

• U • C •

FCTUC FACULDADE DE CIÊNCIAS
E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

DEPARTAMENTO DE FÍSICA

MESTRADO INTEGRADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

Desenvolvimento de biossensores não invasivos para captação de sinais eletroencefálicos baseados em alginato, com potencial utilização em recém-nascidos

Dissertação submetida à Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica sob a orientação do Professor Carlos Fonseca e do Professor Doutor

Albano Cavaleiro

Com a colaboração institucional de:



Ana Cristina Oliveira Martins

Coimbra, Julho 2012

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.

Júri

Presidente: António Adriano Castanhola Batista

Categoria: Professor Auxiliar

Departamento: Departamento de Física

Nome: José Carlos Magalhães Duque da Fonseca

Categoria: Professor Auxiliar

Instituição: Departamento de Engenharia de Materiais da FEUP

Nome: Albano Augusto Cavaleiro Rodrigues de Carvalho

Categoria: Professor Catedrático

Departamento: Departamento de Engenharia Mecânica

Nome: Ana Vera Machado

Categoria: Professor Auxiliar

Instituição: Departamento de Engenharia de Polímeros da Universidade do Minho

*Ao avô e à tia, que não tiveram
tempo para me ver chegar até aqui.*

Agradecimentos

Durante todo este percurso académico muitas pessoas e instituições contribuíram, de modo direto ou indireto, para o meu sucesso, pelo que não posso deixar de agradecer a quem mais me apoiou durante toda esta etapa.

Quero começar por agradecer a todos os elementos que constituem a Centro de Engenharia Mecânica da Universidade de Coimbra (CEMUP), o Departamento de Metalurgia e de Materiais da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto e o Departamento de Polímeros da Universidade do Minho, pela disponibilização de recursos humanos e tecnológicos.

A maioria dos ensinamentos que me foram dados este ano veio da parte do meu supervisor, o professor Carlos Fonseca, que sempre teve uma palavra de motivação e orientação a dar. Obrigada pela paciência, dedicação e por toda a disponibilidade que teve comigo. Ao professor Albano Cavaleiro, expresse o meu profundo agradecimento pela oportunidade concedida, pela sabedoria e pelo apoio mostrado durante o decorrer deste trabalho. Um muito obrigada a ambos, pela orientação dada, pelas críticas e pela confiança que depositaram em mim.

À professora Ana Vera Machado que sempre se mostrou disponível para me ajudar, pela disponibilização de equipamentos, sem os quais uma parte deste trabalho não poderia ter sido realizada, bem como à Joana Barbas pela ajuda incondicional na realização de várias análises.

Ao Patrique Fiedler por toda a disponibilidade, paciência e valiosa ajuda prestada na análise e processamento de sinais com o *Matlab*.

Ao Pedro Chaves pela ajuda dada ao longo da realização dos testes *in-vivo*.

Não posso deixar de agradecer ao professor Miguel Morgado pela excelente coordenação do curso e por lutar para criar mais e melhores oportunidades para todos os estudantes de Engenharia Biomédica.

Aos colegas de laboratório que ajudaram a criar um ambiente descontraído e produtivo, em particular ao Diogo Rodrigues e ao Leonel Gomes por toda a disponibilidade, ajuda e carinho manifestados durante todo este ano.

Aos meus colegas de curso, um obrigada por estes cinco anos fantásticos e pelos momentos partilhados.

Aos meus pais e aos meus irmãos por todo o amor, carinho e apoio imensurável que me deram ao longo de todo o curso e por terem proporcionado todos os meios para que eu concluísse os estudos. Obrigada família!

Ao Alexandre, agradeço apenas porque sim!

A todos o meu Muito Obrigada!

Ana

Resumo

O maior problema na monitorização de sinais eletroencefálicos em recém-nascidos resulta da agressividade do contacto entre o próprio sensor e a pele. Os problemas advêm da natureza do próprio eléctrodo (geralmente metálico) e das pastas condutoras que são usadas para melhorar o contacto eléctrico e facilitar a passagem do sinal. As pastas condutoras provocam reacções alérgicas devido à presença de determinados compostos na sua constituição, tal como surfactantes. Para além disto, durante um exame prolongado, podem ocorrer micromovimentos do próprio sensor que provocam a abrasão da pele, devido ao contacto direto existente entre o sensor metálico e o escalpe. A necessidade de limpeza do escalpe e o contacto prolongado são operações algo agressivas, que podem causar lesões no recém-nascido.

O objetivo deste trabalho é a preparação de um eléctrodo húmido capaz de permitir uma gravação da atividade eléctrica de qualidade confiável, usando um hidrogel de alginato. Este novo conceito de eléctrodo será capaz de garantir o contacto entre o sensor e a pele através de um hidrogel, contribuindo para a atenuação do ruído devido à sua natureza semissólida e deformável. A grande percentagem de água do hidrogel proporcionará um forte efeito hidratante à superfície da pele, colaborando para o aumento do contacto entre a pele e o eléctrodo, redução de impedância, redução do desconforto do bebé e facilidade de utilização. A natureza biocompatível do hidrogel, a capacidade em se conformar a uma área específica e manter essa forma semissólida durante todo o exame diminui a possibilidade de reacções alérgicas e de abrasão da pele. O hidrogel funcionará como uma almofada impedindo o contacto direto entre o sensor e o escalpe. Por outro lado, escolheu-se o alginato devido às suas propriedades de biocompatibilidade e devido à sua capacidade de se ligar eficientemente a catiões bivalente, tais como Ca^{2+} . O hidrogel apresenta deste modo uma excelente biocompatibilidade química e mecânica com os tecidos biológicos.

As propriedades do hidrogel foram otimizadas para garantir um equilíbrio entre o tempo de injeção e o tempo de gelificação. Pretende-se que o hidrogel gelifique rapidamente para evitar escoamento mas, em contrapartida, tem que ter um comportamento mecânico ideal para ser facilmente injetável. Através de análises químicas e reológicas foi possível estudar a cinética de gelificação do hidrogel. Para o fabrico do substrato do eléctrodo foi escolhida a poliamida. Este material foi revestido com prata através da técnica de *Electroless Plating*. A utilização de um polímero revestido com prata para fabrico do eléctrodo, em substituição da prata maciça, é um novo conceito que se pretende demonstrar também. As imagens SEM mostraram que a poliamida é o material ideal para construção do substrato do biossensor devido à homogeneidade e uniformidade da superfície de revestimento. A deposição de uma camada de AgCl sobre o revestimento de Ag através da aplicação de um corrente permitiu a estabilização do potencial do eléctrodo e diminuição da impedância. A espectroscopia de impedância eletroquímica mostrou que a poliamida permite a construção de um sensor estável e com baixas impedâncias.

A conclusão deste estudo com os testes *in-vivo* em adultos saudáveis comprovou a fiabilidade deste novo conceito de eléctrodo.

Abstract

The biggest problem in monitoring electroencephalography signals in newborns results in the aggressiveness contact between the sensor and the skin. The problems arise from the nature of the electrode (usually metallic) and conductive pastes, which are used to improve the electrical contact and facilitate the passage of the signal. The conductive pastes induced allergic reaction due to the presence of certain compounds in its composition, such as surfactants. Furthermore, in a prolonged examination may occur micromovements of the sensor causing the abrasion of the skin, due to the direct contact between the metallic sensor and the scalp. The necessity to clean the scalp and the prolonged contact are aggressive operations which can induce injury in newborns.

The goal of this work is to prepare a wet electrode, which will allow a recording of electrical activity with reliable quality, using an alginate hydrogel. This new concept of electrode will be able to ensure contact between the sensor and the skin through the use of a hydrogel, contributing to the attenuation of noise due to its semisolid shape and deformable. The large percentage of water in the hydrogel will provide a strong moisturizing effect to the skin surface, increasing the contact between the skin and the electrode, reduction the impedance, reducing the discomfort of the newborn and the ease of use. The biocompatible nature of the hydrogel, its ability to conform to a specific area and hold that shape during the examination decreases the possibility of allergic reaction and abrasion skin. The hydrogel will act as a cushion prevents the direct contact between the sensor and the scalp. Moreover, alginate has been chosen because of its biocompatibility properties and due to its ability to bind efficiently to divalent cations, such as Ca^{2+} . Thus, the hydrogel has as excellent chemical and mechanical biocompatibility with biological tissue.

The properties of the hydrogel were optimized to ensure a balance between the injection time and the gelation time. It is intended that the hydrogel solidify quickly to avoid outflow but in contrast, must have an ideal mechanical behavior to be easily injected. Through chemical and rheological analyses was possible to study the gelation kinetics of the hydrogel. In the manufacture of the electrode substrate was chosen the polyamide. This material was coated with silver using the *Electroless Plating* technique. The use of a polymer coated with silver for the manufacture of the electrodes, instead of massive silver, is a new concept that aims to demonstrate. The SEM images showed that the polyamide is the ideal material for the construction of the biosensor of the substrate due to the greater homogeneity and uniformity of the coating surface. The deposition of an AgCl layer on the Ag coating by applying a current, allowed the stabilization of the electrode potential and reduction the impedance. The electrochemical impedance spectroscopy showed that the polyamide allows the construction of a stable sensor with low impedance.

The conclusion of this study with *in-vivo* tests in healthy adults showed the reliability of this new concept of electrode.

Índice de Conteúdos

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iii
Índice de Conteúdos	iv
Índice de Figuras	vi
Índice de Tabelas	viii
Índice de Símbolos e Siglas	ix
Introdução	1
Capítulo I	
Enquadramento Teórico	3
1.1. Sistema Nervoso	3
1.2. Neurónios	4
1.3. Geração de sinais elétricos no corpo	5
1.3.1. Propagação de sinais eletroencefálicos num neurónio	5
1.3.2. Propagação de sinais eletroencefálicos entre neurónios	7
1.4. Sincronização de sinais	8
1.5. Eletroencefalografia (EEG)	9
1.5.1. Técnica de aquisição do sinal	9
1.5.2. Componentes do sistema	13
1.5.3. Aplicações	14
1.6. Eléttodos	14
1.6.1. Eléttodo invasivo	15
1.6.2. Eléttodo não invasivo	15
Capítulo II	
Desenvolvimento do Novo Conceito de Eléttodo	18
2.1. Os exames EEG em recém-nascidos	18
2.2. Projeto do novo eléttodo	19
2.3. Os hidrogéis de alginato	21

2.4. O Sensor	24
Capítulo III	
Material e Métodos.....	28
3.1. Preparação do gel de alginato	28
3.2. Métodos de Caracterização Básica do Hidrogel.....	29
3.2.1. Viscosimetria.....	30
3.2.2. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR).....	31
3.2.3. Análise química.....	33
3.2.4. Reologia.....	33
3.3. Procedimento de deposição de prata sobre o substrato.....	35
3.4. Métodos de Caracterização Básica do Revestimento.....	37
3.4.1. Microscopia Eletrônica de Varrimento e EDS.....	37
3.4.2. Espectroscopia de impedância Eletroquímica	39
3.4.3. Medição do ruído elétrico	41
3.5. Testes in-vivo.....	42
Capítulo IV	
Resultados e Discussão.....	43
4.1. Otimização da síntese do hidrogel.....	43
4.1.1. Peso Molecular.....	43
4.1.2. Composição Química.....	44
4.1.3. Estudo da cinética de gelificação	45
4.1.4. Estudo das propriedades reológicas.....	49
4.2. Produção do revestimento sobre o substrato: o Cobre.....	54
4.2.1. Morfologia do revestimento.....	55
4.2.2. Estabilidade de impedância eletroquímica	60
4.3. Produção do revestimento sobre o substrato: a poliamida	63
4.3.1. Morfologia do revestimento.....	63
4.3.2. Estabilidade de impedância eletroquímica	64
4.3.3. Medição do ruído elétrico	65
4.4. Testes in-vivo.....	68
Capítulo V	
Conclusões	70
Referências	72

Índice de Figuras

Figura 1 – Esquema da medição de biopotenciais através do uso de elétrodos [adaptado de [5]].....	2
Figura 1.1 – Representação dos principais componentes de um neurónio [10].	4
Figura 1.2 – Representação do fluxo iónico durante o potencial de ação [adaptado de [13]].	7
Figura 1.3 – Posições para colocação dos elétrodos pelo Sistema Internacional 10-20 [adaptado de [11]]....	10
Figura 1.4 – Tipos de ondas cerebrais [20].	12
Figura 1.5 – Conjunto de materiais usados num exame EEG [25].....	13
Figura 1.6 – Exemplo de eletrodo invasivo: matriz de elétrodos intra-cortical [5].....	15
Figura 1.7 – Exemplo de eletrodo não invasivos: (A) eletrodo húmido de Ag e AgCl da Universidade de Grent; (B) eletrodo seco de g.@SAHARA.	16
Figura 1.8 – Circuito equivalente de fonte de biopotenciais e de interação eletrodo-pele. A fonte de biopotencial é a fonte de corrente e a resistência do tecido é mostrado por Rt. Cet e Ret são os elementos eletrodo-pele equivalentes [adaptado de [5]].	17
Figura 2.1 – Exemplos de alguns tipos de elétrodos/montagens usados em recém-nascidos [17, 31].....	19
Figura 2.2 – Protótipo do biossensor a projetar: a ventosa (esq.) e o substrato do eletrodo (dir.) (medidas expressas em mm).	20
Figura 2.3 – Biossensor construído para transmissão de sinais EEG em recém-nascidos.....	20
Figura 2.4 – Estrutura dos blocos homopoliméricos (-M e -G) e heteropoliméricos (-MG) que constituem a molécula de alginato: (A) sequência M-M, (B) sequência G-G e (C) sequência M-G-M [37].	22
Figura 2.5 – Ligações iónicas entre o ião Ca^{2+} e o alginato – modelo da caixa de ovos. (A) Quelação dos catiões bivalentes; (B) Formação de junções intercadeias [40].....	23
Figura 2.6 – Reação de síntese de poliamida [45].	25
Figura 2.7 – Esquema de deposição de material através de métodos eletroquímicos.	26
Figura 3.1 – Esquema do procedimento experimental usado para produção do hidrogel.	29
Figura 3.2 – Esquema da constituição e funcionamento do viscosímetro de Ubbelohde [adaptado de [55]].	31
Figura 3.3 – Sistema FTIR-ATR [adaptado de [57]].	32
Figura 3.4 – Reómetro do Departamento de Polímeros da Universidade do Minho.....	35
Figura 3.5 – Esquema de montagem experimental para deposição eletroquímica. A montagem eletroquímica contém: 1) eletrodo de referência de Ag/AgCl; 2) Amostra de Cu; 3) Eletrodo auxiliar de	

grafite; 4) Solução eletrolítica com 0,2 M de EDTA; 5) Potencióstato EG&G 273A; 6) computador para aquisição de resultados [adaptado de [63]].	36
Figura 3.6 – Na figura à esquerda está representado um desenho esquemático de uma coluna de SEM [65]. À direita encontra-se o equipamento JEOL JSM 6301F situado no Centro de Materiais da Universidade do Porto.	38
Figura 3.7 – Montagem experimental usada para a medição do ruído a sonda: Working (verde) e a Working Sense (azul) foram ligados a uma amostra, e o Counter (vermelho) e o Reference (branco) foram ligados à outra amostra.	41
Figura 3.8 – Montagem experimental usado em testes in-vivo.	42
Figura 4.1 – Espectros FTIR-ATR dos diferentes alginatos.	45
Figura 4.2 – Estudo da influência da concentração de alginato no tempo de gelificação e injeção, realizado com o alginato 71238.	46
Figura 4.3 – Evolução da cinética de gelificação dos hidrogéis obtidos a partir de diferentes alginatos.	47
Figura 4.4 – Influência da concentração de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e CaCO_3 na cinética de gelificação dos hidrogéis.	48
Figura 4.5 – Estudo das propriedades reológicas em hidrogéis com rácios $\text{Ca}^{2+}:\text{COO}^-$ de: 0,158 (amostra 1), 0,189 (amostra 2), 0,253 (amostra 3), 0,316 (amostra 4) e 0,379 (amostra 5).	50
Figura 4.6 – Estudo das propriedades viscoelásticas ao longo do tempo numa amostra que usa o CaCO_3 como única fonte de Ca^{2+} . À direita está representado A evolução e na amostra padrão (amostra 1).	51
Figura 4.7 – Representação das propriedades viscoelásticas dos diferentes compostos.	53
Figura 4.8 – Evolução das propriedades viscoelástica das amostras com a frequência, em amostras com diferentes com rácios $\text{Ca}^{2+}:\text{COO}^-$ de: 0,158 (amostra 1), 0,189 (amostra 2), 0,253 (amostra 3), 0,316 (amostra 4) e 0,379 (amostra 5).	54
Figura 4.9 – Efeito do tempo de ativação nas propriedades do revestimento.	56
Figura 4.10 – Efeito da velocidade de adição da solução de Ag nas propriedades do revestimento.	57
Figura 4.11 – Efeito da concentração do $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa}$ de nas propriedades do revestimento.	58
Figura 4.12 – Fotografias SEM de revestimento realizado com deposição química e eletroquímica (esq.) e revestimento realizado somente com deposição química (dir.).	60
Figura 4.13 – Curva impedância-frequência para amostras camadas de AgCl com diferentes espessuras, usando uma solução de NaCl (expresso em C/cm^2).	61
Figura 4.14 – Elementos presentes à superfície do revestimento obtidos a partir de uma análise EDS e respetiva imagem SEM, em que é visível o elemento de Zn disperso por toda a amostra.	62
Figura 4.15 – Processo de deposição de prata sobre a poliamida [adaptado de [65]].	63
Figura 4.16 – Fotografia do revestimento de prata sobre poliamida.	64
Figura 4.17 – Curva impedância-frequência para amostras de poliamida. À esquerda está representado a evolução da curva impedância-frequência de amostras com camadas de AgCl de diferente espessura. À direita estão representadas as curvas impedância-frequência obtidas com diferentes soluções de NaCl e HCl (expresso em C/cm^2).	65
Figura 4.18 – Representação do ruído espectral para amostras preparadas com NaCl e HCl.	67
Figura 4.19 – Deriva em potencial dos diferentes elétrodos preparados.	68
Figura 4.20 – Sinais elétricos adquiridos em testes in-vivo com o novo elétrodo e com um elétrodo de AgCl tradicional.	69

Índice de Tabelas

Tabela 3.1 – Propriedades do hidrogel avaliadas e respectivas técnicas de caracterização.	29
Tabela 3.2 – Propriedades do revestimento avaliadas e respectivos métodos de caracterização.	37
Tabela 3.3 – Condições de testes eletroquímicos para deposição de AgCl nos diferentes elétrodos.	40
Tabela 4.1 – Peso molecular obtido para cada alginato a partir dos respectivos tempos de escoamento.	44
Tabela 4.2 – Influência da presença de NaCl na cinética de gelificação.	48
Tabela 4.3 – Comparação do comportamento de gelificação dos hidrogéis para os diferentes alginatos.	49

Índice de Símbolos e Siglas

EDS	Espectrómetro de Energia Dispersiva
EEG	Eletroencefalografia
FTIR-ATR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com Refletância Total Atenuada
ISE	Estabilidade de impedância eletroquímica
SEM	Microscopia Eletrônica de Varrimento
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
AgNO₃	Nitrato de prata
Ag/AgCl	Prata/Cloreto de prata
Ca²⁺	Ião cálcio
CaCO₃	Carbonato de cálcio
C₄H₄O₆KNa	Tartarato de sódio e potássio
CaSO₄·2H₂O	Sulfato de cálcio di-hidratado
COO⁻	Ião carboxilo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GDL	Glucona Delta-Lactona
-G	Monômero de ácido α -L-gulurônico
G'	Módulo elástico
G''	Módulo viscoso/dissipativo
K⁺	Ião potássio
-M	Monômero de ácido β -D-manurônico
Na⁺	Ião sódio
NaCl	Cloreto de Sódio

Introdução

O sistema nervoso é responsável pela interação do organismo ao meio ambiente em que está inserido. A sua função é perceber e identificar as condições ambientais externas, bem como as condições internas do próprio corpo e desencadear respostas que se adaptem a essas condições. Este sistema funciona como um dispositivo de comunicação cujos componentes usam substâncias e energia no processamento de sinais.

Todas as nossas sensações, sentimentos, pensamentos, respostas motoras e emocionais, aprendizagem e memória, causas de doenças mentais, e qualquer outra função ou disfunção do cérebro humano não poderiam ser compreendidas sem o conhecimento do fascinante processo de comunicação entre as células nervosas. Os neurónios coletam continuamente informações sobre o estado interno do organismo e do seu ambiente externo, avaliam essas informações e coordenam atividades apropriadas à situação e às necessidades atuais da pessoa [1].

Atualmente, os avanços tecnológicos têm permitido um estudo detalhado da atividade neuronal, detetando a evolução de estados cognitivos bem como eventuais anomalias que possam estar presentes na análise clínica de um indivíduo. Um diagnóstico precoce aumenta sensivelmente a expectativa de cura, contribuindo consideravelmente para uma melhoria do doente [2]. Das várias técnicas que permitem analisar a atividade neuronal, destaca-se a *Eletroencefalografia* (EEG) por permitir medir a atividade elétrica do sistema nervoso central (SNC), através da colocação de elétrodos no couro cabeludo na superfície encefálica, ou até mesmo no interior da substância encefálica. Apresenta uma resolução temporal muito elevada, na ordem dos milissegundos, sendo por estas razões preferencialmente escolhido para investigação, para diagnóstico de doenças (tumores cerebrais), ou desordens de trato psiquiátrico, tais como hiperatividade e défice de atenção em crianças, deficiências senis e até mesmo determinados casos de depressão. A capacidade de refletir tanto a atividade normal como anormal do cérebro torna o EEG uma ferramenta muito poderosa no campo na neurologia e neurofisiologia clínica. Para além disto, oferece vantagens significativas sobre outras tecnologias como o MRI (Ressonância Magnética) e CT (Tomografia Computorizada), tanto em termos de custo como de espaço [3]. A qualidade do exame de EEG é influenciada pelo posicionamento dos elétrodos e pelo seu contacto com a superfície onde estão

colocados. Os elétrodos funcionam como interface de comunicação entre o escalpe do paciente e o dispositivo eletrônico tendo a função de medir e gravar correntes no corpo (*Figura 1*). Um mau contacto entre o escalpe e o elétrodo pode comprometer a aquisição do sinal elétrico, pelo que se usam pastas condutoras para aumentar este contacto.

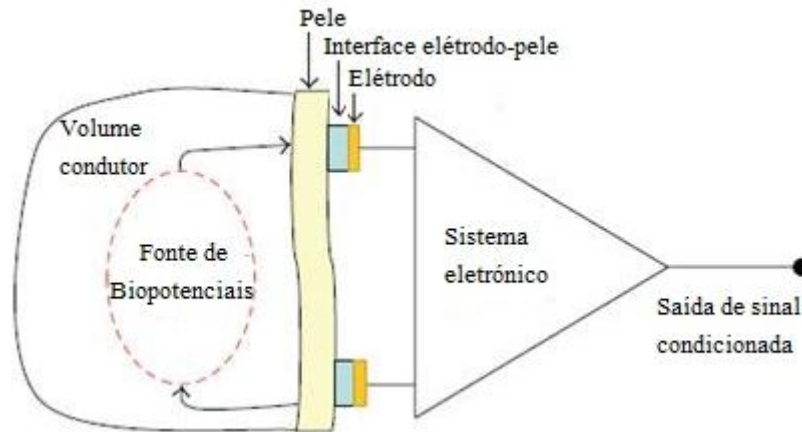


Figura 1 – Esquema da medição de biopotenciais através do uso de elétrodos [adaptado de [4]].

O uso de pastas condutoras e elétrodos metálicos podem provocar danos no escalpe do recém-nascido. A presença de determinados compostos na constituição das pastas, nomeadamente surfactantes, pode provocar reações alérgicas sobre o escalpe do mesmo. Por outro lado, durante um exame prolongado, podem ocorrer micromovimentos do próprio sensor que provocam a abrasão da pele, devido ao contacto direto existente entre o sensor metálico e o escalpe. A necessidade de limpeza do escalpe, o contacto prolongado e os longos períodos de preparação para realização do exame são operações agressivas, que podem causar lesões no recém-nascido [5].

O objetivo desta dissertação é a criação de um elétrodo com potencial utilização em recém-nascidos, capaz de transmitir eficazmente os sinais biológicos, oferecendo um contacto com a pele biocompatível quer do ponto de vista mecânico quer químico. O elétrodo a projetar irá diferir dos atuais pelo facto de usar um hidrogel de alginato para promover o contacto e a transmissão do sinal entre o escalpe do paciente e o transdutor propriamente dito, garantindo uma redução do ruído ambiente ou ruído devido a artefactos de movimento. Este gel polimérico irá funcionar como um material inerte condutor, sem espalhar, sujar ou danificar o cabelo [6]. Para além disso, terá a capacidade de interagir com a pele de forma não abrasiva e sem causar reações alérgicas.

No final do projeto o elétrodo será avaliado através de testes *in-vivo* e comparado com sinais adquiridos com elétrodos tradicionais.

Capítulo I

Enquadramento Teórico

A aquisição de um sinal neuronal é possível devido à existência de células excitáveis no nosso organismo, capazes de conduzir o impulso elétrico até ao eletrodo. Estas células transmitem informação por vibrações, como por exemplo as ondas rádio, não existindo fusão das suas ramificações. Se considerássemos cada célula como sendo uma pequena antena a informação viajaria de uma célula para outra através da vibração transmitida por uma e captada por outra.

Ao longo deste capítulo faz-se um breve enquadramento teórico acerca da constituição do Sistema Nervoso, bem como o modo de transmissão de sinais elétricos ao longo deste. A técnica de medição da atividade elétrica ao longo do escalpe do paciente, EEG, é também aqui explicada, culminando com a apresentação dos seus principais componentes, os eletrodos.

1.1. Sistema Nervoso

O Sistema Nervoso é responsável por controlar e coordenar as funções de todos os sistemas do organismo bem como, interpretar e desencadear respostas adequadas de estímulos externos.

O sistema nervoso é dividido em:

- *Sistema Nervoso Central (SNC)*: é a porção de receção de estímulos, de comando e responsável por desencadear respostas. É formado pelo encéfalo e pela medula espinhal, protegidos respetivamente, pelo crânio e pela coluna vertebral. O encéfalo apresenta três partes (cérebro, cerebelo e tronco encefálico).

- *Sistema Nervoso Periférico (SNP)*: constituído pelas vias que conduzem os estímulos ao sistema nervoso central ou que levam até aos órgãos respetivos as ordens emanadas da porção central. É formado pelos nervos cranianos e espinhais, pelos gânglios e pelas terminações nervosas [7].

O SNC é heterogêneo quanto à distribuição dos corpos dos neurónios e dos seus prolongamentos. As regiões onde predominam os corpos neuronais são chamadas de substância cinzenta, enquanto regiões que contêm, predominantemente, prolongamentos neuronais são denominados de substância branca. Para compreendermos melhor as funções de coordenação e regulação exercidas pelo sistema nervoso, é importante compreender a estrutura básica de um neurónio e como ocorre a transmissão da mensagem nervosa [8].

1.2. Neurónios

O sistema nervoso diferencia-se em duas linhagens celulares: os **neurónios** e as **células da glia**.

O neurónio é uma célula excitável responsável pela receção e transmissão dos estímulos do meio (interno e externo), possibilitando ao organismo a execução de respostas adequadas para a manutenção da homeostasia. Esta célula é constituída por dendrites, um corpo celular, um axónio e terminais sinápticos (*Figura 1.1*). A sua estrutura reflete a sua divisão funcional em compartimentos especializados em receber, entregar e transmitir informação. De modo simples, podemos dizer que as dendrites recebem, o corpo celular integra e os axónios transmitem a informação nervosa – este fluxo unidirecional de informação também é conhecido como polarização neuronal [9].

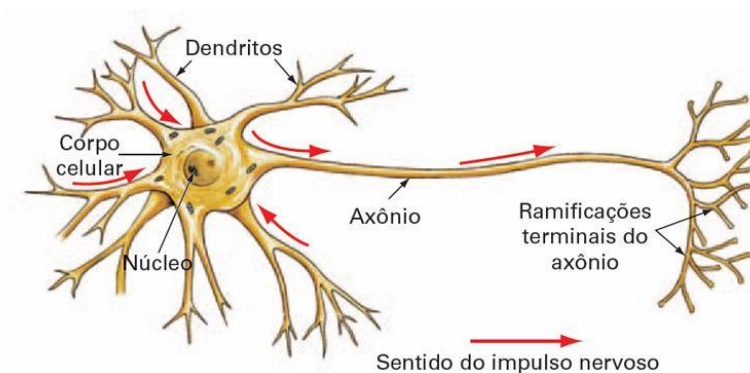


Figura 1.1 – Representação dos principais componentes de um neurónio [10].

Os neurónios são células com capacidade de excitabilidade e de condutibilidade. A excitabilidade diz respeito à capacidade que permite a uma célula responder a estímulos. A resposta emitida pelos neurónios assemelha-se a

uma corrente elétrica transmitida ao longo de um fio condutor: uma vez excitados, os neurónios transmitem essa onda de excitação por toda a sua extensão com grande velocidade em um curto espaço de tempo. Esse fenómeno deve-se à propriedade de condutibilidade [9].

As células da glia, ou neuralgia são células do sistema nervoso que proporcionam suporte e nutrição aos neurónios. Estas células para além de darem suporte aos neurónios têm um papel importante na formação de circuitos neuronais no SNC. Ao recobrir todo o neurónio, as células da glia isolam-se e impedem a propagação desordenada dos impulsos nervosos criando circuitos neurais independentes e contribuindo para a amplificação do sinal neuronal. As células da glia intervêm também na orientação do crescimento das dendrites e axónios dos neurónios [11].

