eléctrodo é colocado numa solução contendo o ião cloreto como o principal anião. (E. T. McAdams, Lacknermeier, McLaughlin, & Macken, 1995) Por essa razão, antes de serem posicionados no escalpe, são colocados numa solução de 10 mM NaCl.

O eléctrodo PEDOT-CNT consiste num fio de ouro em forma helicoidal revestido com um polímero PEDOT dopado com MWCNT-COOH. Este fio é colocado numa cápsula que serve de reservatório para o eléctrodo e no qual será armazenado o gel condutor (Easycap, referência: LECTRON III-10) que permite o contacto com a pele. O gel é colocado 10 minutos antes do posicionamento do eléctrodo para garantir um potencial estável.

Quando um eléctrodo de superfície é aplicado na pele, esta passa a ser incluída no funcionamento do eléctrodo. Assim, a qualidade do eléctrodo depende das propriedades da pele do voluntário e da sua preparação. A interface gel-pele tem um papel muito importante nos processos de ruído.(Huigen et al., 2002) Dá-se, portanto, bastante importância à limpeza adequada da pele com álcool etílico sendo desejável uma pequena abrasão que permita a exclusão da camada de células mortas.

Os eléctrodos são posicionados o mais perto possível, sem que haja contacto entre eles, com uma distância de aproximadamente 2 cm entre os centros dos dois eléctrodos. Desta forma, registam-se as ondas provenientes da mesma região.

Todos os eléctrodos são colocados no escalpe auxiliados pelo gel que facilita o contacto com a pele. A quantidade de gel deve ser a suficiente para manter o contacto tendo em atenção que se deve usar a menor quantidade de gel possível para evitar curto-circuitos entre os dois eléctrodos em estudo já que se encontram posicionados a 2 cm de distância.

Para a deteção do ritmo alfa é necessário registar os sinal eletroencefálicos na zona occipital, por essa razão escolheu-se a posição O2. (Grozea, Voinescu, & Fazli, 2011) Para além da colocação dos eléctrodos de Ag/AgCl e PEDOT-CNT é necessário posicionar um eléctrodo de referência na posição Fp1 e um eléctrodo Terra na orelha.

O posicionamento e a manutenção dos eléctrodos na zona de estudo são auxiliados pelo uso de uma touca que segue o Sistema 10-20.

O registo dos sinais é garantido pelo amplificador eegoTM mini-series. Na **Figura 3.7.** pode observar-se a montagem realizada. Todos os eléctrodos são ligados às respectivas entradas do amplificador: os eléctrodos em estudo são ligados individualmente

aos canais O1 e O2, o eletrodo de referência ao canal REF, e o eletrodo terra é ligado ao canal GRD.

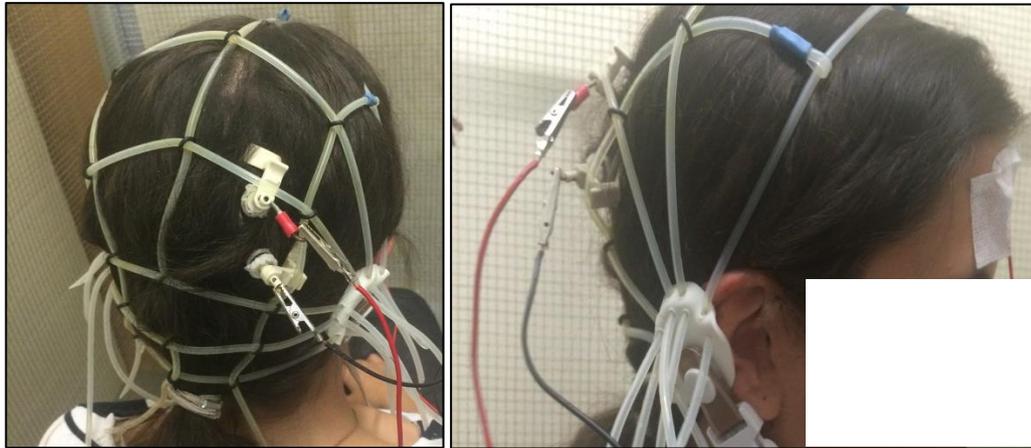


Figura 3.7. | Montagem experimental utilizada nos testes *in-vivo*.

Antes do registo, medem-se as impedâncias a partir do software do amplificador. O ensaio prossegue quando as impedâncias são inferiores a 20 k Ω , garantindo-se as condições necessárias para uma monitorização fiável. (Lopez-Gordo et al., 2014)

Vários tipos de episódios são registados: 60 segundos com os olhos fechados e 60 segundos com os olhos abertos. A taxa de amostragem é de 512 amostras/segundo.

3.9.2. *Processamento do sinal*

O processamento de sinal é útil para melhorar e ajudar na distinção de alguns aspectos dos sinais EEG, como por exemplo na detecção de ritmos cerebrais.

Os sinais analógicos são contínuos e podem ser medidos ou visualizados com vários graus de precisão. O EEG é um sinal analógico: a voltagem varia suavemente ao longo do tempo. Os sinais digitais são fundamentalmente diferentes pois representam pontos discretos no tempo e os seus valores são quantificáveis com uma determinada resolução.

Quando ocorre a passagem de sinal analógico para digital, tal acontece em

determinados pontos do sinal analógico sendo os restantes indeterminados. Este processo é conhecido como amostragem e na maioria das aplicações ocorre em intervalos de regulares. O recíproco do intervalo de amostragem é a taxa de amostragem expressa em hertz (Hz ou amostras por segundo). (Rampil, 1998) O processo de amostragem limita a frequência máxima que pode ser representada. Pelo menos duas amostras são necessárias em cada ciclo de uma determinada frequência para se registrar a amplitude do sinal, para esta frequência. Por isso, existe um limite de frequência de metade da taxa de amostragem, conhecido como o limite de Nyquist ou frequência de Nyquist. A taxa de amostragem deve ser pelo menos duas vezes maior que a frequência máxima de interesse no sinal.(Cottis, 2001)

Considera-se que os sinais EEG têm uma frequência máxima de 30 ou 40 Hz, contudo 70 Hz é um limite mais realista. Para além disso, outros sinais presentes no escalpe incluem *powerline interference* a 50 Hz e o electromiograma que, se presente, pode estender-se até 100 Hz. Para preverir a distorção por aliasing destes outros sinais presentes, muitos sistemas de EEG digitais usam uma taxa de amostragem superior a 250 Hz.(Rampil, 1998)

Para os ensaios in-vivo realizados na zona occipital do encéfalo, a amplificação do sinal é realizada pelo amplificador eegoTM mini-series, ocorrendo a conversão digital do sinal através do software do amplificador. Procede-se à análise dos sinais através do software Matlab (Mathworks Inc., MA), a partir de algoritmos desenvolvidos para o efeito.

No Matlab, é aplicado um filtro passa-banda Butterworth de ordem 20 cuja banda de frequências é de 0,5 Hz a 100 Hz.(Huigen et al., 2002) É através deste filtro que se garante a validade do Teorema de Nyquist: a frequência de amostragem é pelo menos o dobro da frequência máxima de interesse no sinal.(Rampil, 1998) Os primeiros 10 segundos do potencial de cada amostra medidos foram desprezados para evitar a inclusão de artefactos.

Parâmetros calculados para avaliação dos sinais

O valor quadrático médio (RMS – do inglês “*Root Mean Square*”), que é uma medida da tendência central dos dados:

$$RMS = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i^2} \quad \text{(Equação 3.2.)}$$

na qual, x_i corresponde ao valor da amplitude em cada ponto.

O desvio do valor quadrático médio (RMSD – do inglês “*Root Mean Square Deviation*”):

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (w_i - d_i)^2}{n}} \quad \text{(Equação 3.3.)}$$

na qual, w_i e d_i correspondem ao ponto i do sinal registado a partir do eléctrodo de referência (Ag/AgCl) e do eléctrodo de teste (Ag/AgCl ou PEDOT-CNT), respectivamente. (Mota et al., 2013) A partir do RMSD pode-se avaliar a semelhança ou disparidade entre as medições efetuadas no mesmo ensaio para os diferentes eléctrodos.

O coeficiente de Correlação de Spearman:

$$C_{Spearman} = \frac{\sum_i (w_i - \bar{w})(d_i - \bar{d})}{\sqrt{\sum_i (w_i - \bar{w})^2}} \quad \text{(Equação 3.4.)}$$

na qual, \bar{w} e \bar{d} correspondem à média dos pontos i do sinal registado a partir do eléctrodo de referência (Ag/AgCl) e do eléctrodo de teste (Ag/AgCl ou PEDOT-CNT), respectivamente. Este coeficiente é uma medida da intensidade relação entre as duas variáveis: os sinais obtidos para os dois eléctrodos, sendo o limite superior 1 que se traduz na igualdade entre os dois sinais. (Mota et al., 2013)

A transformada de Fourier e a densidade espectral de potência

O Teorema de Fourier afirma que qualquer onda finita e contínua pode ser descrita, com uma determinada precisão, como a soma de ondas seno e cosseno de amplitudes e fase específicas, como se representa na **Figura 3.8. (A)** Um sinal pode ser concetualizado como vários componentes de diferentes frequências – um espectro. Este espectro é simplesmente um histograma de amplitudes em função das frequências (**Figura 3.8. (B)**). (Rampil, 1998)

Uma boa analogia à análise de Fourier é o efeito da passagem de luz branca através de um prisma de vidro, criando-se um arco-íris. Cada cor representa uma frequência específica e a luminosidade relativa é uma medida da amplitude de energia para cada frequência. (Rampil, 1998)

A Transformada Discreta de Fourier (DFT – do inglês “*Discrete Fourier Transform*”) atua em dados digitalizados e foi definido um algoritmo eficiente para a sua computação: Transformada Rápida de Fourier (FFT – do inglês “*Fast Fourier Transform*”). Na **Figura 3.8.**, mostra-se um exemplo da transformada de Fourier.

O PSD é normalmente representado em função da frequência baseado na Transformada de Fourier. Usa-se o método de Welch que é desenvolvido obtendo janelas não-sobrepostas da onda, afinando nos extremos da janela, aplica-se a FFT para cada janela, faz-se a média e finalmente o quadrado do valor para converter a amplitude para unidades de potência. Permite o estudar como um transdutor ou amplificador responde a todas as frequências.(Cutmore & James, 1999)

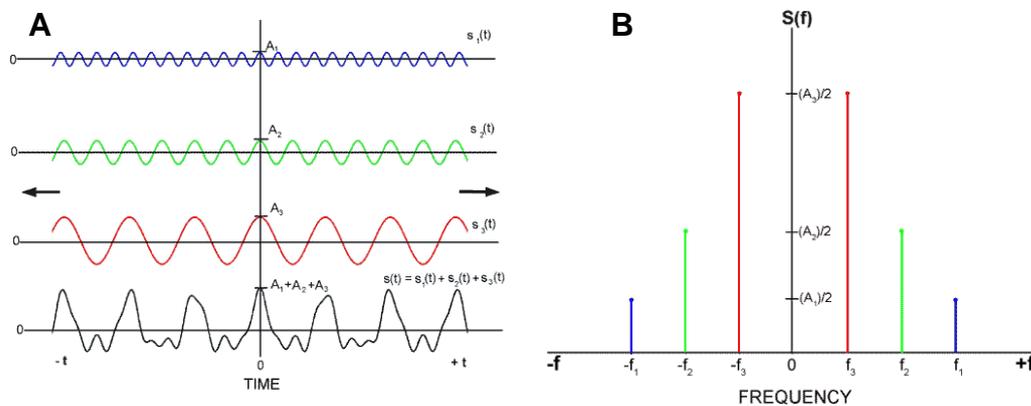


Figura 3.8. | Exemplo da Transformada de Fourier. (A) Três ondas cosseno com amplitudes A_1 , A_2 e A_3 combinam-se para formar um sinal composto com amplitude $A_1+A_2+A_3$. (B) A Transformada de Fourier da onda composta representada na figura A.

Cálculo da razão sinal-ruído

O parâmetro que determina a boa qualidade do sinal obtido é a SNR. Quando um indivíduo fecha os olhos, aparece um pico aproximadamente a 10 Hz no EEG. Este aumento observado na densidade espectral de potência é reversível com a abertura dos olhos. Este ritmo – o alfa – é sobreposto no sinal de fundo e ruído do EEG. A SNR pode ser calculada a partir da seguinte equação:

$$SNR = 10 \log_{10} \frac{\overline{PSD}_{banda\ de\ interesse}}{\overline{PSD}_{banda\ total\ do\ sinal-banda\ de\ interesse}} (dB) \quad \text{(Equação 3.5.)}$$

na qual, $\overline{PSD}_{banda\ de\ interesse}$ corresponde à média de todos os valores da potência da densidade espectral, da banda de interesse, e $\overline{PSD}_{banda\ total\ do\ sinal-banda\ de\ interesse}$ corresponde à média de todos os valores da potência da densidade espectral que não fazem parte da banda de interesse. (Tautan et al., 2014)

Capítulo IV

Apresentação e Discussão de Resultados

Este capítulo destina-se à apresentação e discussão dos resultados obtidos a partir da eletropolimerização de elétrodos de Au com PEDOT e PEDOT-CNT.

4.1. Limpeza dos fios de Ouro

Foram aplicados três métodos distintos para a limpeza dos fios de Au:

- (1) Limpeza 1: abrasão com lixa e sonicação
- (2) Limpeza 2: abrasão com lixa, sonicação e CV numa solução de 50 mM de ácido sulfúrico
- (3) Limpeza 3: solução piranha

Após a limpeza, procedeu-se à eletropolimerização formando superfícies 1CNT_1S_i200 e 1CNT_1S_i50 (**Tabela 3.2.**). Posteriormente foram sujeitos a testes de EIS e CV para avaliar as características eletroquímicas dos filmes, sendo a única variável a limpeza realizada.

Na **Figura 4.1.** representam-se os Diagramas de Bode e os voltamogramas cíclicos para as superfícies relativas às três limpezas efetuadas.

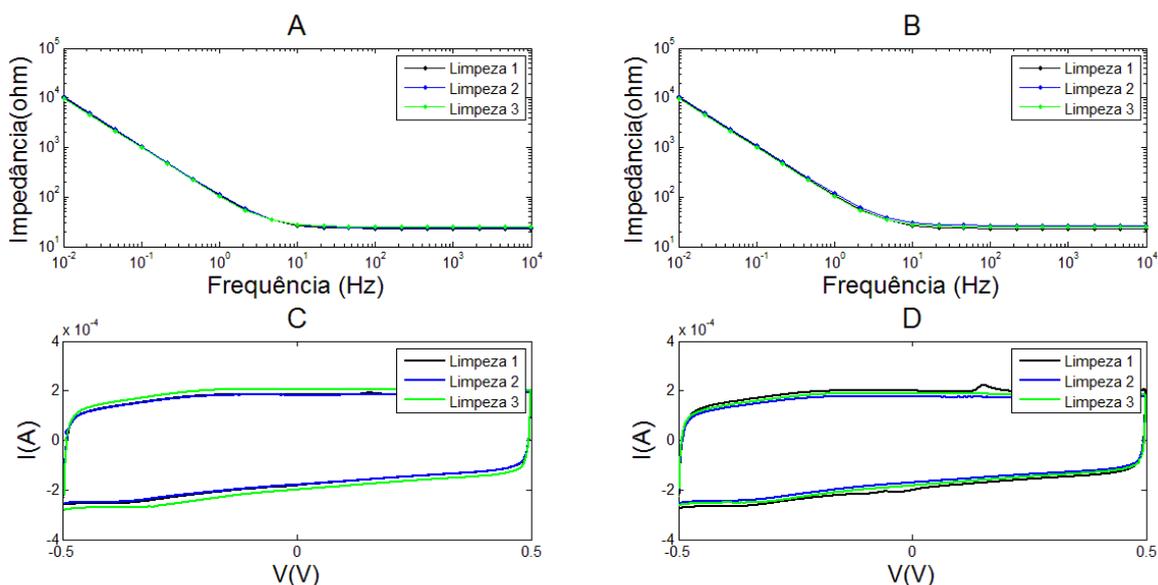


Figura 4.1. (A,B) Diagrama de Bode do espectro de impedâncias relativos à superfície 1CNT_1S_i200 e 1CNT_1S_i50, respetivamente. (C,D) Voltamogramas Cíclicos relativos à superfície 1CNT_1S_i200 e 1CNT_1S_i50, respetivamente. Para todas as figuras é possível comparar as alterações induzidas pelos diferentes métodos de limpeza do material.

Não se observam diferenças relevantes nos Diagramas de Bode, quer para uma densidade de corrente de 200 ou $50\mu A/cm^2$. O mesmo se aplica aos voltamogramas cíclicos. Assim, as três limpezas efectuadas dão origem a superfícies que permitem a adesão e formação do filme. Contudo, quando se realizaram as limpezas 2 e 3 sem abrasão com lixa o filme não aderiu. Conclui-se que a limpeza por abrasão é a técnica mais eficiente para a limpeza do fio. Para prevenir a introdução de erros e por não se observar diferenças relevantes entre as três limpezas adoptou-se a limpeza mais simples: Limpeza 1- lixa e sonicção.

4.2. Eletropolimerização dos filmes

Apesar de existirem outros métodos opcionais à polimerização eletroquímica, este método domina o campo das aplicações neuronais, por várias razões. Quando comparado à polimerização química, tem a vantagem de limitar o revestimento do eléctrodo de base. O polímero formado está fortemente ligado à superfície condutora subjacente. Para além disso, permite o controlo conveniente da topografia e espessura

do filme através de vários parâmetros do processo, como por exemplo: carga elétrica aplicada, a concentração do contra-íão, sistema galvanostático ou potenciostático. (Asplund et al., 2010)

Existem montagens de dois e quatro elétrodos. Contudo, a de três elétrodos é a montagem mais adequada para este tipo de ensaios pois as mudanças de potencial no eletrodo de trabalho são medidas independentemente das mudanças que ocorrem no contra-eletródo. Nas células eletroquímicas com dois elétrodos mede-se a queda de potencial total entre o eletrodo de trabalho, o eletrólito e o contra-eletródo. A medição isolada da queda de potencial no eletrodo de trabalho permite o estudo das reações específicas desse eletrodo com rigor. A montagem de quatro elétrodos é usada para medições com elevada precisão da resistência da solução ou da resistência da superfície de alguns materiais. (Gamry, 2016f)

Os elétrodos de referência mais comuns são o SCE, Ag/AgCl e Cu/CuSO₄ que mantêm um potencial eletroquímico bem definido e estável. Vários erros podem surgir em ensaios causados pela má escolha do eletrodo de referência. (Gamry, 2016d)

A eletropolimerização dos dois filmes de PEDOT e PEDOT-CNT foi efetuada de modo a manter constante a espessura do filme (500 nm). Sabendo-se a espessura do filme pretendido e a densidade do polímero é possível calcular a massa de polímero necessária tendo em conta a área do fio que será revestida.

