



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Hugo da Mota Branco Fernandes Teixeira

**Desenvolvimento de um estimulador *low-cost* e
open-source para aplicações em engenharia de
tecidos**

Dissertação no âmbito do Mestrado Integrado em Engenharia Física
orientada pelos Professor Doutor António Miguel Lino Santos
Morgado e pela Professora Doutora Paula Cristina Rodrigues Pascoal
Faria e apresentada ao Departamento de Física da Universidade de
Coimbra

Setembro de 2023

'A José quase apetece travar o passo para chegar atrasado aos problemas que o esperam'

José Saramago *in* O Evangelho Segundo Jesus Cristo

Agradecimentos

Gostaria de começar por expressar a minha gratidão aos meus coordenadores, Professor Doutor Miguel Morgado e Professora Doutora Paula Pascoal-Faria, por me terem aceitado como orientando na presente dissertação, e pela oportunidade em trabalhar na área de Engenharia de Tecidos. Além disto, agradeço também por toda a orientação prestada, pelos *insights* perspicazes e pelo *feedback* construtivo dado ao longo de todo o período em que esta decorreu, que permitiram que este projeto chegasse a bom porto.

Gostaria de agradecer também ao aluno de doutoramento em Engenharia Biomédica João Meneses pelo esforço incansável na transmissão dos conceitos da área, pela disponibilidade incessantemente demonstrada e pela simpatia e cordialidade em todas as interações. A todos os colegas do LibPhys, gostaria de agradecer pela ajuda prontamente disponibilizada, pelo ótimo ambiente e pelas discussões frutíferas, que se mostraram, também elas, determinantes.

Quero também reconhecer o apoio fundamental de toda a minha família, que sempre se mostrou presente, fornecendo incentivos, amor e apoios inabaláveis, além do ambiente propício e bases necessárias à progressão na minha caminhada académica. Agradeço também a todos os meus colegas e amigos, não só pelo conforto dado em momentos menos bons, mas principalmente pela disponibilidade manifestada neles e em todos os outros. O meu sincero obrigado.

Por fim, gostaria de agradecer ao Departamento de Física da Universidade de Coimbra, pela disponibilização praticamente imediata das verbas que tornaram possível o avançar deste projeto.

Abstract

Electrical stimulation (ES) has a significant impact on tissue engineering (TE), where it is utilized to enhance cell proliferation, differentiation, and tissue growth. Despite its widespread use, the exact mechanisms of how ES affects cells and tissues are still not completely understood. Moreover, commercial stimulators can be expensive and lack transparency in design and operation. This thesis presents the development of a low-cost (794 €) and open-source stimulator that employs capacitive coupling (CC) as the method of stimulation delivery. The stimulator features multiple identical outputs, a user-friendly graphical user interface (GUI), and was designed using only open-source hardware and software components, making it easy to modify, repair, and replicate. It is based on the AD9833 integrated circuit, a signal generator, which enables the creation of electric fields applied to deliver ES to the culture medium via electrodes.

The stimulator demonstrated remarkable capability in generating consistent sine waves as the stimulation pattern over an extended duration, offering independent control over both frequency and amplitude. The findings revealed its potential to establish electric fields (EF) within the culture medium up to $(1.3286 \pm 0.0920) V/m$, while the stimulator exhibited a calculated bandwidth of ≈ 34 kHz.

The work developed demonstrates the feasibility of developing an accessible and affordable tool for TE research through the creation of a low-cost and open-source electrical stimulator. The open-source nature of the device promotes transparency and collaboration in the field, making it easier for researchers to customize and improve the stimulator to meet their specific needs. Additionally, by enabling scanning studies in the frequency and amplitude of the electric field, this stimulator will play a crucial role in advancing the field of TE, as it provides a mean of mapping the causal effects of ES on tissues.

Keywords: Tissue engineering, Electrical Stimulation, Mesenchymal Stem Cells, Capacitive Coupling, Open-source, Low-cost, Bioreactors, Modelling, Biophysics

Resumo

A estimulação elétrica (*Electrical Stimulation, ES*) tem um impacto significativo na engenharia de tecidos (*Tissue Engineering, TE*), onde é utilizada para melhorar a proliferação celular, diferenciação e crescimento de tecidos. Apesar de seu uso generalizado, os mecanismos exatos de como a ES afeta células e tecidos ainda não são completamente compreendidos. Além disso, estimuladores comerciais tendem a ser dispendiosos e carecer de transparência relativamente ao seu *design* e operação. Esta dissertação apresenta o desenvolvimento de um estimulador de baixo custo (794 €) e *open-source* que utiliza acoplamento capacitivo (*Capacitive Coupling, CC*) como método de entrega da estimulação. O estimulador possui múltiplas saídas idênticas, uma GUI amigável, e foi projetado utilizando apenas *hardware* e *software open-source*, o que torna possível a sua modificação, reparação e replicação de forma extremamente simples. Todo o projeto parte de um gerador de sinais que tem por base o circuito integrado AD9833, e permite a aplicação de ES ao meio de cultura através de campos elétricos criados via elétrodos.