1.3. Geração de sinais elétricos no corpo

Os sinais elétricos no corpo humano são produzidos essencialmente devido aos impulsos nervosos. Um impulso nervoso é a transmissão de um sinal codificado de um estímulo dado ao longo da membrana do neurónio, a partir do seu ponto de aplicação.

A enorme quantidade de energia acumulada nos neurónios e a capacidade destes em usá-la de um modo eficiente garante que o sinal do neurónio viaje ao longo do axónio, permitindo a comunicação de um neurónio com o neurónio seguinte. Os axónios dos neurónios transmitem pulsos de eletricidade chamados *potenciais de ação*, que se propagam ao longo de fibras nervosas, como uma onda se propaga numa corda de saltar esticada quando é agitada uma das pontas. Isto é possível porque a membrana do axónio contem canais iónicos, que podem abrir e fechar de modo a controlar a passagem de espécies com carga elétrica [8].

1.3.1. Propagação de sinais eletroencefálicos num neurónio

Todas as células são constituídas por uma cápsula que contém uma solução proteica revestida pela membrana plasmática. A diferença de potencial elétrico entre o meio interno e o meio externo resulta das diferentes concentrações de iões entre estes meios nomeadamente, iões de sódio (Na^+), iões de potássio (K^+) e iões de cloreto (Cl^-). Nas condições de repouso, os fluidos dentro e fora da célula são sempre neutros, isto é, a concentração de aniões (iões negativos) em qualquer local é sempre igual à concentração de catiões (iões positivos), não havendo acúmulo local de cargas elétricas nesse fluido. O potencial de membrana existe sob duas formas: o potencial de repouso e o potencial de ação.

Potenciais de repouso celular

O potencial de repouso tem origem num mecanismo simples de transporte ativo alternado com transporte passivo de iões. Por transporte passivo, os iões de Na^+ entram para a célula através de gradientes de concentração. Posteriormente, a célula expulsa esses iões (Na^+) ativamente para o exterior, ao mesmo tempo que introduz ativamente iões de K^+ . A grande mobilidade do ião K^+ faz com que este volte passivamente para o lado externo da membrana, conferindo-lhe uma carga positiva. Do lado interno, iões fosfato, proteínas aniónicas e iões Cl^- que acompanham por atração eléctrica o Na^+ , tornam o potencial eléctrico da membrana negativo, e diz-se que a célula está polarizada [1]. O potencial de membrana é assim a diferença de potencial eléctrico constante da membrana plasmática de células em repouso. Em células nervosas em repouso o potencial de membrana é cerca de -90 mV, sendo esta concentração mantida pelo potencial de difusão do Na^+ , difusão de K^+ da membrana e as bombas de Na^+/K^+ [1, 12].

Potenciais de ação celular

Os sinais neuronais propagam-se por meio de potenciais de ação. Estes potenciais são variações muito rápidas de potencial de membrana, consistindo numa variação não-linear do potencial como respostas a um estímulo suficientemente intenso. Só são observados potenciais de ação, quando as cargas positivas presentes no interior da membrana aumentam a diferença de potencial nas áreas vizinhas, para um valor superior ao “*threshold*” (valor do limiar de voltagem), resultando em variações da permeabilidade de membrana celular a estes iões [8]. O potencial de ação caracteriza-se pela fase de despolarização e repolarização. A *Figura 1.2* representa o fluxo iónico característico de um potencial de ação.

O potencial de ação de uma célula excitável dura apenas alguns milésimos de segundos. Quando uma célula é estimulada por um estímulo suficientemente intenso para provocar a variação de potencial de -90 mV para um potencial entre -70 e -50 mV, ocorre passagem de iões de Na^+ por difusão simples de fora para o interior da célula e inicia-se a fase de despolarização. Como resultado, o interior da membrana passa a apresentar um potencial inverso daquele encontrado nas condições de repouso, isto é, positivo no interior e negativo no exterior, o qual pode chegar a +35 mV (*Figura 1.2 – etapa 1*). Durante este espaço de tempo a permeabilidade dos iões de Na^+ retorna ao normal e, simultaneamente, ocorre um aumento na permeabilidade aos iões de K^+ (saída) devido ao excesso de cargas positivas encontradas no interior da célula (*Figura 1.2 – etapa 2*). Os iões de Na^+ que estavam em grande quantidade no interior da célula vão sendo transportados ativamente para o exterior. Todo este processo vai fazer com que o potencial desta fase passe a ser aproximadamente -95 mV. Por fim, na fase de repolarização a permeabilidade da membrana aos iões de K^+ retorna ao normal e a célula retorna às condições iniciais com potencial de membrana em torno de -90 mV (*Figura 1.2 – etapa 3*). Agora, a bomba de Na^+/K^+ começa a

trabalhar, transportando Na^+ para fora e K^+ para dentro da célula, de modo a que esteja pronta para um novo potencial de ação [8, 9].

A transmissão de impulso elétrico entre duas células excitáveis por pontos de contacto muito próximos entre elas.

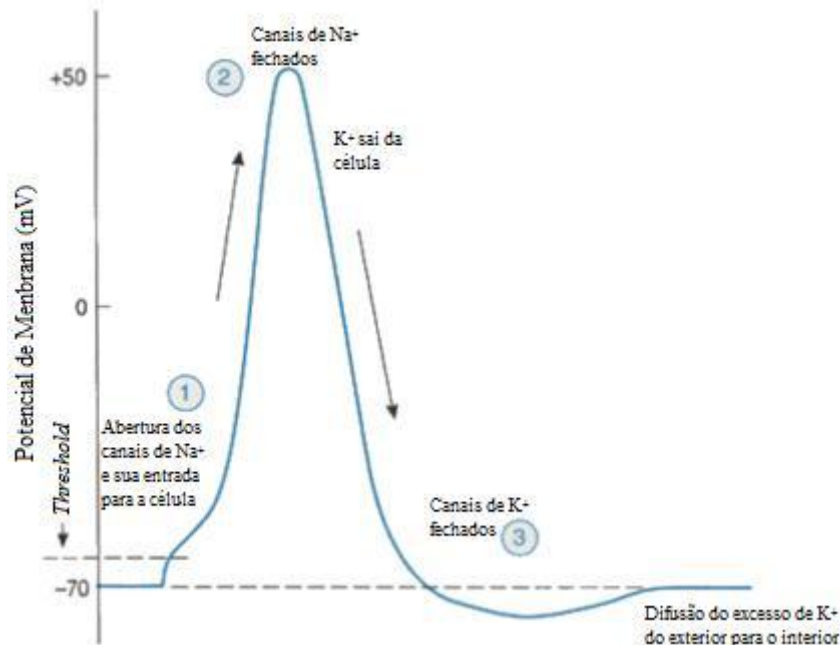


Figura 1.2 – Representação do fluxo iónico durante o potencial de ação [adaptado de [13]].

1.3.2. Propagação de sinais eletroencefálicos entre neurónios

A ausência de contacto físico entre neurónios requer outros métodos para garantir a propagação do sinal. As sinapses são regiões de contacto entre a extremidade de uma célula com a superfície de outras, na qual ocorre a transmissão do impulso elétrico. Existem dois tipos de sinapses: sinapses elétricas e sinapses químicas.

- *Sinapse Elétrica* – a transmissão do sinal ocorre através de conexões (regiões comunicantes entre duas células unidas por canais iónicos), dando-se pela transmissão direta de iões de uma célula a outra. O neurónio que origina a corrente é chamado de elemento pré-sináptico e o neurónio para onde a corrente flui é chamado de pós-sináptico [7].
- *Sinapse química* – os impulsos são transmitidos de um axónio de um neurónio pré-sináptico para as dendrites ou corpo celular de um neurónio pós-sináptico. Entre estes dois neurónios existe uma fenda sináptica, local onde há transmissão do impulso nervoso. Nestas sinapses, o neurónio secreta uma

substância química, o neurotransmissor, que se difunde na fenda sináptica, ligando-se quimicamente a recetores específicos no neurónio pós-sináptico dando continuidade à propagação do sinal. No neurónio pós-sináptico o sinal é convertido novamente em sinal elétrico [7].

As sinapses são fundamentais para o funcionamento do SNC, uma vez que são responsáveis por garantir a propagação do impulso nervoso entre células. Contudo, um único impulso nervoso é insuficiente para estimular a área responsável por executar uma resposta.

1.4. Sincronização de sinais

As alterações do potencial de membrana em células excitáveis podem ser devidas a modificações temporárias na permeabilidade iónica. Quanto mais canais de um ião estiverem abertos, mais o potencial de repouso se desloca na direção do potencial de equilíbrio desse ião. A corrente elétrica provocada por um ião está dependente do número de canais abertos e da *driving force* para esse ião. A *driving force* é a diferença, em milivolts, entre o potencial de equilíbrio desse ião e o potencial de membrana. Por exemplo, a *driving force* para o K^+ é de apenas de 20 mV, enquanto para o Na^+ é de 130 mV. A elevada *driving force* que tende a mover o Na^+ através da membrana celular, é contrariada pela baixa permeabilidade ao Na^+ da mesma. Pelo contrário, a pequena *driving force* do K^+ é compensada pela maior permeabilidade da membrana celular ao K^+ no estado de repouso. As modificações do potencial de membrana podem decorrer em pequenas regiões de membrana ao serem transmitidas ao longo da superfície da célula. As modificações locais podem respeitar a resposta a um estímulo, como ocorre nos potenciais dos recetores ou nos potenciais sinápticos. Os potenciais de ação são utilizados na sinalização a grande distância dos nervos e músculos [14].

A atividade elétrica gerada por um neurónio individual é pequena para ser medida em EEG. A aquisição deste sinal só é possível quando milhares ou milhões de neurónios, com orientação espacial similar, emitem de forma sincronizada. Se as células não possuem uma orientação espacial similar os seus iões não se alinham, tornando-se impossível a datação dos sinais. A sincronização é vista como o comportamento cooperativo universal. Os neurónios tanto competem como cooperam uns com os outros. A sincronização dos elementos de uma rede dá origem a um comportamento ordenado, coerente, que está associado não somente à produção de informação biológica, mas também às potenciais aplicações em comunicação e identificação de sistemas [15]. A EEG reflete o somatório da atividade síncrona de milhares ou milhões de neurónios que apresentam uma orientação espacial similar, garantindo a aquisição de um sinal reprodutível e permitindo uma análise e interpretação fidedignas [16].

1.5. Eletroencefalografia (EEG)

O desenvolvimento tecnológico da eletrónica, acoplado ao crescimento no conhecimento científico sobre as causas orgânicas das doenças humanas possibilitou um grande desenvolvimento das técnicas de diagnóstico e terapêutica na medicina.

O primeiro eletroencefalógrafo surgiu no início do século XX. Este equipamento revolucionou a neurologia introduzindo um novo conceito na esfera médica: o sinal biológico [2]. O termo “sinal biológico” refere-se a variações temporais que ocorrem em alguma forma de energia no corpo humano, como resultado do seu funcionamento. A EEG caracteriza a evolução temporal do somatório dos potenciais de membrana dos neurónios.

Esta técnica tem sofrido uma crescente notoriedade entre outras técnicas sobretudo devido à crescente incidência da obesidade, distúrbios do sono, doenças cardiovasculares e autoimunes nas sociedades modernas, impulsionando o crescimento dos equipamentos de EEG nos últimos anos [3, 16]. Atualmente é a técnica de imagem mais usada na monitorização cerebral, por proporcionar um excelente tempo de resolução entre o estímulo e o registo da atividade do cérebro.

1.5.1. Técnica de aquisição do sinal

Os sinais de EEG podem ser medidos a partir da superfície cortical, o chamado *eletroencefalograma*, ou podem ser detetados com auxílio de eléctrodos de profundidade, chamado de *eletrocorticograma*. A medição da atividade elétrica a partir de eléctrodos colocados na superfície do couro cabeludo é o método mais usado por ser não invasivo, e por não apresentar qualquer risco ou limitação para o paciente.

Os eléctrodos são colocados no escalpe do paciente que se encontra relaxado, de modo a evitar interferência elétrica a partir de contrações musculares. Posteriormente pede-se que se realizem algumas funções, como abrir/fechar os olhos, realizar inspirações/expirações profundas de modo a detetar diferentes tipos de ondas. O tipo de atividade solicitada ao paciente depende da área patológica em estudo. A preparação para um exame de rotina EEG leva cerca de 30 minutos para um técnico treinado, e aproximadamente 30 minutos de duração de exame.

Esta técnica tem como vantagens o facto de ser uma técnica não invasiva, não causando qualquer dor ao paciente, ser fácil de realizar, apresentar baixo custo e fornecer um feedback interpretável, mostrando o estado metabólico de estruturas corticais em tempo real. O tempo de resposta é uma das grandes vantagens de EEG, pois permite gravar padrões complexos da atividade neuronal em frações de segundos após estimulação. A dificuldade de descobrir em que parte do cérebro provém a atividade elétrica pode ser visto como uma desvantagem. No

entanto, a colocação de vários eléttodos em todo o escalpe altera esta dificuldade fornecendo uma ideia mais precisa do local onde os potenciais são mais fortes [2, 5]. Consegue-se assim, mapear a atividade elétrica em diversas regiões cerebrais. A colocação dos eléttodos não é aleatória, sendo necessário um sistema de colocação padronizado para a sua colocação no escalpe, facilitando a comparação/referenciação dos resultados [2].

Posicionamento dos eléttodos

A qualidade do sinal obtido a partir de EEG é influenciada pelo contacto com a superfície onde estão colocados os eléttodos, bem como pelo seu posicionamento. Os vários sinais medidos resultam da distribuição de eléttodos pelo escalpe em diferentes posições. Esta distribuição obedece a um Sistema Internacional padrão 10-20, que é o modo padronizado para a colocação de eléttodos recomendado pela Federação Internacional das Sociedades de Encefalografia e Neurofisiologia [2].

Segundo este padrão, a cabeça é dividida em distâncias proporcionais a partir de marcos proeminentes no crânio, para fornecer uma cobertura adequada de todas as regiões do cérebro. O rótulo 10-20 designa a distância proporcional, em percentagem, entre as orelhas e o nariz onde os pontos para os eléttodos são escolhidos. Os locais onde os eléttodos são colocados são denominados de acordo com as áreas cerebrais adjacentes: F (frontal), C (central), T (temporal), P (posterior) e O (occipital). Estas letras são acompanhadas por números ímpares do lado esquerdo da cabeça, e com números pares do lado direito, como se pode verificar na *Figura 1.3*.

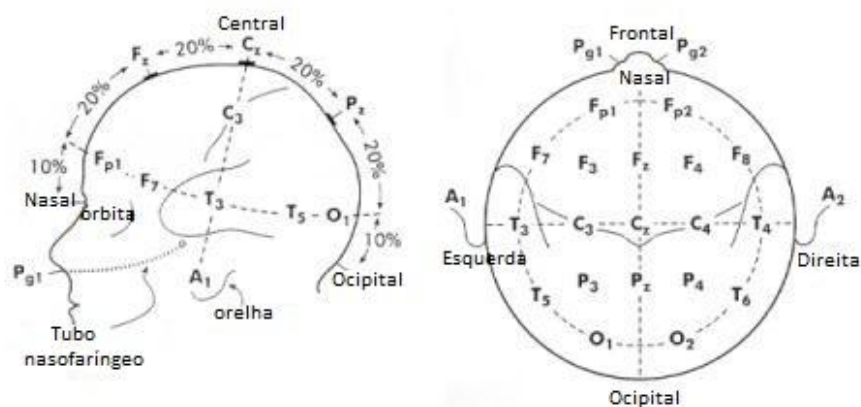


Figura 1.3 – Posições para colocação dos eléttodos pelo Sistema Internacional 10-20 [adaptado de [11]].

Na aquisição de um registo EEG em recém-nascidos são usados, pelo menos, oito eléttodos posicionados nas posições Fp1, Fp2, C3, C4, T3, T4, O1 e O2. O eléttodo de referência é normalmente colocado na posição Fp1 [17].

Este sistema é importante pois facilita a comparação e interpretação da EEG de diferentes pacientes, ou mesmo de registos do mesmo paciente realizados em diferentes momentos [18]. Dependendo do que se deseja avaliar ou da necessidade de rapidez de resultado existem varias técnicas de avaliar um sinal EEG. Por exemplo, se for necessário um resultado rápido pode-se avaliar o sinal de EEG simplesmente através das ondas cerebrais e comparando-as com EEGs normais. Se for necessário um exame mais detalhado, poderão realizar-se algumas técnicas de processamento de sinal, como por exemplo, as Transformadas de Fourier. O sinal obtido é composto por um conjunto de ondas que fornecem diferente informação [2].

Tipos de ondas

A amplitude das ondas depende de vários fatores tais como, localização, diâmetro e distância entre os elétrodos, do estado funcional e até mesmo do estado de maturidade do individuo. As amplitudes podem variar de 0 a 200 μV e a frequência de 0 a 30 Hz. A intensidade das ondas cerebrais registadas em EEG é determinada na sua maioria pelo número de neurónios e fibras que disparam de forma síncrona [18, 19].

A partir do registo obtido da atividade elétrica do cérebro, obtém-se um sinal contínuo de EEG, caracterizado por um padrão regular de ondas, de frequência e amplitude variável consoante os estados cerebrais. Estas ondas cerebrais têm uma grande complexidade, devido à elevada quantidade de informação que é recebida por cada elétrodo. A *Figura 1.4* representa os cinco tipos de ondas:

- *Delta* é uma onda de baixa frequência (0,5 a 4 Hz) e com as maiores amplitudes de entre todas as ondas cerebrais (12 a 16 mV). É um ritmo comum em recém-nascidos e detetada em adultos durante o sono profundo. Está associada a algumas encefalopatias e lesões cerebrais, pois são observados surtos de ondas delta, desorganizando o traço de base. Surge como uma resposta fisiológica do sistema nervoso central à variação do CO_2 .

- *Teta* é uma onda de frequência de 4 a 7,5 Hz, com grandes amplitudes. É uma onda comum em crianças, permitindo detetar a fisiologia do córtex temporal e parietal. É registada em situações graves de stress emocional, em estado de vigília com atenção forçada e durante a resolução de problemas lógicos. Quando assimétrico ou constante, a atividade Teta pode sugerir disfunção em determinada área cerebral.

- *Alfa* é uma onda com alta frequência (entre 7,5-13 Hz), amplitude média de 50 μV e predominam na região posterior do cérebro. É registada quando o paciente está consciente, relaxado e com os olhos fechados. Estas ondas surgem por volta dos 3 anos de idade e desaparecem quando os olhos estão abertos, quando há ação da luz ou quando existe atividade mental.

- *Beta* é uma onda com frequência entre 13-30Hz, amplitude de 10 μ V e detetada principalmente nas regiões anteriores do cérebro. Registada quando ocorre um estímulo visual e uma atividade mental, estando desta forma associada a estados de concentração do paciente.

- *Gama* é uma onda que é filtrada, não aparecendo nos registos EEG, uma vez que não tem interesse clínico. Caracteriza-se por frequências superiores a 30 Hz e está associada à atividade mental, incluindo percepção, consciência, estado de programação motora [2].

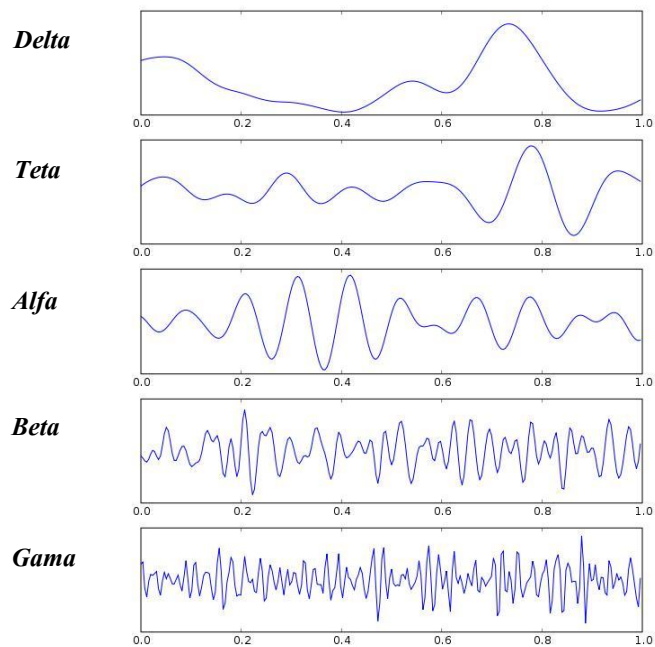


Figura 1.4 – Tipos de ondas cerebrais [20].

Em recém-nascidos é comum observar-se ondas lentas difusas e bilaterais, frontais ou de predomínio posterior, e que geralmente são normais. A aquisição de um traçado descontínuo, com período de atenuação entre 5 a 20 segundos em EEGs de recém-nascidos está correlacionada com um bom prognóstico, tanto do ponto de vista motor como intelectual. No entanto, alguns padrões eletroencefálicos significam mau prognóstico, nomeadamente: traçados de baixa amplitude, longos períodos de inatividade (>30 s) e surtos de supressão. Estes tipos de alterações em ondas cerebrais de recém-nascidos indicam um alto risco de encefalopatias [21].

A gama de frequências característica da atividade elétrica em recém-nascidos varia entre 3-13 Hz [22]. A impedância de contacto deve estar compreendida entre 100 Ω a 10 k Ω para a captação de um sinal preciso [17]. Impedâncias de contacto inferior a esta gama de valores indicam a possibilidade de ocorrer um curto-circuito entre eléctrodos e impedâncias superiores facilitam o aparecimento de artefactos [4].

1.5.2. Componentes do sistema

As gravações recolhidas do escalpe do paciente relativamente à atividade neuronal permitem uma avaliação das possíveis alterações ao longo do tempo no circuito elétrico básico na condução do sinal. Contudo, só é possível obter este traçado eletroencefalográfico devido à presença de um conjunto de sistemas de gravação representados na *Figura 1.5*, a enumerar:

- *Eléttodos* – o elemento de captação do sinal;
- *Amplificadores* – dispositivo eletrónico que aumenta a amplitude do sinal registado;
- *Conversor analógico/digital* – dispositivo que converte um sinal contínuo num sinal discreto, amostrando-o no tempo. Transforma o sinal obtido analiticamente num sinal digital [23];
- *Dispositivos de gravação*.

Os eléctrodos captam o sinal do escalpe, e encaminham-no para os amplificadores. Por sua vez, estes amplificam os sinais detetados da faixa dos microvolts para uma faixa onde possam ser digitalizados com precisão. Os conversores transformam o sinal de formato analógico para digital e o computador armazena e exhibe os dados obtidos [24].

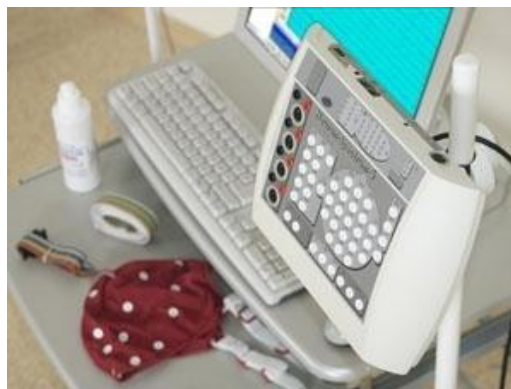


Figura 1.5 – Conjunto de materiais usados num exame EEG [25].

A gravação do sinal elétrico da superfície do escalpe do recém-nascido deve provocar a mínima perturbação do comportamento e dos cuidados normais do recém-nascido. O sistema de aquisição de EEG deve ser posicionado o mais próximo possível da incubadora ou cama, de modo a permitir uma observação contínua e próxima do comportamento normal do recém-nascido. Para uma gravação ótima de EEG é necessário aquisição de um ciclo de sono, o qual varia entre 45 a 60 minutos [17].

1.5.3. Aplicações

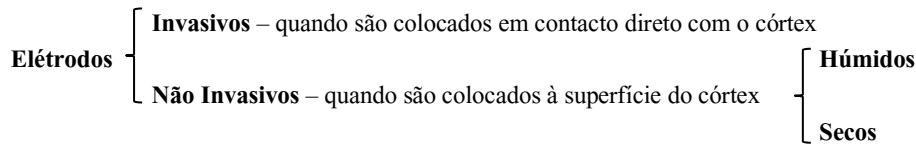
A técnica de EEG apresenta uma vasta gama de aplicações que vão desde a capacidade de monitorar o estado de vigília, coma ou morte encefálica, localizar áreas danificadas após traumatismo craniano, acidente cerebral vascular, monitorar o desenvolvimento cognitivo, estudar a epilepsia, possibilitando testar os efeitos de drogas epiléticas, acompanhar o desenvolvimento do cérebro humano/animal e estudar os distúrbios do sono e da fisiologia [2, 26].

A EEG realizada no recém-nascido é um dos exames mais importantes da investigação neurológica. A atividade elétrica do cérebro humano começa por volta da semana 17-23 de desenvolvimento pré-natal. Em crianças, especialmente em recém-nascidos, a realização de EEG pode ser fundamental para detetar anomalias, danos presentes no SNC e defeitos na maturação e crescimento do cérebro, as quais podem representar um grande risco de debilidade no neurodesenvolvimento. A informação sobre o desenvolvimento do recém-nascido é sobretudo vital quando se trata de prematuros, pois uma datação precoce destas lesões pode alertar tanto aos clínicos como os pais, permitindo uma intervenção apropriada e precoce. Para além disto, também permite monitorar os movimentos oculares e respiração [21].

1.6. Eléttodos

O eléttodo é um componente crítico nos dispositivos de monitoramento e avaliação da atividade eletroencefálica, pois funciona como interface entre o corpo e o dispositivo eletrónico. São constituídos por materiais condutores e funcionam, simultaneamente, como um transdutor, de modo a transformar uma corrente iónica numa corrente eletrónica. Devem possuir uma baixa impedância, facilitando a condução de sinais elétricos. Caso contrário, sistemas com impedâncias elevadas podem conduzir a distorções difíceis de serem separadas do sinal original [23]. Estes componentes podem ser feitos de vários materiais, sendo a prata, o ouro e a platina os mais usados. Os eléttodos de Ag/AgCl foram adotados quase que de imediato e permanecem até hoje, o tipo de sensores mais usados, devido à sua confiabilidade, baixo nível de ruído intrínseco e estabilidade de potencial elétrico [2].

Sabe-se que a nível biológico, os maiores obstáculos da transdução do sinal de EEG são: o cabelo e a epiderme. Em situações clínicas típicas, o cabelo é removido e a epiderme é raspada ou perfurada. Foram-se desenvolvendo eléttodos capazes de responder a estes inconvenientes sendo atualmente divididos da seguinte forma:



1.6.1. Eléttodo invasivo

Os eléctrodos invasivos apresentam uma forma de agulha ou fio, e são projetados para serem implantados de forma subcutânea. Uma vez que estão em contacto direto com o músculo ou grupo muscular a ser analisado, propiciam uma informação muito mais precisa e localizada do que os eléctrodos não invasivos.

A *Figura 1.6* representa este tipo de sensores que têm a capacidade de captar maiores amplitudes e cobrir um espectro de frequências muito maior do que os eléctrodos não invasivos. Porém, em contrapartida, requerem maiores cuidados: para além de necessitarem de uma excelente esterilização, existe o risco da quebra do eléctrodo dentro do tecido ou órgão e potencial reação inflamatória devido ao encapsulamento do dispositivo [4].

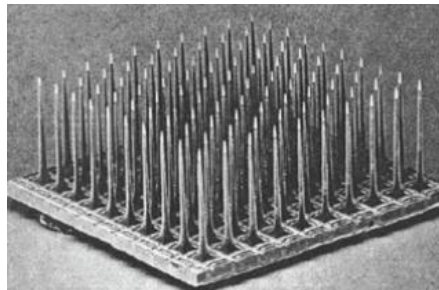


Figura 1.6 – Exemplo de eléctrodo invasivo: matriz de eléctrodos intra-cortical [4].

1.6.2. Eléttodo não invasivo

A medição do sinal elétrico cerebral também pode ser realizada de modo não invasivo, através da colocação de eléctrodos na superfície do escalpe, embora neste caso os sinais sejam muito atenuados pela presença da caixa craniana, a qual funciona ainda como filtro passa-baixo limitando drasticamente a gama de frequências de medida.

Eléttodo seco

Os chamados eléctrodos secos são um tipo de eléctrodo superficial que dispensa o uso de pastas condutoras ou preparação do couro cabeludo, reduzindo o tempo de preparação e o desconforto para o paciente [27]. No entanto,

devido à ausência de um gel ou pasta condutora, a impedância interfacial é muito maior do que no caso húmido, tornando essencial a integração de um estágio de pré-amplificação no eléctrodo. Além de ser mais caro, apresenta um contacto eléctrodo-pele muito sensível a artefactos de movimento, devido ao facto de ser seco, dependendo muito do acoplamento mecânico [6].

Eléctrodo húmido

Em eléctrodos superficiais húmidos há um material de interface entre o eléctrodo e a pele. Este material consiste em pastas condutoras constituídos por eletrólitos, surfactantes, espessantes e água. De uma maneira geral, o eletrólito é o responsável pela condução, os surfactantes melhoram a penetração do gel e os espessantes dão consistência ao material. A interface eléctrodo-pele tem uma impedância dependente de fatores como: a camada de interface (preparação prévia da pele, massa gorda, cabelo), área de superfície do eléctrodo e temperatura do eletrólito [4].

Apresenta como desvantagens o facto de necessitar da preparação do escalpe do paciente, para melhorar a qualidade do sinal e requerer um controlo regular da qualidade da pasta, uma vez que pode secar e degradar a qualidade do sinal [1]. No entanto, o uso de um gel apresenta vantagens tais como a capacidade de fornecer os iões necessários para que a reação redox ocorra na interface eléctrodo-pele, permitindo um potencial de meia célula mais estável e, conseqüentemente, um baixo valor para o ruído [28]. Na *Figura 1.7* mostram-se alguns exemplos de eléctrodos não invasivos.