Através da Lei da Eletrólise de Faraday (**Equação 3.1.** página 24) calcula-se a carga necessária no processo de eletropolimerização. Quanto maior a carga aplicada durante o processo, maior é o crescimento do polímero e até um determinado ponto pode relacionar-se com um aumento na rugosidade da superfície e uma diminuição abrupta da impedância. (Asplund et al., 2010)

Para a mesma carga, ou seja para a mesma espessura, varia-se a densidade de corrente. Sendo que todos os fios, em todos os ensaios, têm sensivelmente a mesma área varia-se a corrente aplicada e o tempo de deposição. Estas diferentes densidades de corrente são aplicadas às três soluções de PEDOT-CNT que dão origem a diferentes superfícies, como se representa na **Tabela 3.2.**

Na **Figura 4.2.** representam-se as curvas de eletropolimerização para as seguintes superfícies: 2CNT_1S_i200, 2CNT_1S_i100, 2CNT_1S_i50 e 0CNT_1S_i200. As restantes curvas podem ser consultadas no **Apêndice A**, e seguem a mesma tendências das representadas abaixo.

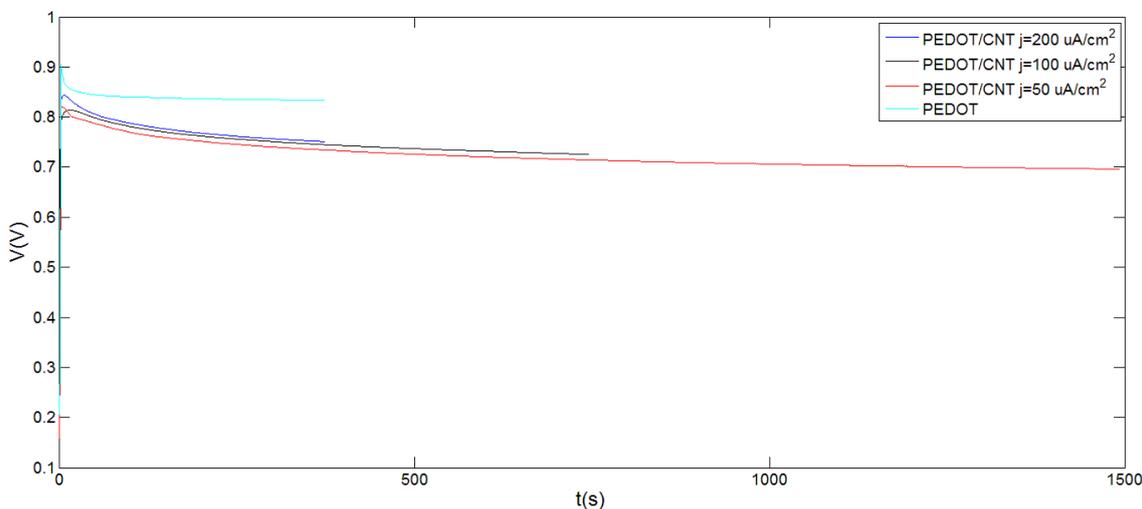


Figura 4.2. Registo do potencial do eléctrodo durante o processo de eletropolimerização para as superfícies 2CNT_1S_i200, 2CNT_1S_i100, 2CNT_1S_i50 e 0CNT_1S_i200, com a legenda: PEDOT/CNT $j=200 \mu A/cm^2$, PEDOT/CNT $j=100 \mu A/cm^2$, PEDOT/CNT $j=50 \mu A/cm^2$ e PEDOT.

Como é expectável pela literatura, os valores iniciais do potencial do eléctrodo de trabalho são aproximadamente 1 V, atingindo o potencial de oxidação do EDOT (aproximadamente 0,85V), e diminuem gradualmente com o tempo de deposição. A diminuição do potencial é um indicador da diminuição da impedância do eléctrodo durante a deposição do filme de PEDOT e PEDOT-CNT.(Cui & Martin, 2003; Xia, Masaki, Jianga, & Yanagida, 2007)

O potencial atingido pelo eléctrodo de trabalho, no caso da superfície de PEDOT, é superior aos potenciais atingidos para as soluções com MWCNT-COOH. Sabe-se que os nanotubos de carbono se comportam como dopantes na cadeia de PEDOT de carga positiva, tal como o contra-íão PSS^- , sendo ambos embebidos na formação do polímero.(Luo et al., 2011) Os nanotubos incorporados na matriz polimérica melhoram a condutividade do compósito reduzindo a queda de potencial entre o substrato e a interface eléctrodo-eletrólito, tal como foi comprovado por Gerwig et al.

4.3. Caracterização eletroquímica dos filmes

A técnica de EIS mede as mudanças na impedância eléctrica em função da frequência. Na CV observam-se mudanças na corrente que se devem ao potencial aplicado no eléctrodo de trabalho que varia entre valores pré-estabelecidos. Ambas as técnicas são usadas para verificar se a alteração do revestimento se traduz em alterações das propriedades eletroquímicas. (Keefer et al., 2008)

4.3.1. Espectroscopia de Impedância

De acordo com Gerwig et al., existe diminuição significativa dos valores de impedância para os fios revestidos com PEDOT e PEDOT-CNT relativamente ao mesmo fio sem revestimento. O fio de ouro foi sujeito à mesma técnica de limpeza que os fios sujeitos a eletropolimerização. Nas **Figuras 4.3. e 4.5.**, as diminuições confirmam-se. Tal deve-se à elevada condutividade eléctrica do polímero PEDOT e do compósito PEDOT-CNT e do aumento da área superficial relativamente ao fio sem revestimento.

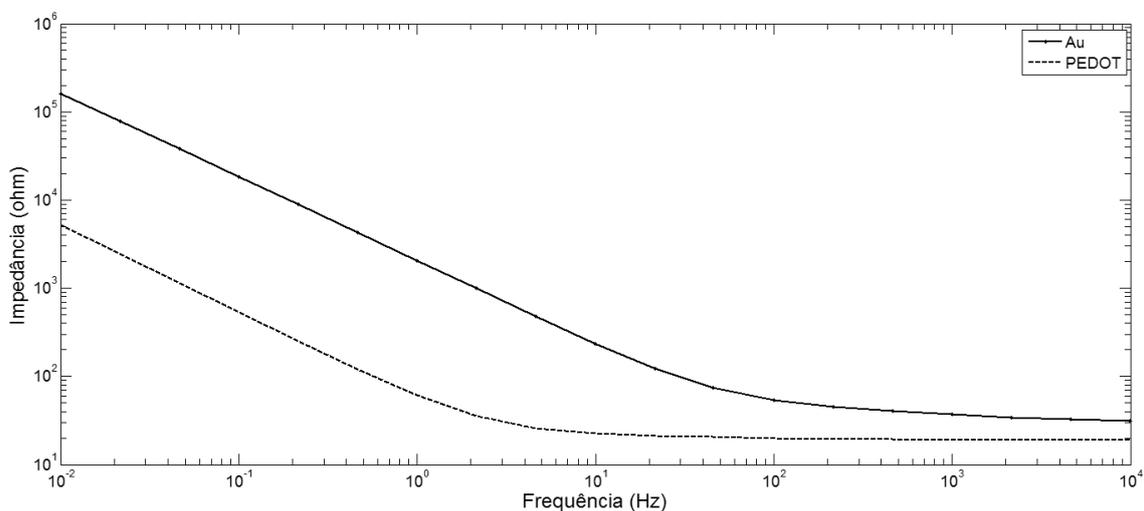


Figura 4.3. | Diagrama de Bode do espectro de impedâncias relativos à superfície 0CNT_1S_i200 e ao fio de Au sem revestimento.

Pode-se observar na **Figura 4.4.** que para frequências acima de 10 Hz, o filme de PEDOT apresenta um comportamento quase resistivo com o ângulo de fase a

aproximar-se dos 0° . Para frequências mais baixas, a impedância não é puramente resistiva sendo afetada pela capacidade de dupla camada da interface. O ouro sem revestimento tem comportamento resistivo a partir de frequências bastante mais altas (1000 Hz) que o eletrodo de PEDOT.

A impedância elétrica é constituída por uma parte real e por uma parte imaginária. Neste caso, a parte imaginária deve-se à capacidade de dupla camada na interface eletrodo-eletrólito. Sabe-se que a impedância dos condensadores é inversamente proporcional à capacidade elétrica. Logo, quanto menor a capacidade elétrica, maior a impedância relativa a essa dupla camada. Assim, pode explicar-se o comportamento capacitivo predominante do ouro, para uma gama de frequências bastante maior que a do PEDOT, pela sua capacidade elétrica significativamente menor, como se comprova a partir da Voltametria Cíclica.

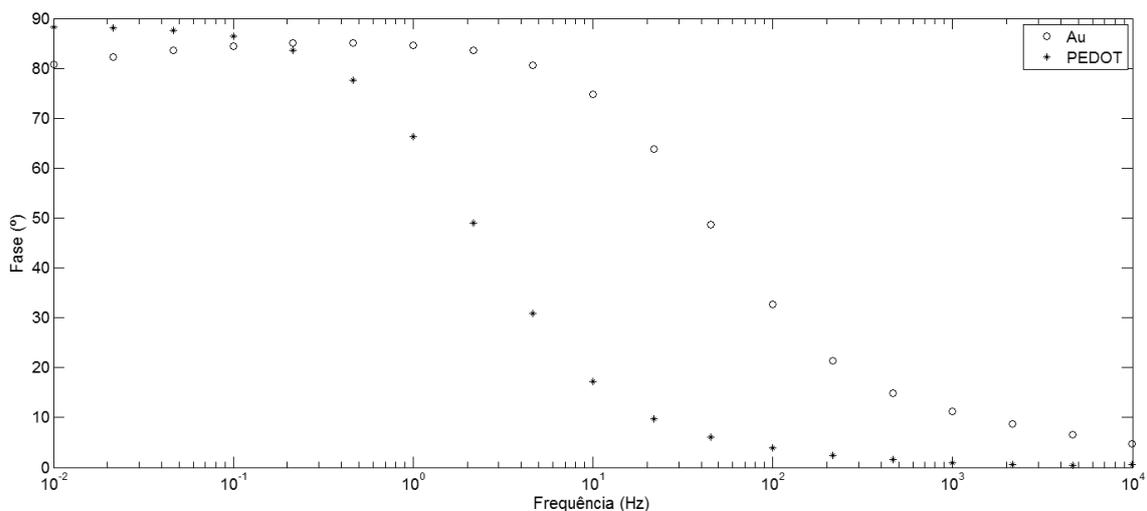


Figura 4.4. Diagrama de Fase do espectro de impedâncias relativos à superfície 0CNT_1S_i200 e ao fio de Au sem revestimento.

Para a mesma solução, foram aplicadas três densidades de corrente diferentes e em todos os casos a variação da impedância entre estas não é significativa. Os Diagramas de Bode e de Fase seguem a mesma tendência para as superfícies que têm origem em diferentes soluções e podem ser consultados no **Apêndice B**.

A partir do Diagrama de Fase das superfícies de PEDOT-CNT (**Figura 4.6**), conclui-se que o comportamento capacitivo predomina na para frequências mais baixas,

pois o ângulo de fase aproxima-se de 90° . O comportamento resistivo é dominante na gama mais alta de frequências com o ângulo de fase próximo de 0° .

Para as superfícies poliméricas observa-se uma diminuição da parte imaginária da impedância significando que a capacidade elétrica é maior. A partir da comparação dos Diagramas de Fase de PEDOT e PEDOT-CNT conclui-se que o comportamento é muito semelhante.

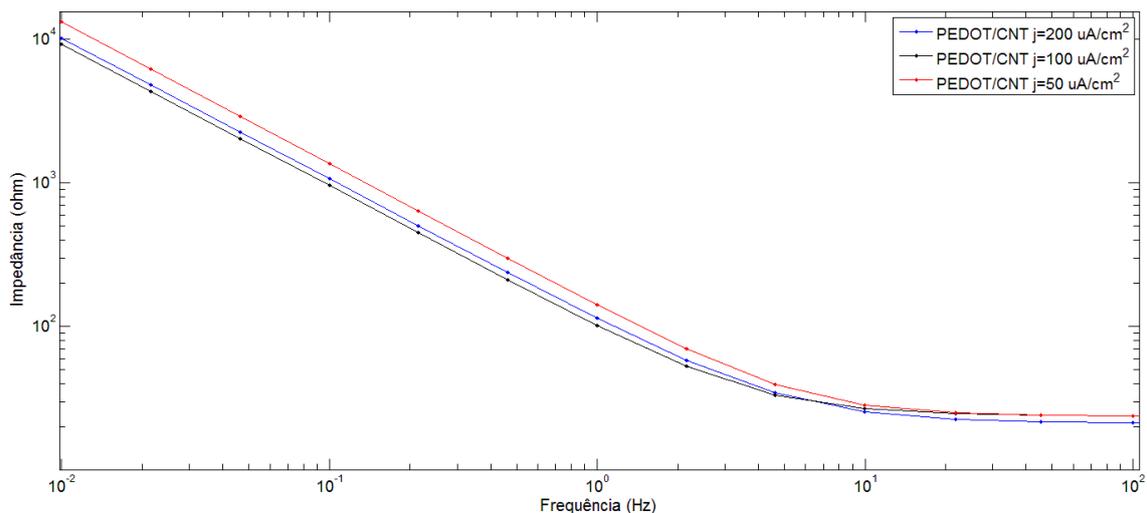


Figura 4.5. Diagrama de Bode do espectro de impedâncias do fio de Au sem revestimento e das seguintes superfícies: 2CNT_1S_i200, 2CNT_1S_i100 e 2CNT_1S_i50.

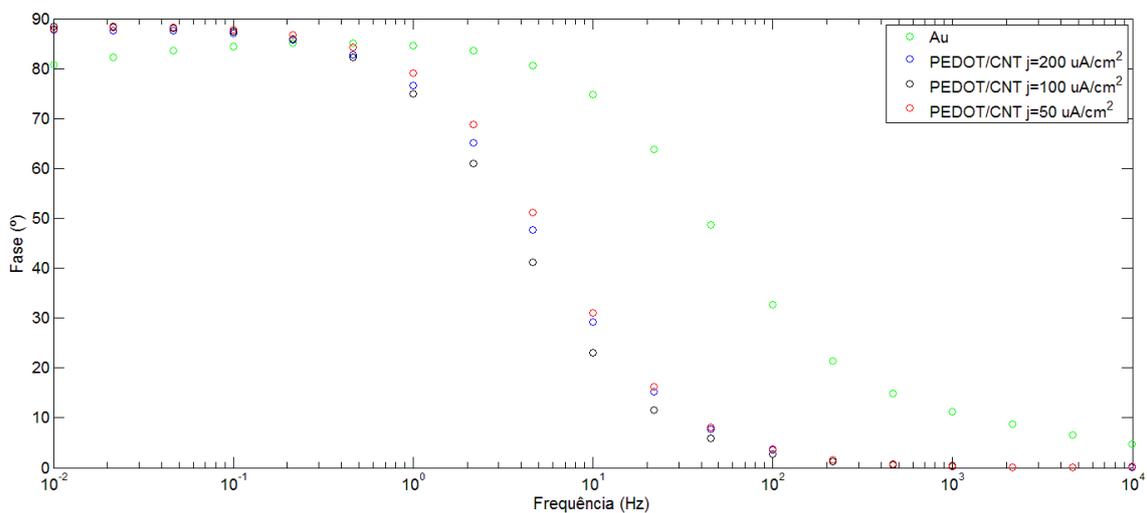


Figura 4.6. Diagrama de Fase do espectro de impedâncias do fio de Au sem revestimento e das seguintes superfícies: 2CNT_1S_i200, 2CNT_1S_i100 e 2CNT_1S_i50.

4.3.2. Voltametria Cíclica

Os voltamogramas cíclicos dão informação acerca da capacidade elétrica de cada superfície, de reações eletroquímicas que ocorrem na superfície, quantidade de material eletroativo no eletrodo e da sua estabilidade. Compara-se o aumento/diminuição da capacidade para as diferentes superfícies relativamente ao fio de Au sem revestimento e entre estas. (Cogan, 2008)

Na **Figura 4.7.** representam-se os voltamogramas para o fio de ouro sem revestimento e para a superfície 0CNT_1S_i200. Na **Figura 4.8.** para as superfícies: 2CNT_1S_i200, 2CNT_1S_i100, 2CNT_1S_i50 e para o fio de ouro sem revestimento. Representam-se apenas as superfícies relativas à eletropolimerização a partir da solução A pois os restantes voltamogramas cíclicos seguem a mesma tendência e podem ser consultados no **Apêndice C.**

A forma quase retangular do CV indica um comportamento semelhante ao de um condensador para o filme de PEDOT e PEDOT-CNT. (Gerwig et al., 2012) A capacidade de cada filme foi calculada a partir do integral da corrente no tempo, e provou-se ser maior para ambos os filmes quando comparados ao fio de Au sem revestimento. Estes resultados estão em concordância com os resultados na Espectroscopia de Impedância. O aumento da capacidade para ambos os revestimentos relativamente ao fio de Au relaciona-se com a elevada área de superfície efetiva e com a excelente condutividade dos filmes, daí o interesse no desenvolvimento de eletrodos com filmes porosos que aumentem a sua área efetiva. (Luo et al., 2011)

Para elevadas taxas de amostragem na CV, a resistência, devido aos poros existentes no filme, limita o acesso a toda a área efetiva do eletrodo e o voltamograma dá informação apenas acerca da superfície mais exposta do material. (Cogan, 2008) Espera-se, por isso, que para taxas de amostragem menores se observem valores maiores de capacidade. Por essa razão, a nossa taxa de amostragem é relativamente baixa 100 mV/s.