O estimulador demonstrou elevada capacidade de gerar ondas sinusoidais consistentes como base do padrão de estimulação ao longo de períodos temporais alargados, oferecendo controlo de forma independente das variáveis frequência e amplitude. Os resultados obtidos revelam a possibilidade de obter campos elétricos (*Electric Fields, EF*) no meio de cultura com intensidades de até $(1.3286 \pm 0.0920) V/m$, apresentando o estimulador uma largura de banda de ≈ 34 kHz.

O trabalho desenvolvido demonstra não só a viabilidade da criação de uma ferramenta acessível e económica para a área de TE, mas promove também, através da natureza *open-source* do dispositivo, a transparência e colaboração na área, tornando mais fácil à comunidade científica personalizar e melhorar o estimulador de acordo com suas necessidades específicas. Mais ainda, ao permitir estudos de variação da frequência e magnitude do campo elétrico, este estimulador desempenhará um papel crucial no avanço do campo de TE, visto fornecer um meio de mapear os efeitos causais da ES nos tecidos.

Keywords: Engenharia de Tecidos, Estimulação Elétrica, Células Estaminais Mesenquimais, Acoplamento Capacitivo, Open-source, Baixo-custo, Biorreatores, Modelação, Biofísica

Tabela de Conteúdos

EPÍGRAFE	ii
AGRADECIMENTOS	iv
ABSTRACT	vi
RESUMO	viii
TABELA DE CONTEÚDOS	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ACRÓNIMOS	xv
1 MOTIVAÇÃO	1
2 INTRODUÇÃO	2
2.1 Engenharia de Tecidos	2
2.1.1 Estratégias em TE	2
2.1.1.1 <i>Scaffold-Free</i>	2
2.1.1.2 <i>Scaffold-Based</i>	3
2.1.2 Fontes de Células	4
2.1.3 Estimulação Elétrica enquanto Fator Sinalizante (<i>Signaling Factor, SF</i>)	6
2.2 Aplicação de Estimulação Elétrica em TE	9
2.2.1 Métodos para Aplicação de Estímulos	9
2.2.2 Tipos de Estimulação Elétrica	10
2.2.3 Elétrodos e Biotoxicidade	11
2.2.4 Gama de Parâmetros	13
2.2.5 Necessidade de Uniformidade	14
3 MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 Biorreator	16
3.2 Simulações Numéricas	16
3.3 Criação de GUI	17
3.4 Implementação Física do Estimulador	17
3.5 Determinação da Largura de Banda	17
3.5.1 Diagrama de Bode de Magnitude	17
3.5.2 Diagrama de Bode de Fase	18
3.6 Campo Elétrico no Biorreator	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1 Projeto do Circuito de Amplificação	19
4.1.1 Campo Elétrico no Biorreator	19
4.1.2 Dimensionamento do Amplificador	21
4.1.2.1 Resistência de Carga e Corrente Pedida ao OP-AMP	24
4.1.2.2 Capacitância Introduzida pelos Elétrodos	29
4.1.3 Dimensionamento do Pré-Amplificador	29
4.1.3.1 Acoplamento com o Gerador de Sinais e com o Estágio de HV	32
4.2 Visualização do Estado do Módulo de Amplificação - <i>Interfacing</i> com GUI	36
4.2.1 Processamento da Saída	36

4.2.2	Criação de GUI	41
4.3	Implementação Física do Estimulador	45
4.3.1	Largura de Banda	47
4.3.2	Campo Elétrico no Meio de Cultura	51
5	CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO	56
	REFERÊNCIAS	58
	ANEXOS	66
A.1.	<i>Script</i> Arduino para Detecção de Picos	66