Figura 1.7 – Exemplo de eléctrodo não invasivos: (A) eléctrodo húmido de Ag e AgCl da Universidade de Grent; (B) eléctrodo seco de g.@SAHARA.

A *Figura 1.8* mostra como o contacto eléctrodo-pele pode ser modelado. A interface eléctrodo-pele não é apenas resistiva, como também possui elementos capacitivos. Isto é importante uma vez que a frequência do sinal depende sobretudo do contacto eléctrodo-pele. Por causa da interação entre o eléctrodo metálico e eletrólitos, os iões acumulam-se como placas paralelas. A troca de ião-eletrão ocorre entre o eléctrodo e o eletrólito, segundo a equação:



E resulta numa tensão chamada de potencial de meia célula, calculada a partir da equação de *Nerst* [4].

$$\varepsilon = \varepsilon^0 - \frac{0,05916}{n_e} \log Cl^- \quad (\text{Equação 1.2})$$

Onde:

ε : potencial de meia célula (V)

ε^0 : força eletromotriz que se obtém a partir dos potenciais normais dos elétrodos

n_e : número de eletrões transferidos

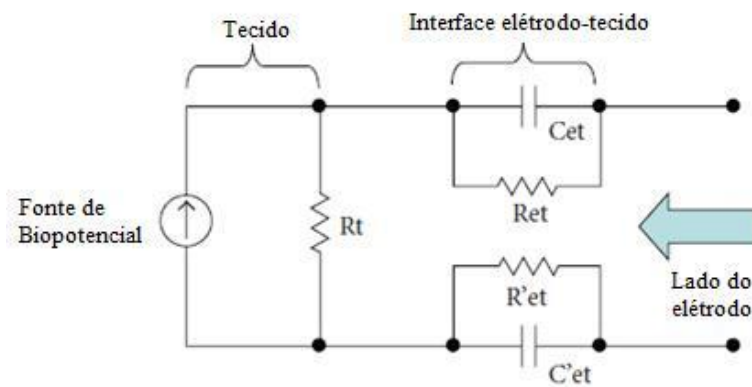


Figura 1.8 – Circuito equivalente de fonte de biopotenciais e de interação elétrodo-pele. A fonte de biopotencial é a fonte de corrente e a resistência do tecido é mostrado por R_t . C_{et} e R_{et} são os elementos elétrodo-pele equivalentes [adaptado de [4]].

Capítulo II

Desenvolvimento do Novo Conceito de Eléctrodo

O desenvolvimento de um eléctrodo de EEG eficaz requer a consideração de vários fatores, incluindo a suscetibilidade de impedância a artefactos de gravação, estabilidade a longo prazo, contacto seguro com a pele, e várias considerações práticas, tais como tamanho, peso, simplicidade de aplicação e custo.

Ao longo deste capítulo será introduzida a problemática inerente aos eléctrodos tradicionais quando aplicados a recém-nascidos, apresentando-se seguidamente o novo conceito de eléctrodo capaz de responder eficazmente a estas limitações, orientado para a aplicação em recém-nascidos.

2.1. Os exames EEG em recém-nascidos

O maior problema na monitorização de sinais eletroencefálicos em recém-nascidos resulta do mau contacto entre o próprio sensor e a pele. Os problemas advêm da natureza do próprio eléctrodo (geralmente metálico) e das pastas condutoras usadas para melhorar o contacto eléctrico e facilitar a passagem do sinal. Estas operações podem ser algo agressivas para o recém-nascido, podendo ainda causar lesões [6, 29]. Sabe-se que 11,4% das crianças exibem lesões após um registo EEG devido a vários mecanismos:

- Durante o processo de aquisição do sinal podem ocorrer lesões mecânicas devido à pressão direta e prolongada exercida pelo eléctrodo sobre a pele. As pastas condutoras são viscosas, pelo que qualquer movimento irá permitir o contacto direto entre o material metálico do eléctrodo e a pele. Este contacto irá provocar a abrasão da pele causando lesões na superfície do escalpe do recém-nascido.

- As pastas condutoras contêm agentes tóxicos, tal como surfactantes, os quais podem causar lesões químicas, nomeadamente reações alérgicas [30].

A *Figura 2.1* mostra alguns tipos e posicionamento de eléctrodos para a aquisição do sinal em recém-nascidos.



Figura 2.1 – Exemplos de alguns tipos de eléctrodos/montagens usados em recém-nascidos [17, 31].

O novo eléctrodo será capaz de fazer o contacto entre o sensor e a pele sem a necessidade de pastas condutoras. O objetivo será a preparação de um eléctrodo superficial húmido, de modo a permitir uma gravação de atividade eléctrica de qualidade confiável e com reações cutâneas mínimas para o recém-nascido.

2.2. Projeto do novo eléctrodo

O eléctrodo a projetar irá diferir dos atuais pelo facto de usar um hidrogel de alginato como interface. Este hidrogel irá permitir a transmissão do sinal, reduzindo o ruído resultante de artefactos de movimento devido à sua natureza semissólida. De acordo com as funções que se pretende que o novo eléctrodo desempenhe, este pode ser dividido em duas partes: a ventosa e o substrato do eléctrodo. A ventosa terá a capacidade de acomodar o hidrogel por injeção e o eléctrodo foi desenhado de acordo com o tamanho da ventosa escolhida. Pretende-se que funcionem

como um dispositivo único, deste modo desenhou-se o eléctrodo de modo a responder eficazmente a este propósito.

A Figura 2.2 esquematiza as duas peças do biossensor.

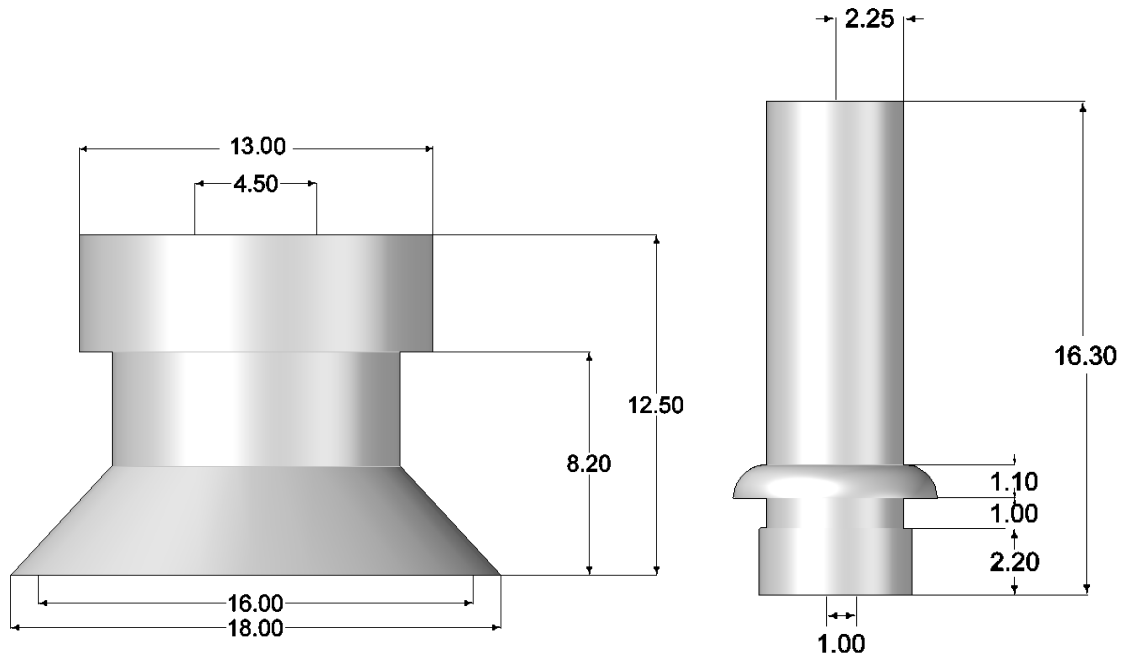


Figura 2.2 – Protótipo do biossensor a projetar: a ventosa (esq.) e o substrato do eléctrodo (dir.) (medidas expressas em mm).

A ventosa foi comprada à empresa SMC®. Esta é constituída por borracha nitrílica (NBR) e com dimensões adequadas ao uso em recém-nascido. O substrato do eléctrodo foi desenhado especificamente para esta ventosa. O material do substrato foi maquinado de acordo com estas dimensões e revestido com prata, através da técnica de *Electroless Plating*, para aquisição das propriedades condutoras necessárias à transmissão do sinal. Este material é colocado a partir da parte inferior da ventosa, sendo posteriormente feito o contacto eléctrico na parte superior desta, tal como se mostra na Figura 2.3.

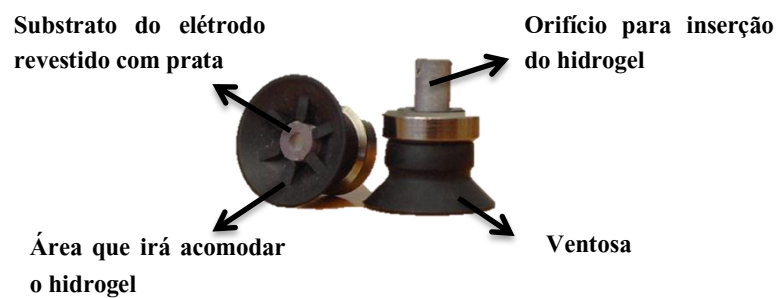


Figura 2.3 – Biossensor construído para transmissão de sinais EEG em recém-nascidos.

O biossensor a projetar apresenta como vantagens o facto de ser fácil de manusear. A existência de uma ventosa permitirá a criação de vácuo, mantendo o biossensor imóvel durante todo o exame. Como consequência, o sinal detetado será menos suscetível a ruído resultante de artefactos de movimento. Este eletrodo húmido tornará os exames EEG mais limpos, na medida em que não haverá a necessidade de se usarem pastas condutoras. O hidrogel colocado a partir do orifício presente na parte superior do substrato conformar-se-á à área da ventosa, não havendo escoamento do mesmo durante todo o exame. Funcionará como uma almofada entre o metal e o escalpe, incluindo pouca ou nenhuma preparação necessária da pele, conforto e facilidade de aplicação. Para além disto, o facto de o biossensor apresentar uma parte removível permite que este seja facilmente lavado após a realização de um exame EEG, podendo ser reutilizável.

2.3. Os hidrogéis de alginato

O hidrogel, ao contrário das pastas condutoras, tem a capacidade de se conformar ao volume da ventosa, permitindo um bom contacto elétrico. Como não está em contacto direto com o ar é menos propenso à secagem inadequada podendo ser pressionado no centro, sem risco de se espalhar ou sujar o escalpe devido à sua natureza sólida. Por outro lado, proporcionará um forte efeito hidratante à superfície da pele, o que lhe dá a capacidade de aumentar o contacto com a pele e o eletrodo, permitindo a redução de impedância e melhoria do desempenho do eletrodo [18]. Todas estas razões fazem com que este hidrogel apresente potenciais características para ser usado como gel condutor em eletroencefalografia, principalmente devido ao seu carácter hidrofílico e à sua elevada biocompatibilidade [5].

Os hidrogéis são redes de polímeros hidrofílicos que podem absorver mais de 300 a 400 vezes o seu peso seco em água. Podem ser fabricados para serem quimicamente estáveis ou, eventualmente, desintegrar-se e dissolver-se. Podem ser classificados em termos de estrutura como homogéneo (não poroso), ou heterogéneos (poroso). As diferenças na sua estrutura surgem como resultado da maneira pela qual as cadeias do polímero interagem com o ambiente aquoso. Em hidrogéis homogéneos as cadeias poliméricas têm uma elevada afinidade com a água em redor formando uma só fase, e são altamente móveis. Por outro lado, os hidrogéis heterogéneos apresentam regiões onde as cadeias poliméricas e a água solvente formam duas fases distintas [32].

A formação de um hidrogel ocorre quando um polieletrólito é combinado com um ião multivalente de carga oposta, formando-se um hidrogel físico, dependendo as características finais do hidrogel das concentrações iniciais dos componentes, da força iónica e do pH da solução [33].

O alginato, também chamado de algina, é um polissacarídeo aniônico que se encontra nas paredes celulares de algas marinhas *Marrons (Phaeophyta)*, onde age como componente estrutural na parede celular e nos espaços intracelulares, promovendo simultaneamente rigidez e flexibilidade [34]. É um polímero constituído por cadeias lineares de resíduos de ácido β -D-manurónico (-M) unidos por ligações tipo (1 \rightarrow 4) e resíduos do seu epímero, o ácido α -L-gulurónico (-G), em várias proporções. Como se pode verificar na *Figura 2.4*, uma molécula deste polímero é constituída por blocos homopoliméricos, -M e -G, e por blocos heteropoliméricos, -MG. As concentrações de ácido manurónico e gulurónico variam não só entre espécies mas também com a época de colheita e idade ou parte da planta em que a amostra é recolhida. A proporção e distribuição desses segmentos ao longo da cadeia determinam as propriedades químicas e físicas do alginato [35]. A disposição espacial dos monómeros dá-se segundo a posição energética mais favorável. Para blocos G-G esta é uma posição em forma de cadeira, 1C_4 , sendo os monómeros unidos por ligação glicosídica α (1 \rightarrow 4). Para M-M trata-se da posição 4C_1 , sendo a ligação glicosídica do tipo β (1 \rightarrow 4), tal como se pode observar na seguinte figura [36, 37].

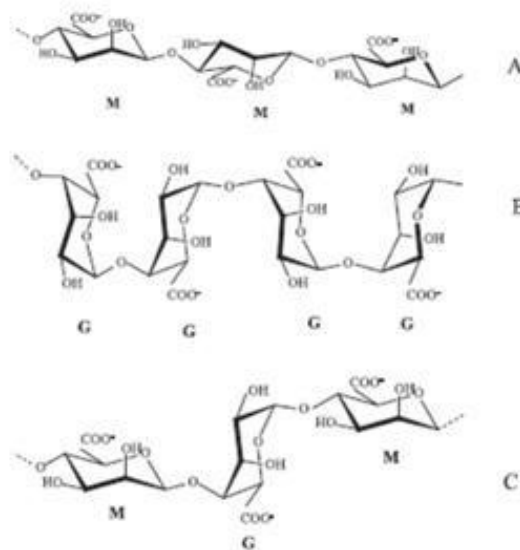


Figura 2.4 – Estrutura dos blocos homopoliméricos (-M e -G) e heteropoliméricos (-MG) que constituem a molécula de alginato: (A) sequência M-M, (B) sequência G-G e (C) sequência M-G-M [37].

A característica mais importante no alginato quer do ponto de vista industrial ou biotecnológico, é a sua capacidade de se ligar eficientemente a cátions bivalentes, tais como Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} entre outros, permitindo a formação de um hidrogel [38]. Os géis de alginato podem desenvolver-se a temperatura constante. Esta propriedade única é particularmente útil para a aplicação pretendida, pois estará em contacto com as células e tecidos com baixa tolerância a temperaturas elevadas. Para além disto, o alginato é um polímero biocompatível, abundante e apresenta baixo preço. Estas propriedades tornam este composto ideal para fazer a interface de

contacto entre pele-elétrodo, pois resolve os problemas de alergias e desconforto existentes quando se usam as pastas condutoras tradicionais [34].

A gelificação de alginato ocorre quando cátions bivalentes participam na ligação entre cadeias do alginato dando origem a uma rede tridimensional em forma de gel. Os cátions ligam-se fortemente aos blocos -G das cadeias de alginato, uma vez que a estrutura dos blocos permitem um alto grau de coordenação dos íons bivalentes, sendo este modelo designado por “**Modelo da caixa de ovos**” [39, 40].

Segundo este modelo, os blocos -G do alginato formam junções com outros blocos -G adjacentes do polímero, formando uma espécie de “caixa” e resultando numa estrutura viscosa. Esta cavidade formada pelos blocos -G é assim capaz de acomodar um íon bivalente. De modo geral, cada íon reticulante interage com dois resíduos -G adjacentes, bem como dois resíduos -G numa cadeia oposta, introduzindo a formação de zonas de junções. Estas zonas de junção representam as interações físicas que mantêm as cadeias do alginato juntas, permitindo a formação do hidrogel. Existe uma proporção de 4:1 entre os grupos -G e os íons bivalentes, tal como se mostra na *Figura 2.5* [40].

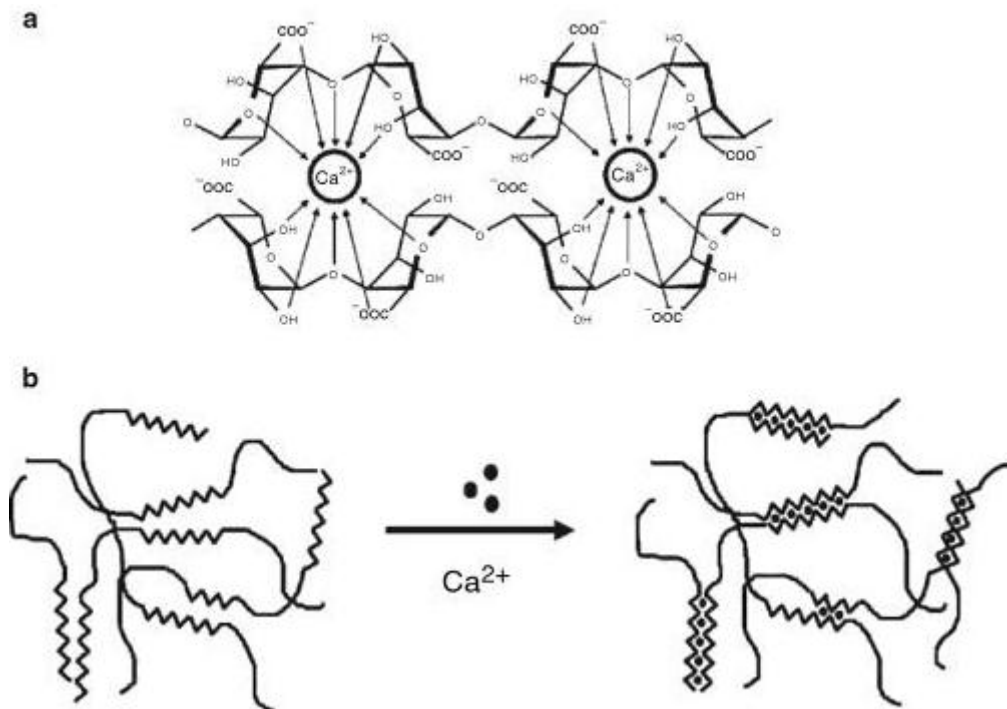


Figura 2.5 – Ligações iônicas entre o íon Ca^{2+} e o alginato – modelo da caixa de ovos. (A) Quelação dos cátions bivalentes; (B) Formação de junções intercadeias [40].

O alginato forma géis com a maioria dos cátions bi e polivalentes. Cátions monovalentes e íons de Mg^+ não provocam a gelificação, enquanto íons como Ba^{2+} e Sr^{2+} produzem géis com maior resistência mecânica do que o

Ca^{2+} . Contudo, tem-se escolhido o Ca^{2+} para promover a formação do gel, uma vez que os seus sais apresentam baixo custo, estão facilmente disponíveis e não são tóxicos [40]. O Ca^{2+} ajuda a manter as moléculas juntas, fazendo com que o polímero se ligue e agregue com mais firmeza, denominando-se esta ligação de “ligação cooperativa” [38]. O cloreto de cálcio (CaCl_2) é um dos agentes mais frequentemente usado para reticular ionicamente o alginato. No entanto, conduz normalmente a uma rápida gelificação, devido à sua alta solubilidade em soluções aquosas. O resultado é uma variada densidade de reticulação e um gradiente de concentração do polímero no gel [41]. Para se obter um gel homogêneo, o Ca^{2+} deve ser libertado lentamente na solução de alginato. O sulfato de cálcio di-hidratado ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e o carbonato de cálcio (CaCO_3), devido à sua menor solubilidade, diminuem a velocidade de gelificação e alargam o tempo de trabalho dos géis de alginato [35].

Recentemente descobriu-se que o Ca^{2+} também se liga a sequências -GM da cadeia. A existência de sequências alternadas, em alginatos naturais, pode permitir uma melhoria das propriedades necessárias dos hidrogéis de cálcio, dependendo da aplicação pretendida para o hidrogel. O rácio M/G e a maneira como os ácidos são distribuídos nas cadeias de alginato, têm um efeito marcante na formação e resistência mecânica do gel. Um rácio de M/G baixo (<1) apresenta uma grande proporção de blocos de ácido gulurónico, formando um gel com elevada resistência mecânica e rígido. Pelo contrário, para um baixo número de blocos de ácido gulurónico, isto é, para um rácio M/G elevado (>1) produz-se um gel de modo gradual, macio e elástico. A maior fragilidade dos géis formados entre os grupos -M é devido à menor resistência de ligação entre as cadeias poliméricas e maior a flexibilidade entre as moléculas [40].

2.4. O Sensor

O sensor desenhado terá a capacidade de detetar a atividade elétrica de um conjunto de neurónios. Assim, é importante que o substrato do eletrodo seja estável e bom condutor elétrico, de modo a transmitir eficazmente o sinal original. A prata é um bom exemplo de material para fabrico do sensor, devido à sua ductilidade e elevada condutividade elétrica. No entanto, este material apresenta um custo elevado. A utilização de revestimentos na área da biomedicina aparece como uma solução que permite contornar muitas das desvantagens dos materiais.

O cobre foi o primeiro material a ser escolhido para construção do substrato do eletrodo, devido à sua elevada condutibilidade térmica e elétrica. É um material maleável e flexível, no entanto é prejudicialmente suscetíveis à oxidação, resultando na diminuição de propriedades desejáveis, tais como a qualidade e a estabilidade [42]. Segundo Hai H. et al. [43] o revestimento do cobre com um filme de prata permitirá reduzir a oxidação do cobre, garantindo a transferência do sinal de modo eficaz.

Uma outra opção para a construção do substrato do eletrodo foi a poliamida. A escolha deste material ficou a dever-se à grande afinidade da prata pelo grupo amida do polímero, permitindo a formação de um filme com boa adesão. A poliamida é um polímero termoplástico obtido a partir de polimerização por condensação de diaminas com ácidos dicarboxílicos. Na reação de produção de uma poliamida, há formação de uma ligação peptídica entre o grupo amina (NH_2) e o grupo carboxílico (COOH), sendo eliminada uma pequena molécula, geralmente água. Esta reação está representada na *Figura 2.6*. Carateristicamente, as poliamidas são polímeros muito resistentes ao desgaste e à abrasão e apresentam boas propriedades mecânicas [44].

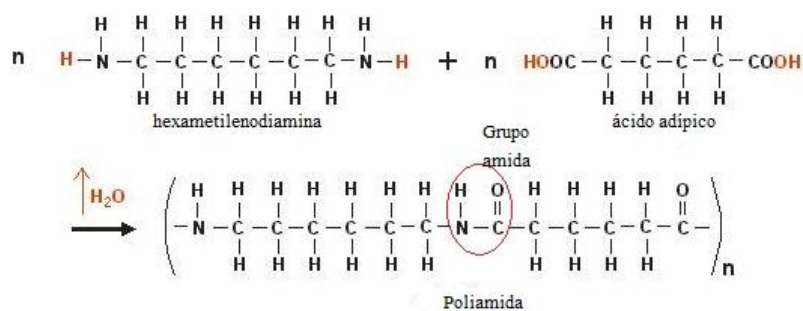


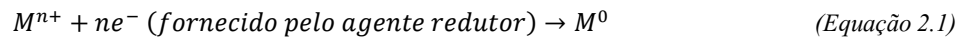
Figura 2.6 – Reação de síntese de poliamida [45].

O revestimento do substrato com prata por *Electroless Plating* permitiu superar os problemas associados com a oxidação do cobre, ao custo elevado da prata ou à ausência de propriedades condutoras no polímero [46]. A comparação das propriedades dos diferentes revestimentos obtidos sobre os diferentes substratos ajudará a escolher os materiais ideais para que o sensor seja capaz de desempenhar a função pretendida.

Método químico de deposição de prata: *Electroless Plating*

O *Electroless Plating* é uma técnica que permite a deposição de um metal ou partículas deste, na superfície de um objeto, sem a necessidade de corrente elétrica [47]. É uma técnica muito usada por apresentar baixo custo e ser fácil de executar, uma vez que não requer qualquer equipamento específico para ser realizada. Esta técnica de revestimento é baseada num processo autocatalítico que envolve várias reações simultâneas em uma ou várias soluções aquosas.

Este método inicia-se pela realização de um pré-tratamento da amostra para remoção de impurezas e sujidades da superfície, de modo a favorecer cineticamente a redução da espécie metálica na interface polímero/solução em relação ao material existente no meio reacional. Após a limpeza, os iões metálicos são reduzidos por agentes catalíticos presentes nas soluções de revestimento, a partir da seguinte equação geral:



A redução do íon metálico na superfície da amostra conduz à formação de uma fina e heterogénea película do metal. A adição de catalisantes promove o crescimento desta camada à superfície, conduzindo à formação de uma cobertura mais uniforme e estável [48].

Esta técnica tem como vantagem o facto de permitir uma concentração de iões de metal constante a banhar todas as partes do objeto, havendo uma uniforme deposição no metal. No entanto, apresenta como desvantagem o facto de, em alguns materiais, não ser suficiente para a formação de um revestimento suficientemente espesso para a transmissão eficaz dos sinais EEG. Nestes casos, o método eletroquímico é usado para fazer crescer o filme obtido por *Electroless Plating* [49].

Método eletroquímico de deposição da prata: Electroplating

Numa reação eletroquímica ocorre transferência de cargas para ou de um eletrodo, geralmente um metal ou semicondutor. Nesta transferência de carga, a quantidade de carga envolvida no processo de redução (*Processo Catódico*¹), tem que ser a mesma que a quantidade envolvida no processo de oxidação (*Processo anódico*²). A quantidade de carga que flui através de um eletrólito depende do potencial aplicado e da resistência da solução [50].

Na operação de eletrodeposição, a amostra a ser tratada é considerada o cátodo de uma célula eletrolítica que contém uma solução conhecida como banho de deposição. De acordo com a *Lei de Faraday* para a eletrólise, a quantidade de todos os elementos libertados no cátodo ou no ânodo durante a eletrólise é proporcional à quantidade de eletricidade que passa através da solução. Para que a reação eletrolítica ocorra numa célula, os eletrões devem atravessar um circuito que liga os dois eletrodos (*Figura 2.7*).

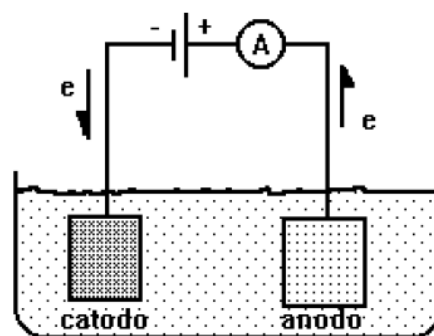


Figura 2.7 – Esquema de deposição de material através de métodos eletroquímicos.

¹ *Processo Catódico* – redução da espécie pela transferência de eletrões do eletrodo. Ex: $2H_2O + 2e^{-} = H_2 + 2OH^{-}$

² *Processo Anódico* – oxidação de uma espécie pela remoção de eletrões. Ex: $2H_2O - 4e^{-} = O_2 + 4H^{+}$

A corrente I é a medida conveniente da taxa de reação na célula enquanto a carga Q , que passa durante um período t , indica a quantidade total a que a reação ocorreu. A carga necessária para a conversão de “ m ” moles de um material em produto, numa reação com “ n_e ” elétrons (“ n_e ” é o número de cargas envolvidas na reação), é calculada usando a *Lei de Faraday* expressa na *Equação 2.2*.

$$Q = \int I dt = mn_e F \quad (\text{Equação 2.2})$$

A quantidade de massa de substância depositada na amostra, m (gramas), é facilmente calculado através da *Equação 2.3*.

$$m = \frac{Q}{F} \cdot \frac{M}{n_e} \quad (\text{Equação 2.3})$$

Onde F é a constante de *Faraday* (96 485 C/mol) e M representa a massa molar da substância (g/mol).

Capítulo III

Material e Métodos

Neste capítulo estão apresentadas detalhadamente todas as técnicas usadas para a caracterização dos diferentes constituintes do hidrogel, com o intuito de se escolher os materiais ideais para a sua produção. Deste modo, é importante a análise das propriedades mecânicas finais do hidrogel, recorrendo-se à reologia para a avaliação do desempenho do hidrogel ao longo do tempo. Ao longo deste capítulo é explicado também como se produziu o revestimento de prata sobre os diferentes materiais, bem como são apresentadas todas as técnicas de caracterização do revestimento usadas como auxiliares à interpretação e compreensão dos resultados.

3.1. Preparação do gel de alginato

A resistência mecânica do hidrogel depende da fonte e concentração de alginato, bem como do seu grau de polimerização. De modo a analisar estas restrições, estudou-se três alginatos de sódio com propriedades diferentes: alginato de sódio 180947, 71238 e A2033. Usou-se carbonato de cálcio (CaCO_3), glucono delta-lactona G4750 (GDL), sulfato de cálcio di-hidratado ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), e cloreto de sódio, (NaCl). Todos os produtos mencionados são da marca *Sigma – Aldrich Chemicals*. A *Figura 3.1* esquematiza o procedimento experimental usado. Começou-se por dissolver o alginato em água desionizada (solução 1). De modo análogo, dissolveu-se o CaCO_3 (solução 2), o $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em combinação com o GDL (solução 3) e o NaCl (solução 4). A solução de CaCO_3 foi adicionada à solução de alginato e misturada durante 30 segundos (*Figura 3.1*, etapa A). Posteriormente, a solução 2 foi adicionada à solução anterior e agitada durante mais 30 segundos para a gelificação iniciar-se (*Figura 3.1*, etapa B). Finalmente adicionou-se a solução de NaCl à mistura anterior (*Figura*

3.1, etapa C). A mistura final obtida foi colocada em microtubos com volume de 1,5 ml, os quais foram dispostos num suporte para gelificar, à temperatura ambiente (*Figura 3.1*, etapa D) [51, 52].