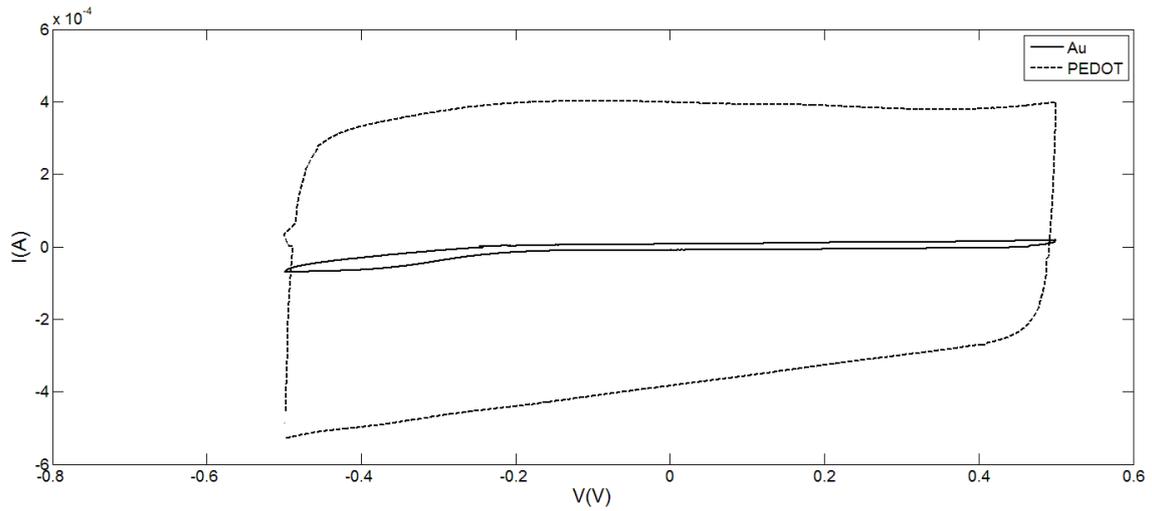


Figura 4.7. Representação do terceiro ciclo da CV de diferentes materiais: Au sem revestimento e 0CNT_1S_i200.

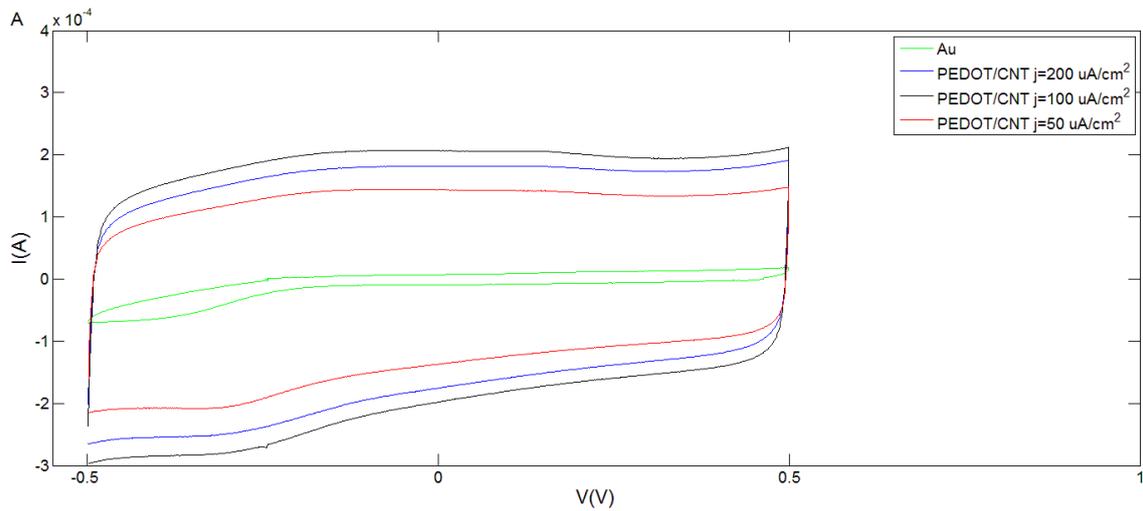


Figura 4.8. Representação do terceiro ciclo da CV de diferentes superfícies: 0CNT_1S_i200, 2CNT_1S_i200, 2CNT_1S_i100 e 2CNT_1S_i50.

Aplica-se a mesma carga para todas as superfícies, esperando-se obter capacidades semelhantes para todos os filmes, como se observa na **Tabela 4.1**.

Tabela 4.1. Propriedades eletroquímicas dos diferentes materiais: Au, PEDOT e PEDOT-CNT. Indicam-se os valores de impedância e capacidade para as diferentes superfícies assim como o pico da curva de polimerização.

Superfícies	$V_{\text{electropolimerização}}$ (V)	$Z_{f=10\text{Hz}}$ (Ω)	C (mF)
Au	-----	235,40	0,202
0CNT_1S_i200	0,904	22,44	7,472
2CNT_1S_i200	0,833	28,45	3,458
2CNT_1S_i100	0,788	26,67	3,935
2CNT_1S_i50	0,818	28,45	2,861
1CNT_1S_i200	0,808	26,15	3,298
1CNT_1S_i100	0,830	30,23	2,737
1CNT_1S_i50	0,791	21,37	3,323
1CNT_1,5S_i200	0,885	28,17	3,525
1CNT_1,5S_i100	0,859	24,45	3,587
1CNT_1,5S_i50	0,838	31,01	3,421

Para avaliar a estabilidade da capacidade e da impedância, realizaram-se os mesmos testes para os mesmos fios, alguns dias após os ensaios iniciais. Comprovou-se a estabilidade das propriedades do filme, pois não se observaram alterações relevantes.

O revestimento com polímeros condutores, como o PEDOT e o compósito PEDOT-CNT, permite a acumulação de cargas elétricas no material, como se observa nos voltamogramas. Contudo, a capacidade para o PEDOT é superior à capacidade obtida para as superfícies de PEDOT-CNT. Tal não está em concordância com a literatura referida. (Baranauskas et al., 2011; Gerwig et al., 2012; Lota et al., 2004) Sabendo-se que a capacidade aumenta com o aumento da carga de polimerização. O aumento de carga leva ao aumento da espessura do filme, aumento da porosidade e da concentração de espécies eletroativas. (Luo et al., 2011; Mandal et al., 2014) Um aumento da densidade de corrente, consiste num aumento da carga total transferida

durante o processo de eletropolimerização. Mas quando se aplicaram correntes de $400 \mu A/cm^2$ o filme de PEDOT-CNT não era resistente a apresentando falhas. Tal poderá dever-se ao aumento excessivo da espessura do filme que o torna menos resistente.

Uma capacidade elevada significa uma aproximação a um eléctrodo não polarizável, isto é, um eléctrodo que permite a passagem de carga livremente sem que haja uma alteração da diferença de potencial na sua interface. Esta característica não se verifica para o ouro sem revestimento mas ambos os filmes aumentam significativamente a capacidade eléctrica (**Tabela 4.1.**). Conseguiu-se um aumento da capacidade eléctrica de aproximadamente 15 vezes com o revestimento de PEDOT-CNT no fio de ouro.

Os eléctrodos desenvolvidos destinam-se ao registo eletroencefálico sendo a característica eléctrica mais importante a impedância baixa na interface eléctrodo-pele para que não haja distorção do sinal e se possam adquirir sinais com melhor SNR possível. Um bom eléctrodo, de uma perspectiva eléctrica, terá um valor muito baixo de impedância e a carga será transferida quase livremente na interface sendo a diferença de potencial na interface mínima. Um eléctrodo perfeito teria impedância nula, mantendo-se o potencial constante.

4.4. Morfologia da superfície

Keefter et al., propuseram que os revestimentos com CNTs aumentam a área de superficial efectiva - área acessível ao eletrólito. Um aumento da micro ou nanoporosidade do filme que reveste o material condutor provoca uma diminuição da impedância. Assim, a porosidade da superfície formada deve ser tida em conta no desenvolvimento do eléctrodo para a interface neuronal.(Asplund et al., 2010; Bobacka et al., 2000; Voge & Stegemann, 2011; Yeh et al., 2009)

4.4.1. Microscopia Electrónica de Varrimento

A morfologia superficial e espessura do filme foram observadas por SEM (**Figura 4.9. e 4.10.**), com o objetivo de observar: o efeito da incorporação de CNTs no polímero

PEDOT, para as superfícies PEDOT-CNT: o efeito da concentração de CNTs, o efeito da concentração de NaPSS e o efeito da densidade de corrente aplicada durante o processo de eletropolimerização. As Figuras A-1 e A-2 representam a morfologia da superfície 0CNT_1S_i200. As restantes figuras correspondem a superfícies PEDOT-CNT.

Efeito da incorporação dos CNTs

Identifica-se a presença de MWCNT-COOH para todas as superfícies de PEDOT-CNT, comparando-se a morfologia das superfícies B, C, D e E com a A, na **Figura 4.9**. Observa-se a presença de pequenos fios na superfície que correspondem aos nanotubos de carbono embebidos na matriz polimérica criando uma rede.

Entre a superfície da **Figura 4.9. A e B** varia apenas a presença de MWCNT-COOH. Ambas foram polimerizadas a partir de soluções com a mesma concentração de EDOT e NaPSS e aplicando-se a mesma densidade de corrente. Conclui-se que a incorporação dos nanotubos altera significativamente a morfologia da superfície observando-se o aumento da porosidade, relativamente à superfície de PEDOT. Um aumento da porosidade significa uma aumento da área efetiva do eletrodo, uma das características que se procuram nestes eletrodos, pois quanto maior a área do eletrodo, menor é a impedância. (Neuman, 2000)

Efeito da densidade de corrente

Para maiores densidades de corrente, o tempo de deposição é menor e a carga aplicada é a mesma. Sabe-se que o crescimento inicial do polímero resulta num filme bastante denso e liso mas a partir de determinada espessura o polímero torna-se poroso e rugoso. (Xiao et al., 2004)

Para menores tempos de deposição (**Figura 4.9. B**) o revestimento é mais poroso, sendo a área efetiva do polímero maior. Sabe-se, portanto, para maiores densidades de corrente se obtêm filmes mais porosos.

Efeito da concentração de NaPSS

O NaPSS e os MWCNT-COOH são ambos dopantes de carga negativa para a cadeia de PEDOT, durante o processo de eletropolimerização. Para maiores concentrações de

NaPSS espera-se que a concentração de nanotubos incorporados no polímero seja menor. Sendo que, os nanotubos conferem uma estrutura em forma de rede ao polímero, quando em menor quantidade é expectável observar-se um polímero menos denso e organizado.

Na **Figura 4.9. D** representa-se a superfície obtida para um aumento de 0,5% na concentração de NaPSS relativamente à superfície B. Aparentemente, a porosidade não se altera. O filme da superfície com menor concentração de NaPSS (**Figura 4.9. B**) é mais organizado.

Efeito da concentração de CNTs

Para uma maior concentração de nanotubos, espera-se uma superfície com mais MWCNT-COOH incorporados. Na **Figura 4.9. E**, representa-se a superfície com a maior concentração de nanotubos e que apresenta à superfície uma rede interconectada de nanotubos que aparentam estar em maior concentração que nas anteriores.

De realçar que a inexistência de poros para a superfície, apesar de ser rugosa, se deve ao tempo de polimerização que é 4 vezes maior. O crescimento do filme é muito lento e assume-se que os poros formados são preenchidos pelo polímero.

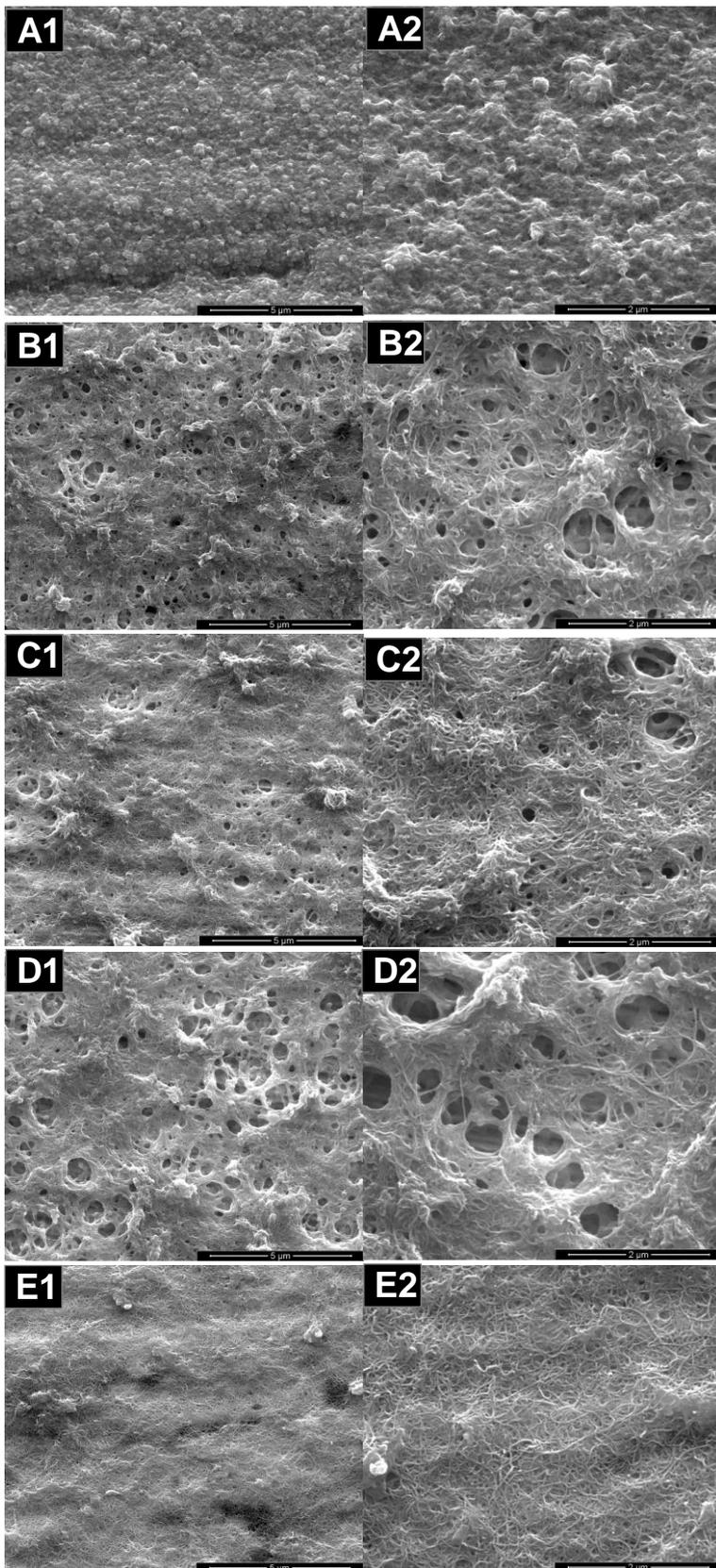


Figura 4.9. | Morfologia de várias superfícies:

(A) 0CNT_1S_i200

(B) 1CNT_1S_i200,

(C) 1CNT_1S_i100

(D) 1CNT_1,5S_i200

(E) 2CNT_1S_i50

Na **Figura 4.10.** observa-se a secção transversal do filme com uma espessura de 516,9 nm, aproximadamente o valor esperado (500 nm).

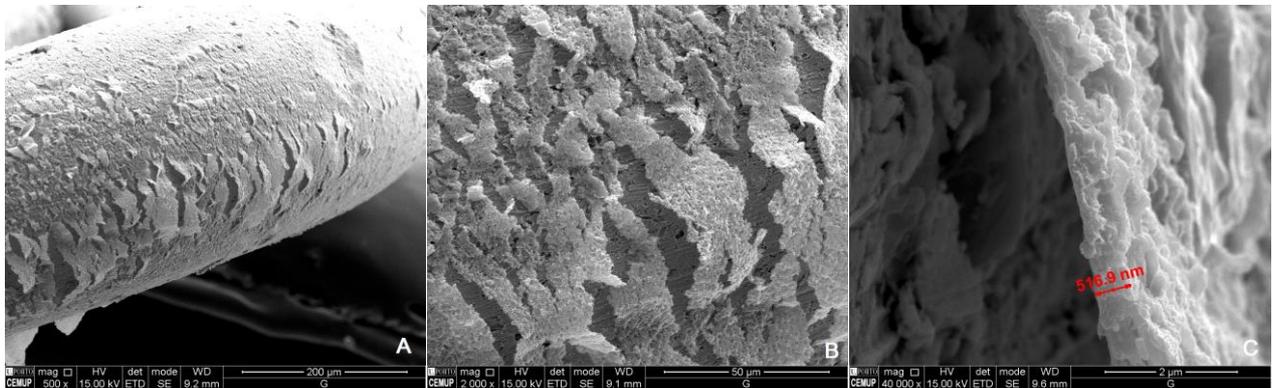


Figura 4.10. | (A,B) Torção do fio polimerizado com PEDOT-CNT para observação da resistência do filme e para medição da espessura com diferentes magnificações: 500x e 2 000x, respetivamente. (C) Visualização das falhas e medição da espessura do filme (516,9 nm).

Confirma-se a presença de nanotubos de carbono analisando-se a composição da superfície do filme dos eléctrodos revestidos a partir de EDS. O sódio tem origem no NaPSS e na solução salina NaCl, pois antes de serem submetidos ao SEM e EDS, estes fios foram analisados por EIS e CV. O enxofre e o oxigénio provêm do EDOT. (**Figura 4.11.**)

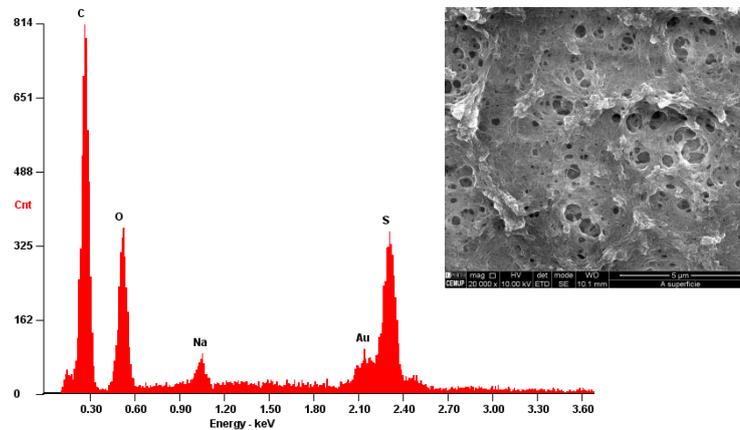


Figura 4.11. | Análise EDS: elementos presentes na superfície representada pela imagem SEM.

4.4.2. Microscopia de Força Atômica

Para se conseguir uma caracterização mais pormenorizada, as superfícies foram caracterizadas por AFM. As imagens são apresentadas na **Figuras 4.12**. Estas amostras correspondem a superfícies 0CNT_1S_i200 e 1CNT_1S_i200, 1CNT_1S_i100 e 1CNT_1S_i50.

As imagens topográficas, de amplitude e a três dimensões de todos os filmes foram tratadas no programa *Gwyddion* (**Figuras 4.12**). Através deste programa foi também possível determinar parâmetros de rugosidade superficial: S_q – corresponde à rugosidade média.

A partir destas imagens pretende-se complementar estudo da morfologia e topografia realizado por SEM. Sendo que todos os filmes têm origem na mesma solução, exceto o filme de PEDOT, pretende-se analisar com maior pormenor o efeito da densidade de corrente aplicada durante o processo de eletropolimerização dos filmes.

A superfície de PEDOT (0CNT_1S_i200) quando comparada à superfície de PEDOT-CNT com a mesma densidade de corrente (1CNT_1S_i200) é mais homogênea e menos rugosa (**Figuras 4.12**. 0CNT_1S_i200 (B) e 1CNT_1S_i200 (B)). As imagens da revelam uma diminuição da rugosidade da superfície com a diminuição da densidade de corrente aplicada. Os poros existentes na amostra de PEDOT têm menor amplitude enquanto os poros encontrados nas superfícies de PEDOT-CNT têm um diâmetro e altura bastante maiores. Tais conclusões são confirmadas pelas imagens de SEM (**Figuras 4.9**).

As imagens de fase (**Figuras 4.12**. B) permitem a identificação de diferentes materiais pois resulta de contrastes associados às diferenças de fase induzidas devido à variação das propriedades dos materiais. As superfícies são praticamente homogêneas o que significa que as propriedades na superfície não traduzem a presença de diferentes materiais. Conclui-se que os nanotubos estão bem incorporados na matriz polimérica.

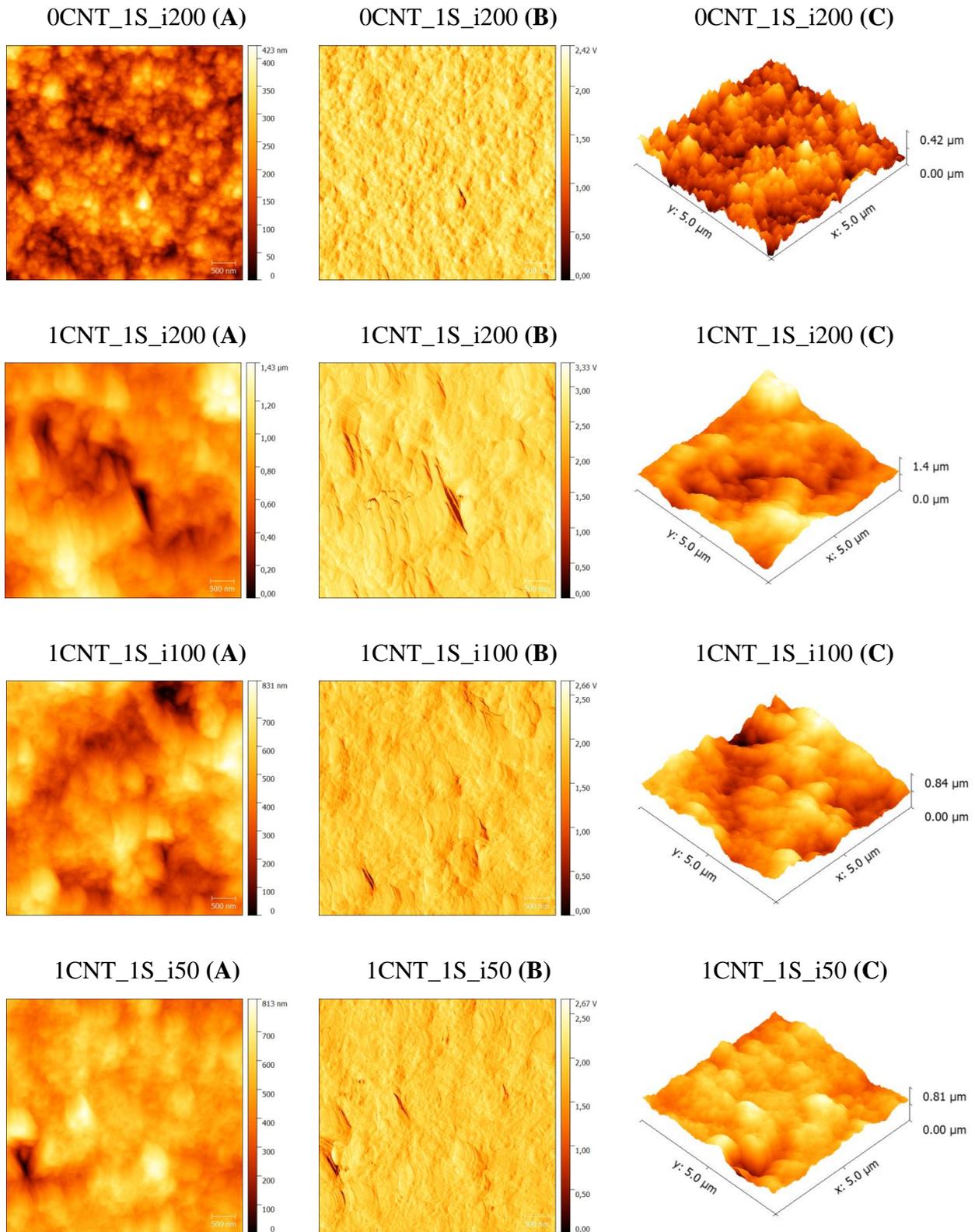


Figura 4.12. | Imagens topográficas (A) de amplitude, (B) de fase e (C) a três dimensões das superfícies: 0CNT_1S_i200, 1CNT_1S_i200, 1CNT_1S_i100, 1CNT_1S_i50.

A rugosidade da superfície foi caracterizada através do cálculo do valor RMS da rugosidade da superfície (S_q) e da área de superfície (A_s). S_q consiste na raiz quadrada da distribuição de alturas da superfície e é considerado um parâmetro mais sensível que a rugosidade média, para grandes desvios relativamente ao plano médio. Ambos os parâmetros são calculados a partir do programa *Gwyddion*.

Nas **Figuras 4.13.** representam-se os gráficos de barras obtidos para o valor RMS da rugosidade da superfície (S_q) e da área de superfície para as diferentes amostras analisadas por AFM. Conclui-se a partir da observação das imagens obtidas e pelo cálculo da rugosidade da superfície que: para densidades de corrente mais elevadas, a rugosidade também é mais elevada assim como a área de superfície efetiva.

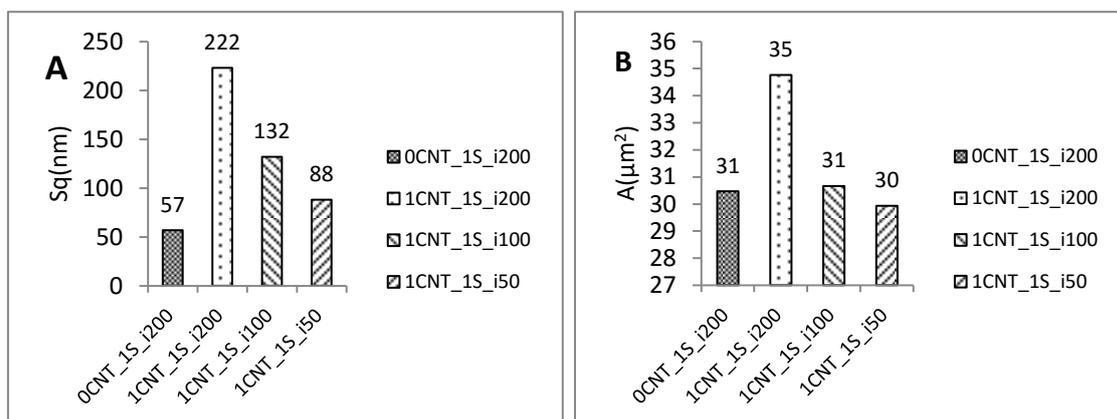


Figura 4.13. Representação do valor RMS da rugosidade da superfície (S_q) em nanómetros e (B) da área de superfície efetiva, para as seguintes superfícies: 0CNT_1S_i200, 1CNT_1S_i200, 1CNT_1S_i100 e 1CNT_1S_i50.

A rugosidade da superfície com nanotubos de carbono, e com a mesma densidade de corrente aplicada durante o processo de eletropolimerização, em relação à superfície sem nanotubos é 4 vezes maior. Um aumento de 2,3 vezes mantém-se para a superfície com metade da densidade de corrente aplicada. Apenas para $j = 50 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ se observa uma aproximação ao coeficiente de rugosidade da superfície de PEDOT, sendo no entanto superior para o filme PEDOT-CNT.

A incorporação de MWCNT-COOH no revestimento do fio de ouro provoca um aumento de 14% da área superficial efetiva, relativamente ao filme de PEDOT e nas mesmas condições de eletropolimerização: mesma concentração de EDOT, NaPSS e

densidade de corrente aplicada. Para as restantes densidades de corrente: 100 e 50 $\mu A/cm^2$, a área não aumentou significativamente e para o último caso é menor.

4.5. Adesão do filme: teste da fita-cola

A adesão do filme é uma das características mais importantes num revestimento. Existem vários tipos de testes que permitem analisar a adesão do filme mas o da fita-cola é muito simples e barato. (Valli, 1986) Antes e depois da aplicação da fita-cola são realizados os ensaios de caracterização eletroquímica: EIS e CV.

De acordo com os diagramas da **Figura 4.14.**, não existem alterações relevantes nos Diagramas de Bode nem nos Voltamogramas Cíclicos para as superfícies de PEDOT-CNT. Contudo, para a superfície de PEDOT, observa-se uma diminuição significativa da capacidade, de 7,4 mC para 5,6 mC, correspondendo a uma diminuição de 24%. Para as superfícies de PEDOT-CNT 2CNT_1S_i200 e 1CNT_1,5S_i50 as diminuições relativas percentuais são: 8% e 4%, respetivamente.

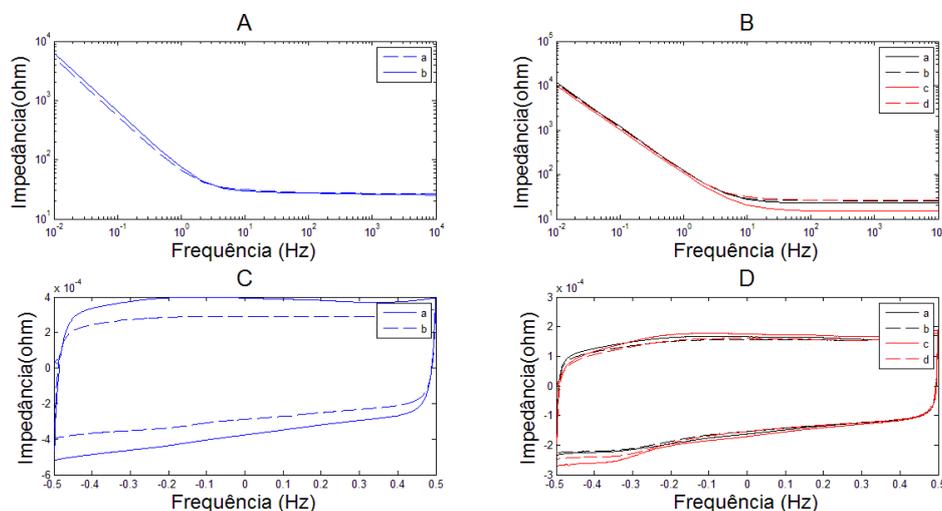


Figura 4.14. (A, B) Diagramas de Bode das superfícies: PEDOT e PEDOT-CNT (C,D) Voltamogramas Cíclicos das superfícies: PEDOT e PEDOT-CNT, respetivamente. Para as superfícies de PEDOT: a – antes da aplicação da fita-cola, b – após a aplicação da fita-cola. Relativamente às superfícies de PEDOT-CNT: a – superfície 1CNT_1S_i50 antes da aplicação da fita-cola, b - superfície 1CNT_1S_i50 após a aplicação da fita-cola, c – superfície 2CNT_1S_i200 antes da aplicação da fita-cola, d - superfície 2CNT_1S_i200 após a aplicação da fita-cola.

Pretende-se que os eléctrodos desenvolvidos se destinem ao registo de atividade cerebral no escalpe, onde estão sujeitos a forças de fricção devido à presença de cabelo. É, por isso, importante que o material seja o mais resistente possível de forma a garantir a estabilidade dos eléctrodos e se possível a sua reutilização.

Este simples ensaio permite a caracterização mecânica da superfície do eléctrodo. Conclui-se que os MWCNT-COOH tornam a superfície mais robusta e que por isso superam, na perspetiva mecânica, os eléctrodos de PEDOT.

4.6. Caracterização dos eléctrodos in-vitro

Na **Figura 4.15** analisa-se o valor RMS do ruído e o declive médio para cada uma das superfícies: PEDOT e PEDOT-CNT. Divide-se o sinal em segmentos analisando-se a evolução dois parâmetros.

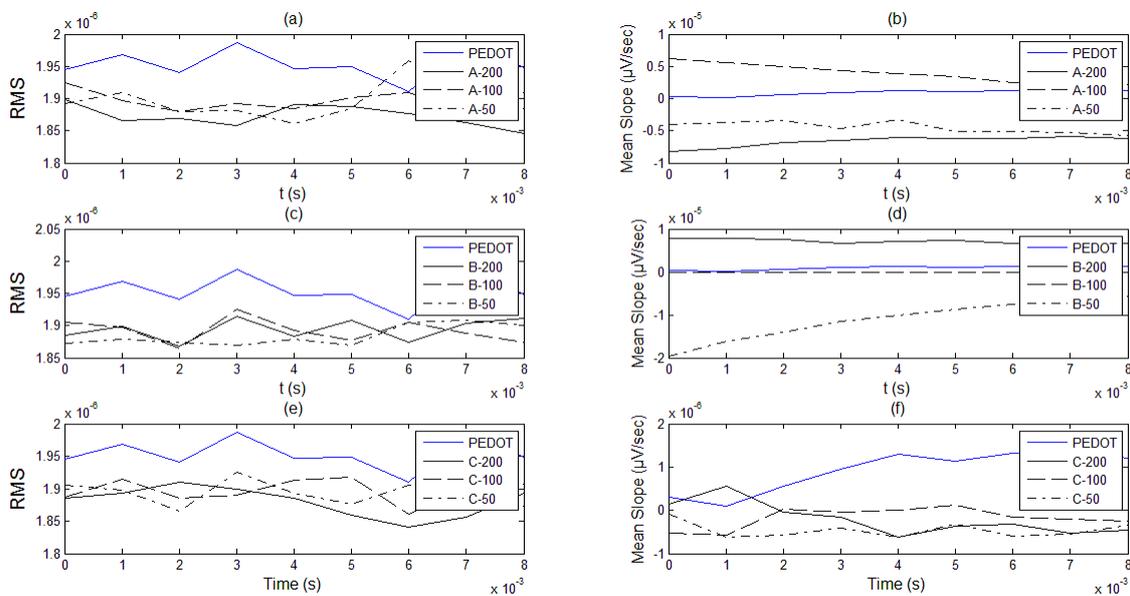


Figura 4.15 Representação dos valores RMS e do declive médio de: (a,b) PEDOT e PEDOT-CNT 2CNT_1S_i200, 2CNT_1S_i100 e 2CNT_1S_i50; (c,d) PEDOT e PEDOT-CNT 1CNT_1S_i200, 1CNT_1S_i100e 1CNT_1S_i50; (e,f) PEDOT e PEDOT-CNT 1CNT_1,5S_i100, 1CNT_1,5S_i200e 1CNT_1,5S_i50, respetivamente.

A densidade espectral de potência para todas as superfícies é semelhante. Observa-se contudo um pico para a superfície de PEDOT por volta dos 16 Hz e 32 Hz, que corresponderá a uma interferência, como se observa na **Figura 4.16**.