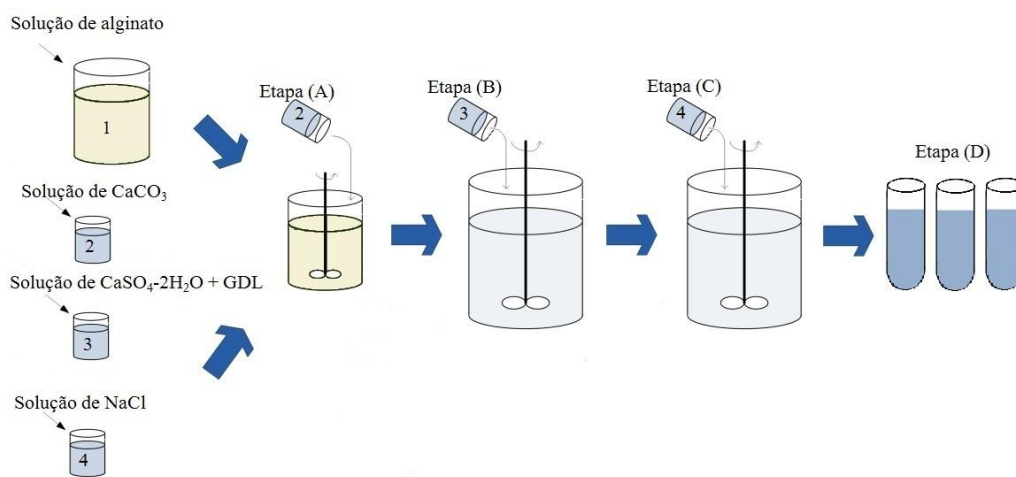


Figura 3.1 – Esquema do procedimento experimental usado para produção do hidrogel.

O CaCO₃ e o CaSO₄·2H₂O forneceram os íons de Ca²⁺ necessário para iniciar a gelificação. A libertação de Ca²⁺ do CaCO₃ é bastante lenta, devido sobretudo à baixa solubilidade do CaCO₃. Assim, a adição do GDL contribuiu para o aumento da velocidade de libertação de Ca²⁺ do CaCO₃, acidificando ligeiramente o meio. A razão molar de CaCO₃:GDL foi sempre mantida a 0,5 para aquisição de um pH ~7 [53].

3.2. Métodos de Caracterização Básica do Hidrogel

Foram utilizadas diferentes técnicas para interpretar e compreender o comportamento dos hidrogéis. A *Tabela 3.1* sumaria todas as técnicas utilizadas com as respetivas propriedades que avaliam.

Tabela 3.1 – Propriedades do hidrogel avaliadas e respetivas técnicas de caracterização.

Caraterização do hidrogel	Técnica
Peso molecular	Viscosimetria
Composição química	FTIR-ATR
Tempo de gelificação	Análise química
Propriedades químicas	Reologia

3.2.1. Viscosimetria

A viscosidade é a medida de resistência de uma substância ao escoamento e está relacionada com as forças intermoleculares. A viscosidade intrínseca relaciona-se com as forças intermoleculares de uma substância, quando esta se encontra misturada com algum outro tipo de molécula e a qual irá interferir na viscosidade total. Esta interferência na viscosidade depende de cada soluto e traduz, igualmente, a resistência de uma substância em fluir: quanto maior a resistência, maior será a viscosidade [54]. Este parâmetro está diretamente relacionado com o peso molecular viscosimétrico (MW) e o qual é muito próximo do peso molecular médio (PM). Para medição da viscosidade intrínseca compara-se o tempo gasto por uma solução em escorrer pelo capilar, com o tempo gasto por solvente puro. O tempo de escoamento é proporcional à viscosidade do fluido e inversamente proporcional à densidade. A viscosidade relativa (η_r) é uma grandeza adimensional, dada pela razão entre a viscosidade da solução ($\eta_{solução}$) e a viscosidade do solvente puro (η_{solv}). Para muitas soluções poliméricas nas concentrações de interesse temos que $\frac{\rho_{solução}}{\rho_{solv}} \sim 1$, deste modo a viscosidade relativa depende apenas da razão dos tempos:

$$\eta_r = \frac{t_{solução}}{t_{solv}} \quad (\text{Equação 3.1})$$

Para o cálculo da viscosidade intrínseca é necessário ainda definir a viscosidade específica (η_{sp}), também adimensional, e calculada a partir da seguinte equação:

$$\eta_{sp} = \frac{\eta_{solução} - \eta_{solv}}{t_{solv}} \quad (\text{Equação 3.2})$$

A viscosidade relativa e específica dependem da concentração da substância (C em g/dl) na solução, deste modo, a viscosidade intrínseca pode ser calculada a partir da seguinte equação:

$$[\eta] = \frac{\sqrt{2(\eta_{sp} - \eta_r)}}{c} \quad (\text{Equação 3.3})$$

O peso molecular viscosimétrico foi assim calculado através da seguinte equação:

$$[\eta] = B \times [MW]^v \quad (\text{Equação 3.4})$$

Onde os valores de B e v são, respetivamente, 0,023 e 0,984 para o alginato e para uma temperatura de 25 °C [7, 55, 56].

O viscosímetro mais usado para determinar a viscosidade intrínseca de soluções é o viscosímetro de *Ubbelohde*. Na *Figura 3.2* está representado um diagrama esquemático deste tipo de viscosímetro, bem como o seu funcionamento.

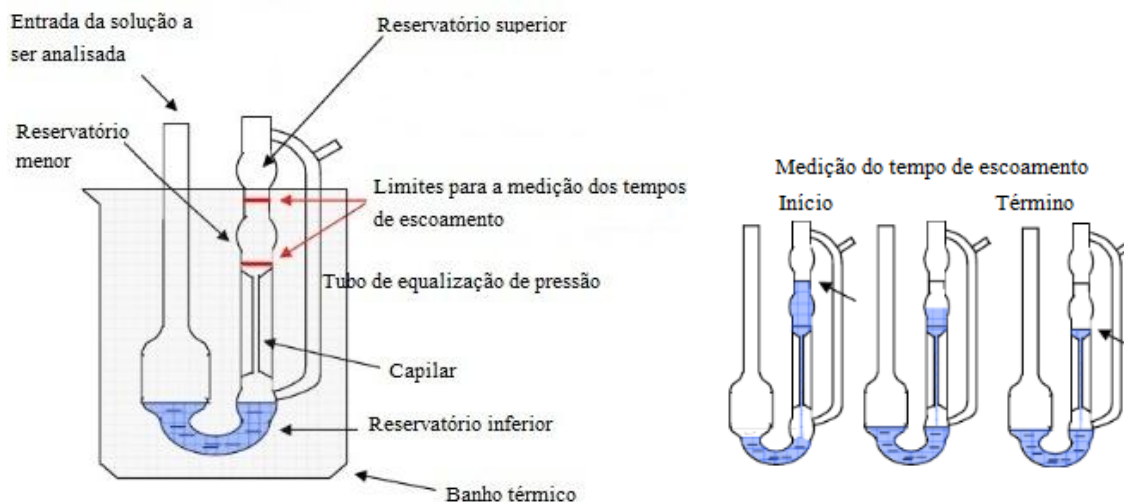


Figura 3.2 – Esquema da constituição e funcionamento do viscosímetro de Ubbelohde [adaptado de [57]].

Num viscosímetro de *Ubbelohde* o líquido é extraído inicialmente para o reservatório superior a partir de uma capilar e por vácuo. O capilar é suspenso acima do reservatório inferior e, em conjunto com o tubo de equalização de pressão, asseguram que a única parte da pressão entre a parte superior do bolbo e a parte inferior do capilar seja aquela devido à pressão hidrostática, isto é, devido ao próprio peso. A partir dos diferentes tempos de escoamento obtidos é possível calcular a viscosidade intrínseca da substância.

A viscosidade intrínseca, $[\eta]$, foi medida com o auxílio de um viscosímetro *Ubbelohde 501-10* com um capilar de 0,63 mm de diâmetro. As amostras foram colocadas no viscosímetro para medição dos tempos de escoamento. O viscosímetro foi colocado num banho de água a 25,4°C de um equipamento *mgw Lauda, Viscoboy 2*. Teve-se o cuidado de verificar regularmente a temperatura do banho de água com um termopar, de modo a evitar a possibilidade de oscilações de temperatura.

3.2.2. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)

A espectroscopia de infravermelho por transformadas de Fourier (*FTIR*) é uma técnica amplamente utilizada que permite identificar ligações químicas em materiais, podendo assim ajudar à caracterização das amostras em

estudo. A combinação de FTIR com o ATR (refletância total atenuada) apresenta como vantagem o facto de não requerer qualquer preparação prévia das amostras.

Em espectroscopia de reflexão interna a radiação que se propaga em um meio óticamente denso, de índice de refração n_1 , sofre reflexão interna total numa interface de um meio adjacente de mais baixa densidade ótica (índice de refração $n_2 < n_1$). Esta onda é chamada de *onda evanescente*. Este fenómeno ocorre apenas quando o ângulo de incidência excede um ângulo crítico, θ_c , determinado por:

$$\sin \theta_c = \frac{n_2}{n_1} \quad (\text{Equação 3.5})$$

Esta onda propaga-se ao longo da superfície do cristal até à extremidade oposta (Figura 3.3) [58].

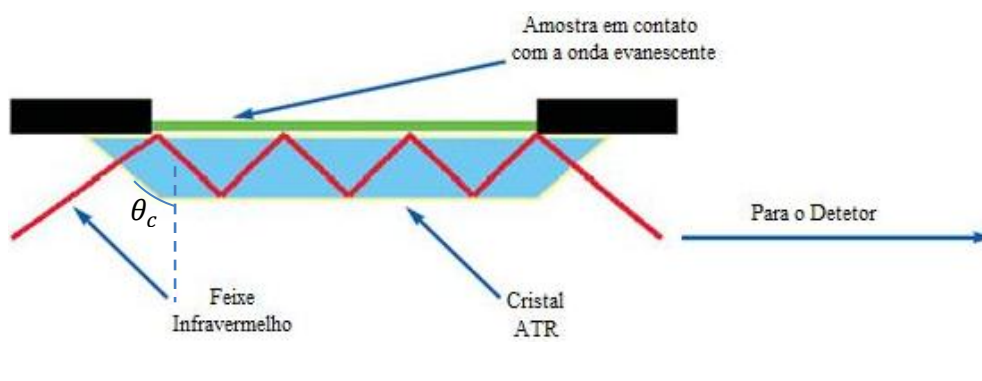


Figura 3.3 – Sistema FTIR-ATR [adaptado de [59]].

O feixe IV penetra apenas algumas centenas de nanómetros abaixo da superfície da amostra, o que permite a caracterização das ligações químicas presentes apenas à superfície. Como a radiação não tem energia suficiente para excitar os eletrões, apenas consegue que as ligações dos grupos funcionais vibrem com uma frequência característica. Assim, quando se expõe uma determinada amostra a radiação IV, ela absorve essa luz a frequências que são características das ligações químicas presentes nas amostras [60].

As amostras foram analisadas através da colocação de um pouco de pó de cada alginato sobre a célula de diamante. A diferença de granulometria de cada alginato constitui uma limitação física da amostra que não se consegue evitar, podendo ser visto como uma desvantagem para a eficaz aquisição de resultados. Esta análise foi realizada com um equipamento *Jasco FTIR 4100*, com um equipamento ATR Golden Gate com célula de diamante (*MKII Golden Gate Single Reflection ATR System Universal*) da *Specac*. Usou-se uma resolução espectral de 8 cm^{-1} e realizaram-se 64 acumulações à temperatura ambiente na região de 4000 a 600 cm^{-1} .

3.2.3. Análise química

O tempo de gelificação foi caracterizado como sendo o momento em que a mistura não fluía quando se inclinava o frasco num ângulo aproximado de 90° e apresentava, simultaneamente, um aspeto de um gel semissólido à superfície. O tempo de injeção foi definido como o intervalo de tempo em que era possível injetar o hidrogel usando uma seringa. No estudo destes tempos usou-se o CaCO₃ e o CaSO₄-2H₂O como a única fonte de iões de cálcio [35]. Os géis obtidos com os diferentes compostos foram estudados de modo a que a concentração molar de cálcio adicionado variasse até um valor específico. Usou-se uma razão molar padrão entre o Ca²⁺ e o COO⁻ de 0,158 designada de X. A análise da densidade de reticulação foi possível através da multiplicação de um fator por esta razão molar Ca²⁺:COO⁻, tal como 1,4X (razão molar: 0,221), 1,6X (razão molar: 0,253), 2X (razão molar: 0,316) e 2,4X (razão molar: 0,379) [6, 51, 52, 61].

3.2.4. Reologia

A reologia é uma área da física que analisa as deformações ou tensões de um material, provocadas pela aplicação de uma força/tensão. Na prática, preocupa-se sobretudo com alterações mecânicas para caracterizar o fluxo de materiais, que exibem uma combinação de propriedades elásticas, viscosas e plásticas. A caracterização destas propriedades em materiais poliméricos é importante, não só do ponto de vista da sua quantificação como também para compreensão/previsão da evolução da gelificação, determinação da arquitetura molecular, determinação do comportamento durante o processo e da performance na aplicação ao produto final.

O comportamento reológico de materiais ideais é matematicamente descrito pela *Lei de Hooke* formulada na *Equação 3.6*.

$$\sigma = E \cdot \varepsilon \quad (\text{Equação 3.6})$$

Segundo esta lei, a deformação sofrida por um material (ao ser submetido à ação de uma força deformadora) é diretamente proporcional à força deformadora, sempre que a referida força não ultrapasse o limite de elasticidade, o qual depende do material em questão. Deste modo, a tensão que se aplica (σ) é diretamente proporcional à deformação específica (ε) sofrida pela amostra, sendo a constante de proporcionalidade o módulo de elasticidade ou módulo de *Young* (E). Estes materiais são conhecidos como reversíveis ou elásticos, uma vez que a sua deformação é reversível. Os materiais viscosos em que a deformação é irreversível obedecem à *Lei de Newton*:

$$\sigma_{yx} = -\mu \frac{dv_x}{dy} \quad (\text{Equação 3.7})$$

Segundo esta lei, a relação entre a tensão aplicada e o gradiente local de velocidade ($\frac{dv_x}{dy}$) é definida através de uma relação linear, sendo neste caso a viscosidade do fluido (μ) a constante de proporcionalidade. Todos os fluidos que seguem este comportamento são denominados de fluidos newtonianos, em que a resposta a uma tensão aplicada é dependente da quantidade de movimento por difusão molecular, ou seja, quanto maior a viscosidade, menor será a velocidade a que o fluido se movimenta. No entanto, quando a relação entre tensão aplicada e o gradiente de velocidade é não linear, ocorrem desvios da idealidade. Em fluidos não-newtonianos (tal como os sistemas poliméricos), a relação entre taxa de deformação e a tensão aplicada não é constante exibindo um comportamento que combina propriedades elásticas (sólido) e viscosas (líquido). Estes sistemas são chamados viscoelásticos [62].

A resposta elástica e viscosa dos sistemas viscoelásticos pode ser quantificada usando um sistema de medição que opera no modo oscilatório. Este método oscilatório permite determinar vários parâmetros viscoelásticos, tais como as componentes elástica (G') e viscosa/dissipativa (G'') do módulo complexo (G^*) [63]. A relação entre estes parâmetros é dada pelas seguintes equações:

$$G^* = \sqrt{G'^2 + G''^2} \quad (\text{Equação 3.8})$$

$$G' = G^* \cos \delta \quad (\text{Equação 3.9})$$

$$G'' = G^* \sin \delta \quad (\text{Equação 3.10})$$

A análise das propriedades reológicas dos hidrogéis foi realizada usando um *Reómetro Physica MCR 300 (Paar Physica)* e os valores obtidos foram trabalhados usando o software *RHEOPLUS®*. Este instrumento inclui uma geometria de cilindros concêntricos, na qual o prato se encontra fixo e o cone exerce movimentos oscilatórios, com uma frequência controlada (*Figura 3.4*). A temperatura foi controlada cuidadosamente dentro da resolução aproximada de 0,1°C.

As amostras estudadas apresentavam diferentes rácios $\frac{[Ca^{2+}]}{[COO^-]}$, tal como se realizou nos testes químicos: usou-se uma razão molar padrão entre o Ca^{2+} e o COO^- de 0,158 (amostra 1), de 0,221 (amostra 2), de 0,253 (amostra 3), de 0,316 (amostra 4) e de 0,379 (amostra 5). Cada amostra foi colocada, uma a uma, sobre o porta amostras e sujeita a dois testes: um *time sweep test (TST)* e um *frequency sweep test (FST)*. O propósito do *TST* baseou-se na quantificação do tempo necessário para que ocorresse a gelificação, isto é, a determinação de uma zona estável de gelificação. Neste teste, o equipamento operou num modo oscilatório, com a aplicação de uma deformação de 5% a todas as amostras e uma frequência de 1 Hz, durante 60 minutos. A quantificação da mudança de fase a uma temperatura e frequência constante permitiu não só determinar a zona estável, como também vários

parâmetros viscoelásticos. No *FST* o equipamento operou em modo dinâmico, com frequências entre 0,1 a 100 Hz e permitiu a determinação das propriedades elásticas e viscosas dos materiais [64].

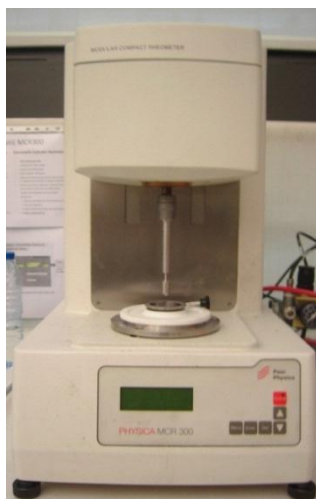


Figura 3.4 – Reómetro do Departamento de Polímeros da Universidade do Minho.

3.3. Procedimento de deposição de prata sobre o substrato

Deposição de prata sobre o Cobre

A deposição de uma camada de prata sobre o cobre dividiu-se em duas etapas: uma deposição química e uma deposição eletroquímica.

Na deposição química, revestiu-se uma placa de cobre com uma fina camada de prata (aproximadamente 1 μm de espessura). O cobre sofreu primeiramente um pré-tratamento que passou por duas etapas: inicialmente foi polido, para remoção de impurezas e sujidades, e posteriormente foi disperso em uma solução de 9,4 mM de sulfato de amónia ((NH_4)₂ SO_4 , Panreac Química) e 37,6 mM de hidróxido de amónia (NH_4OH , Merck). Foram estudados tempos de limpeza de 2, 8 e 10 minutos. Após este pré-tratamento, o cobre foi adicionado a uma solução de tartarato de sódio e potássio, ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa}$ 16-54 g/l, Sigma – Aldrich Chemicals). Finalmente, uma solução aquosa contendo nitrato de prata, (AgNO_3 , AnalaR Normapur) e hidróxido de amónia, com uma razão molar $\text{AgNO}_3/\text{NH}_4\text{OH}$ de 1:3, foi adicionada gota a gota à solução anterior. A velocidade de adição da solução variou de 0,1 a 0,3 ml/min. Após a cessação do processo de revestimento, a placa de cobre revestida com prata foi removida e, em seguida, lavada com água desionizada para remoção de produtos químicos residuais e impurezas [46, 47].

Seguidamente à deposição da fina camada de prata por métodos químicos realizou-se uma deposição eletroquímica de Ag para o crescimento desta camada inicial, usando uma solução composta por 0,1 M de AgNO_3 , 0,2 M de ácido etilindiamino tetra-acético ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$, *Sigma-Aldrich Chemicals*), 0,5 M de NH_4OH e 0,1 M de nitrato de amónia (NH_4NO_3). O esquema da montagem experimental da deposição eletroquímica está representado na *Figura 3.5*. Usou-se um eléctrodo de Ag/AgCl como referência e um eléctrodo cilíndrico auxiliar de grafite de modo a permitir uma uniforme distribuição de campos eléctricos em toda a área da amostra. As curvas de deposição foram medidas usando um Potencióstato *EG&G PAR 273A* e as medidas de deposição de carga foram adquiridas com o software *CorrWare/CorrView®*. Todas as medições foram realizadas à temperatura ambiente (25°C) a 0 V e uma densidade de carga de 2.0 C/cm^2 .

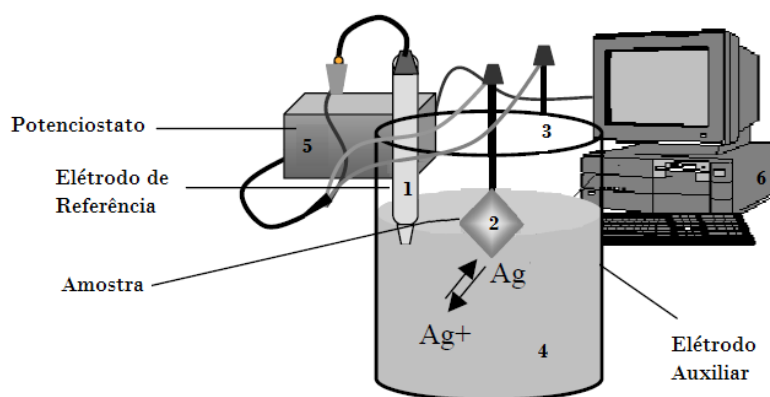
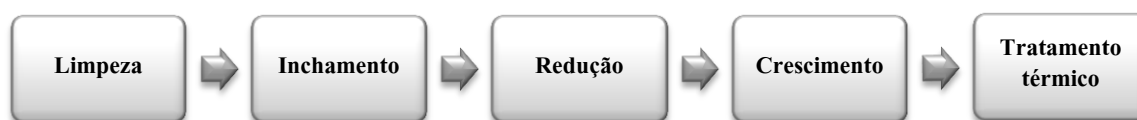


Figura 3.5 – Esquema de montagem experimental para deposição eletroquímica. A montagem eletroquímica contém: 1) eléctrodo de referência de Ag/AgCl; 2) Amostra de Cu; 3) Eléctrodo auxiliar de grafite; 4) Solução eletrolítica com 0,2 M de EDTA; 5) Potencióstato EG&G 273A; 6) computador para aquisição de resultados [adaptado de [65]].

Deposição de prata sobre a poliamida

O processo de revestimento da poliamida passou por cinco etapas representadas no diagrama abaixo:



1. *Limpeza*: a realização de um pré-tratamento permitiu a remoção de impurezas e sujidades à superfície do polímero. As amostras foram colocadas em 2-propanol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$, AnalaR Normapur) durante 10 minutos na tina de ultra-sons e posteriormente, foram mergulhadas em água destilada e colocadas novamente no ultrasons por mais 10 minutos.
2. *Inchamento*: Realizado o pré-tratamento, mergulhou-se as amostras durante 60 minutos numa solução de 1,77 mol/L de AgNO_3 para ocorrer o inchamento do polímero.
3. *Redução*: As amostras foram retiradas e lavadas com água destilada para remoção dos excessos de Ag que não se encontravam bem aderentes. Mergulhou-se as amostras em uma solução de $66,1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ de

borohidreto de sódio (NaBH_4 , Merck) durante mais 10 minutos com agitação moderada. Seguidamente, as amostras foram novamente lavadas com água destilada para remoção de Ag mal aderida, secas e colocadas novamente na solução de AgNO_3 durante mais 10 minutos. Repetiu-se este processo mais duas vezes para aumentar a quantidade de prata depositada sobre a amostra.

4. *Crescimento*: As amostras foram posteriormente colocadas num frasco com uma solução composta por 0,32 mol/L de glucose (Merck), 0,07 mol/L de AgNO_3 , 0,02 mol/L de ácido trisódico (Sigma – Aldrich Chemicals) e uma concentração de amónia necessária para se dar a precipitação da Ag. Deixou-se na estufa durante 24h a 40°C.
5. *Tratamento térmico*: Colocou-se as amostras durante 24h a 70 °C e durante 10 min a 170 °C.

3.4. Métodos de Caracterização Básica do Revestimento

O revestimento foi estudado com auxílio de várias técnicas. A *Tabela 3.2* apresenta as técnicas usadas e respetivas propriedades que avaliam.

Tabela 3.2 – Propriedades do revestimento avaliadas e respetivos métodos de caracterização.

Caraterização do revestimento	Técnica
Morfologia e composição	SEM e EDS
Estabilidade de impedância eletroquímica	ISE
Estabilidade do potencial	Medição do ruído elétrico
Desempenho	Testes In vivo

3.4.1. Microscopia Eletrónica de Varrimento e EDS

A microscopia eletrónica de varrimento (*SEM*) é um instrumento muito poderoso que permite a observação e caracterização da superfície de materiais. Este microscópio, relativamente aos convencionais, apresenta uma grande profundidade de campo e uma elevada resolução, o que permite o estudo da morfologia dos revestimentos [66].

Esta técnica baseia-se na criação de um feixe de eletrões em uma coluna de vácuo, a partir de um filamento de tungsténio por efeito de campo. A diferença de um campo elétrico entre o cátodo e o ânodo origina a emissão

de eletrões, os quais são acelerados em direção à amostra. Os eletrões bombardeados, denominados de eletrões primários, passam por lentes condensadoras e por uma lente objetiva que têm a função de focalizar o feixe sobre a amostra (*Figura 3.6*). Estes eletrões interagem com a amostra por dispersão e absorção na sua superfície, provocando a emissão de radiação, corpuscular e eletromagnética, que é coletada por detetores específicos.

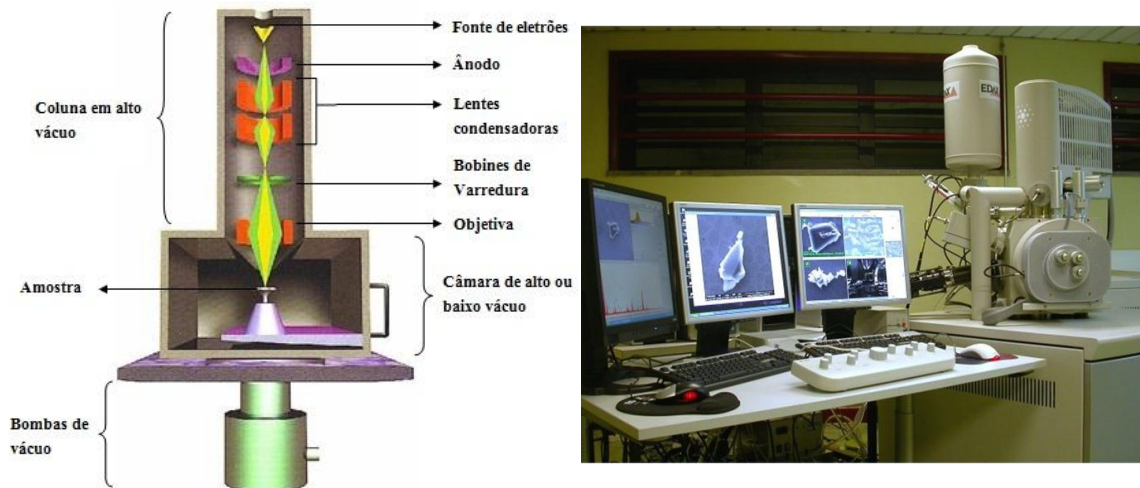


Figura 3.6 – Na figura à esquerda está representado um desenho esquemático de uma coluna de SEM [67]. À direita encontra-se o equipamento JEOL JSM 6301F situado no Centro de Materiais da Universidade do Porto.

Da radiação emitida após a interação dos eletrões primários com as amostras, os sinais mais importantes para gerar as imagens SEM são:

- *Eletrões Secundários*: tem origem em interações inelásticas entre os eletrões primários e os eletrões atômicos, sendo o sinal proveniente de uma profundidade de cerca de 10 nm. A sua intensidade é essencialmente função da topografia [66].

- *Eletrões Retrodifundidos*: resultam de interações elásticas entre os eletrões primários e os átomos da amostra, sendo provenientes de regiões até 1 μm de profundidade. A intensidade deste sinal é função da orientação da amostra relativamente ao feixe e do número atômico desta, permitindo obter informação relativa à variação da composição química da amostra [68].

A espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS) é uma técnica usada em combinação com o SEM, a qual possibilita uma análise da composição química elementar num dado ponto. Estes detetores capturam os raios X emitidos pela amostra. Cada elemento emite um valor característico de energia em virtude da sua estrutura atômica, deste modo a partir dos diferentes raios X capturados é possível determinar quais os elementos presentes à superfície da amostra, bem como a sua localização. Todo este processo ocorre em vácuo para que não haja dispersão ou atenuação dos eletrões [69].

As amostras foram imobilizadas numa fita de grafite colocada num suporte de metal. No estudo morfológico dos revestimentos utilizou-se um microscópio da marca *JEOL*, modelo *JSM 6301F*, acoplado um sistema de microanálise com sistemas de observação de amostras a baixa temperaturas. As condições de operação foram 15 kV de tensão de aceleração e pressão na câmara de aproximadamente $2,2 \times 10^{-3}$ Pa.

3.4.2. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

A espectroscopia de impedância eletroquímica pode ser considerada uma técnica de caracterização de cinética dos sistemas eletroquímicos. Esta técnica é capaz de estudar processos cujas constantes de tempo variam ao longo e em várias ordens de grandeza. O seu carácter estacionário permite que cada medida seja o resultado de uma média de valores, obtendo-se assim elevados níveis de precisão.

Esta técnica consiste basicamente na aplicação de uma pequena perturbação ao sistema em estudo, sob a forma de uma onda sinusoidal de potencial,

$$V(t) = V_0 \text{sen } \omega t \quad (\text{Equação 3.11})$$

em que V_0 é a amplitude e ω a frequência angular, em que a corrente do sistema se traduz em

$$I(t) = I_0 \text{sen } (\omega t + \varphi) \quad (\text{Equação 3.12})$$

em que I_0 é a amplitude do sinal de corrente e φ a diferença de fase entre os dois sinais.