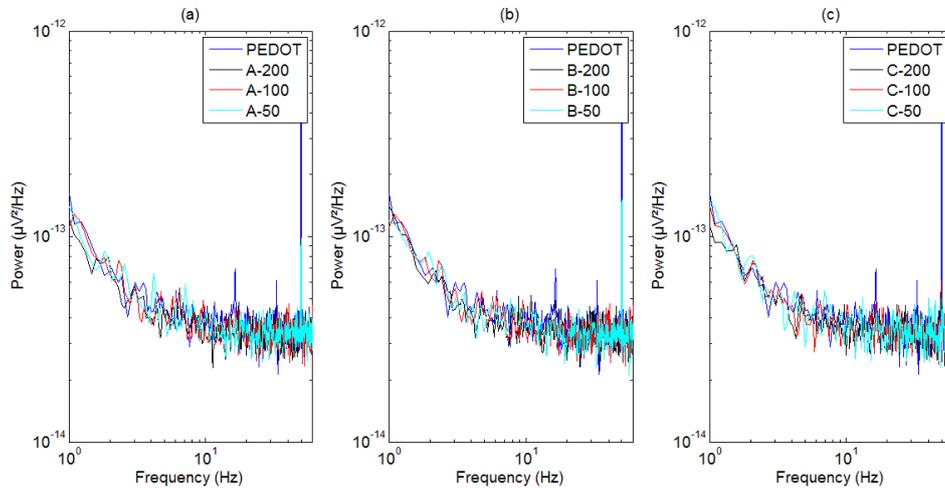


Figura 4.16 | Densidade espectral de potência do ruído para as diferentes superfícies: (a) PEDOT e PEDOT-CNT 2CNT_1S_i200, 2CNT_1S_i100 e 2CNT_1S_i50, (b) PEDOT e PEDOT-CNT 1CNT_1S_i200, 1CNT_1S_i100e 1CNT_1S_i50 e (c) PEDOT e PEDOT-CNT 1CNT_1,5S_i100, 1CNT_1,5S_i200e 1CNT_1,5S_i50.

Não há diferenças relevantes entre os valores RMS do ruído para as diferentes superfícies de PEDOT e PEDOT-CNT, estando na gama de valores do valor RMS de ruído para a superfície de ouro sem revestimento e limpa, por abrasão com lixa e sonicção, que é aproximadamente 2 μV . Pode consultar-se a densidade espectral de potência do ruído relativamente ao ouro sem revestimento no **Apêndice D**.

O declive médio para o fio de ouro sem revestimento é 0 e para as superfícies de PEDOT e PEDOT-CNT são muito baixos, na gama dos 10^{-5} a 10^{-6} $\mu\text{V}/\text{s}$.

O PSD confirma a informação obtida pelo valor RMS do ruído e do declive médio, demonstrando que o ruído é semelhantes para todas as superfícies.

4.7. Escolha da superfície para os eletrodos

Experimentaram-se diferentes soluções para a construção dos eletrodos de PEDOT-CNT. A partir das diferentes análises realizadas escolheu-se, para a eletropolimerização, a solução A: 2 mg/ml CNTs, 1% NaPSS e 10 mM EDOT e uma densidade de corrente de $200 \mu A/cm^2$, ou seja, a superfície: 2CNT_1S_i200.

Os ensaios de caracterização eletroquímica provaram que para os três tipos de superfícies, as impedâncias e capacidades elétricas são semelhantes. Os ensaios de ruído não mostram diferenças entre as superfícies. A partir da análise da morfologia e topografia, por SEM e AFM, mostrou-se que a superfície A apresenta mais nanotubos que melhoram a condutividade elétrica e a adesão do filme à superfície de ouro. Por essa razão, escolheu-se a solução A: 1% NaPSS, 10mM EDOT e 2 mg/ml de MWCNT-COOH.

Para maiores densidades de corrente obtêm-se superfícies mais porosas. O aumento da porosidade com o aumento da densidade da corrente é confirmado pelo AFM. Assim, a densidade de corrente escolhida para a eletropolimerização dos fios de ouro foi: $200 \mu A/cm^2$.

4.8. Ensaios *in-vivo*

Após o desenvolvimento dos eletrodos com superfície 2CNT_1S_i200, realizaram-se ensaios *in-vivo* para determinar o ruído gerado na pele, pelo sistema e pelos eletrodos. Posteriormente, registaram-se sinais EEG na zona occipital do encéfalo. Estes ensaios têm como objetivo a comparação dos novos eletrodos com os eletrodos tradicionais de Ag/AgCl.

4.8.1. Análise das propriedades elétricas dos eletrodos *in-vivo*

A partir dos Diagramas de Bode e Fase obtidos para ambos os eletrodos de Ag/AgCl e PEDOT-CNT, confirma-se que a performance do novo eletrodo iguala a do tradicional.

(Figuras 4.17. e 4.18.) A impedância do PEDOT-CNT na pele, para 10 Hz, é ligeiramente inferior à do Ag/AgCl.

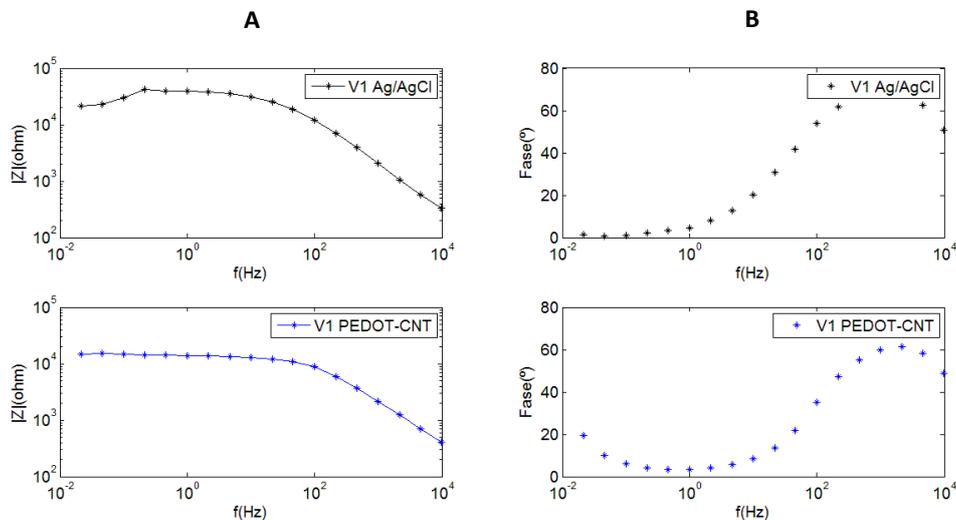


Figura 4.17 | Diagrama de Bode (A) e de Fase (B) para os elétrodos em contacto com a pele. (Voluntário 1)

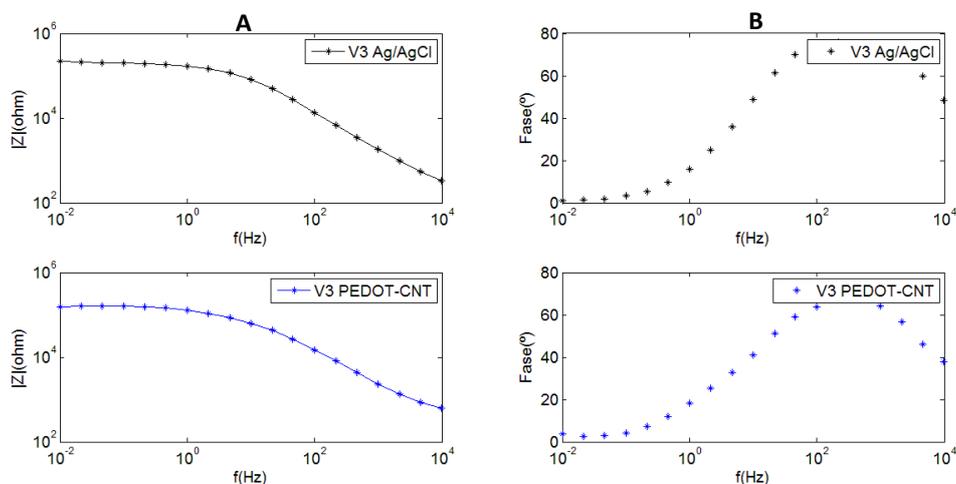


Figura 4.18 | Diagrama de Bode (A) e de Fase (B) para os elétrodos em contacto com a pele. (Voluntário 3)

Ambos apresentam um comportamento resistivo para baixas frequências. À medida que a frequência aumenta, a capacidade de dupla camada predomina na impedância elétrica.

4.8.2. Determinação da componente de ruído presente no sinal registado

Através de ensaios de ruído elétrico realizados na zona da tíbia na superfície da pele, em voluntários, avaliou-se o ruído característico de cada eletrodo.

A EIS é uma técnica que pode ser usada para estudar as propriedades da pele e do eletrodo. Realizando-se ensaios EIS para cada um dos eletrodos: Ag/AgCl e PEDOT-CNT calcula-se: o ruído térmico presente no sinal que é proporcional à parte real da impedância que se mede.

Segundo Cogan et al., a contribuição da pele para a impedância medida pode ser estimada pela impedância registada a elevadas frequências, pois a contribuição devido à transferência de carga entre a interface eletrodo-pele é desprezável. Tal explica a tendência para os mesmos valores, a elevadas frequências, nos diferentes ensaios.

Nas **Figuras 4.19 e 4.20**, observam-se os PSD calculados para cada ensaio *in-vivo* dos eletrodos Ag/AgCl e PEDOT-CNT.

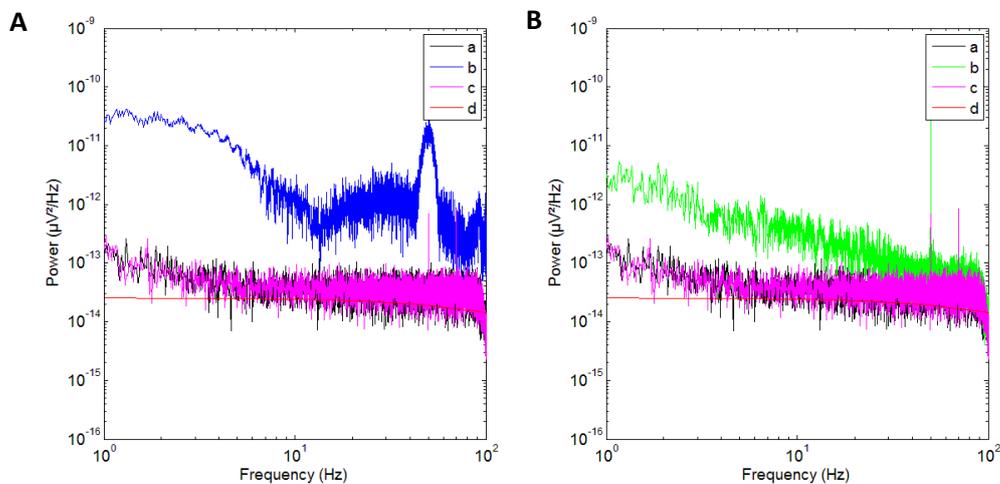


Figura 4.19 | PSD obtido para os ensaios *in-vivo* (Voluntário 1) para o eletrodo Ag/AgCl (A) e PEDOT-CNT (B), sendo: (a) ruído do amplificador, (b) ruído *in-vivo*, (c) ruído *in-vitro* e (d) ruído térmico calculado a partir da EIS

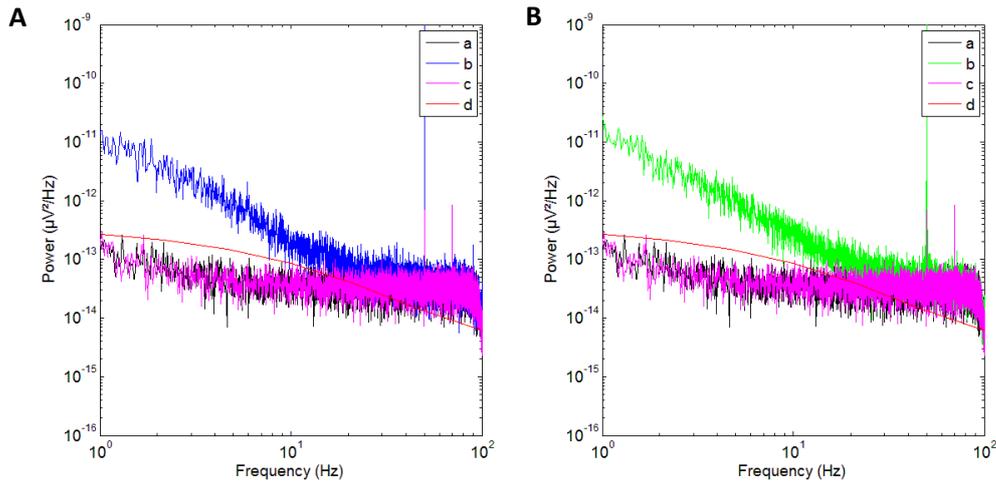


Figura 4.20 PSD obtido para os ensaios *in-vivo* (Voluntário 1) para o eletrodo Ag/AgCl (A) e PEDOT-CNT (B), sendo: (a) ruído do amplificador, (b) ruído *in-vivo*, (c) ruído *in vitro* e (d) ruído térmico calculado a partir da EIS

Na **Figura 4.21**, representam-se os valores RMS do ruído calculados a partir dos PSD obtidos nas **Figuras 4.19**, e **4.20**.

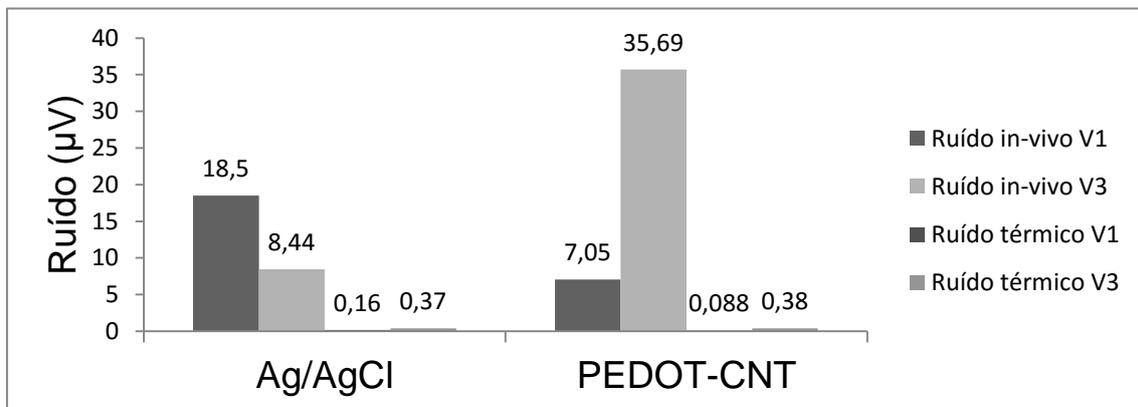


Figura 4.21 Gráfico de Barras que representa o valor RMS do ruído do amplificador, térmico e *in-vivo*, para os dois eletrodos: Ag/AgCl e PEDOT-CNT, para os voluntários 1 e 3.

Para o Voluntário 1, o ruído é maior no eletrodo de Ag/AgCl enquanto para o voluntário 3, o ruído é maior no eletrodo de PEDOT-CNT. Mais ensaios seriam necessários para fazer conclusões fiáveis acerca de qual dos eletrodos é mais suscetível ao ruído. Apesar disso, consegue-se aferir que o ruído térmico é desprezável, para

ambos os ensaios. Tal acontece para o ruído do amplificador e para o ruído medido *in-vitro*. O que permite concluir que a maior contribuição para o ruído é a da pele.

4.8.3. Registo eletroencefálico

Após a determinação do ruído na pele, procede-se ao registo de sinais EEG na zona occipital do encéfalo. Estes ensaios são realizados no interior da gaiola de *Faraday* para evitar a adição de interferências ao sinal registado. A atividade neuronal foi registada, realizando-se dois ensaios: Ag/AgCl vs. Ag/AgCl e Ag/AgCl vs. PEDOT-CNT. Pretende-se avaliar a diferença das ondas registadas entre os dois elétrodos. O registo dos sinais é garantido pelo amplificador eegoTM mini-series.

Após a aquisição do sinal, este é processado em Matlab, aplicando-se um filtro passa-banda e calculando-se vários parâmetros como foram descritos no subcapítulo 3.9.2.

Os sinais registados são segmentados para visualização e estão representados nas **Figuras 4.22, 4.23., 4.24, 4.25.**

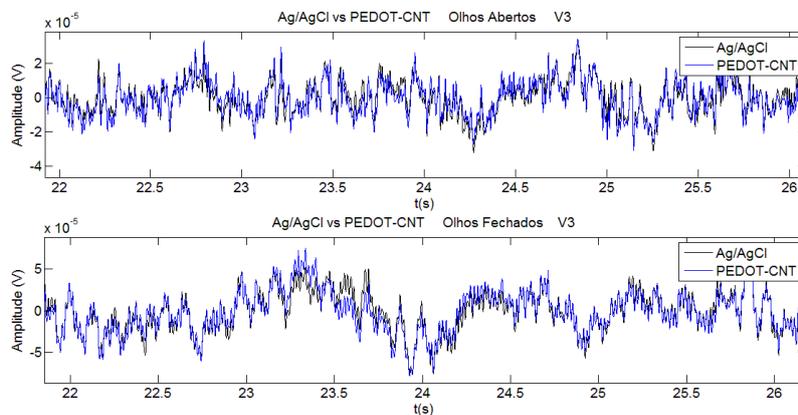


Figura 4.22 Segmento dos sinais eletroencefálicos registados com olhos abertos e olhos fechados para os elétrodos com a montagem: Ag/AgCl vs. PEDOT-CNT. (Voluntário 3)

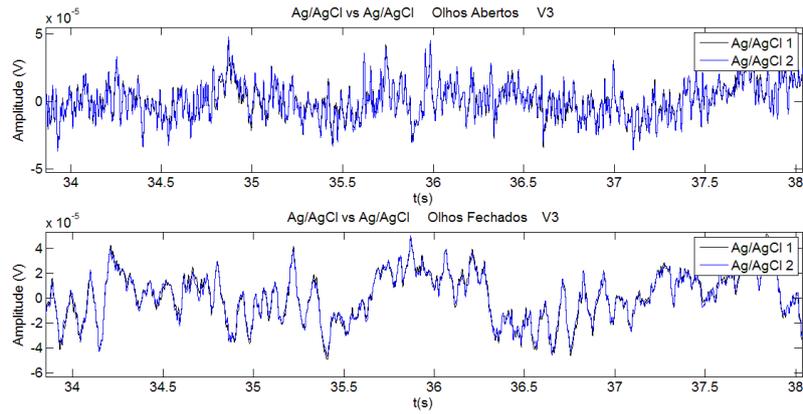


Figura 4.23 Segmento dos sinais eletroencefálicos registrados com olhos abertos e olhos fechados para os elétrodos com a montagem: Ag/AgCl vs. Ag/AgCl. (Voluntário 3)

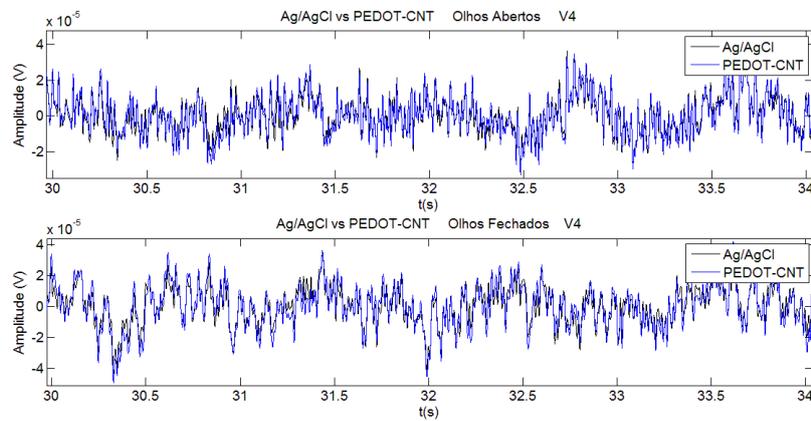


Figura 4.24 Segmento dos sinais eletroencefálicos registrados com olhos abertos e olhos fechados para os elétrodos com a montagem: Ag/AgCl vs. PEDOT-CNT. (Voluntário 4)

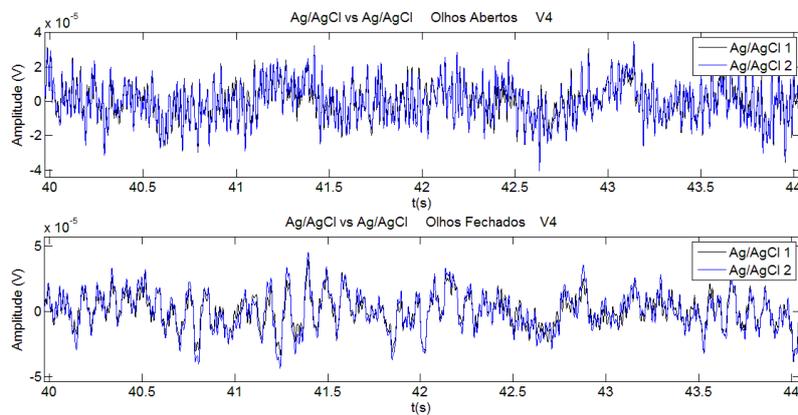


Figura 4.25 Segmento dos sinais eletroencefálicos registrados com olhos abertos e olhos fechados para os elétrodos com a montagem: Ag/AgCl vs. Ag/AgCl. (Voluntário 4)

Os parâmetros descritos no subcapítulo 3.9.2. e calculados através do Matlab são: o valor RMS do sinal, RMSD, Correlação de Spearman e a razão sinal-ruído (**Equação 3.5.**). Representam-se todos os valores obtidos na **Tabela 4.2.**

Tabela 4.2. | RMS, RMSD, Correlação de Spearman e SNR calculados para os elétrodos de Ag/AgCl e PEDOT-CNT nos dois ensaios realizados: Ag/AgCl vs. PEDOT-CNT e Ag/AgCl vs. Ag/AgCl.

Voluntário	Ag/AgCl vs. Ag/AgCl						Ag/AgCl vs. PEDOT-CNT					
	Ensaio	Eléttodos	RMS (μV)	RMSD (μV)	Corr (%)	SNR (dB)	Eléttodos	RMS (μV)	RMSD (μV)	Corr (%)	SNR (dB)	
V3	Olhos abertos	Ag/AgCl	12,88	2,02	98	1,83	Ag/AgCl	9,95	3,81	92	2,26	
		Ag/AgCl	12,95			1,71	PEDOT-CNT	10,17			2,24	
	Olhos Fechados	Ag/AgCl	20,39	2,35	99	5,92	Ag/AgCl	24,71	8,62	94	5,33	
		Ag/AgCl	19,43			5,57	PEDOT-CNT	25,14			5,27	
V4	Olhos abertos	Ag/AgCl	10,85	2,76	96	0,32	Ag/AgCl	10,57	2,64	97	2,68	
		Ag/AgCl	11,18			0,32	PEDOT-CNT	11,04			1,74	
	Olhos Fechados	Ag/AgCl	11,98	4,51	95	9,84	Ag/AgCl	12,19	4,46	95	7,74	
		Ag/AgCl	14,24			10,50	PEDOT-CNT	13,86			5,65	

Os valores RMS do sinal, em ambas as montagens, e para os dois eléttodos (Ag/AgCl e PEDOT-CNT) são semelhantes, sugerindo que o eléttodo de PEDOT-CNT consegue captar tão bem quanto os eléttodos de Ag/AgCl a atividade cerebral. O RMSD dá informação acerca da diferença na forma de onda entre os dois sinais. É maior para a montagem Ag/AgCl vs. PEDOT-CNT, o que é natural por se tratarem de dois eléttodos diferentes, sendo o seu processo de transdução diferente. A correlação de Spearman dá informação acerca da semelhança entre os registos feitos entre os dois eléttodos, tal como o RMSD. Confirma-se que a correlação é maior para uma montagem de Ag/AgCl

vs. Ag/AgCl. Mas pode-se concluir que a correlação para os elétrodos de PEDOT-CNT vs Ag/AgCl é bastante boa, acima dos 90%.

A SNR é o parâmetro que define a performance do eletrodo. Para todos os ensaios os valores da SNR dos elétrodos de PEDOT-CNT são próximos dos calculados para o Ag/AgCl.

Na **Figura 4.26**, representa-se a densidade espectral de potência dos sinais EEG registrados. (Voluntário 3). Distinguem-se dois picos, para ambos os elétrodos, na região do ritmo alfa (8-12 Hz). Existe ainda mais um pico, por volta dos 50 Hz, que corresponde a interferência eletromagnética.

Conclui-se por isso, que o eletrodo PEDOT-CNT consegue registrar a atividade elétrica com a mesma fiabilidade do eletrodo tradicional de Ag/AgCl.

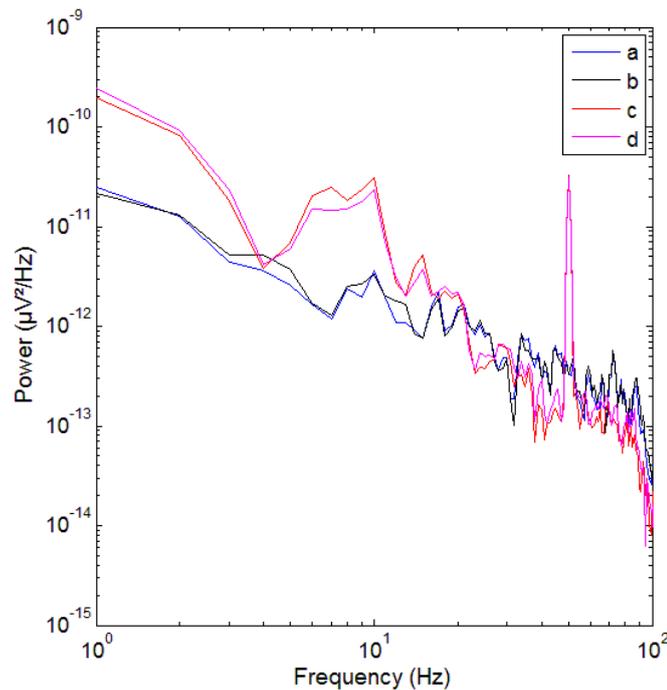


Figura 4.26 | Densidade espectral dos sinais EEG registrados, na zona occipital do encéfalo, do ensaio Ag/AgCl vs. PEDOT-CNT: (a) Ag/AgCl – olhos abertos, (b) PEDOT-CNT – olhos abertos, (c) Ag/AgCl – olhos fechados, (d) PEDOT-CNT – olhos fechados. (Voluntário 3)

Conclusão

Este projeto propôs-se a desenvolver um novo eléctrodo para o registo electroencefalográfico. Baseou-se na literatura e nos desenvolvimentos recentes feitos na área. Os polímeros condutores têm sido amplamente estudados devido às suas características concordantes com os requisitos necessários para o bom funcionamento de um eléctrodo neuronal.

Um dos polímeros mais promissores é o PEDOT e tem sido alvo de vasta investigação. Os eléctrodos desenvolvidos baseiam-se neste polímero aliando as extraordinárias características dos nanotubos de carbono. O compósito PEDOT-CNT depositado em superfícies metálicas já foi aplicado à construção de eléctrodos para estimulação e registo da actividade cerebral com sucesso. Contudo, a grande maioria destes estudos destinam-se a registos invasivos. O desafio deste trabalho era provar que estes eléctrodos também conseguem medir actividade eléctrica no escalpe, sem contacto directo com o córtex cerebral. O maior desafio nos registos electroencefálicos são as elevadas impedâncias na interfaces eléctrodo pele e todas as impedâncias associadas ao crânio e ao tecido do organismo.

Comprovou-se que é possível construir eléctrodos revestidos com polímeros condutores através da eletropolimerização, de forma reprodutível. Estabeleceu-se um método experimental após vários ensaios que permitem a construção dos eléctrodos. De notar que uma das etapas mais exigentes do processo é conseguir uma boa dispersão dos nanotubos de carbono que tendem a agregar-se. Tal pode ser revertido pela mistura em água com um surfactante que ajuda a estabilizar os nanotubos.

O eléctrodo desenvolvido foi caracterizado a partir de diversas técnicas como, por exemplo: de caracterização electroquímica (Espectroscopia de Impedância e Voltametria Cíclica), morfológicas e topográficas (Microscopia Electrónica de Varrimento e Microscopia de Força Atómica, químicas (Espectroscopia Dispersiva de Raios-X), de adesão do filme (Teste da fita-cola) e de suscetibilidade ao ruído.

Provou-se que a incorporação dos nanotubos não prejudica a performance do eletrodo mas melhora a adesão do filme à superfície, uma característica muito importante quando se pretendem desenvolver materiais que estão sujeitos a forças de fricção, como no nosso caso: a fricção devida aos cabelos no escalpe. O PEDOT-CNT origina filmes bastante mais porosos, relativamente aos filmes de PEDOT, que aumentam a área efectiva do eletrodo, um dos parâmetros que se pretende atingir para diminuir a impedância na interface eletrodo-pele e melhorar a razão sinal-ruído. A densidade de corrente utilizada durante o processo de eletropolimerização tem efeito nos polímeros obtidos. A porosidade diminui com a diminuição da densidade de corrente.

Assim, escolheram-se os parâmetros que, a partir dos ensaios referidos, produziram superfícies com melhores características: para a solução de eletropolimerização escolheu-se uma concentração de 2 mg/ml de nanotubos de carbono funcionalizados com ácido carboxílico, 10 mM de EDOT e 1% de NaPSS, a densidade de corrente aplicada escolhida foi $200 \mu A/cm^2$ que dá origem a filmes com maior porosidade mas mantendo a estrutura resistente do compósito.

A partir dos ensaios de ruído *in-vitro* para os eletrodos de Ag/AgCl e PEDOT-CNT mostrou-se que ambos têm o mesmo comportamento, tendo uma contribuição muito baixa para o ruído registado *in-vivo* na pele. O ruído do amplificador e o ruído térmico são também desprezáveis. A maior contribuição para o ruído é devida à pele.

Ficou demonstrado pelo registo eletroencefálico que o eletrodo de PEDOT-CNT é capaz de registar sinais neuronais com a mesma fiabilidade dos eletrodos tradicionais. No futuro, é importante aperfeiçoar a montagem experimental e o design dos eletrodos para garantir as as melhores condições na aquisição dos sinais.

Referências

- Arequeta-Robles, U., Woolley, A., Poole-Warren, L., Lovell, N., & Green, R. (2014). Organic electrode coatings for next-generation neural interfaces. *Frontiers in Neuroengineering*, 7.
- Asplund, M., Nyberg, T., & Inganäs, O. (2010). Electroactive polymers for neural interfaces. *Polymer Chemistry*, 1(9), 1374-1391. doi:10.1039/C0PY00077A
- Baranauskas, G., Maggiolini, E., Castagnola, E., Ansaldo, A., Mazzoni, A., Angotzi, G., . . . Fadiga, L. (2011). Carbon nanotube composite coating of neural microelectrodes preferentially improves the multiunit signal-to-noise ratio. *Journal of Neural Engineering*, 8(6), 1-12.
- Baughman, R. H., Zakhidov, A. A., & Heer, W. A. (2002). Carbon Nanotubes-The Route Toward Applications. *Science*, 297(5582), 787-792.
- Binnig, G., & Quate, C. F. (1986). Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters*, 56(9), 930-933.
- Bobacka, J., Lewenstam A., & Ivaska, A. (2000). Electrochemical impedance spectroscopy of oxidized poly(3,4-ethylenedioxythiophene) film electrode in aqueous solutions. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 489, 17-27.
- Brodal, P. (2010). Main features of structure and function *The Central Nervous System* (pp. 3-115): Oxford University Press.
- Bronzino, J. (2000). Principles of Electroencephalography. In J. Bronzino (Ed.), *The Biomedical Engineering Handbook* (2 ed.). Boca Raton: CRC Press LLC.
- Castagnola, E., Maiolo, L., Maggiolini, E., Minotti, A., Marrani, M., Maita, F., . . . Ricci, D. (2015). PEDOT-CNT-Coated Low-Impedance, Ultra-Flexible, and Brain-Conformable Micro-ECoG Arrays. *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering*, 23(3), 342 - 350.

- Clark, J. (2010). The Origin of Biopotentials. In J. Webster (Ed.), *Medical Instrumentation: Application and Design* (4 ed., pp. 163-180): John Wiley & Sons, Inc.
- Cogan, S. F. (2008). Neural Stimulation and Recording Electrodes. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 10, 275-309.
- Cottis, R. A. (2001). Interpretation of electrochemical noise data. *Corrosion*, 57, 265–285.
- Cui, X., & Martin, D. C. (2003). Electrochemical deposition and characterization of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) on neural microelectrode arrays. *Sensors and Actuators B Chemical*, 89(1), 92-102.
- Cutmore, T., & James, D. (1999). Identifying and reducing noise in psychophysiological recordings. *International Journal of Psychophysiology*, 32, 129-150.
- Departamento de Física. (2009). Microscopia Electrónica. Retrieved from http://www.fis.uc.pt/data/20092010/apontamentos/apnt_339_10.pdf
- Filho, A., & Fagan, S. (2007). Funcionalização de nanotubos de carbono. *Química Nova*, 30(7).
- Fischer, L., Tenje, M., Heiskanen, A., Masuda, N., Castillo, J., Bentien, A., . . . Boisen, A. (2009). Gold cleaning methods for electrochemical detection applications. *Microelectronic Engineering*, 86(4), 1282-1285.
- Freitas, S., Maia, S., Figueiredo, A., Gomes, P., Pereira, P., Barbosa, M., & Martins, M. (2014). Selective albumin-binding surfaces modified with a thrombin-inhibiting peptide. *Acta Biomater*, 10(3), 1227-1237.
- Gamry. (2016a). Basics of Electrochemical Impedance Spectroscopy. Retrieved from <http://www.gamry.com/application-notes/EIS/basics-of-electrochemical-impedance-spectroscopy/>
- Gamry. (2016b). Faraday Cage: What Is It? How Does It Work? Retrieved from <http://www.gamry.com/application-notes/instrumentation/faraday-cage/>

- Gamry. (2016c). Ground vs. Reference For EEG Recording. Retrieved from <https://www.biopac.com/knowledge-base/ground-vs-reference-for-eeeg-recording/>
- Gamry. (2016d). Reference Electrodes. Retrieved from <http://www.gamry.com/application-notes/electrodes-cells/reference-electrodes/>
- Gamry. (2016e). Testing Electrochemical Capacitors Part 1: CV, EIS, and Leakage Current. Retrieved from <http://www.gamry.com/application-notes/battery-research/testing-electrochemical-capacitors-cyclic-voltammetry-leakage-current/>
- Gamry. (2016f). Two, Three and Four Electrode Experiments. Retrieved from <http://www.gamry.com/application-notes/electrodes-cells/two-three-and-four-electrode-experiments/>
- Gerwig, R., Fuchsberger, K., Schroepel, B., Link, G., Heusel, G., Kraushaar, U., . . . Stelzle, M. (2012). PEDOT-CNT Composite Microelectrodes for Recording and Electrostimulation Applications: Fabrication, Morphology and Electrical Properties. *Frontiers in Neuroengineering*, 5.
- Goldman, R., Stern, J., Engel, J., & Cohen, M. (2012). Simultaneous EEG and fMRI of the alpha rhythm. *Neuroreport*, 13(18), 2487–2492.
- Grozea, C., Voinescu, C., & Fazli, S. (2011). Bristle-sensors – low-cost flexible passive dry EEG electrode for neurofeedback and BCI applications. *Journal of Neural Engineering*, 8(2).
- Heath, J. (2015). *Energy Dispersive Spectroscopy Microscopy and Analysis*: John Wiley & Sons, Inc.
- Huigen, E. (2001). *Noise characteristics of surface electrodes*. University of Amsterdam
- Huigen, E., Peper, A., & Grimbergen, C. (2002). Investigation into the origin of the noise of surface electrodes. *Medical and Biological Engineering and Computing*, 40(3), 332-338.