A impedância, Z , do sistema será:

$$Z = \frac{V}{I} = \frac{V_0}{I_0} \frac{\text{sen } \omega t}{\text{sen } (\omega t + \varphi)} \quad (\text{Equação 3.13})$$

A impedância do sistema pode ser representada como um vetor \vec{Z} , o qual corresponde à divisão do vetor \vec{V} pelo vetor \vec{I} . Este vetor pode ser tratado como um número complexo, da forma:

$$Z = Z_{real} + Z_{imag} \quad (\text{Equação 3.14})$$

Num ensaio de espectroscopia de impedância eletroquímica efetua-se a determinação de impedância do sistema ao longo de uma vasta gama de frequências. Os resultados obtidos para os vários valores de frequência da perturbação imposta podem ser representados segundo um *Diagrama de Bode*. Neste diagrama, a distribuição dos

valores de impedância por várias ordens de grandeza são representados em coordenadas polares (magnitude $\log |Z|$ em função de $\log \omega$).

Os elétrodos de Ag/AgCl apresentam, por norma, um potencial mais estável e, conseqüentemente, menos ruído quando em contacto com um eletrólito. Deste modo, a deposição de uma camada de AgCl sobre o revestimento de Ag, irá estabilizar o potencial do eléctrodo e baixar a impedância de interface. Segundo a *Equação 1.1* apresentada no *Capítulo I*, o eléctrodo de prata responde reversivelmente aos iões de cloreto presentes na solução, formando-se assim uma camada de AgCl sobre a superfície do eléctrodo [70].

A montagem experimental usada é semelhante à que se usou na deposição eletroquímica da prata sobre o cobre, representado na *Figura 3.5*, usando neste caso um potencióstato *EG&G PAR 273A* para deposição do AgCl, um analisador de resposta em frequência *SOLARTRON 1250*, para medição da impedância e uma solução que continha cloro. Analisou-se a deposição do AgCl com duas soluções diferentes: uma solução com 0,9% NaCl e uma outra de 1M de HCl [70, 71]. Para a medição da impedância das diferentes amostras revestidas com prata usou-se um software *Zplot/Zview®*.

A deposição do AgCl sobre a prata foi realizada de forma semelhante em ambas as soluções. Iniciou-se pela realização de uma limpeza eletrolítica prévia para remoção de sujidades, fazendo passar uma corrente de $-0,6 \text{ mA/cm}^2$ durante alguns minutos. Após isto, deposita-se uma quantidade de cloreto de prata, fazendo passar 10 mA/cm^2 durante 5 segundos, e mediu-se a impedância final da amostra com esta nova camada de AgCl. É depositada uma nova camada de AgCl e mede-se novamente a curva de impedância [70, 71]. O procedimento foi repetido até se obter uma camada de AgCl suficiente para garantir a estabilidade do potencial (aproximadamente 5 mg de AgCl). Uma vez preparado, o eléctrodo de Ag/AgCl foi mantido em solução de NaCl e HCl com diferentes concentrações, durante quatro dias para o potencial estabilizar. As concentrações das soluções usadas estão representadas na *Tabela 3.3*.

Tabela 3.3 – Condições de testes eletroquímicos para deposição de AgCl nos diferentes elétrodos.

Procedimento	Deposição da camada de AgCl	Imersão da amostra durante 24h	Imersão da amostra estabilização durante 72h
1	0,9 % NaCl	0,9 % NaCl	0,9 % NaCl
2	1M HCl	0,05M HCl	0,005M HCl

3.4.3. Medição do ruído elétrico

A gravação de biopotenciais na superfície do escalpe não é uma representação exata do evento em análise. É composta por uma tensão desejada, o sinal, e um número de tensões indesejadas, o ruído. O ruído é uma flutuação aleatória de sinais elétricos indesejados que torna mais difícil de detetar ou processar os sinais reais, deste modo é importante conhecer a magnitude e origem deste ruído. O ruído eletrodo-pele pode ser dividido em dois componentes: a interface eletrodo-gel e a interface gel-pele. O ruído proveniente da interface eletrodo-gel pode ser calculado através da colocação de dois eletrodos, um contra o outro, sendo o valor típico obtido com eletrodos de Ag/AgCl de 1 μ V. O ruído proveniente da interface eletrólito-pele pode ser calculado através de medições de ruído com o eletrodo em contacto direto com a pele, e geralmente varia entre 1 e 15 μ V [72]. Como o ruído proveniente do contacto gel-pele depende exclusivamente do tratamento de pele (grau de abrasão e limpeza da pele) a que o paciente é sujeito, deve-se garantir que o ruído imposto pela interface eletrodo-gel é o mínimo possível, de modo a não causar qualquer ruído que possa mascarar o sinal que está a ser gravado.

Na medição do ruído produzido na interface eletrodo-gel, foram usados dois eletrodos colocados frente a frente, tal como se mostra na *Figura 3.7*. Neste estudo foi desprezado a interface gel-pele.

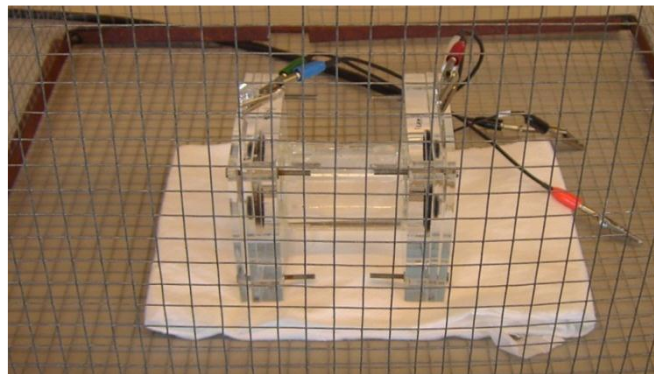


Figura 3.7 – Montagem experimental usada para a medição do ruído a sonda: Working (verde) e a Working Sense (azul) foram ligados a uma amostra, e o Counter (vermelho) e o Reference (branco) foram ligados à outra amostra.

A medição do ruído nas amostras de Ag/AgCl foi realizada com recurso a um potenciômetro *Gamry G300* com o auxílio do software *ESA410*®. Foram analisados pares de amostras com as mesmas condições, imersos em solução de NaCl em potencial de circuito aberto e a uma taxa de amostragem de 1000 Hz durante um período de 10 minutos. A célula eletroquímica foi mantida dentro de uma gaiola de *Faraday*.

3.5. Testes *in-vivo*

Os testes *in-vivo* são testes realizados em adultos saudáveis com o objetivo de avaliar a performance do novo eletrodo. Estes testes permitiram avaliar o desempenho do novo biossensor, através da comparação de sinais elétricos transmitido pelo novo sensor, com sinais adquiridos com eletrodos AgCl tradicionais.

A análise dos sinais elétricos do escalpe foi realizada em adultos com idade compreendida entre 22-23 anos, com um *bioamplificador ANT* (do inglês *Advanced Neuro Technology*) de 32 canais. A *Figura 3.8* mostra a montagem de EEG usada para a medição do registo da atividade elétrica do escalpe, colocada na parte frontal do crânio do indivíduo que se encontra relaxado, de modo a evitar interferência elétrica a partir de contrações musculares. Para a aquisição de um registo de EEG espontâneo usou-se um eletrodo de referência comum na posição Fp1, o novo eletrodo e um eletrodo de Ag/AgCl comercial na posição Fp2 e um eletrodo Terra na posição Fp7. Foi realizado o registo durante alguns minutos. Os sinais foram posteriormente analisados com a aplicação *eeglab* do *Matlab*.

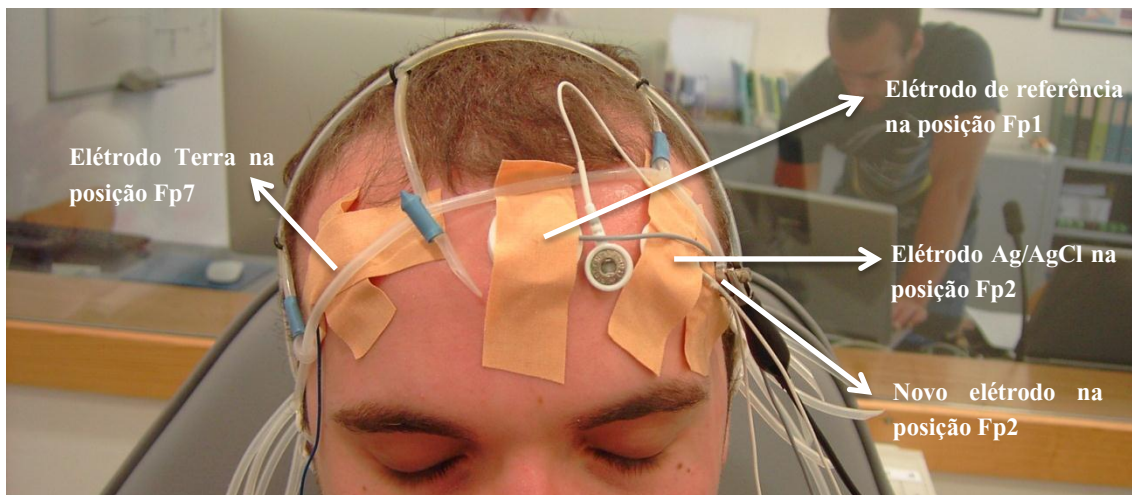


Figura 3.8 – Montagem experimental usado em testes in-vivo.

Capítulo IV

Resultados e Discussão

O Capítulo IV reúne todos os resultados experimentais obtidos, desde a caracterização da composição do hidrogel até à composição e caracterização do revestimento. A análise destes resultados permitirá selecionar o material ideal para a construção do substrato do eletrodo, capaz de responder aos objetivos que motivaram este trabalho.

4.1. Otimização da síntese do hidrogel

O peso molecular dos diferentes alginatos, a diferença de proporções de grupos -M e -G, as diferentes fontes de Ca^{2+} , a presença ou ausência de NaCl são fatores que influenciam quer o tempo de gelificação, quer o tempo de injeção. Para além disto, a diferente concentração destes compostos irá permitir a aquisição de hidrogéis com diferentes propriedades mecânicas. De modo a produzir-se um hidrogel com as propriedades ideais para a aplicação pretendida, o estudo da influência de cada um destes parâmetros tornou-se crucial para o desenvolvimento deste trabalho.

4.1.1. Peso Molecular

O tamanho ou comprimento da cadeia polimérica influencia não só o comportamento reológico dos hidrogéis formados, bem como a estabilidade, as propriedades físicas do produto final e sobretudo os tempos de gelificação dos hidrogéis.

A Tabela 4.1 mostra os tempos de escoamento obtidos para cada amostra, bem como as respectivas viscosidades e peso molecular aproximado, calculados a partir das equações apresentadas no capítulo anterior. A viscosidade do soluto (água destilada) foi de 81 segundos.

Tabela 4.1 – Peso molecular obtido para cada alginato a partir dos respectivos tempos de escoamento.

Amostras	Tempos de escoamento (s)	Viscosidade Intrínseca (dl/g)	Peso molecular (kDa)
Alginato 180947*	176	7	322
Alginato 71238*	352	14	694
Alginato A2033*	449	19	920

**Referência de Sigma – Aldrich Chemicals*

O peso molecular é aproximadamente igual ao peso molecular viscosimétrico, e o qual varia proporcionalmente com a viscosidade intrínseca. Dos alginatos analisados, o polímero que apresenta menor peso molecular é o alginato 180947, enquanto o alginato 71238 e o alginato A2033 apresentam, aproximadamente um valor para o peso molecular duplo e triplo deste, respectivamente.

Pretende-se que o alginato escolhido apresente uma viscosidade tal que permita a sua injeção no eletrodo e simultaneamente, impeça o escoamento do material para o exterior do mesmo. O aumento do comprimento da cadeia tende a diminuir a mobilidade da mesma e aumentar a resistência, como consequência do maior número de interações existentes na cadeia entre o catião bivalente e o ião carboxilo. Estas interações tendem a manter as cadeias individuais mais fortemente na posição, habilitando-as a resistirem à deformação e separação da matriz, tanto em tensões como a temperaturas mais elevadas [55].

4.1.2. Composição Química

É importante saber a proporção de grupos -M e -G de cada polímero usado, na medida em que é uma das propriedades que nos fornece mais informação sobre o seu comportamento quando se pretende criar um hidrogel, nomeadamente a sua resistência mecânica. Nos espectros IV dos diferentes alginatos é visível um conjunto de bandas características, nomeadamente as bandas que se referem aos grupos -M e -G, respetivamente em 808 e 1030 e em 787 e 1080 cm^{-1} [73]. Através do quociente da intensidade destas bandas dos espectros com correção da linha de base, é possível fazer uma boa estimativa do rácio M/G [74]. Em alginatos este rácio pode variar de 0,5 a 2,5, devido às heterogeneidades entre o comprimento da cadeia e distribuição dos blocos -M e -G. Para além disto, a quantidade de grupos -M e -G está diretamente relacionada com a origem do alginato: algas de origem diferentes

apresentam diferente proporção deste rácio, e consequentemente, diferentes propriedades físico-químicas. A Figura 4.1 mostra os espectros obtidos para cada alginato.

O quociente da intensidade das bandas de $808/787\text{ cm}^{-1}$ e $1030/1080\text{ cm}^{-1}$ permitiu estimar o rácio M/G dos diferentes alginatos. De acordo com este rácio, a razão M/G obtida para as bandas referidas foi de 1,2 e 1,4 para o alginato 180948, para o alginato 71238 obteve-se 0,9 e 1,3 e, finalmente, para o alginato A2033 a razão foi de 1,1 e 1,6, respetivamente.

Tal como foi explicado nos capítulos anteriores, quanto menor for o rácio M/G, maior é a presença do grupo -G e consequentemente maior a resistência mecânica do gel. Dos dados obtidos observa-se que, o alginato 71238 (obtido a partir de *Alga Marrom*) é aquele que apresenta valores inferiores quer para o quociente da intensidade das bandas de $808/787\text{ cm}^{-1}$, quer para o quociente de $1030/1080\text{ cm}^{-1}$, sendo portanto o que apresenta maior quantidade de grupos -G. Assim, o alginato 71238 permitirá a formação de um gel com maior resistência mecânica que os restantes alginatos, colocando-o em vantagem sobre estes neste aspeto [74].

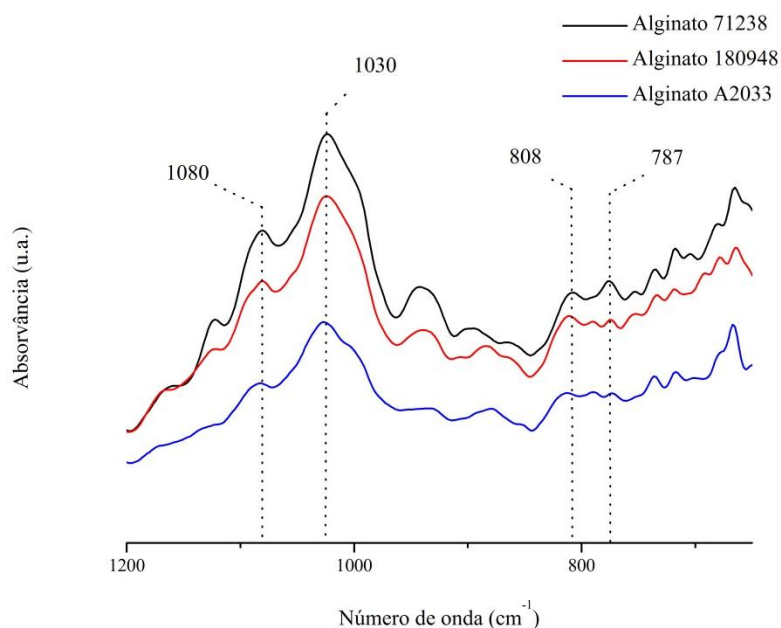


Figura 4.1 – Espectros FTIR-ATR dos diferentes alginatos.

4.1.3. Estudo da cinética de gelificação

A concentração de polímero, o tipo de agente de reticulação e a presença de NaCl tem uma grande influência na cinética de gelificação do hidrogel. Deste modo, o estudo da influência de cada um destes parâmetros permitiu aferir as condições de preparação ideais para se ter um hidrogel com as propriedades desejadas.

Concentração de polímero

A influência da concentração do polímero na cinética de gelificação está representada na *Figura 4.2*.

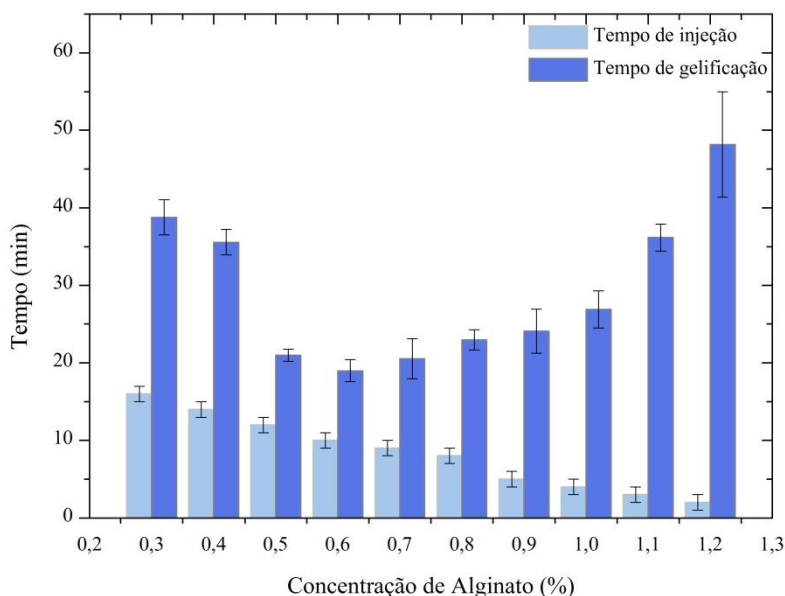


Figura 4.2 – Estudo da influência da concentração de alginato no tempo de gelificação e injeção, realizado com o alginato 71238.

Os hidrogéis apresentam uma variação da taxa de gelificação com o aumento da concentração do polímero. Esta conclusão indica que o rearranjo conformacional das cadeias do polímero é importante para a formação da reticulação. Uma maior concentração de polímero resulta em maior viscosidade e, conseqüentemente, maior é o impedimento entre as cadeias de polímeros. Como resultado, verifica-se um menor rearranjo conformacional da cadeia polimérica, para a formação de ligações cruzadas de modo eficaz [34]. No entanto, para concentrações inferiores a 0,6% de alginato, observam-se elevados tempos de gelificação. Isto ocorre porque a baixa concentração de alginato presente em solução, traduz-se numa menor densidade do ião COO^- presente e, conseqüentemente, a necessidade de um maior tempo para as cadeias se conseguirem organizar. O facto destes iões se encontrarem muito afastados, leva a que demorem mais tempo a formarem o modelo para a receção do Ca^{2+} .

A *Figura 4.3* mostra o comportamento dos diferentes alginatos para uma gama de concentrações de alginato definida a partir das viscosidades do polímero, isto é, a partir das propriedades de cada polímero. Por exemplo, a partir da *Viscosimetria* observou-se que o alginato 180947 apresenta baixa viscosidade (7 dl/g), sendo difícil a obtenção de hidrogéis para baixas concentrações deste. Em contrapartida, o alginato A2033 apresenta alta viscosidade (19 dl/g), o que dificulta a aquisição de hidrogéis em concentrações elevadas deste polímero. Selecionou-se assim uma gama de concentrações de 0,4% a 1%.

Este estudo permitiu concluir que todos os alginatos obedecem à cinética química determinada anteriormente, variando o tempo de gelificação com o peso molecular: quanto maior o peso molecular, menor o tempo de gelificação.

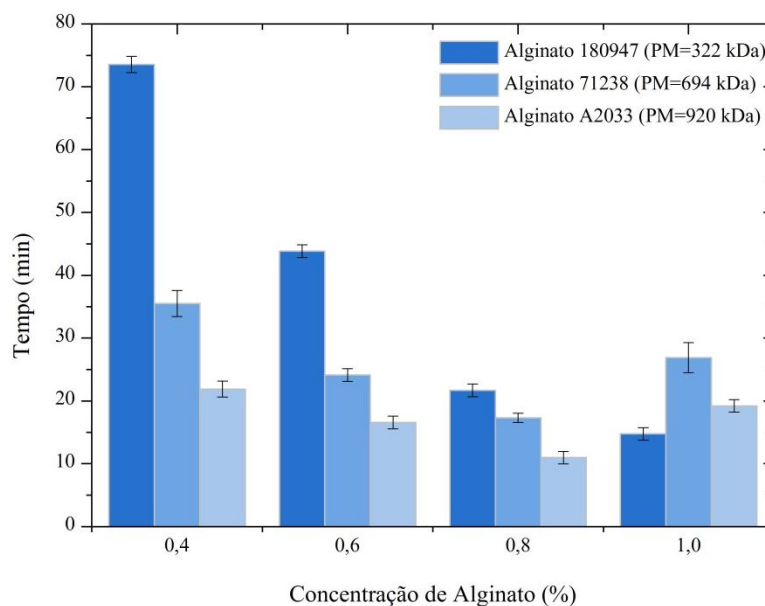


Figura 4.3 – Evolução da cinética de gelificação dos hidrogéis obtidos a partir de diferentes alginatos.

Fontes de Cálcio

Foram estudados diferentes compostos dadores de íons de Ca^{2+} . Existem compostos que cedem rapidamente estes íons para a formação de uma rede reticulada, enquanto outros necessitam de determinadas condições de pH para cederem estes íons. Para se analisar como diferentes agentes de reticulação influenciam o tempo de gelificação e as propriedades mecânicas estudou-se dois compostos dadores de Ca^{2+} : o $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e o CaCO_3 .

Para se estudar a influência de diferentes fontes de cálcio, a concentração de alginato foi mantida constante e fez-se variar a concentração dos compostos responsáveis pela iniciação da gelificação. A análise da Figura 4.4 permite concluir que o $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ produz um hidrogel rapidamente, mesmo quando em baixas concentrações, formando-se géis muito heterogêneos. Em contrapartida, o sistema CaCO_3 -GDL é muito lento, produzindo-se um gel com maior resistência mecânica, uniforme, transparente formado por estruturas homogêneas. A lenta taxa de gelificação do CaCO_3 permite a formação de géis homogêneos, no entanto necessita de um maior tempo para que a gelificação ocorra [34].

O CaCO_3 é um composto pouco solúvel em água. A passagem desta solução pelo ultrasons durante 15 minutos aumenta a velocidade de gelificação do hidrogel na ordem de 3 a 5 minutos. O ultrasons permite a desagregação do material em solução, contribuindo para o aumento da área específica das partículas em solução. Isto contribui para que o encontro do Ca^{2+} com o COO^- ocorra mais rapidamente.

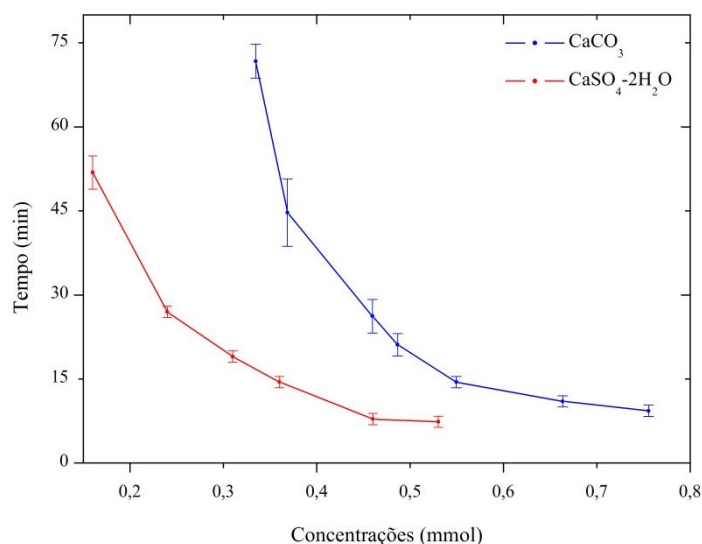


Figura 4.4 – Influência da concentração de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e CaCO_3 na cinética de gelificação dos hidrogéis.

Presença de NaCl

O hidrogel terá como principal função a condução do impulso nervoso do escalpe do recém-nascido, para o sistema de análise de sinais elétricos. De modo a conferir a estes hidrogéis as propriedades condutoras necessárias para tal função, adicionou-se um sal ao gel, o NaCl. A influência deste composto na cinética de gelificação está representada na Tabela 4.2, em que é possível analisar a diferença nos tempos de gelificação entre os géis com e sem este sal.

Tabela 4.2 – Influência da presença de NaCl na cinética de gelificação

Concentração de Alginato 71238	Tempos de gelificação na presença de NaCl (minutos)	Tempos de gelificação na ausência de NaCl (minutos)
0,4%	28±1	36±2
0,6%	14±1	24±1
0,8%	11±1	17±1
1%	9±1	27±2
1,2%	24±4	48±7

Da análise da tabela conclui-se que há uma diminuição considerável do tempo de gelificação na presença de NaCl. Esta diminuição ocorre devido ao facto da solubilidade do $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ aumentar na presença deste sal [75]. O NaCl contribui para uma maior facilidade de libertação de Ca^{2+} deste composto, ligando-se com maior rapidez aos iões COO^- para a iniciação da reticulação, requerendo menos tempo para a aquisição de uma estrutura

semissólida. A concentração de NaCl adicionada não excedeu o limite de isotonicidade, de modo a que a composição do gel apresentasse uma concentração de moléculas semelhantes às dos fluidos do nosso corpo e, portanto, o risco de causar reações alérgicas é diminuto.

O estudo da composição química de diferentes hidrogéis permitiu concluir que é necessário um equilíbrio entre o tempo de gelificação e o tempo de injeção para que este desempenhe a função pretendida de modo eficaz. A *Tabela 4.3* faz uma comparação entre as concentrações necessárias de todos os compostos para a aquisição de um hidrogel em tempos de gelificação semelhantes. Neste estudo foram mantidas constantes as razões $\text{Ca}^{2+}:\text{COO}^-$ e $\text{CaCO}_3:\text{CaSO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Conclui-se que o alginato 71238 é o melhor para a aplicação pretendida, pois é aquele que nos oferece um melhor equilíbrio entre o tempo de gelificação e o tempo de injeção, possibilitando um melhor desempenho do hidrogel. Por outro lado, verificou-se que os hidrogéis produzidos a partir dos diferentes alginatos, mas com o mesmo tempo de gelificação, apresentavam propriedades mecânicas diferentes. O alginato 71238 era aquele que apresenta melhores propriedades mecânicas, mantendo-se completamente coeso após a sua remoção da ventosa. Isto é devido ao facto de este polímero apresentar menor razão M/G, quando comparado com os restantes polímeros.

Tabela 4.3 – Comparação do comportamento de gelificação dos hidrogéis para os diferentes alginatos.

Tipo	Concentrações	CaCO ₃ (mmol)	CaSO ₄ ·2H ₂ O (mmol)	Tempo de Injeção (minutos)	Tempo de Gelificação (minutos)
Alginato 180974	1%	0,883	0,514	4±1	15±1
Alginato 71238	0,6%	0,550	0,319	6±1	14±1
Alginato A2033	0,6%	0,504	0,296	4±1	14±1

4.1.4. Estudo das propriedades reológicas

As propriedades viscoelásticas dos hidrogéis relacionam a resposta termo-hidro-mecânica do gel com a sua microestrutura e podem fornecer informação revelante para a modulação do seu desempenho. A reologia é a técnica ideal para análise das propriedades viscoelásticas do material, passando pela gelificação, uma vez que, se as condições de ensaio forem escolhidas cuidadosamente, provoca perturbações mínimas na microestrutura e cinética de gelificação do mesmo [76].

A *Figura 4.5* traduz a evolução da viscosidade complexa ao longo do tempo para as diferentes amostras. São claramente visíveis duas fases de gelificação: uma *fase primária*, em que ocorre uma gelificação acentuada, seguida de uma *gelificação secundária*, menos acentuada e com tendência a estabilizar. O ponto de transição entre

estas duas fases dá indicação do tempo necessário para que o hidrogel adquira forma própria. Neste ponto, o hidrogel já se encontra na forma semissólida.

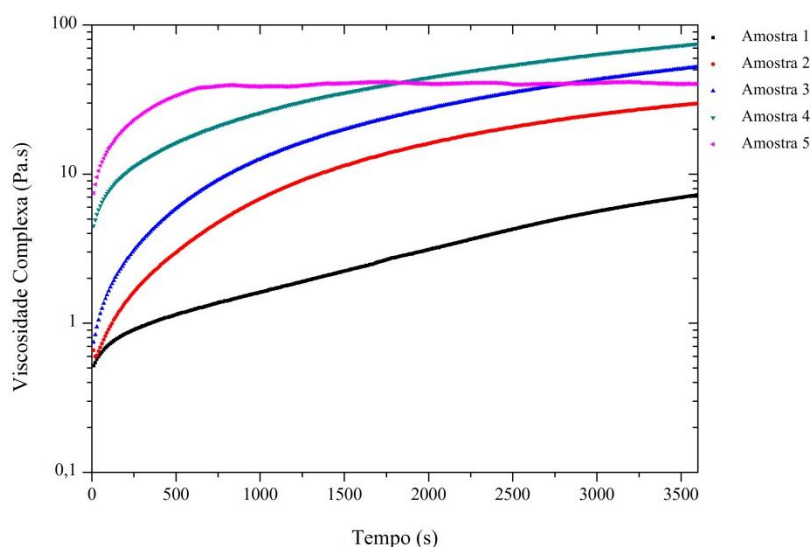


Figura 4.5 – Estudo das propriedades reológicas em hidrogéis com rácios $\text{Ca}^{2+}:\text{COO}^-$ de: 0,158 (amostra 1), 0,189 (amostra 2), 0,253 (amostra 3), 0,316 (amostra 4) e 0,379 (amostra 5).