- Jensen, W. (2012). Faraday's Laws or Faraday's Law? *Journal of Chemical Education*, 89(9), 1208–1209.
- Keefer, E., Botterman, B., Romero, M., Rossi, A., & Gross, G. (2008). Carbon nanotube coating improves neuronal recordings. *Nature Nanotechnology*, 3, 434 - 439
- Klem, G., Luders, H., Jasper, H., & Elger, C. (1999). The ten-twenty electrode system of the International Federation. In G. Deuschl & A. Eisen (Eds.), *Guidelines of the International Federation of Clinical Physiology* (Vol. 5, In: (EEG Suppl. 52)): International Federation of Clinical Neurophysiology.
- Kolarcik, C., Catt, K., Rost, E., Albrecht, I., Bourbeau, D., Zhanhong, D., . . . Cui, X. Evaluation of poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/carbon nanotube neural electrode coatings for stimulation in the dorsal root ganglion. *Journal of Neural Engineering*, 12(1).
- Lopes da Silva, F. (2010). EEG: origin and measurement. In C. Mulert & L. Lemieux (Eds.), *EEG-fMRI: physiological basis, technique and applications*. (1 ed., pp. 19-38). Berlin: Springer-Verlag.
- Lopez-Gordo, M. A., Sanchez-Morillo, D., & Pelayo Valle, F. (2014). Dry EEG Electrodes. *Sensors*, 14, 12847-12870.
- Lota, K., Khomenko, V., & Frackowiak, E. (2004). Capacitance properties of poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/carbon nanotubes composites. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 65, 295-301.
- Ludwig, K., Uram, J., Yang, J., Martin, D., & Kipke, D. (2006). Chronic neural recordings using silicon microelectrode arrays electrochemically deposited with a poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) film. *Journal of Neural Engineering*, 3(1), 66-70.
- Luo, X., Weaver, C. L., Zhou, D. D., Greenberg, R., & Cui, X. T. (2011). Highly stable carbon nanotube doped poly(3,4-ethylenedioxythiophene). *Biomaterial*, 32(24), 5551-5557.

- Mandal, H., Knaack, G., Charkhkar, H., McHail, D., Kastee, J., Dumas, T., . . . Pancrazio, J. (2014). Improving the performance of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) for brain-machine interface applications. *Acta Biomaterial*, *10*(6), 2446-2454.
- Mansfeld, F., Sun, Z., Hsu C., & Nagiub, A. (2001). Concerning trend removal in electrochemical noise measurements. *Corrosion Science*, *43*(2), 341-352.
- McAdams, E. (2010). Bioelectrodes. In J. Webster (Ed.), *Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation* (2 ed.): John Wiley & Sons, Inc.
- McAdams, E. T., Lackermeier, A., McLaughlin, J. A., & Macken, D. (1995). The linear and non-linear electrical properties of the electrode-electrolyte Interface. *Biosensors and Bioelectronics*, *10*(1-2), 67-74.
- Mota, A. R., Duarte, L., Rodrigues, D., Martins, A. C., Machado, A. V., Vaz, F., . . . Fonseca, C. (2013). Development of a quasi-dry electrode for EEG recording. *Sensors and Actuators A: Physical*, *199*, 310-317.
- Mousavi, Z., Bobacka, J., Lewenstam A., & Ivaska, A. (2009). Poly(3,4-ethylenedioxythiophene (PEDOT) doped with carbon nanotubes as ion-to-electron transducer in polymer membrane-based potassium ion-selective electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, *633*(1), 246-252.
- Neuman, M. R. (2000). Biopotential Electrodes. In J. Bronzino (Ed.), *The Biomedical Engineering Handbook* (2 ed.). Boca Ranton: CRC Press LLC.
- Peng, C., Jin, J., & Cheng, G. (2007). A comparative study on electrochemical co-deposition and capacitance of composite films of conducting polymers and carbon nanotubes. *Electrochimica Acta*, *53*(2), 525-537.
- Rampil, I. J. (1998). A Primer for EEG Signal Processing in Anesthesia *Anesthesiology*, *89*(4), 22.
- Royal Society of Chemistry. (2016). Ultrasonication. Retrieved from <http://www.rsc.org/publishing/journals/prospect/ontology.asp?id=CMO:000170>

- Schmitz, I., Schreiner, M., Friedbacher, G., & Grasserbauer, M. (1997). Phase Imaging as an Extension to Tapping Mode AFM for the Identification of Material Properties on Humidity-Sensitive Surfaces. *Applied Surface Science*, 115(2), 190-198.
- Swapp, S. (2016). Scanning Electron Microscopy (SEM). Retrieved from http://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/SEM.htm
- Tate, P., Seeley, R., & Stephens, T. (2003). Organização funcional do tecido nervoso *Anatomia e Fisiologia* (6 ed., pp. 159-175): McGraw Hill Higher Education.
- Tautan, A., Mihajlovic, V., Chen, Y., Grundlehner, B., Penders, J., & Serdijn, W. (2014). Signal Quality in Dry Electrode EEG and the Relation to Skin-electrode Contact Impedance Magnitude *Proceedings of the 7th International Conference on Biomedical Electronics and Devices* (pp. 12–22). France.
- Teplan, M. (2002). Fundamentals of EEG measurement. *Measurement Science Review*, 2, 1-11.
- Universidade do Minho. (2014). Técnicas de caracterização de revestimentos finos. Retrieved from <https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/3280/5/Cap%C3%ADtulo%204.pdf>
- Valli, J. (1986). A review of adhesion test methods for thin hard coatings. *Journal of Vacuum Science & Technology A Vacuum Surfaces and Films*, 3007-3014.
- Viscambio. (2016). What is Bio – Frequency and its major role in Human Life? Retrieved from <http://viscambio.net/what-is-bio-frequency-and-its-major-role-in-human-life/>
- Voge, C., & Stegemann, J. (2011). Carbon nanotubes in neural interfacing applications. *Journal of Neural Engineering*, 8(1).
- Wu, T., Lin, Y., & Liao, C. (2005). Preparation and characterization of polyaniline/multi-walled carbon nanotube composites. *Carbon*, 43(4), 734-740.

- Xia, J., Masaki, N., Jianga, K., & Yanagida, S. (2007). The influence of doping ions on poly(3,4-ethylenedioxythiophene) as a counter electrode of a dye-sensitized solar cell. *Journal of Materials Chemistry*(27), 2845-2850.
- Xiao, Y., Cui, X., & Martin, D. (2004). Electrochemical polymerization and properties of PEDOT/S-PEDOT on neural microelectrode arrays. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 573(1), 43-48.
- Yeh, S., Chen, Y., Su, H., Yew, T., Kao, H., Lee, Y., . . . Chen, H. (2009). Interfacing Neurons both extracellularly and intracellularly using Carbon-Nanotube probes with long-term endurance. *Langmuir*, 25, 7718-7724.

Apêndices

Apêndice A: Curvas de Electropolimerização

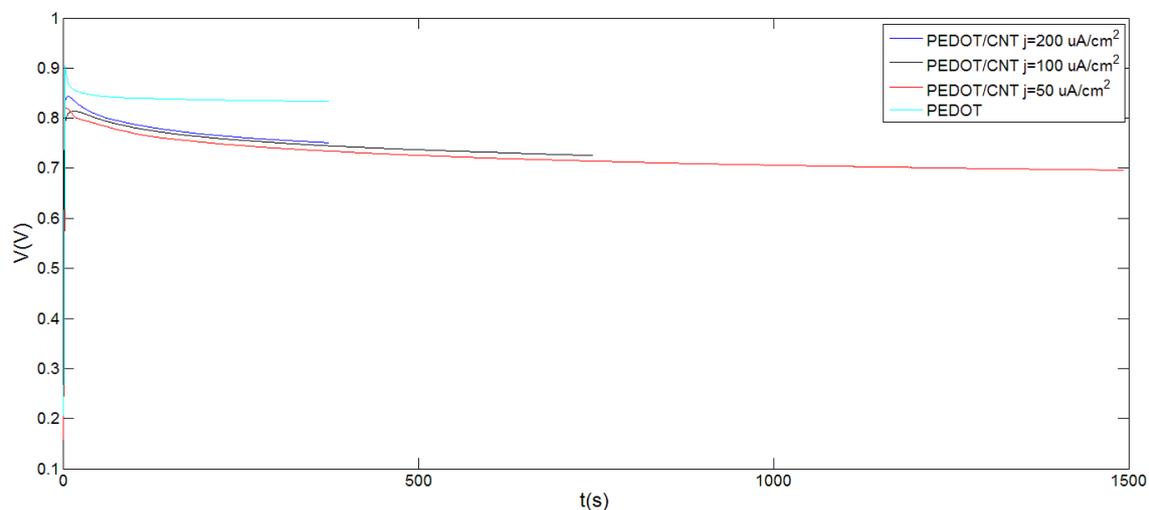


Figura A.1. | Registo do potencial do eléctrodo durante o processo de eletropolimerização para as superfícies 2CNT_1S_i200, 2CNT_1S_i100, 2CNT_1S_i50 e 0CNT_1S_i200, com a legenda: PEDOT/CNT $j=200 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, PEDOT/CNT $j=100 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, PEDOT/CNT $j=50 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ e PEDOT.

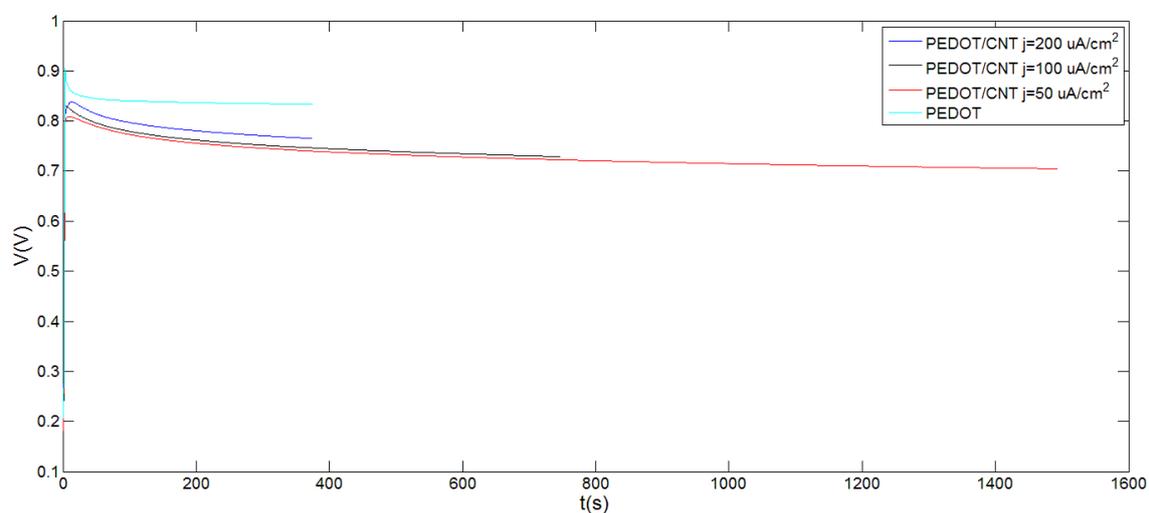


Figura A.2. | Registo do potencial do eléctrodo durante o processo de eletropolimerização para as superfícies 1CNT_1S_i200, 1CNT_1S_i100, 1CNT_1S_i50 e 0CNT_1S_i200, com a legenda: PEDOT/CNT $j=200 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, PEDOT/CNT $j=100 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, PEDOT/CNT $j=50 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ e PEDOT.

Apêndice A: *Curvas de eletropolimerização*

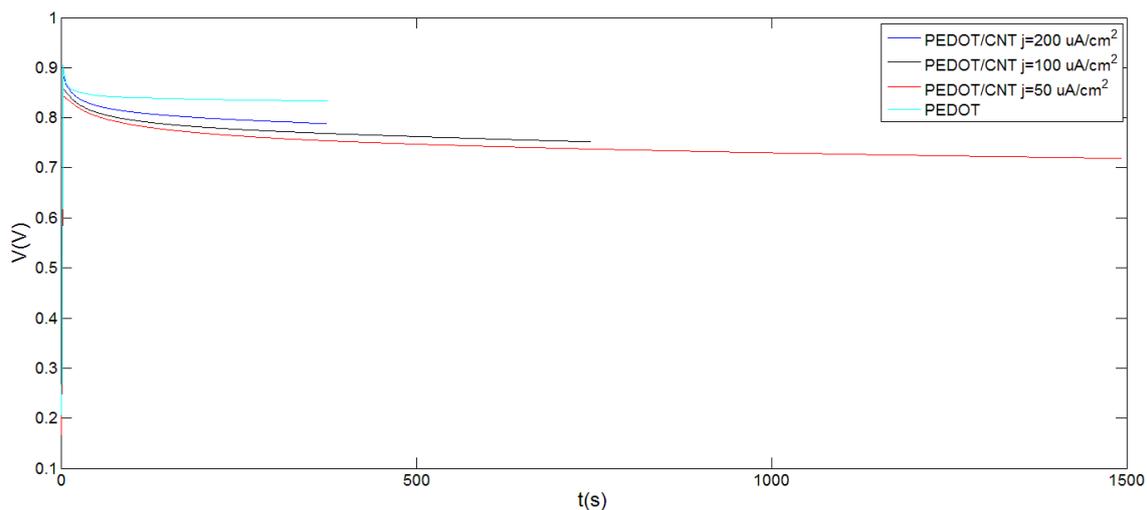


Figura A.3. Registo do potencial do eléctrodo durante o processo de eletropolimerização para as superfícies 1CNT_1,5S_i200, 1CNT_1,5S_i100, 1CNT_1,5S_i50 e 0CNT_1S_i200, com a legenda: PEDOT/CNT $j=200 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, PEDOT/CNT $j=100 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, PEDOT/CNT $j=50 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ e PEDOT.

Apêndice B: Diagramas de Bode e Diagramas de Fase

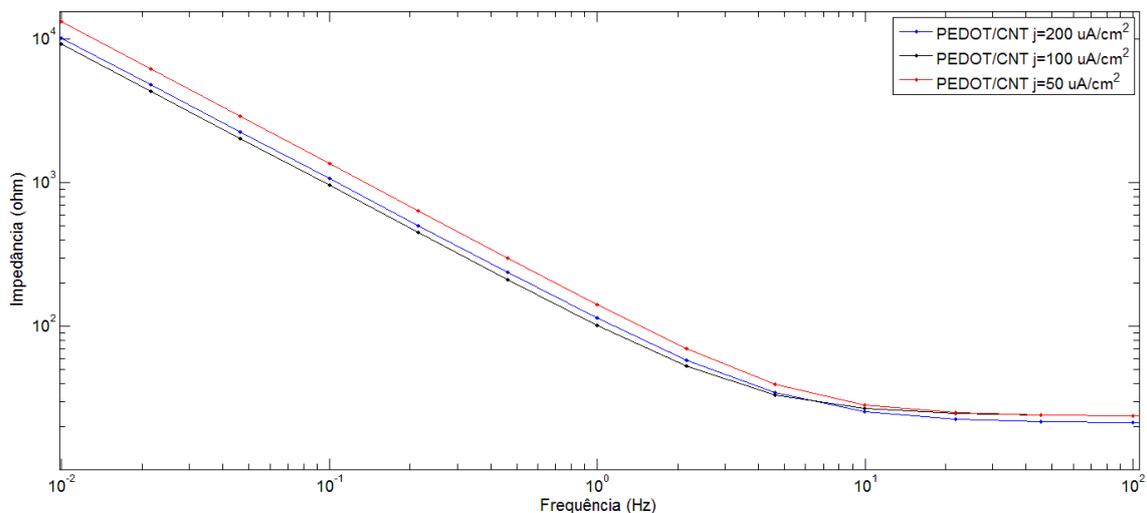


Figura B.1. | Diagrama de Bode do espectro de impedâncias relativos às superfícies: 2CNT_1S_i200, 2CNT_1S_i100 e 2CNT_1S_i50, com a legenda: PEDOT/CNT $j=200 \mu A/cm^2$, PEDOT/CNT $j=100 \mu A/cm^2$ e PEDOT/CNT $j=50 \mu A/cm^2$.

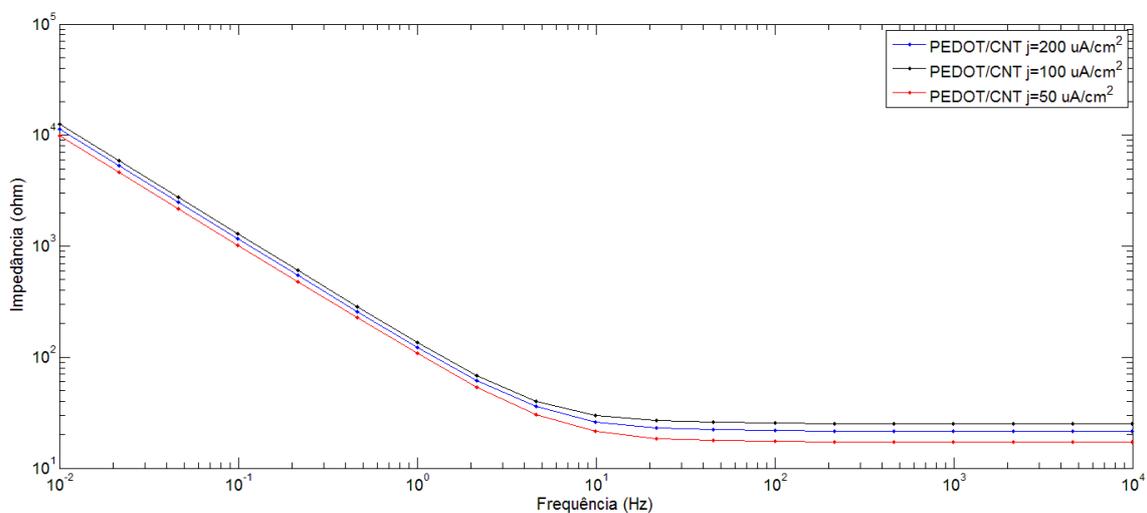


Figura B.2. | Diagrama de Bode do espectro de impedâncias relativos às superfícies: 1CNT_1S_i200, 1CNT_1S_i100 e 1CNT_1S_i50, com a legenda: PEDOT/CNT $j=200 \mu A/cm^2$, PEDOT/CNT $j=100 \mu A/cm^2$ e PEDOT/CNT $j=50 \mu A/cm^2$.