É possível visualizar claramente na amostra 5, o término da gelificação primária e início da gelificação secundária, a qual ocorre aproximadamente aos 10 minutos, uma vez que a gelificação secundária se mantém bastante estável ao longo do tempo. A maior concentração de iões de Ca^{2+} capazes de iniciar a gelificação contribui para esta clara transição. Quando estes iões se encontram todos ligados aos grupos carboxilo atinge-se uma evolução do comportamento reológico independente do tempo, característico da gelificação secundária [77]. Relativamente às amostra 2, 3 e 4, apesar da gelificação secundária não ocorrer de modo acentuado como a anterior, consegue-se analisar uma mudança entre fases de gelificação por volta dos 46, 30 e 20 minutos, respetivamente. Estes valores foram determinados através do traçado de linhas tangentes à zona estável de cada amostra. Com a amostra 1 não é possível apontar claramente esta mudança de fase de gelificação, uma vez que devido à reduzida concentração de Ca^{2+} , a gelificação é bastante lenta, sendo necessário maiores intervalos de tempo. O erro associado ao instante de início de gelificação foi reduzido ao máximo, através da colocação dos hidrogéis no reómetro no mesmo instante de tempo, para todas as amostras. Deste modo, conclui-se que o valor da viscosidade complexa inicial depende diretamente da concentração de iões de Ca^{2+} presentes na solução, o qual é tanto maior, quanto maior for o rácio $\text{Ca}^{2+}:\text{COO}^-$ e, consequentemente, menor será o tempo necessário para atingir uma rede tridimensional estável.

Na análise química observou-se que o aumento da concentração de Ca^{2+} contribui para a diminuição do tempo de injeção e de gelificação. As análises reológicas permitiram de modo mais preciso retirar as mesmas

conclusões e assim validar os resultados obtidos por métodos químicos. As misturas que apresentam maior concentração de Ca^{2+} são as mais viscosas, como consequência da maior densidade de entrelaçamentos entre o Ca^{2+} e o COO^- . O aumento da concentração do teor de Ca^{2+} no gel contribui para um maior grau de reticulação [78]. Soluções com baixa concentração de Ca^{2+} levam à formação de uma fraca rede de reticulação, uma vez que a baixa concentração deste ião não é suficiente para a criação de uma rede de reticulação complexa. Com o aumento da concentração de Ca^{2+} , obtém-se pontos de junções mais estáveis que são formadas por interações de Coulomb.

A Figura 4.6 representa a cinética de gelificação dos hidrogéis usando apenas o CaCO_3 como fonte de cálcio. Escolheu-se este composto para analisar a evolução das propriedades viscoelásticas do hidrogel devido à sua lenta liberação de iões Ca^{2+} .

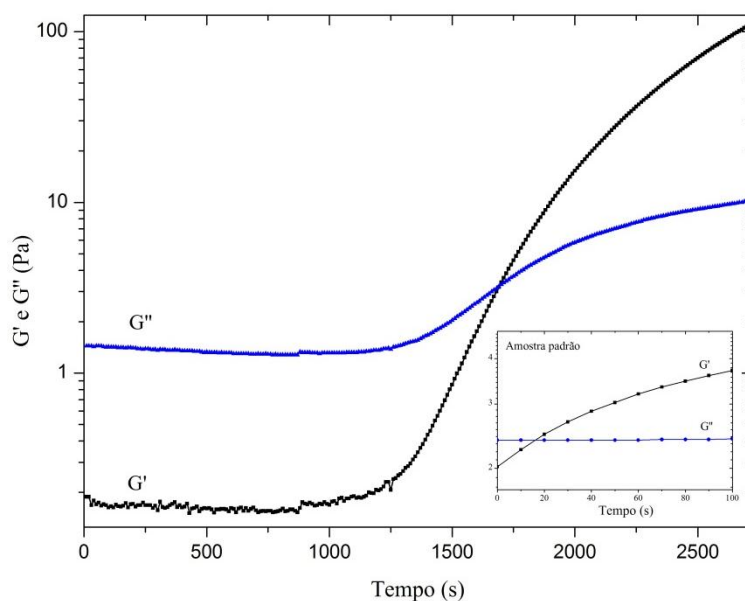


Figura 4.6 – Estudo das propriedades viscoelásticas ao longo do tempo numa amostra que usa o CaCO_3 como única fonte de Ca^{2+} . À direita está representado a evolução e na amostra padrão (amostra 1).

Ambos os módulos (G' e G'') sofrem um crescimento ao longo do tempo. Imediatamente após a colocação do gel no reómetro, a solução ainda se encontrava em uma fase líquida. Nestas condições, as propriedades viscosas dominam e G'' é maior do que G' , exibindo uma viscosidade crescente. Ao longo do tempo, o número de pontos de junções aumentam e G' torna-se superior a G'' . O ponto de interseção entre G' e G'' é normalmente descrito como o ponto de transição de uma fase líquida para uma fase semissólida, designado de ponto de solidificação [78]. Neste ponto, é detetada pela primeira vez uma rede tridimensional, a qual se expande posteriormente por toda a amostra. Com o aumento do tempo de gelificação, mais e mais pontos de junção são formados e a resposta elástica neste regime é maior do que a dissipativa, devido à formação de uma rede tridimensional [76]. No entanto, este ponto de cruzamento entre G' e G'' observado com os hidrogéis obtidos

somente com o CaCO_3 é difícil de se visualizar nas amostras que possuem quer CaCO_3 , quer $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ como agentes de reticulação. Na *Figura 4.6* (Amostra padrão) está representado a evolução das componentes elástica e viscosa para a amostra 1, em que é visível o deslocamento deste valor para, aproximadamente, 20 segundos. A rápida liberação de íons de Ca^{2+} do $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ faz com que o hidrogel apresente uma maior viscosidade inicial, levando a que este valor se encontre na ordem de alguns segundos [78].

A análise reológica de hidrogéis produzidos com diferentes compostos, nas mesmas proporções permitiu concluir que o $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ produz um gel extremamente mais rápido do que o CaCO_3 . O $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ permite uma rápida transição líquido-gel e uma rápida gelificação primária. Em contrapartida, para a mesma concentração de CaCO_3 não ocorre gelificação primária, sendo necessário um período de tempo relativamente mais longo para se obter o mesmo grau de reticulação do $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. A comparação destes compostos mostra que para a aquisição de um hidrogel num mesmo tempo de gelificação, é necessário adicionar uma concentração de CaCO_3 4,6 vezes superior à concentração de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ que seria necessária. Apesar da dissolução de GDL no sistema com CaCO_3 , para aquisição de um pH ~ 7 , a liberação de Ca^{2+} do composto de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ continua a ser significativamente mais rápida e, conseqüentemente, mais rápido ocorre a gelificação do hidrogel [77]. As propriedades viscoelásticas exibidas pelos hidrogéis obtidos com cada um dos compostos foram estudadas a partir de amostras que apresentavam o mesmo valor para a viscosidade complexa, num mesmo tempo de gelificação, e representou-se estas propriedades na *Figura 4.7*. Observa-se que o hidrogel produzido somente com CaCO_3 apresenta melhores propriedades viscoelásticas quando comparado com o hidrogel produzido apenas com $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Usando o CaCO_3 como fonte de cálcio, ocorre a formação de um hidrogel mais coeso e homogêneo, com um comportamento viscoelástico ambivalente. Tal como se verificou pelas análises químicas, o tipo de agente de reticulação escolhido para iniciação da gelificação tem uma enorme influência quer nas propriedades viscoelásticas do hidrogel, quer no tempo de gelificação.

Para a aplicação pretendida, é importante que haja um equilíbrio entre as propriedades viscoelásticas, o tempo de injeção e o tempo de gelificação. Pretende-se que o hidrogel gelifique rapidamente para evitar escoamento mas, em contrapartida, tem que apresentar um comportamento mecânico adequado para ser facilmente injetável, bem como facilmente removível. Por todas estas razões, conclui-se que o ideal será combinar as excelentes propriedades viscoelásticas que o CaCO_3 oferece, com a rápida gelificação dos sistemas com o $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Combinando o CaCO_3 com o $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ é possível controlar quer a taxa de gelificação, quer a homogeneidade dos géis de alginato, obtendo-se um gel com maior resistência mecânica, com melhores propriedades reológicas e com o tempo de gelificação ideal para a aplicação pretendida.

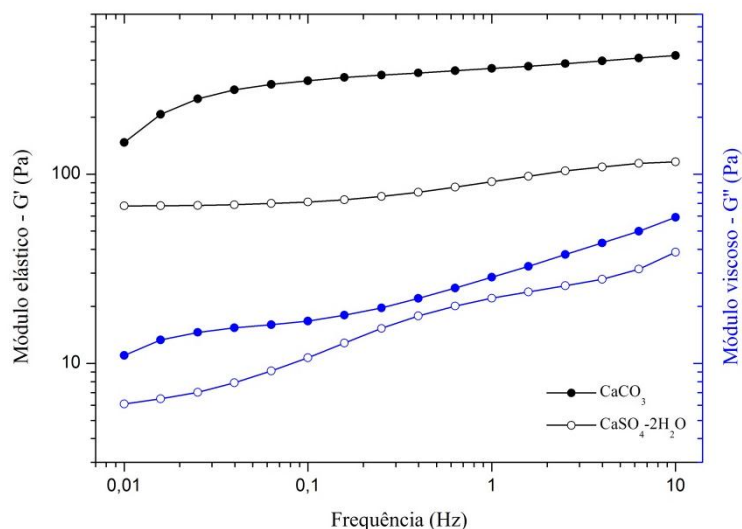


Figura 4.7 – Representação das propriedades viscoelásticas dos diferentes compostos.

A Figura 4.8 mostra a evolução do comportamento elástico e viscoso com a frequência dos diferentes hidrogéis, na presença de ambos os agentes de reticulação e ao final de 60 minutos de gelificação. Observa-se que o hidrogel apresenta um comportamento elástico (G' é independente da frequência). A componente G' é sempre maior do que a componente G'' , sendo o comportamento elástico o efeito dominante [78]. A análise dos gráficos mostra que, para diferentes concentrações de cálcio, a evolução das propriedades do hidrogel ocorre de modo contínuo, representado pelos mesmos tipos de ligações. É possível visualizar-se isto a partir da forma constante de G' . A partir de 0,1 Hz todas as amostras, com exceção da amostra 1, apresentam uma evolução constante de G'' . Este comportamento viscoelástico independente da frequência mostra que a microestrutura formada está consolidada ao final dos 60 minutos (à exceção da amostra 1).

Os valores obtidos para o tempo de gelificação por reologia foram bastante próximos das estimativas feitas a partir dos testes químicos. A análise das propriedades reológicas de diferentes hidrogéis valida os resultados obtidos a partir das análises químicas. O aumento da concentração de cálcio permite que o gel reticule mais rapidamente, devido à maior facilidade de encontro entre o Ca^{2+} e o COO^- . Quer a componente elástica, quer a componente viscosa, são maiores para amostras com maior concentração de Ca^{2+} , e consequente, para amostras com maior proporção de ligações $\text{Ca}^{2+}:\text{COO}^-$. A diferença da magnitude do módulo de elasticidade dos diferentes hidrogéis é consequência do diferente número de ligações atômicas existentes entre o polímero e o agente de reticulação: quanto maior G' maior é a consistência do material. Contudo, verificou-se que para altas razões de $\text{Ca}^{2+}:\text{COO}^-$ ocorre a formação de um gel rapidamente, não havendo tempo suficiente para a homogênea distribuição do Ca^{2+} . Com a amostra de 5 observou-se uma diminuição da magnitude da componente elástica o que traduz uma diminuição do número de pontos de ligação no polímero. Tal como se mostrou anteriormente, a elevada concentração de Ca^{2+} antecipa o ponto de transição entre a fase primária e a fase secundária, levando a

que a rede tridimensional se forme muito rapidamente, não havendo tempo para uma homogeneização destes íões ao longo do polímero. Deste modo, conclui-se que uma razão de $\frac{[Ca^{2+}]}{[COO^-]}$ entre 0,253-0,316 é aquela que oferece um maior equilíbrio entre as propriedades do hidrogel, o tempo de gelificação e o tempo de injeção.

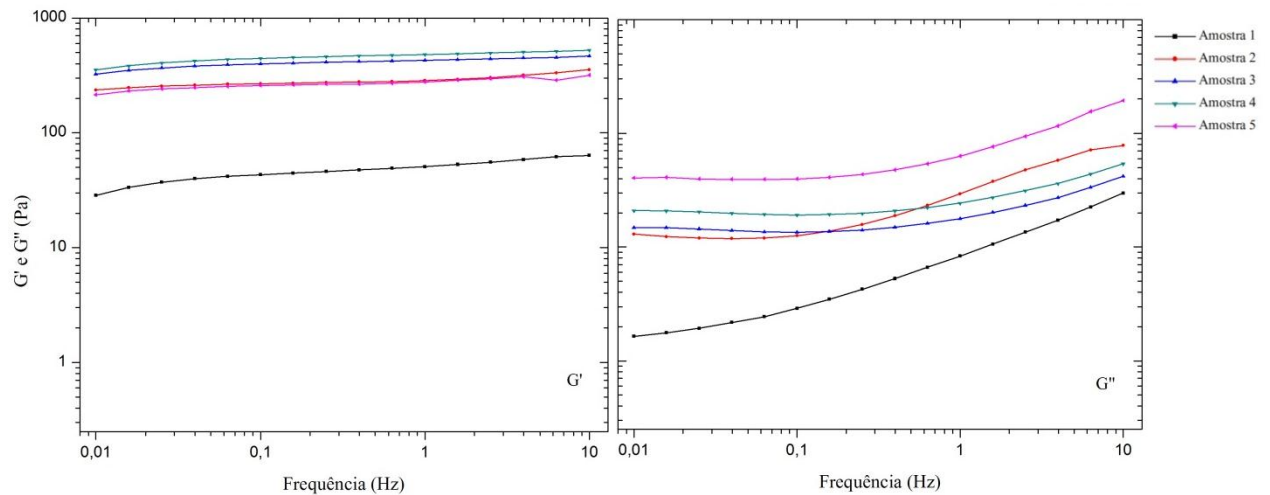
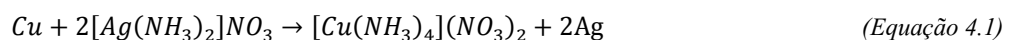


Figura 4.8 – Evolução das propriedades viscoelásticas das amostras com a frequência, em amostras com diferentes razões $Ca^{2+}:COO^-$ de: 0,158 (amostra 1), 0,189 (amostra 2), 0,253 (amostra 3), 0,316 (amostra 4) e 0,379 (amostra 5).

4.2. Produção do revestimento sobre o substrato: o Cobre

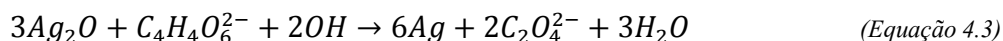
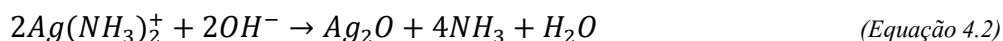
O interesse contínuo de combinar diferentes propriedades estruturais num só material tem contribuído para um avanço vital na biomedicina. O revestimento do cobre com um filme de prata surgiu como solução para evitar o custo elevado da prata e a elevada oxidação do cobre.

No processo de redução da prata por métodos químicos sobre o cobre, é muito importante realizar-se uma correta limpeza da camada de óxidos e hidróxidos da superfície do material, bem como controlar a taxa de adição de prata à solução de tartarato de sódio e potássio. Tal como foi dito anteriormente, a deposição de Ag é um processo autocatalítico, em que as reações de oxidação-redução ocorrem preferencialmente em torno de núcleos de prata. No revestimento do cobre com prata, a reação da superfície ativa do cobre com os íões Ag^+ ,



permite a iniciação da reação. Por outras palavras, os núcleos ativos de Ag são produzidos a partir da reação do cobre com o complexo amina de prata. Estes núcleos de Ag formados na superfície ativa do cobre atuam como

locais ativos para a deposição de novas espécies de prata, que são geradas através da *Equação 4.1* seguindo-se um processo de formação de um filme de prata.



A quantidade de núcleos ativos na superfície do cobre depende de três fatores: tempo de limpeza, velocidade de adição da solução de prata e concentração da solução de $C_4H_4O_6KNa$. Se a superfície do cobre se encontrar completamente limpa e ativa, a reação ocorrerá rapidamente, sendo isto importante para que ocorra uma distribuição uniforme do revestimento de prata [47].

4.2.1. Morfologia do revestimento

Efeito do tempo de ativação

O tempo de ativação corresponde ao tempo necessário para remoção das camadas de óxido e hidróxido da superfície do cobre. Para se analisar a influência do tempo de ativação sobre o revestimento, realizaram-se testes em que a razão R da solução de ativação ($NH_4OH/(NH_4)_2SO_4$) foi mantida constante, e se fez variar o tempo de ativação. O aumento da razão molar de $NH_4OH/(NH_4)_2SO_4$ resulta num significativo aumento de pH, o que faz com que a taxa de dissolução da camada de óxidos seja promovida. A razão molar de $NH_4OH/(NH_4)_2SO_4$ escolhida foi de $R=4$ [43].

A *Figura 4.9* mostra a topografia do revestimento para o tempo de ativação de 2, 8 e 10 minutos. As imagens de SEM do revestimento obtido com um tempo de ativação de 2 minutos exibem vários poros na superfície e o maior tamanho de grão de entre todas as imagens, apresentando assim maior área de superfície. Isto deve-se ao facto de não possuir uma estrutura compacta, acabando por se formar aglomerados de Ag à superfície. Nos revestimentos obtidos com um tempo de ativação de 8 minutos observou-se que quer o tamanho de grão, quer a porosidade diminui. Quando o tempo de ativação é demasiado curto, as camadas de óxidos e hidróxidos não têm tempo suficiente para serem removidas completamente. Consequentemente, os núcleos de ativação da Ag não se irão formar de modo homogéneo em toda a superfície, levando ao aparecimento de porosidade. Para além disso, a incompleta dissolução da camada de óxidos e hidróxidos leva a que a quantidade de agente amoniacal promova o poder de redução do tartarato, promovendo a *Equação 4.3*. São geradas várias espécies de Ag, num curto intervalo de tempo, o que faz com que os poucos núcleos ativos de Ag não tenham o poder suficiente para atrair todas as espécies metálicas e depositá-los sobre si de modo homogéneo. Estas espécies de prata em solução acabam por

promover a nucleação espontânea e, conseqüentemente, o crescimento de aglomerados de Ag com o tempo sobre a superfície.

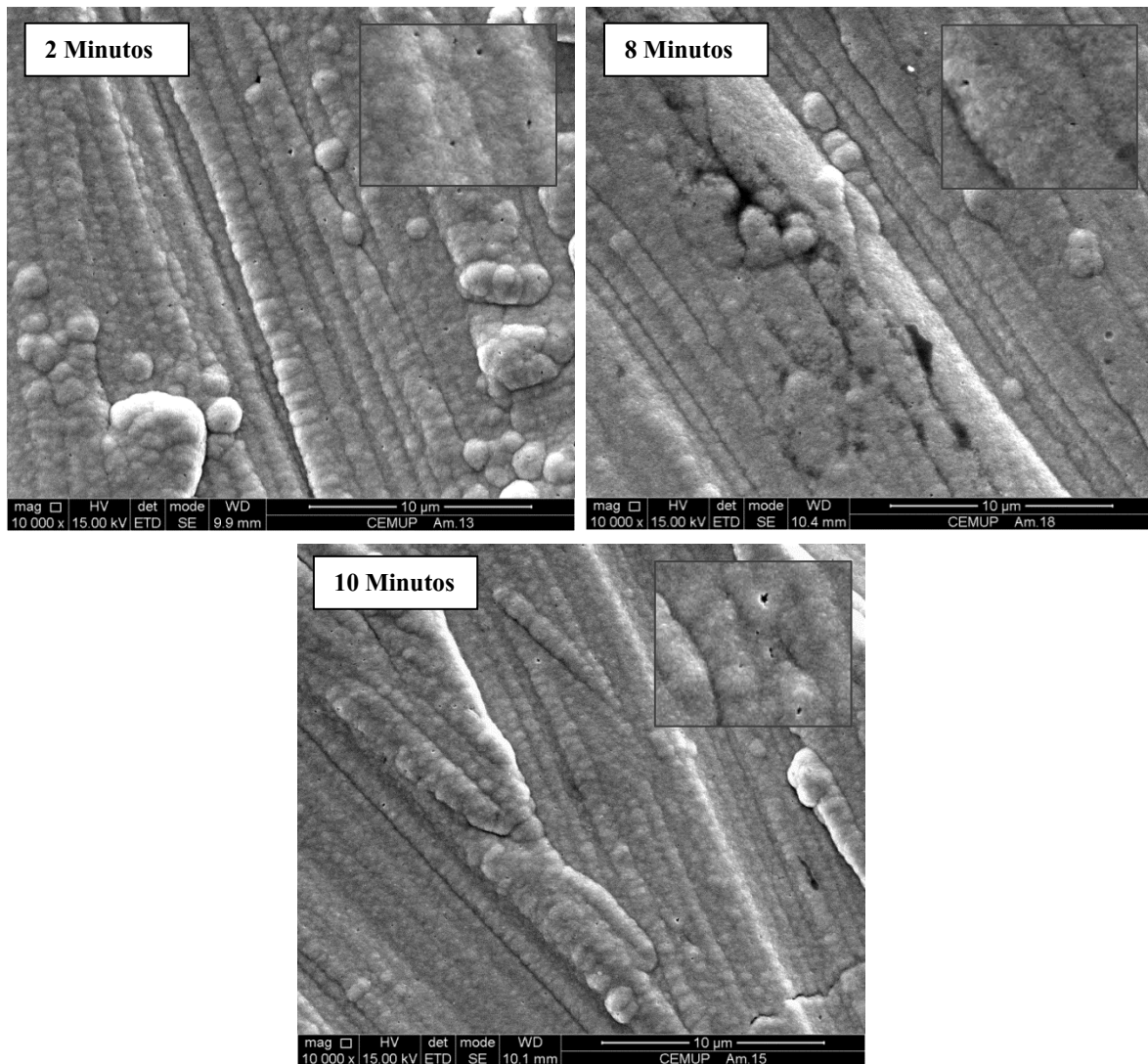


Figura 4.9 – Efeito do tempo de ativação nas propriedades do revestimento.

Quanto maior o tempo de ativação, maior o grau de dissolução das camadas de óxidos e, por conseguinte, mais homogênea é o revestimento de prata. Contudo, esta tendência não se verifica com o aumento contínuo do tempo de ativação. O revestimento produzido com 10 minutos de ativação mostra que há um aumento de porosidade considerável, mas uma diminuição do tamanho de grão. Isto ocorre porque longos períodos de ativação permite o consumo de todo o agente amoniacal da solução, permitindo a inibição da Equação 4.1. Deste modo, o tempo de limpeza de 8 minutos permite a aquisição de um revestimento com menor porosidade.

Efeito da velocidade de adição da solução de prata

A velocidade de adição da solução de prata à solução de $C_4H_4O_6KNa$ foi estudada a 0,1, 0,2 e 0,3 ml/min. A Figura 4.10 mostra as imagens SEM da superfície dos revestimentos obtidos a diferentes taxas.

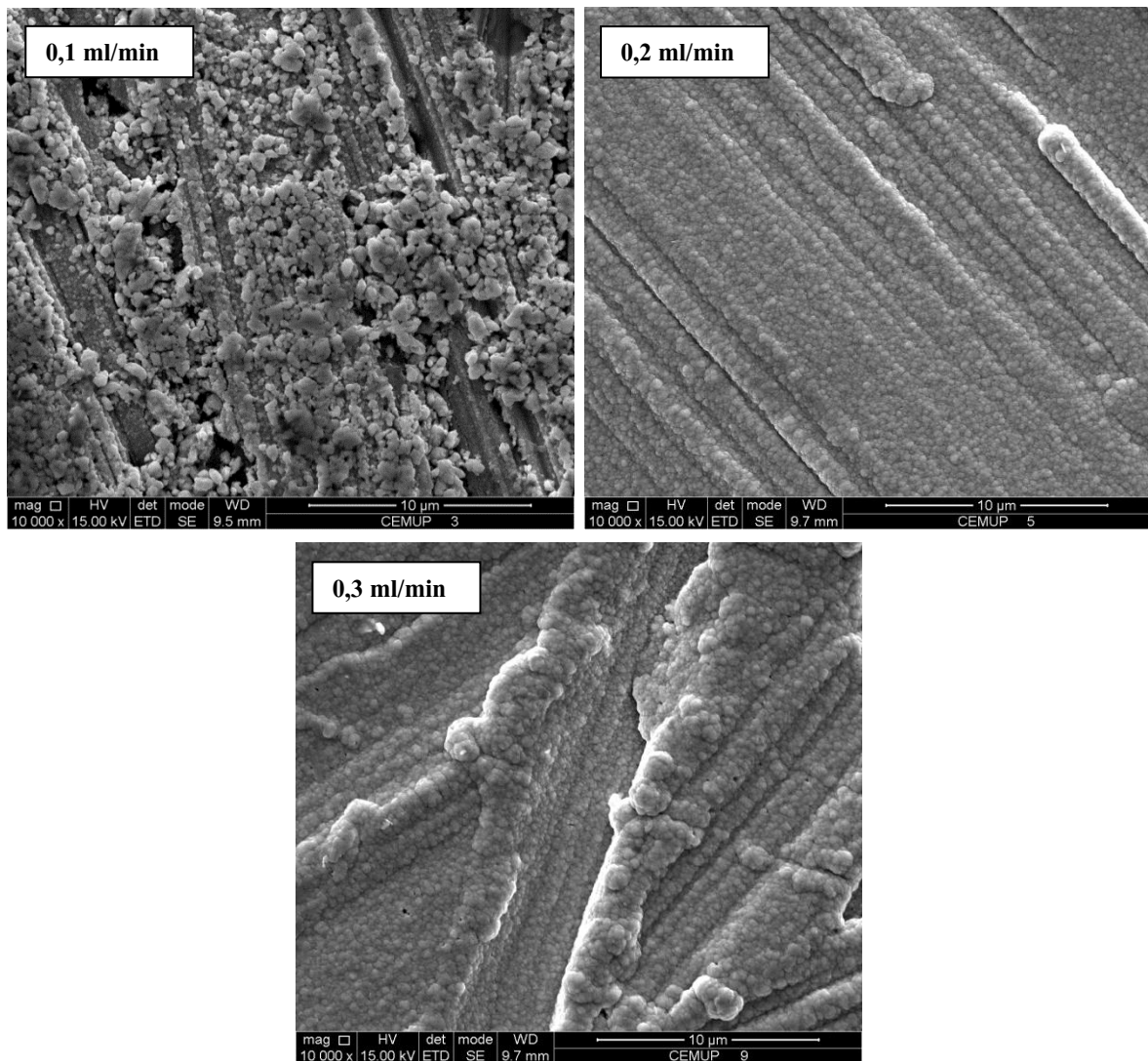


Figura 4.10 – Efeito da velocidade de adição da solução de Ag nas propriedades do revestimento.

A partir da imagem SEM obtida para uma velocidade de adição de 0,1 ml/min observa-se uma superfície porosa e irregular, apresentando porções da superfície de cobre em que não há qualquer revestimento (observado a partir do EDS). Para baixas velocidades de adição, o cobre fica sujeito a um maior tempo de exposição na solução, conseqüentemente, a difusão de oxigênio atmosférico para a solução é também maior. Isto promove a reação de hidrólise sobre a superfície de cobre, e conseqüentemente a anulação da formação dos núcleos de prata sobre este. Por outro lado, com uma velocidade de adição de 0,2ml/min obtém-se um revestimento uniforme, sem

aglomerados de prata, resultando em uma superfície bastante mais lisa, devido à maior espessura de revestimento. Quando a velocidade de adição aumenta para 0,3ml/min, observa-se um aumento da irregularidade do revestimento. O aumento da velocidade de adição num curto intervalo de tempo, leva a que as espécies de Ag não tenham tempo suficiente para migrar completamente para os núcleos à superfície de cobre. Assim, as espécies de Ag que permanecem em solução promovem a nucleação espontânea e consequentemente, o crescimento com o tempo, formando aglomerados de Ag à superfície do revestimento.

Efeito da concentração de tartarato de sódio e potássio

A Figura 4.11 mostra a influência da concentração nas propriedades de revestimento.

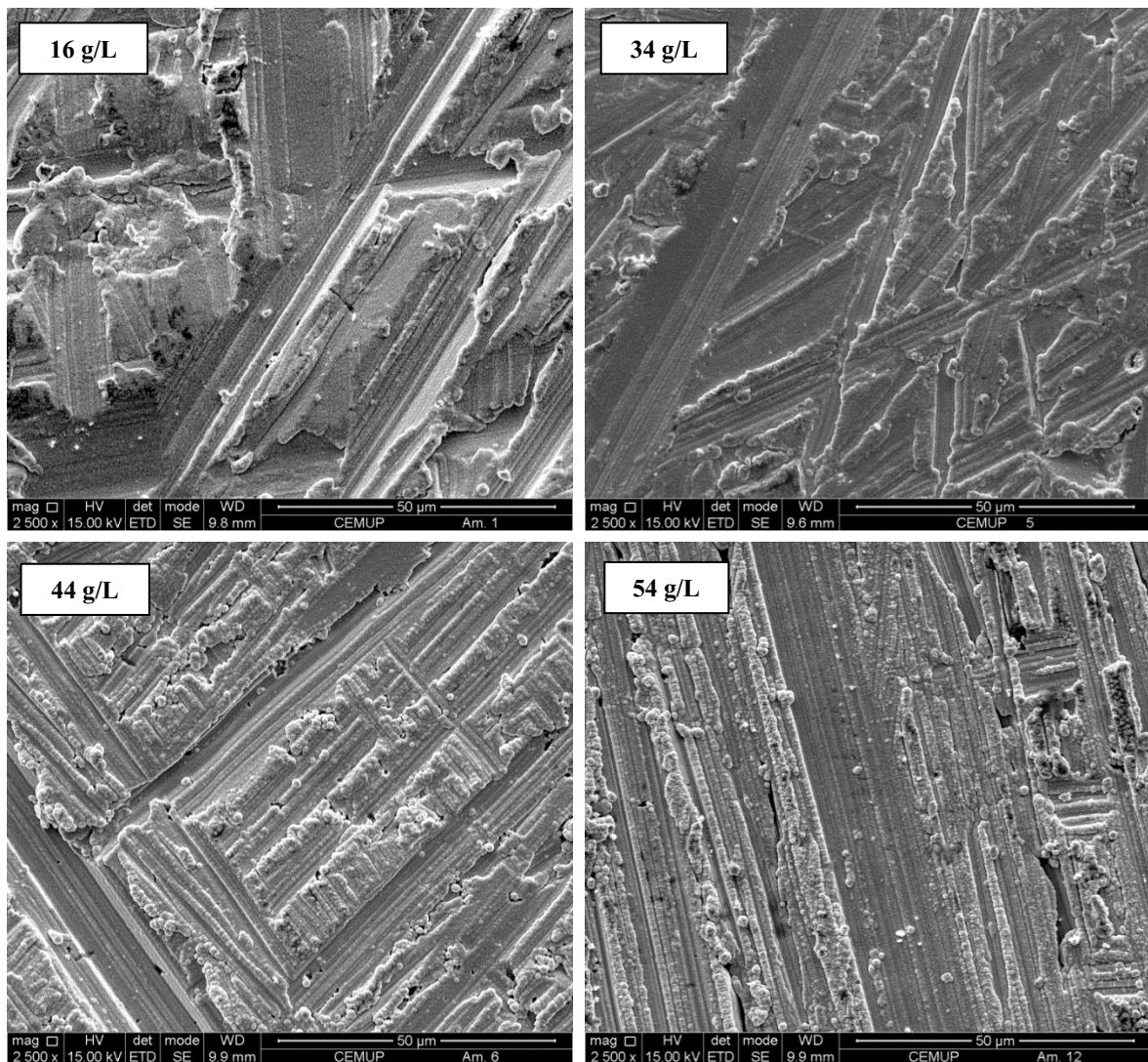


Figura 4.11 – Efeito da concentração do $C_4H_4O_6KNa$ de nas propriedades do revestimento.

Através da análise da figura, observa-se que o revestimento obtido numa solução de 16g/l de $C_4H_4O_6KNa$ apresenta uma superfície bastante homogênea, sem poros e coesa. No entanto, a espessura do revestimento é demasiado fina para a aplicação pretendida, detetando-se através de EDS a presença de cobre à superfície. O aumento da concentração deste composto para 34 g/L permite obter uma camada mais espessa e com baixa porosidade. Para concentrações de 44 e 54 g/L, observa-se o aparecimento de poros, bem como o aumento do tamanho de grão. O $C_4H_4O_6KNa$ utilizado neste estudo funciona tanto como um suave agente redutor, como um agente complexo para os iões Cu^{2+} , o qual suprime a precipitação de hidróxido de cobre [47]. Deste modo, uma menor concentração deste composto produz revestimentos com menor porosidade, devido à rápida deposição da Ag. Para maiores concentrações de $C_4H_4O_6KNa$ a deposição de Ag é mais lenta, o que faz com que estes iões tenham a possibilidade de escolher onde se querem depositar, levando ao aparecimento de porosidade.

Esta análise permitiu concluir que para a aquisição de um revestimento homogêneo sobre o cobre por métodos químicos, a deposição deve ser realizada com um tempo de ativação de 8 minutos, uma velocidade de adição de 0,2 ml/min e uma concentração de $C_4H_4O_6KNa$ de 34 g/L. No entanto, com este método apenas se consegue uma espessura de $\sim 0,9 \mu m$, não sendo o suficiente para evitar a oxidação do cobre. O espessamento desta camada por métodos eletroquímicos permitiu reduzir a probabilidade de oxidação.

Deposição eletroquímica

Por métodos eletroquímicos, desde que não sejam descarregados catiões de hidrogénio no cátodo ao mesmo tempo que a prata, a eficiência da deposição da prata apresenta geralmente um rendimento de 100%, sendo a espessura do revestimento proporcional ao tempo de deposição. No controlo da operação há três variáveis importantes: composição química da solução, a temperatura da solução e a densidade de corrente catódica. Estas variáveis exercem influência direta sobre o carácter do depósito e estão relacionadas entre si [79]. A concentração da solução foi estudada por Oliveira G.M. et al. [80]. Este estudo mostra que na ausência de EDTA formam-se pequenas estruturas cristalinas globulares e aglomerados, tendo um efeito prejudicial para o revestimento. Em contrapartida, os revestimentos obtidos na presença de EDTA mostram o melhoramento do filme de Ag, promovendo uma suavização e brilho do revestimento. Contudo, este agente modifica o potencial de deposição apenas quanto presente no banho de deposição como principal agente complexante (compostos que fornecem os ligantes para formação de complexos), 0,2 M EDTA, sendo esta a concentração usada para a deposição de prata.

Relativamente ao potencial usado, observou-se que potenciais baixos ($-0,3 V$) conduziam a uma deposição da prata com uma eficiência de 90%, no entanto, após a secagem, grande parte desta camada era perdida devido à baixa aderência que o revestimento apresentava. O aumento deste potencial para 0V mostrou que a deposição da Ag era feita com uma eficiência de 100%, encontrando-se bem aderente. A fotografia deste revestimento está representada na *Figura 4.12*, em que é possível observa-se que esta superfície é bastante mais regular.

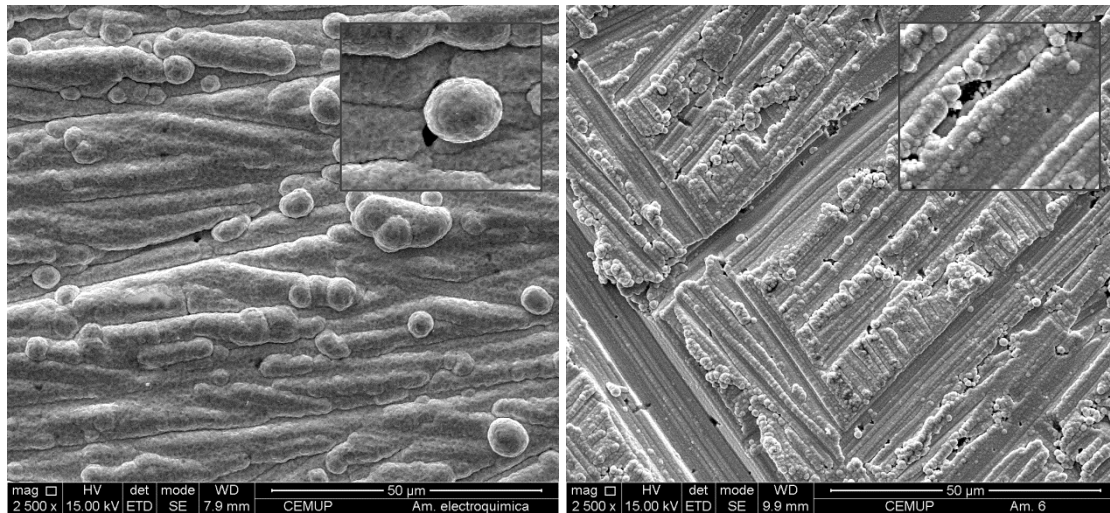


Figura 4.12 – Fotografias SEM de revestimento realizado com deposição química e eletroquímica (esq.) e revestimento realizado somente com deposição química (dir.).

Comparando o revestimento obtido por métodos químicos e o revestimento obtido por métodos químicos e eletroquímicos observa-se que, neste último, não se consegue visualizar o polimento a que o cobre foi sujeito durante a limpeza, revelando assim maior espessura desta camada. Observa-se também que a quantidade de poros presentes à superfície diminui notavelmente, existindo esporadicamente ao logo da superfície. No entanto, a presença destes pequenos poros pode ser prejudicial à estabilidade do eletrodo devido à alta probabilidade de oxidação do cobre.

4.2.2. Estabilidade de impedância eletroquímica

A principal função dos eletrodos é a medição do potencial elétrico de sinais biológicos. Deste modo, é importante que este biossensor apresente uma baixa impedância, de modo a evitar resistência à passagem do sinal original no eletrodo.

Para uma correta medição da impedância e para a aquisição de uma fina e uniforme camada de AgCl é importante que a superfície da amostra se encontrar completamente limpa. Assim, é necessário a realização de uma limpeza eletrolítica do revestimento, tornando a superfície negativa em relação a um eletrodo de referência de modo a libertar-se os óxidos de prata que existam à superfície. A limpeza foi realizada através da passagem de uma corrente de $-0,64 \text{ mA/cm}^2$ durante 60 segundos. A diferença de impedância na amostra antes e após a limpeza eletrolítica é insignificante, pelo que foi desprezada.

A Figura 4.13 representa o Diagrama de Bode obtido para uma amostra de cobre revestida com Ag, em NaCl com $8,28 \text{ cm}^2$ de área. Observa-se que a curva abrupta da impedância para a amostra sem AgCl exibem uma componente capacitiva e uma componente resistiva, tal como se pode verificar pela variação da impedância com a variação da frequência (Figura 4.13, curva A). Com a deposição de uma fina camada de AgCl observa-se uma grande redução da impedância (Figura 4.13, Curva B). À medida que se aumenta a espessura da camada de AgCl, ocorre uma contínua redução da impedância sobretudo para baixas frequências (Figura 4.13, Curva C-D). Os valores obtidos para a impedância sugerem que a interface eletrodo-gel apresente um comportamento independente da frequência, tal como se pode verificar pelo facto da curva impedância-frequência se tornar quase paralela ao eixo horizontal. Isto ocorre porque a componente capacitiva diminui, tornando assim a impedância apenas dependente da componente resistiva, e a qual é independente da frequência. O contínuo aumento da deposição de AgCl conduz ao aumento da impedância tanto para as altas, como para baixas frequências. A camada de AgCl funciona como um isolante, deste modo quanto maior for esta camada, maior é a resistência ao fluxo de corrente e consequentemente, menor será a transmissão do sinal (Figura 4.13, Curva E-J) [71].

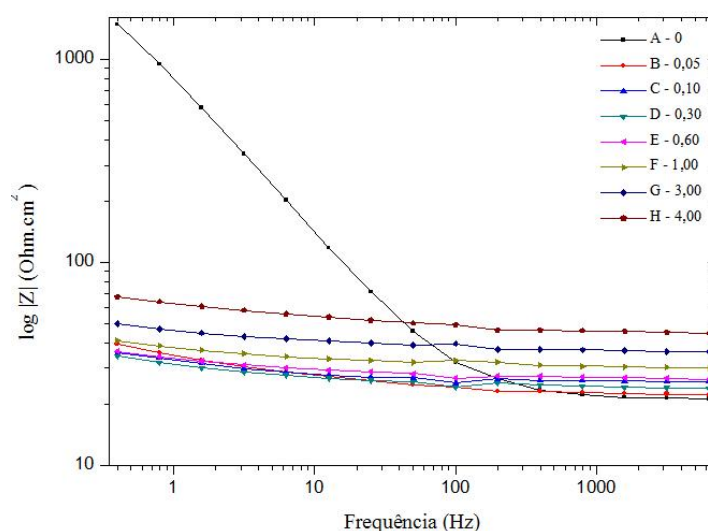
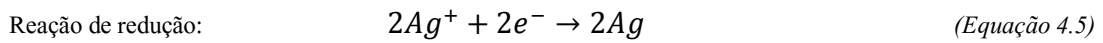
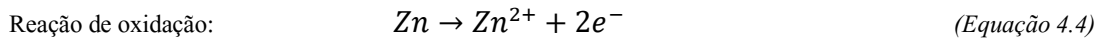


Figura 4.13 – Curva impedância-frequência para amostras camadas de AgCl com diferentes espessuras, usando uma solução de NaCl (expresso em C/cm^2).

De acordo com a Lei de Faraday para a eletrólise, a comparação da quantidade de Ag convertida em AgCl é expressa em *Coulomb*. A quantidade ótima para aquisição da mínima impedância para as frequências em estudo é de $0,05$ a $0,30 \text{ C/cm}^2$, obtendo-se uma impedância de 26Ω . A deposição de AgCl acima de $0,30 \text{ C/cm}^2$ aumenta a impedância para todas as frequências.

Após se encontrar a quantidade ótima de Ag/AgCl para aquisição da mínima impedância, as amostras foram deixadas numa solução de NaCl para a estabilização do potencial. Observou-se que a solução apresentava uma

nuvem azulada dispersa por toda a solução. Através de uma análise SEM-EDS verificou-se que existia uma grande concentração de zinco à superfície do revestimento. As amostras de cobre apresentavam zinco na sua constituição deste modo, a presença de poros no revestimento permitiu que se desse a oxidação do cobre, levando ao aparecimento de zinco como resultado desta processo de oxidação-redução:



Isto é prejudicial ao desempenho do eletrodo, pois para além de dificultar a transmissão do sinal, levará ao aparecimento de eventuais alergias sobre a pele do recém-nascido. A *Figura 4.14* mostra a percentagem dos componentes presentes sobre o revestimento da amostra após ser retirada da solução de estabilização.

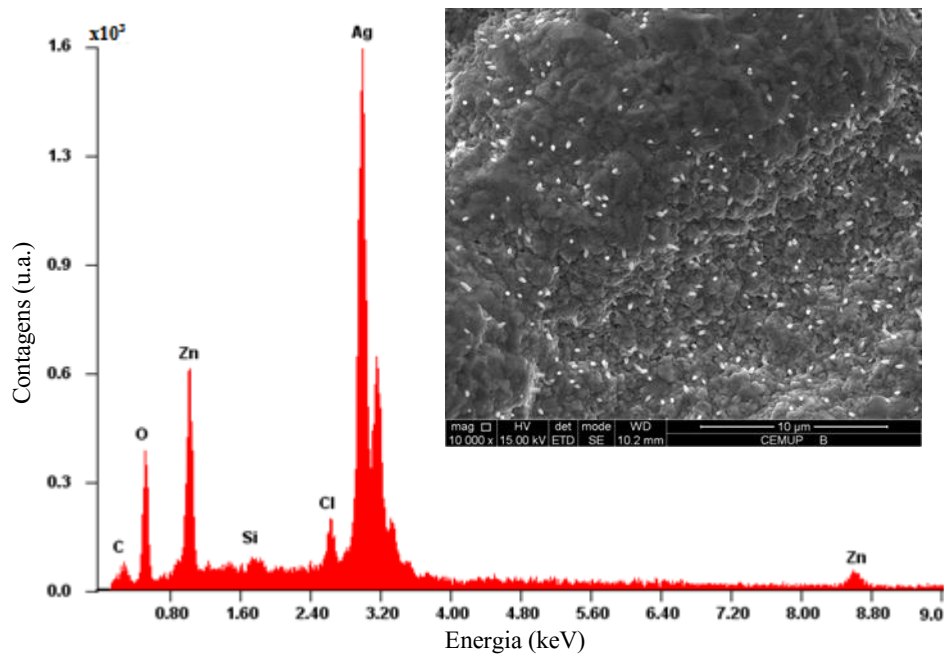


Figura 4.14 – Elementos presentes à superfície do revestimento obtidos a partir de uma análise EDS e respetiva imagem SEM, em que é visível o elemento de Zn disperso por toda a amostra.

Estes resultados mostraram que o cobre não é um bom material para a produção do substrato do eletrodo, pois não permitirá a aquisição do sinal bioelétrico de modo confiável. A poliamida surgiu como solução ao problema de oxidação do cobre devido não só às suas excelentes propriedades mecânicas, como também à elevada facilidade de manuseamento do polímero.

4.3. Produção do revestimento sobre o substrato: a poliamida

Na produção do revestimento de prata sobre a poliamida ocorre um conjunto de reações de oxidação-redução. A *Figura 4.15* exemplifica o processo que ocorre durante a formação deste revestimento ao longo das principais etapas do processo. Após a realização de uma correta limpeza à amostra (*Figura 4.15*, etapa A), a sua colocação numa solução de AgNO_3 permitiu a aquisição de um fino revestimento de prata. A poliamida é um polímero com capacidade de absorção de água aproximadamente de 4%. Por esta razão, durante o inchamento ocorreu entrada do AgNO_3 no polímero juntamente com o solvente e adsorção da prata nos sítios onde existe a ligação amida, devido à grande afinidade da prata com a amida (*Figura 4.15*, etapa B). Posteriormente, a suspensão da amostra numa solução com um forte agente redutor, o NaBH_4 , permitiu a redução da prata presente sobre a amostra. O fornecimento de eletrões levou à redução da prata, depositando-se esta no polímero e já não podendo por isso ser arrastada por solventes para fora (*Figura 4.15*, etapa C). A colocação das amostras na solução final a $40\text{ }^\circ\text{C}$ permitiu o crescimento desta camada heterogénea, formando-se um filme coeso, resistente e uniforme. A glucose atuou como redutor, permitindo a redução da Ag sobre a fina camada heterogêneo, contribuindo deste modo para o crescimento do filme. O ácido trisódico permitiu que este crescimento ocorresse de modo gradual e contínuo. Com a adição deste inibidor, a reação ocorreu de forma lenta e uniforme sobre toda a amostra, contribuindo para a formação gradual de um filme homogêneo (*Figura 4.15*, etapa D). O tratamento térmico da amostra permitiu a compactação e a eliminação de qualquer poro existente à superfície do filme.

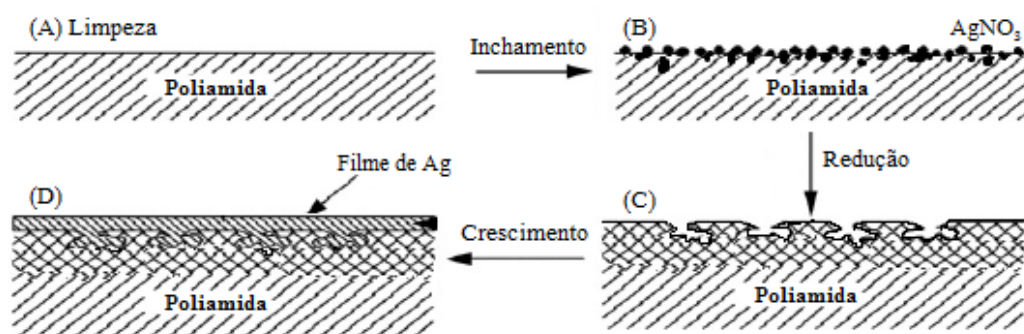


Figura 4.15 – Processo de deposição de prata sobre a poliamida [adaptado de [67]].

4.3.1. Morfologia do revestimento

Através da análise SEM-EDS do revestimento produzido sobre a poliamida constatou-se que o filme de prata produzido era uniforme e regular. Uma ampliação da superfície de 10 000 vezes permitiu analisar a ausência de

qualquer poro à superfície da amostra e a presença de uma grande quantidade de prata sobre esta. Esta espessa camada de prata permitiu uma posterior deposição de uma camada de AgCl, obtendo-se um revestimento de aproximadamente 82% de Ag e 18% de AgCl. Esta camada de AgCl é importante pois como os nossos fluidos corporais contêm cloro, a transmissão do sinal ocorre de modo espontâneo entre o escalpe e o eletrodo. Para além disso, a superfície de AgCl permite reduzir a impedância de contacto pele-gel, garantindo que o eletrodo não causa qualquer resistência à passagem do sinal elétrico.

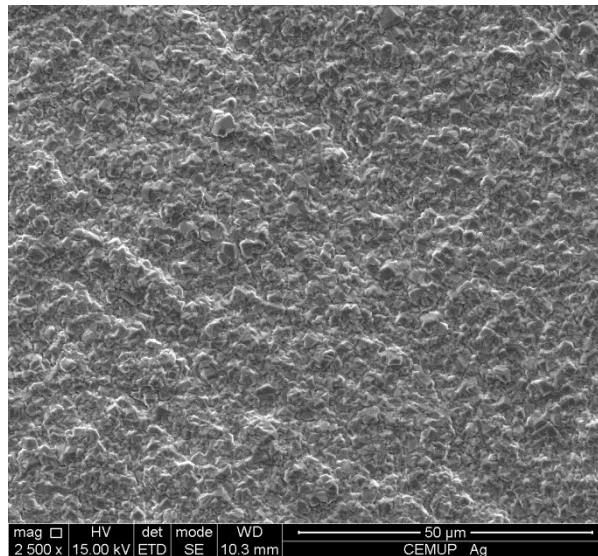


Figura 4.16 – Fotografia do revestimento de prata sobre poliamida.

4.3.2. Estabilidade de impedância eletroquímica

Tal como se realizou com o cobre, a análise da impedância das amostras de poliamida é fundamental para garantir a estabilidade eletroquímica do eletrodo. A Figura 4.17 mostra a evolução da impedância da amostra à medida que se deposita AgCl, para aquisição de um revestimento de Ag/AgCl. As curvas de impedância-frequência foram obtidas com amostras de poliamida de área de $6,93 \text{ cm}^2$, mergulhadas em uma solução de NaCl. Iniciou-se a medição da estabilidade da impedância eletroquímica realizando-se uma limpeza eletrolítica através da passagem de uma corrente de -4 mA durante 60 segundos para remoção de produtos indesejáveis presentes à superfície da amostra. A impedância da amostra revestida somente pela Ag (Figura 4.16, curva A) apresenta carácter resistivo e capacitivo, tal como se obteve com a amostra de cobre. Com a deposição de AgCl sobre o revestimento, verificou-se uma acentuada diminuição da impedância. O valor ótimo de impedância para este material encontra-se para deposições entre $0,05$ a $0,15 \text{ C/cm}^2$, obtendo-se valores de impedância de 40Ω e um

potencial completamente estável. A deposição de AgCl acima deste valor aumenta não só a impedância para baixas como para altas frequências, piorando o desempenho do eletrodo. A poliamida exibe uma impedância muito próxima aos valores de impedância obtidos com o cobre, no entanto a ausência de poros no revestimento produzido sobre este material garante a estabilidade do eletrodo a médio/longo prazo.

Para a aquisição de uma superfície de Ag/AgCl usaram-se duas soluções diferentes: uma solução de NaCl e uma solução de HCl. A *Figura 4.17* mostra o comportamento da curva impedância-frequência para os diferentes banhos de emersão. Na análise do gráfico observa-se que os valores de impedâncias são inferiores quando se usa uma solução de HCl, apresentando impedâncias próximas a 12Ω . Tal como se referiu anteriormente, a impedância é a carga resistiva total do sensor, ou seja, quantifica a oposição total que um determinado componente oferece ao fluxo de uma corrente elétrica variável no tempo. Uma quantidade de impedância baixa vai garantir que o sensor seja capaz de transmitir eficazmente o sinal, não criando qualquer oposição à mesma, deste modo, a solução de HCl é a que permite obter um eletrodo capaz de responder a este propósito.

Tal como se referiu no *Capítulo I*, a impedância de contato do sistema eletrodo-pele deve apresentar um valor entre 100Ω e $10 \text{ K}\Omega$ para que haja uma monitorização correta do sinal. Deste modo, pode-se inferir que este valor de impedância provém apenas do contacto pele-gel uma vez que na interface eletrodo-gel é bastante baixa.

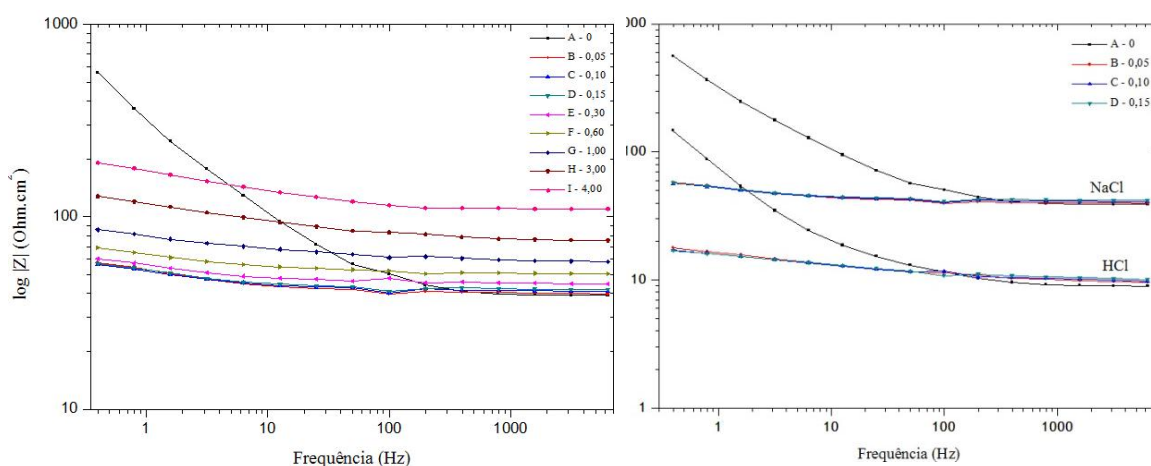


Figura 4.17 – Curva impedância-frequência para amostras de poliamida. À esquerda está representado a evolução da curva impedância-frequência de amostras com camadas de AgCl de diferente espessura. À direita estão representadas as curvas impedância-frequência obtidas com diferentes soluções de NaCl e HCl (expresso em C/cm^2).

4.3.3. Medição do ruído elétrico

O principal requisito para que um material possa ser usado como eletrodo é a sua capacidade de transmitir os sinais elétricos de modo transparente, não causando deste modo qualquer ruído que possa dificultar a aquisição do

signal. Assim, a interface eletrodo-pele não pode causar um ruído significativamente maior que um sinal ECG (aproximadamente de 1 mV) ou de um sinal EEG (aproximadamente de 50 μV) [81].

Na análise dos dados, começou-se por aplicar um filtro passa-banda *Butterworth* de ordem 20 (0,5 – 100 Hz). Os primeiros 10 segundos do potencial de cada amostra medidos foram negligenciados para evitar a inclusão de artefactos, o que dificultaria a análise do sinal. O uso deste filtro é importante pois através dele é possível garantir que a frequência de amostragem (f_s) é pelo menos o dobro da frequência contida no sinal medido (f_e) (*Teorema de Nyquist*). Se $f_s = 2f_e$ todos os picos e vales presentes no sinal serão capturados e representados corretamente. Se $f_s > 2f_e$ obtém-se mais do que amostras suficientes para capturar toda a variação do sinal. Para além disto, se o sinal for analisado sem o uso deste filtro, haverá um erro de desvio associado à frequência de 0 Hz. A presença desta frequência torna a interpretação dos resultados muito difícil, na medida em que a variação do sinal irá ser mínima quando comparada com o valor obtido para esta frequência. Este desvio fará com que apareça um enorme contributo da componente de 0 Hz no gráfico da densidade de poder espectral, dificultando a análise do restante sinal. Assim, é importante limitar a gama de frequências a analisar através da aplicação de um filtro passa-banda.

A *Figura 4.18* representa a densidade do poder espectral (do inglês *Power Spectral Density*, PSD) para amostras de Ag/AgCl preparadas a partir de soluções de NaCl e HCl e respetivos valores para a relação sinal-ruído (do inglês *Root Mean Square*, V_{rms}). Normalmente, os sensores são classificados a partir da relação sinal-ruído. Este valor compara o nível de um sinal desejado com o nível de ruído de fundo. Quanto maior for este valor, maior é o efeito de ruído sobre o sinal a medir. A densidade de poder espectral descreve a taxa a que a energia de um sinal é transferida em função da frequência, isto é, mostra em que frequências ocorrem grandes ou baixas variações de amplitude do sinal. É possível observar-se que o ruído obtido para cada par de amostras é bastante semelhante ao longo de todo intervalo de frequências, bem como o valor de ruído RMS correspondente: $1,91 \pm 0,03 \mu\text{V}_{\text{RMS}}$ (NaCl) e $1,31 \pm 0,02 \mu\text{V}_{\text{RMS}}$ (HCl). As frequências típicas de um exame de EEG variam de 0,5 a 50 Hz, sendo muito importante a análise de ruído para baixas frequências. Observa-se que existe um aumento significativo deste ruído para baixas frequências, comportamento já observado por outros autores [82]. Esta variação permitiu concluir que o eletrodo produzido a partir da solução de NaCl apresenta mais ruído do que os eletrodos produzidos em HCl. No entanto, para uma frequência de 1Hz, o ruído introduzido no sinal pela interface eletrodo-gel é de aproximadamente de $0,3 \mu\text{V}/\sqrt{\text{Hz}}$. O ruído introduzido é mínimo quando comparado com a amplitude do sinal recebido. Para altas frequências, observa-se que todo o ruído é camuflado pelo ruído introduzido pelo equipamento, pelo que não é possível a sua medição em altas frequências, mesmo quando se usa em equipamento de baixo ruído. A gaiola de *Faraday* permitiu eliminar grande parte do ruído de alta frequência (do inglês *Radio Frequency interference*, RFI). O ruído de alta frequência é causado por qualquer tipo de equipamento que gera energia de radiofrequência como parte da sua operação, e a qual apresenta um pico

característico a ~ 50 Hz. Devido ao uso de uma gaiola de *Faraday* foi possível eliminar esta interferência do ruído a 50 Hz, o que mostra que todo o procedimento foi executado corretamente.