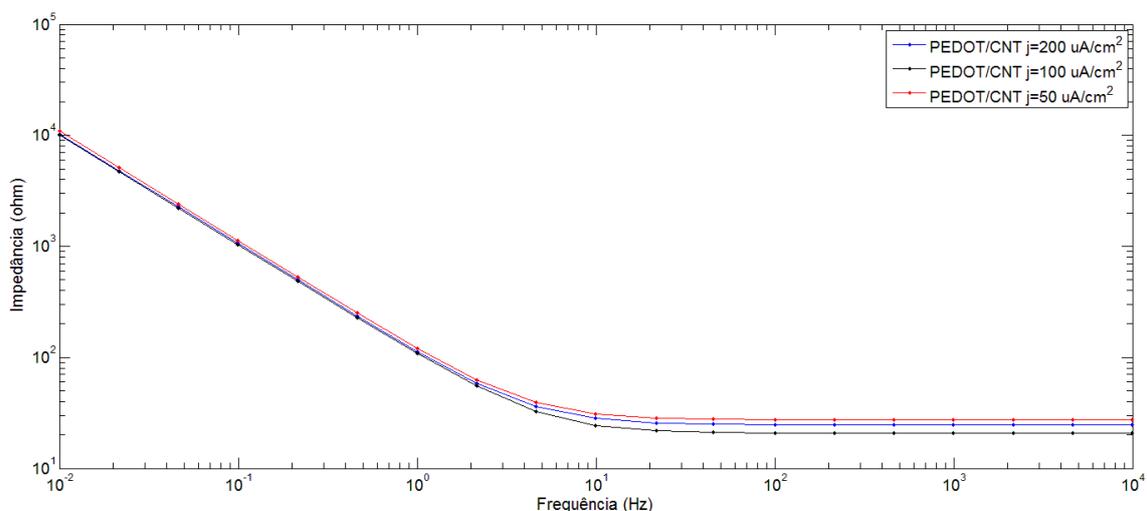


Figura B.3. Diagrama de Bode do espectro de impedâncias relativos às superfícies: 1CNT_1,5S_i200, 1CNT_1,5S_i100 e 1CNT_1,5S_i50, e para o fio de ouro sem revestimento, com a legenda: Au: PEDOT/CNT $j=200 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, PEDOT/CNT $j=100 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ e PEDOT/CNT $j=50 \mu\text{A}/\text{cm}^2$.

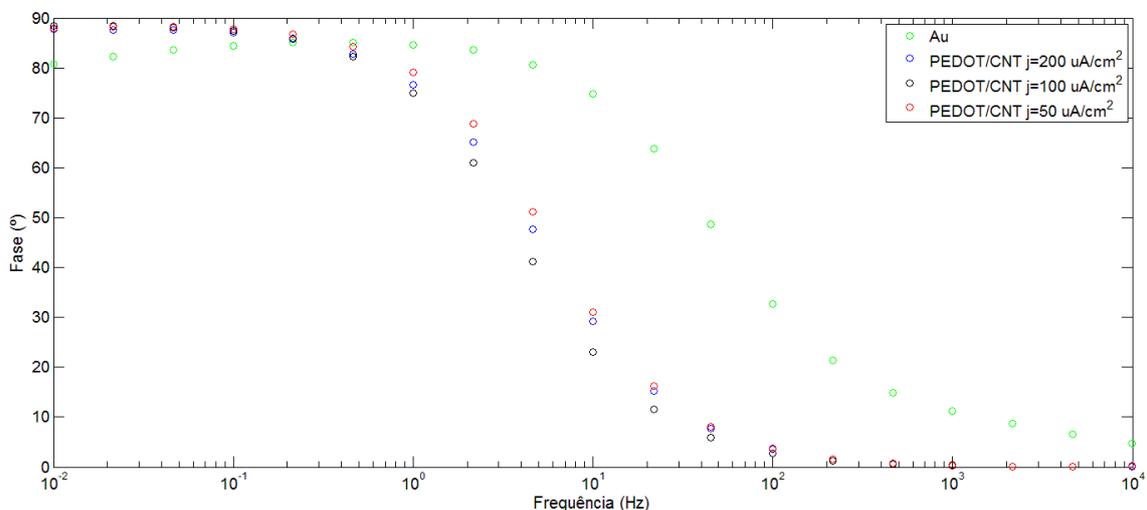


Figura B.4. Diagrama de Fase do espectro de impedâncias relativos às superfícies: 2CNT_1S_i200, 2CNT_1S_i100 e 2CNT_1S_i50, e para o fio de ouro sem revestimento, com a legenda: Au, PEDOT/CNT $j=200 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, PEDOT/CNT $j=100 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ e PEDOT/CNT $j=50 \mu\text{A}/\text{cm}^2$.

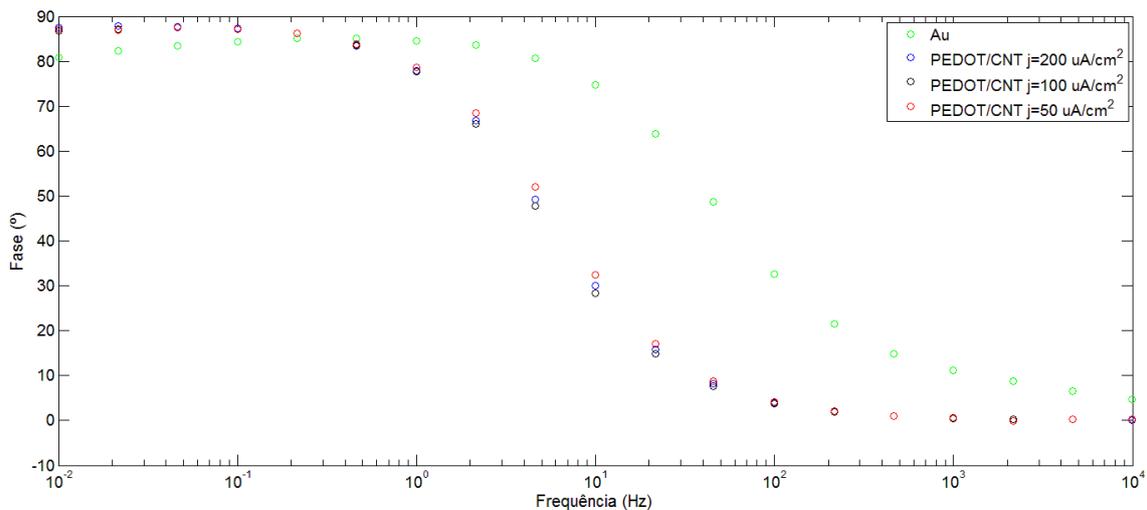


Figura B.5. Diagrama de Fase do espectro de impedâncias relativos às superfícies: 1CNT_1S_i200, 1CNT_1S_i100 e 1CNT_1S_i50, e para o fio de ouro sem revestimento, com a legenda: Au, PEDOT/CNT $j=200 \mu A/cm^2$, PEDOT/CNT $j=100 \mu A/cm^2$ e PEDOT/CNT $j=50 \mu A/cm^2$.

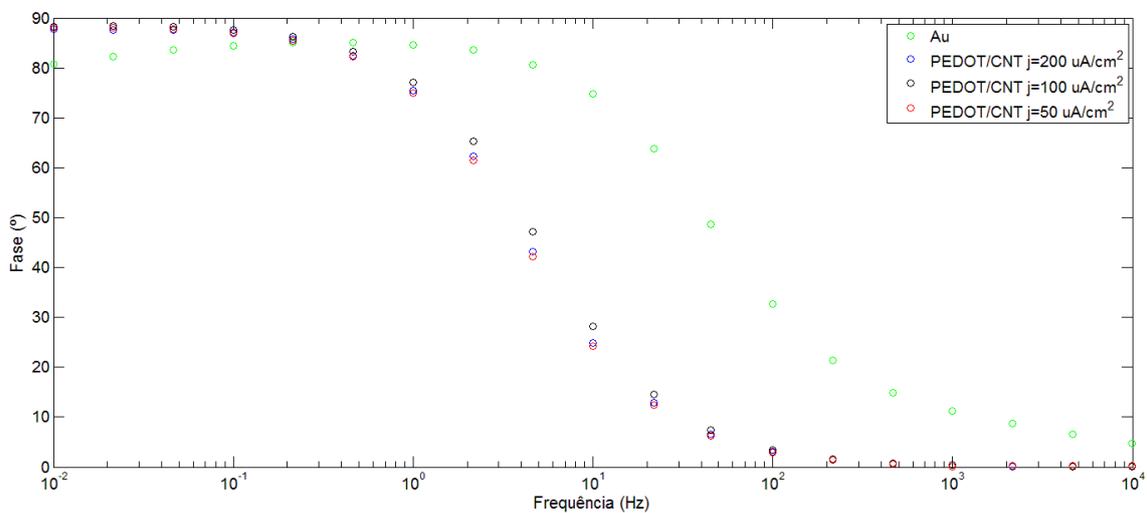


Figura B.6. Diagrama de Bode do espectro de impedâncias relativos às superfícies: 1CNT_1,5S_i200, 1CNT_1,5S_i100 e 1CNT_1,5S_i50, e para o fio de ouro sem revestimento, com a legenda: Au, PEDOT/CNT $j=200 \mu A/cm^2$, PEDOT/CNT $j=100 \mu A/cm^2$ e PEDOT/CNT $j=50 \mu A/cm^2$.

Apêndice C: Voltamogramas Cíclicos

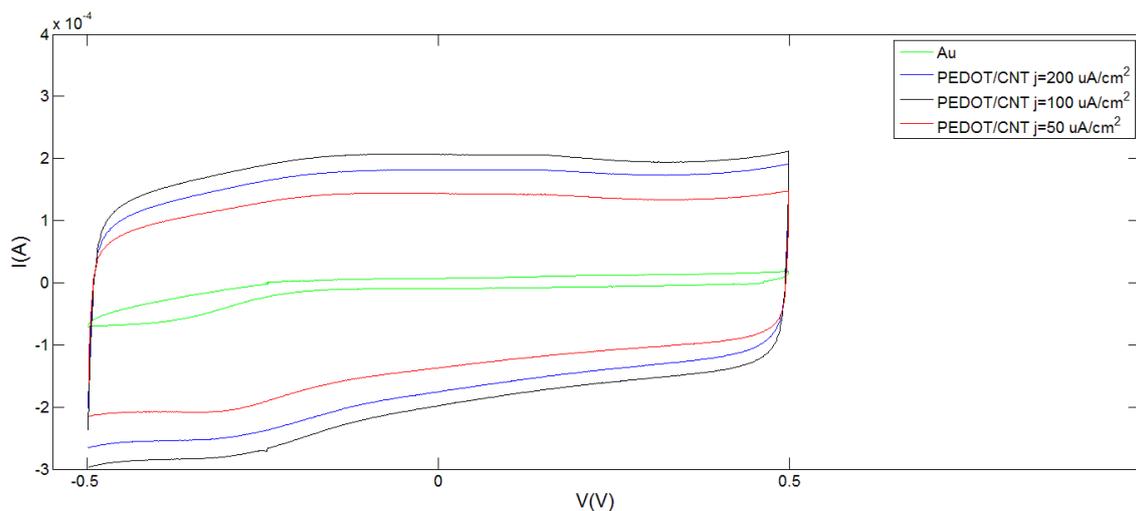


Figura C.1. Voltamogramas Cíclicos relativos às superfícies: 2CNT_1S_i200, 2CNT_1S_i100 e 2CNT_1S_i50 e do fio de ouro sem revestimento, com a legenda: Au, PEDOT/CNT $j=200 \mu A/cm^2$, PEDOT/CNT $j=100 \mu A/cm^2$ e PEDOT/CNT $j=50 \mu A/cm^2$.

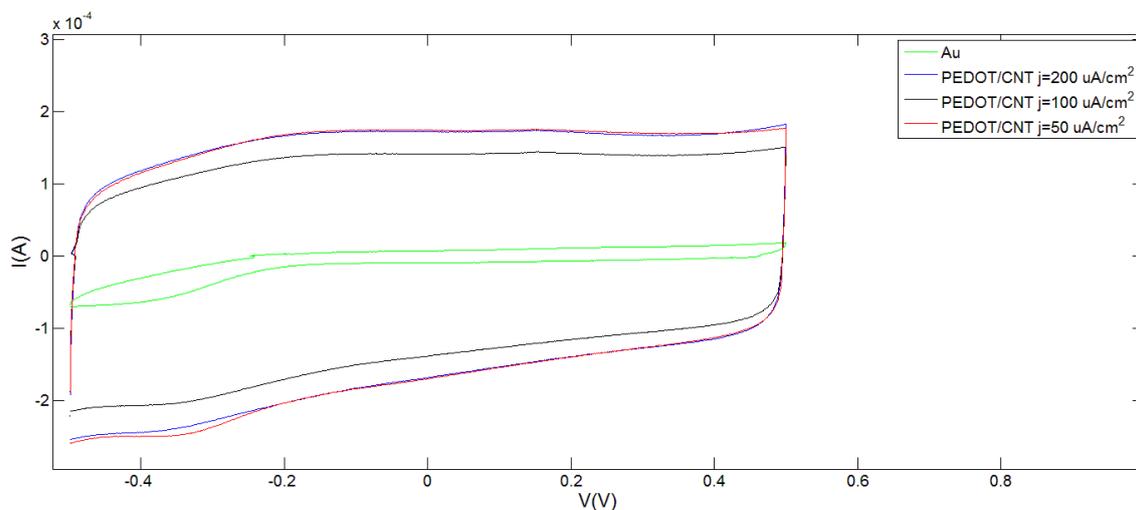


Figura C.2. Voltamogramas Cíclicos relativos às superfícies: 1CNT_1S_i200, 1CNT_1S_i100 e 1CNT_1S_i50 e do fio de ouro sem revestimento, com a legenda: Au, PEDOT/CNT $j=200 \mu A/cm^2$, PEDOT/CNT $j=100 \mu A/cm^2$ e PEDOT/CNT $j=50 \mu A/cm^2$.

Apêndice C: Voltamogramas Cíclicos

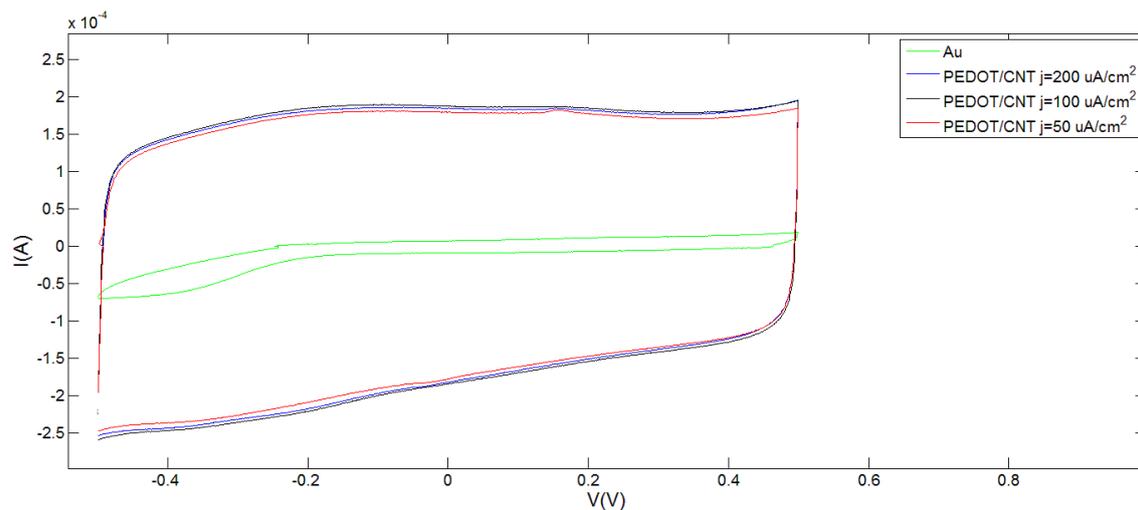


Figura C.3. Voltamogramas Cíclicos relativos às superfícies: 1CNT_1,5S_i200, 1CNT_1,5S_i100 e 1CNT_1,5S_i5 e do fio de ouro sem revestimento, com a legenda: Au, PEDOT/CNT $j=200 \mu A/cm^2$, PEDOT/CNT $j=100 \mu A/cm^2$ e PEDOT/CNT $j=50 \mu A/cm^2$.

Apêndice D: Densidade espectral de potência do ruído para o fio de ouro sem revestimento

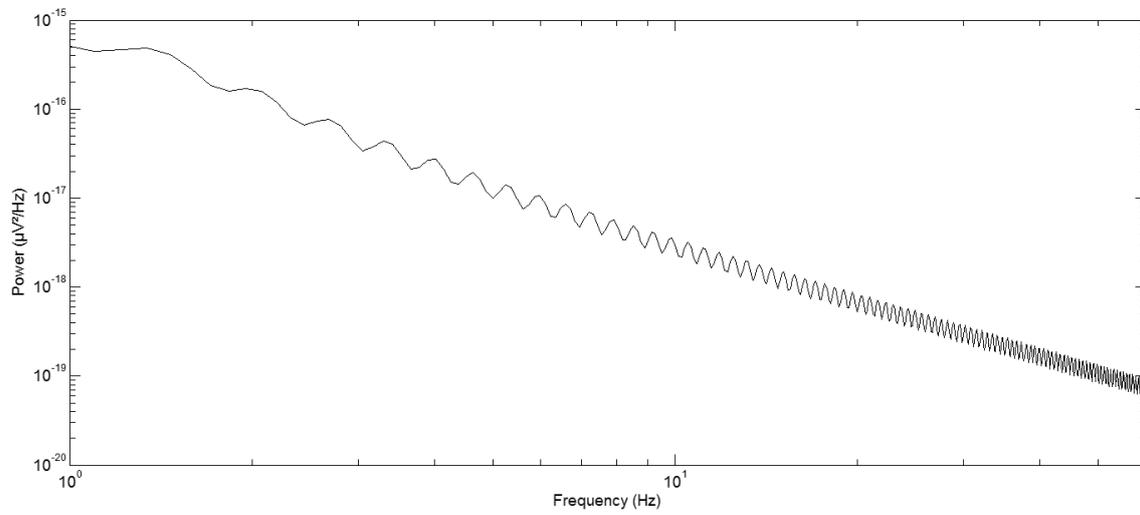


Figura D.1. Densidade espectral de potência do ruído para o fio de ouro sem revestimento.