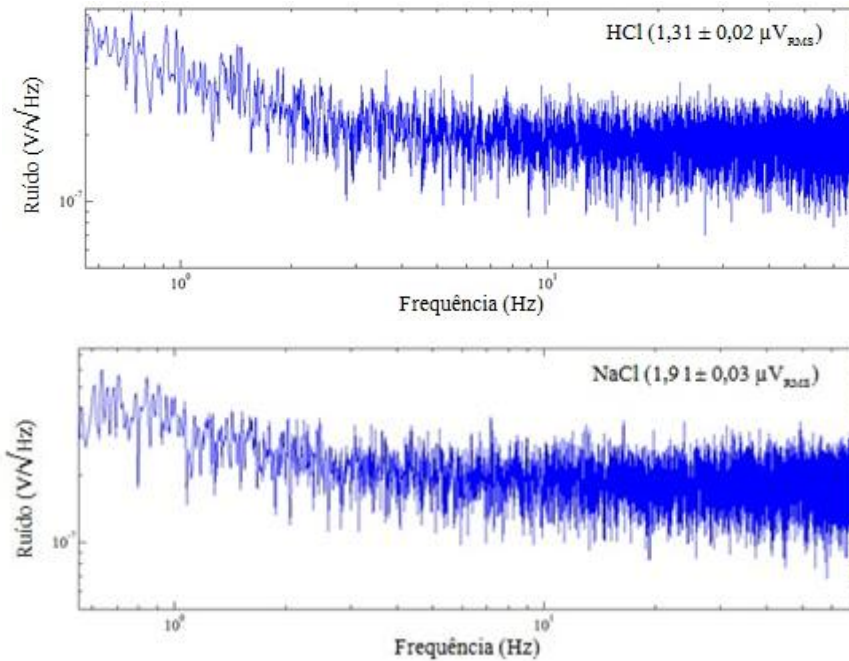


Figura 4.18 – Representação do ruído espectral para amostras preparadas com NaCl e HCl.

Os sinais EEG possuem baixas amplitudes e baixas frequências deste modo, a deriva em potencial (do inglês *drift rate*) é também um parâmetro importante na avaliação do desempenho dos elétrodos (Figura 4.19). Quanto mais baixos forem os valores da deriva, maior é a estabilidade do elétrodo e menor é a interferência deste na gravação do sinal elétrico. A deriva em potencial obtida para elétrodos de Ag/AgCl é praticamente inexistente [81]. Analisando os sinais obtidos com as amostras em estudo, conclui-se que os valores da deriva em potencial do HCl e do NaCl são de $0,13 \mu V/s$ e $0,21 \mu V/s$ respectivamente. Observa-se que as amostras preparadas a partir do HCl apresentam um valor inferior quando comparada com os valores obtidos com as amostras de NaCl e com tendência a estabilizar ao longo do tempo. O baixo valor para a deriva em potencial obtido com uma solução de HCl permite concluir que o elétrodo não causa qualquer perturbação no sinal que está a ser medido, uma vez que apresenta um potencial estável.

Conclui-se que o revestimento de AgCl obtido com uma solução de HCl permite a aquisição de um elétrodo que não causa qualquer interferência na medição do sinal, com baixas impedâncias e com uma deriva de potencial mínima.

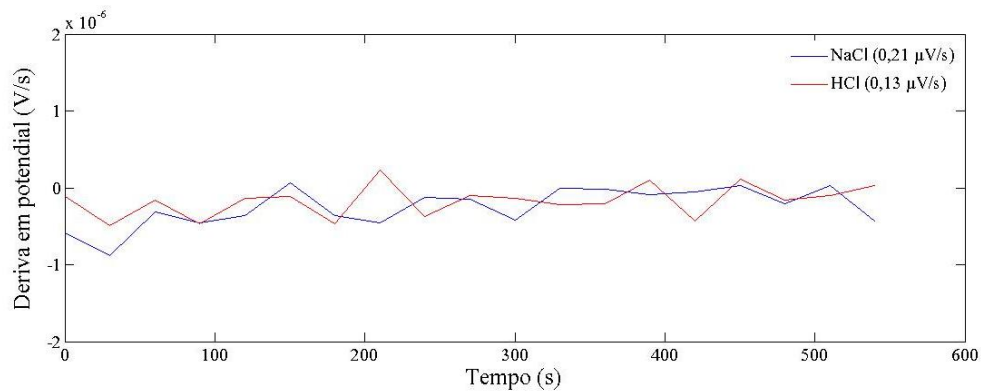


Figura 4.19 – Deriva em potencial dos diferentes eletrodos preparados.

4.4. Testes *in-vivo*

A realização de alguns ensaios experimentais com a ventosa permitiram concluir que o melhor intervalo para a razão de $\text{Ca}^{2+}:\text{COO}^-$ é de 0,253 a 0,319. Este intervalo permite que o gel apresente um tempo de gelificação e injeção de 8-10 e 20-25 minutos, respetivamente. Este valor permite que o hidrogel gelifique de modo a que não haja escoamento e, simultaneamente, seja completamente removível com a ventosa após a finalização do exame.

Os sinais adquiridos foram analisados com o *eeglab*, no qual foi aplicado um filtro passa-banda (0,13-30 Hz), com o intuito de reduzir o ruído de altas frequências que atenua o sinal elétrico detetado. Na *Figura 4.20* estão representados os sinais adquiridos com um eletrodo tradicional de Ag/AgCl e com o novo eletrodo.

Os testes *in-vivo* permitiram provar o novo conceito de eletrodo: o uso de um hidrogel como interface e o uso de um polímero revestido com prata. Estes novos conceitos permitem diminuir a ocorrência de reações alérgicas e de abrasão da pele. Para além disso, o uso de revestimentos sobre um polímero é mais barato e menos agressivo do que o uso de um metal. O teste deste novo eletrodo em adultos saudáveis mostra que os sinais obtidos com o novo biossensor e o eletrodo de AgCl são semelhantes e apresentam baixo ruído, comprovando assim a funcionalidade do novo eletrodo. No entanto, na realização destes testes sentiram-se algumas dificuldades. A montagem inadequada e o difícil controlo das condições de experimentação dificultou a fixação da ventosa ao escalpe. A ventosa revelou ter uma altura inadequada para o sistema de fixação usado, pelo que foi necessário o uso de adesivos para a manter em contacto com o escalpe durante a aquisição do sinal. A baixa fixação deste eletrodo ao escalpe dificultou a aquisição do registo da atividade elétrica, tornando-o mais suscetível a variações do potencial.

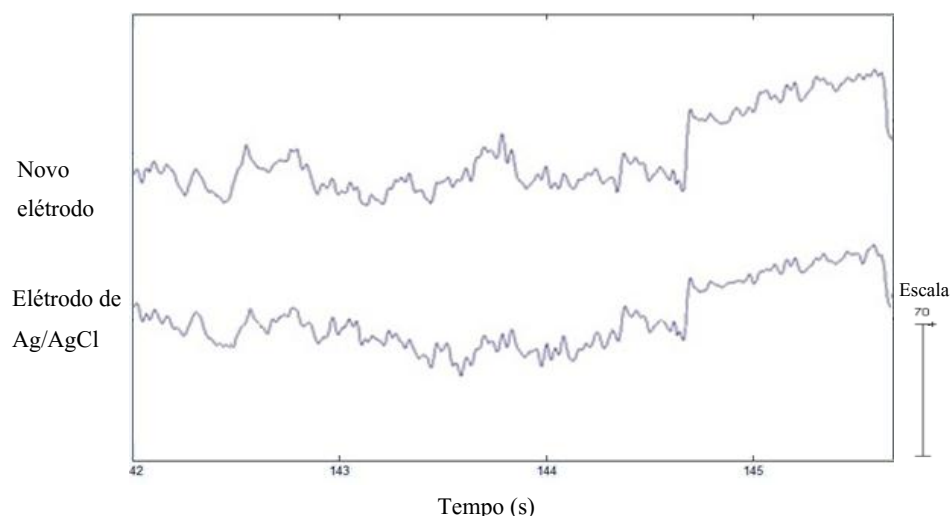


Figura 4.20 – Sinais elétricos adquiridos em testes in-vivo com o novo eletrodo e com um eletrodo de Ag/AgCl tradicional.

Capítulo V

Conclusões

Ao longo deste trabalho foi desenvolvido um novo conceito de elétrodo húmido para EEG, com potencial utilização em recém-nascidos, diferindo dos atuais pelo facto de se usar um hidrogel de alginato em substituição das pastas condutoras tradicionais. O alginato é um material biocompatível e não antigénico permitindo, em combinação com as propriedades de gelificação adequada, a produção de um hidrogel capaz de substituir as pastas e adesivos condutores que sujam e causam lesões no recém-nascido.

A seleção de um hidrogel ideal para o biossensor desenhado foi modulado através da variação quer da concentração/tipo de polímero, quer da concentração de agente de reticulação usado. A análise de diferentes alginatos permitiu concluir que a diferença entre a proporção de grupos -M e -G ao longo da molécula e o peso molecular da cadeia influenciam as propriedades viscoelásticas do hidrogel final. Com os testes de Viscosimetria e de FTIT verificou-se que o alginato 71238 da *Sigma-Aldrich Chemicals*, proveniente de *Alga Marron*, era o material ideal para a produção do hidrogel por apresentar um peso molecular intermédio e um baixo rácio M/G. A maior concentração de grupos -G permite que este alginato seja capaz de formar um hidrogel com elevada resistência mecânica. Por outro lado, as análises químicas mostraram que é importante haver um equilíbrio entre o tempo de gelificação, o tempo de injeção e as propriedades mecânicas deste. O conhecimento do comportamento viscoelástico dos materiais poliméricos permitiu não só alcançar as condições ótimas de produção do hidrogel, como também obter informações valiosas acerca do mecanismo de gelificação e o seu efeito sobre as propriedades mecânicas finais. O hidrogel tem que possuir propriedades viscoelásticas que permitam a sua fácil aplicação e remoção do contacto com a pele com a máxima limpeza e sem danificar o sensor. As análises reológicas mostraram que a combinação do sistema CaCO_3 -GDL com o $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ permite a formação de um hidrogel com propriedades adequadas ao bom funcionamento do elétrodo. A combinação das excelentes propriedades viscoelásticas que o sistema CaCO_3 -GDL fornece, com a rápida gelificação do composto $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, permite controlar quer a cinética de gelificação, quer a resistência mecânica dos hidrogéis.

Na construção do substrato do biossensor usaram-se dois materiais: o cobre e a poliamida. Após otimizado todo o processo de deposição da prata sobre o cobre, por processos químicos e eletroquímicos, as imagens SEM mostraram que era impossível a obtenção de uma superfície homogênea e coesa devido à existência de poros à superfície deste. Apesar de em reduzida quantidade, a presença destes poros permite que o cobre seja facilmente oxidado, levando ao aparecimento de produtos indesejados à superfície do revestimento. Estes produtos aumentam a impedância e impedem a transmissão do sinal elétrico de modo confiável.

A análise do revestimento produzido sobre a poliamida por processos químicos mostrou ser o ideal para a construção de um sensor capaz de captar eficazmente os sinais elétricos. A técnica de *Electroless Plating* permite a aquisição de um revestimento uniforme sobre toda a área do substrato. Para além disto, a grande afinidade da prata aos grupos amida da poliamida permitiu a formação do revestimento com excelente adesão. Com a análise ISE observou-se que as amostras de poliamida revestidas com prata apresentavam um potencial instável, tornando-se mais estável quando se convertia Ag à superfície do revestimento em AgCl. A presença de uma camada de AgCl torna a impedância independente da frequência, contribuindo para a estabilização do potencial. No entanto, a camada de AgCl funciona como isolante, pelo que é importante garantir que a quantidade de Ag convertida em AgCl não ultrapasse os $0,15 \text{ C/cm}^2$. Quantidades de AgCl acima deste valor provocam o aumento da impedância em toda a gama de frequências, piorando a estabilidade do potencial do eléctrodo. Um outro requisito importante para que um material possa ser usado como eléctrodo é a sua capacidade de transmitir os sinais elétricos de modo transparente, não causando deste modo qualquer ruído que possa dificultar a aquisição do sinal. Analisou-se que o ruído introduzido na interface eléctrodo-gel é maior para baixas frequências e apresenta um valor reduzido quando comparado com a amplitude do sinal que se pretende medir.

Os testes *in-vivo* permitiram comprovar que o novo conceito de biossensor é capaz de transmitir o sinal elétrico detetado sobre o escalpe com um desempenho comparável com eléctrodos de Ag/AgCl tradicional, apresentando vantagem sobre estes pelo facto de não causar alergias nem abrasão do escalpe.

Em jeito de conclusão, ficou demonstrado que o uso de um hidrogel de alginato como interface de condução do sinal elétrico entre o escalpe e o eléctrodo superficial é vantajoso. A biocompatibilidade dos materiais usados impossibilitam a ocorrência de reações alérgicas e a sua forma semissólida impede o contacto entre o substrato do eléctrodo e o escalpe, impedindo a possibilidade de abrasão da pele. A capacidade do hidrogel em manter a sua forma permite que este se mantenha imóvel durante todo o exame, tornando-o menos suscetível a ruído resultante de artefactos de movimento e não permitindo o escoamento do hidrogel durante o exame.

No futuro, é importante aperfeiçoar a montagem experimental de modo a permitir condições mais controladas para o registo do sinal com este novo sensor, bem como melhorar o *design* da ventosa e otimizar o processo de produção do hidrogel para uso comercial. O uso de um hidrogel como interface e um polímero revestido com prata como sensor apresentam vantagens, no entanto é importante redesenhar o eléctrodo de modo a melhorar o contacto com o escalpe e realizar novos ensaios para avaliação do seu desempenho.

Referências

- [1] Bronzino, J.D., *The biomedical engineering handbook*. Vol. 2. CRC Press LLC (2000).
- [2] Teplan, M., *Fundamentals of EEG measurement*. Measurement science review, **2**(2): 1-11 (2002).
- [3] Hüsing, B., L. Jäncke, and B. Tag, *Impact assessment of neuroimaging: final report*. Vol. 50. Vdf Hochschulverlag AG, (2006).
- [4] Usakli, A.B., *Improvement of EEG signal acquisition: an electrical aspect for state of the art of front end*. Computational intelligence and neuroscience, **2010** (2010).
- [5] Alba, N.A., Sciabassi, R.J., Sun, M., Cui, X.T., *Novel hydrogel-based preparation-free EEG electrode*. IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering, **18**(4): 415-423 (2010).
- [6] Fonseca C., C.J., Martins R.E., Ferreira V.M., de Sá, J.P.M., Barbosa, MA, da Silva, A.M., *A novel dry active electrode for EEG recording*. Biomedical Engineering, IEEE Transactions on, **54**(1): 162-165 (2007).
- [7] Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M., *Principles of neural science*. Cap. 2: Nerve cells and behavior. Vol. 4. McGraw-Hill New York (2000).
- [8] D. Purves, G.J.A., D. Fitzpatrick, W. C. Hall, A.-S. LaMantia, J. O. McNamara, S. M. Williams, *Neuroscience*. 3^a ed, 1-66: Sinauer Associates, Inc (2004).
- [9] Nowakowski, R.S., *Stable neuron numbers from cradle to grave*. Proceedings of the National Academy of Sciences, **103**(33): 12219-12220 (2006).
- [10] Constituição de um neurónio. Disponível em: <http://profrobertabiologia.blogspot.pt/2010/10/sistema-nervoso.html>. Acedido a 26.09.2011.
- [11] Sebben, C. Helping the medical students. Disponível em: <http://e-medicine.webnode.com.br/>. Acedido a 13.11.2011.
- [12] Guyton, A.C., *Neurociência básica: anatomia e fisiologia*, Guanabara Koogan S.A.: 9 ed (1997).
- [13] Cofer, D. *MindCreators: neuron basics - Action Potential*. Disponível em: <http://www.mindcreators.com/NeuronBasics.htm>. Acedido a 30.11.2011.
- [14] Coelho, T., Moreira A. *Fisiologia das membranas celulares*. Disponível em: http://fisiologia.med.up.pt/Textos_Apoio/Membranas/Membranas.pdf. Acedido a 26.02.2012.
- [15] Ghisovan, N., Nemri, A., Shumikhina, S., Molotchnikoff, S., *Synchrony between orientation-selective neurons is modulated during adaptation-induced plasticity in cat visual cortex*. BMC Neuroscience, **9**(1): 1-17 (2008).
- [16] Lodder, S., van Putten, M.J.A.M., *Automated EEG analysis: Characterizing the posterior dominant rhythm*. Journal of neuroscience methods, **200**(1): 86-93 (2011).

- [17] Walls-Esquivel, E., Vecchierini, M. F., Héberlé, C., Wallois, F., *Electroencephalography (EEG) recording techniques and artefact detection in early premature babies*. *Neurophysiologie Clinique/Clinical Neurophysiology*, **37**(5): 299-309 (2007).
- [18] Cardoso, R., *Uma estratégia de modelagem tridimensional para mapeamento de EEG de superfície*. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, 2005.
- [19] Borges, T.V., *Processamento de sinais de actividade eléctrica neuronal a partir de ferramentas matemáticas clássicas*. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, 2009.
- [20] Electroencephalography. *Imagens de ondas cerebrais*. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Electroencephalography>. Acedido a 30.11.2011.
- [21] Silva, D., Lima, M., *Aspectos Gerais e Práticos do EEG*. *Rev. Neurociências*, **6**(3): 137 - 146 (1998).
- [22] Field, T., Diego, M., Dieter, J., Hernandez-Reif, M., Schanberg, S., Kuhn, C., Yando, R., Bendell, D., *Prenatal depression effects on the fetus and the newborn*. *Infant Behavior and Development*, **27**(2): 216-229 (2004).
- [23] Moore, J., Zouridakis, G., *Biomedical technology and devices handbook*. 2ª ed. Vol. 12. CRC Press (2004).
- [24] Niedermeyer, E., Silva, F.L. , *Electroencephalography: basic principles, clinical applications, and related fields*. Lippincott Williams & Wilkins (2005)
- [25] Catálogo hospitalar de Beja - imagem de equipamento de EEG. Disponível em: <http://catalogohospitalar.com.br/eletroencefalografia-3.html>. Acedido a 25.01.2012.
- [26] Neuper, C., Müller, GR, Kübler, A., Birbaumer, N., Pfurtscheller, G., *Clinical application of an EEG-based brain-computer interface: a case study in a patient with severe motor impairment*. *Clinical neurophysiology*, **114**(3): 399-409 (2003).
- [27] Gargiulo, G., Bifulco, P., Calvo, R.A., Cesarelli, M., Jin, C., van Schaik, A. *A mobile EEG system with dry electrodes*. *IEEE* (2008).
- [28] Dias, N.S., Carmo, J. P., Mendes, P. M., Correia, J. H., *Wireless instrumentation system based on dry electrodes for acquiring EEG signals*. *Medical Engineering & Physics* (2011).
- [29] Searle, A., Kirkup, L., *A direct comparison of wet, dry and insulating bioelectric recording electrodes*. *Physiological Measurement*, **22**: 71-83 (2000).
- [30] Jarrar, R., Buchhalter, J., Williams, K., McKay, M., Luketich, C., *Technical Tips: Electrode Safety in Pediatric Prolonged EEG Recordings*. *American Journal of Electroneurodiagnostic Technology*, **51**(2): 114-117 (2011).
- [31] Boashash, B., *A Time-Frequency Approach for Newborn Seizure Detection*. *Engineering in Medicine and Biology Magazine, IEEE*, **20**(5): 54-64 (2011).
- [32] Bellich, B., Borgogna, M., Cok, M., Cesàro, A., *Release Properties of Hydrogels: Water Evaporation from Alginate Gel Beads*. *Food Biophysics*, **6**(2): 259-266 (2011).
- [33] Hoffman, A.S., *Hydrogels for biomedical applications*. *Advanced drug delivery reviews*, **54**(1): p. 3-12 (2002).
- [34] Kuo, C.K., Ma, P.X., *Ionic crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties*. *Biomaterials*, **22**(6): 511-521 (2001).
- [35] Davidovich-Pinhas, M., Bianco-Peled, H., *A quantitative analysis of alginate swelling*. *Carbohydrate Polymers*, **79**(4): 1020-1027 (2010).
- [36] Draget, K.I., Taylor, C., *Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications*. *Food Hydrocolloids*, **25**(2): 251-256 (2011).

- [37] Garcia-Cruz, C.H., Foggetti, U., Silva, A.N., *Bacterial alginate: technological aspects, characteristics and production*. Química Nova, **31**(7): 1800-1806 (2008).
- [38] Li, L., Fang, Y., Vreeker, R., Appelqvist, I., Mendes, E., *Reexamining the egg-box model in calcium-alginate gels with X-ray diffraction*. Biomacromolecules, **8**(2): 464-468 (2007).
- [39] Lee, K.Y., Mooney, D.J., *Alginate: Properties and biomedical applications*. Progress in polymer science, **37**: 106-126 (2011).
- [40] Rehm, B.H.A., *Alginates: biology and applications*. Cap. I. Vol. 13. Springer Verlag, 21-34 (2009).
- [41] Stevens, M.M., Qanadilo, H.F., Langer, R., Prasad Shastri, V., *A rapid-curing alginate gel system: utility in periosteum-derived cartilage tissue engineering*. Biomaterials, **25**(5): 887-894 (2004).
- [42] Hammond, C.R. *The Elements*. Disponível em: <http://www.mindspring.com/~gurumo/files/The%20Elements.pdf>. Acedido a 21.05.2012.
- [43] Hai, H., Ahn, J.G., Kim, D.J., Lee, J.R., Chung, H.S., Kim, C.O., *Developing process for coating copper particles with silver by electroless plating method*. Surface and Coatings Technology, **201**(6): 3788-3792 (2006).
- [44] Coelho, J. *Apontamentos de apoio à disciplina de Biomateriais, 2009/2010*.
- [45] Borges, I. *Reação de síntese de uma poliamida*. Disponível em: <http://garrastazupolimeros.blogspot.pt/2010/10/polimeros-de-condensacao.html>. Acedido a 28.05.2012.
- [46] Xu, X., Luo, X., Zhuang, H., Li, W., Zhang, B., *Electroless silver coating on fine copper powder and its effects on oxidation resistance*. Materials Letters, **57**(24-25): 3987-3991 (2003).
- [47] Zarkadas, G., Stergiou, A., Papanastasiou, G., *Influence of citric acid on the silver electrodeposition from aqueous AgNO₃ solutions*. Electrochimica acta, **50**(25-26): 5022-5031 (2005).
- [48] Gray, J.E., Norton, P.R., Griffiths, K., *Mechanism of adhesion of electroless-deposited silver on poly (ether urethane)*. Thin Solid Films, **484**(1): 196-207 (2005).
- [49] Pereira, F.C., Bergamo, E.P., Zanoni, M.V.B., Moretto, L.M., Ugo, P., *Aplicações de nanoelectrodos como sensores na Química Analítica*. Química Nova, **29**(5): 1054 (2006).
- [50] Wolyneć, S., *Técnicas eletroquímicas em corrosão*. Edusp (2003).
- [51] Oliveira, S.M., Barrias, C.C., Almeida, I.F., Costa, P.C., Ferreira, M.R.P., Bahia, M.F., Barbosa, M.A., *Injectability of a bone filler system based on hydroxyapatite microspheres and a vehicle with in situ gel-forming ability*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, **87**(1): 49-58 (2008).
- [52] Turco, G., Marsich, E., Bellomo, F., Semeraro, S., Donati, I., Brun, F., Grandolfo, M., Accardo, A., Paoletti, S., *Alginate/hydroxyapatite biocomposite for bone ingrowth: a trabecular structure with high and isotropic connectivity*. Biomacromolecules, **10**(6): 1575-1583 (2009).
- [53] Nunamaker, E.A., Otto, K.J., Kipke, D.R., *Investigation of the material properties of alginate for the development of hydrogel repair of dura mater*. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, **4**(1): 16-33 (2011).
- [54] Corrêa, N.M., Camargo Júnior, F.B., Ignácio, R.F., Leonardi, G.R., *Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos*. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, **41**(1): 73-79 (2005).
- [55] Sperger, D.M., Fu, S., Block, L.H., Munson, E.J., *Analysis of composition, molecular weight, and water content variations in sodium alginate using solid-state NMR spectroscopy*. Journal of pharmaceutical sciences, **100**(8) (2011).

- [56] Zhou, Q., Xanthos, M., *Nanosize and microsize clay effects on the kinetics of the thermal degradation of polylactides*. *Polymer Degradation and Stability*, **94**(3): 327-338 (2009).
- [57] Pilling, S. *Determinação da Viscosidade de Líquidos*. Disponível em: <http://pt.scribd.com/doc/38240352/FQE1-Roteiro5-Viscosidade-Liquidos>. Acedido a 05.07.2011.
- [58] *Thermo Nicolet: Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry*. Disponível em: <http://mmrc.caltech.edu/FTIR/FTIRintro.pdf>. Acedido a 07.04.2012.
- [59] *PerkinElmer Life and Analytical Sciences: FT-IR Spectroscopy Attenuated Total Reflectance*. Disponível em: http://shop.perkinelmer.com/content/TechnicalInfo/TCH_FTIRATR.pdf. Acedido a 07.04.2012.
- [60] Kwam, K.S. *Capítulo 4: FTIR-ATR Diffusion Study*. Disponível em: http://scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd-71498-94026/unrestricted/ETD_CHAPTER_4.PDF. Acedido a 19.04.2012.
- [61] Bron, J.L., Vonk, L.A., Smit, T.H., Koenderink, G.H., *Engineering alginate for intervertebral disc repair*. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, **4**(7): 1196-1205 (2011).
- [62] Jiang, J., *Rheology and structure of thermoreversible hydrogels*. Dissertação para o grau de Doutor em Filosofia de Ciência de materiais e engenharia. ProQuest (2007).
- [63] Rezende, R.A., P.J. Bártolo, and A. Mendes, *Rheological behavior of alginate solutions for biomanufacturing*. *Journal of Applied Polymer Science*, **113**(6): 3866-3871 (2009).
- [64] Karrabi, M., Bakhshandeh, G., Ghoreishy, M.H.R., *Rheological Study of Tyre Tread Compound (Part II): A Method to Study the Relaxation Time and Viscosity Index Using Parallel Plate Rheometer*. *Iranian Polymer Journal*, **13**(5): 397-404 (2004).
- [65] Cheng, C., Arunagiri, T., Chyan, O., *Electrodeposition of silver and copper/silver multilayer on ruthenium substrate as a potential new metal interconnect for integrated circuits*. *American Journal of Undergraduate Research*, **2**(1): 11-18 (2003).
- [66] Martins, N.M. *A Microscopia Eléctronica de Varrimento na Caracterização de Materiais*. Disponível em: <http://home.utad.pt/%7Eume/Fundamentos%20Te%F3ricos.pdf>. Acedido a 08.05.2012.
- [67] Zhao, H. and J. Cui, *Electroless plating of silver on AZ31 magnesium alloy substrate*. *Surface and Coatings Technology*, **201**(8): 4512-4517 (2007).
- [68] *Handbook of analytical methods for materials: Scanning Electron Microscopy*. Disponível em: <http://mee-inc.com/sem.html>. Acedido a 08.05.2012.
- [69] Swapp, S. *Scanning Electron Microscopy (SEM)*. Disponível em: http://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/SEM.html. Acedido a 08.05.2012.
- [70] Lito, M.J.G., Camões, M.F., *Meeting the requirements of the silver/silver chloride reference electrode*. *Journal of solution chemistry*, 2009. **38**(11): p. 1471-1482.
- [71] Geddes, L.A., Baker, L.E., Moore, A.G., *Optimum electrolytic chloriding of silver electrodes*. *Medical and Biological Engineering and Computing*, **7**(1): 49-56 (1969).
- [72] Hewson, D.J., Duchême, J., Hogrel, J.-Y., *Changes in impedance at the electrode-skin interface of surface EMG electrodes during long-term EMG recordings*, in *Proceedings - 23rd Annual Conference 2001*, <http://www.dtic.mil/cgi-bin/GetTRDoc?AD=ADA409602>.
- [73] Gómez-Ordóñez, E., Rupérez, P., *FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds*. *Food Hydrocolloids*, **25**(6): 1514-1520 (2011).

- [74] Sakugawa, K., Ikeda, A., Takemura, A., Ono, H., *Simplified method for estimation of composition of alginates by FTIR*. Journal of Applied Polymer Science, **93**(3): 1372-1377 (2004).
- [75] Shukla, J., Mohandas, VP, Kumar, A., *Effect of pH on the Solubility of CaSO₄· 2H₂O in Aqueous NaCl Solutions and Physicochemical Solution Properties at 35° C*. Journal of Chemical & Engineering Data, **53**(12): 2797-2800 (2008).
- [76] Weng, L., Chen, X., Chen, W., *Rheological characterization of in situ crosslinkable hydrogels formulated from oxidized dextran and N-carboxyethyl chitosan*. Biomacromolecules, **8**(4): 1109-1115 (2007).
- [77] Ingar Draget, K., Østgaard, K., Smidsrød, O., *Homogeneous alginate gels: a technical approach*. Carbohydrate Polymers, **14**(2): 159-178 (1990).
- [78] Wloka, M., et al., *Rheological properties of viscoelastic biofilm extracellular polymeric substances and comparison to the behavior of calcium alginate gels*. Colloid & Polymer Science, **282**(10): 1067-1076 (2004).
- [79] Ticianelli, E.A., Gonzalez, E.R., *Eletroquímica: princípios e aplicações*. Edusp (1998).
- [80] Oliveira, G.M., Barbosa, L.L., Broggi, R.L., Carlos, I.A., *Voltammetric study of the influence of EDTA on the silver electrodeposition and morphological and structural characterization of silver films*. Journal of Electroanalytical Chemistry, **578**(1): 151-158 (2005).
- [81] Pedrosa, P., Alves, E., Barradas, N. P., Fiedler, P., Haueisen, J., Vaz, F., Fonseca, C., *TiNx coated polycarbonate for bio-electrode applications*. Corrosion Science, **56**(0): 49-57 (2012).
- [82] Huigen, E., A. Peper, and C. Grimbergen, *Investigation into the origin of the noise of surface electrodes*. Medical and Biological Engineering and Computing, **40**(3): 332-338 (2002).