Lista de Figuras

1	Materiais e processos básicos necessários em TE	4
2	Procedimento de obtenção, cultura, e possíveis usos de células estaminais	5
3	Mecanismos celulares e funções ativadas pela aplicação de ES	8
4	Métodos para aplicação de ES	9
5	Representação esquemática de ES com recursos a pontes salinas	11
6	Vista frontal do biorreator	16
7	Vista superior do biorreator	16
8	Circuito de <i>auto-balancing bridge</i>	18
9	Modelo de circuito RC para um sistema de entrega de ES por CC	20
10	Amplificador principal - solução de três OPA462	22
11	Simulação do circuito de 3 OP-AMPs - representação gráfica das tensões ao longo do circuito	23
12	Simulação do circuito de 3 OP-AMPs - característica de transferência DC	23
13	Representação esquemática da resistência de carga introduzida pelo conjunto potenciômetro + eletrodo	24
14	Cálculo da resistência de carga introduzida pelo conjunto potenciômetro + eletrodo, no caso em que o segundo se encontra com resistência $R = 0 \Omega$	25
15	Cálculo da resistência de carga introduzida pelo conjunto potenciômetro + eletrodo, no caso em que o segundo se encontra com resistência $R = POT \Omega$	25
16	Cálculo da resistência de carga introduzida pelo conjunto potenciômetro + eletrodo - caso genérico	26
17	Cálculo da resistência de carga introduzida pelo conjunto potenciômetro + n eletrodos	27
18	Corrente pedida ao OP-AMP pelo conjunto potenciômetro + n eletrodos	28
19	Capacitância introduzida por n eletrodos	29
20	Circuito do Pré-amplificador	30
21	Simulação do Pré-Amplificador para $f = 10$ Hz	31
22	Simulação do Pré-Amplificador para $f = 60$ kHz	32
23	Circuito Pré-Amplificador - inclusão de condensador de acoplamento	33
24	Circuito de Amplificação completo	34
25	Simulação para circuito de amplificação completo, $f = 120$ Hz	34
26	Simulação para circuito de amplificação completo, $f = 120$ Hz - corroboração da remoção do <i>offset</i> DC	35
27	Simulação para circuito de amplificação completo, $f = 27$ kHz	35
28	Simulação para circuito de amplificação completo, $f = 27$ kHz - aparecimento do fenómeno de <i>clipping</i>	36
29	Divisor de tensão para injeção do sinal de saída do módulo de amplificação no Arduino	37
30	Circuito para processamento do sinal para injeção no Arduino	37
31	Resultados simulacionais para processamento do sinal a injetar no Arduino	38
32	Malha de retificação para injeção de sinal no Arduino	38
33	Diagrama de fluxo do <i>script</i> para deteção de picos	40
34	Interpretação gráfica do <i>script</i> para deteção de picos	41
35	GUI para visualização do ganho atual - painel de comunicação	41
36	GUI para visualização do ganho atual - ligação com Arduino estabelecida	43
37	GUI para visualização do ganho atual - aspeto final	45
38	GUI para controlo do AD9833	45
39	Configuração padrão do OPA462EVM	46
40	Circuito de alimentação do OPA462EVM	46

41	Sinal recuperado do osciloscópio para obtenção do diagrama de Bode de ganho	47
42	Diagrama de Bode de ganho	48
43	Efeito do SR para $f > 28$ kHz - dados experimentais para $f = 80$ kHz	49
44	Determinação do desvio Δt	50
45	Diagrama de Bode de fase	50
46	Módulo da impedância do biorreator como função da tensão aplicada	51
47	Comparação do módulo da impedância $ Z_e $ obtido experimentalmente com os valores teóricos	52
48	Comparação do módulo do campo elétrico no meio de cultura $ E_{mc} $ obtido experimentalmente com os valores teóricos	54

Lista de Tabelas

1	<i>Growth Factors</i> em TE e respetiva funcionalidade	7
2	DC, CC e IC - Vantagens e desvantagens dos três métodos	10
3	Biomateriais utilizados em <i>scaffolds</i> para aplicação de ES	12
4	Efeito da aplicação de ES para diferentes intensidades de campo elétrico	13
5	Propriedades elétricas dos materiais constituintes do biorreator	16
6	Campos elétricos típicos no biorreator - caraterísticas necessárias do sinal a ser injetado nos elétrodos	21
7	Desvio de $ Z_e _{exp}$ relativamente ao valor teórico	53
8	Desvio de $ E_{mc} _{exp}$ relativamente ao valor teórico	54

Lista de Acrónimos

AC - Alternated Current
ATP - Adenosine triphosphate
BNC - Bayonet Neill-Concelman
BM-MSCs - Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells
BW - Bandwidth
CAT5 - Category 5
CC - Capacitive Coupling
CC - Capacitive Coupling
DAC - Digital to Analog Converter
DC - Direct Coupling, Direct Current
DUT - Device Under Test
ECM - Extra Cellular Matrix
EF- Electric Fields
ELF - Extremely Low Frequency
ES - Electrical Stimulation
ESCs - Embryonic Stem Cells
GBWP - Gain Bandwidth Product
GF - Growth Factor
GND - Ground
GUI - Graphical User Interface
HV - High Voltage
IC - Inductive Coupling
LCST - Lower Critical Solution Temperature
MSCs - Mesenchymal Stem Cells
NO - Normally Open
OP-AMP - Operational Amplifier
PANI - Polyaniline
PBS - Phosphate Buffered Saline
PEMF - Pulsed Electromagnetic Field Stimulation
PLA - Poly(lactic acid)
pNIPAM - Poly(N-isopropyl acrylamide)
PPY - PolyPyrrole
SCNT - Somatic Cell Nuclear Transfer
SF - Signaling Factor
SR - Slew Rate
TE - Tissue Engineering
USB - Universal Serial Bus

1 Motivação

Na área da Engenharia Biomédica, mais especificamente em Engenharia de Tecidos, a aplicação de estímulos a meios de cultura através de campos elétricos tem provocado vários tipos de respostas, que variam desde a proliferação celular à migração, passando pelo crescimento e diferenciação, chegando mesmo a culminar na apoptose (que conduz à morte celular). Tal facto é hoje em dia associado à possibilidade do campo elétrico aplicado despoletar cascatas de eventos a nível intra-celular, através da alteração pontual da polarização da membrana celular e da permeabilidade de certos canais de iões.^[1] Contudo, o conjunto de mecanismos que conduzem a este processos não é conhecido na sua plenitude^[2].

Tal facto deve-se à dificuldade em comparar diferentes estudos referentes à área, configurada, maioritariamente, pela utilização de *setups* experimentais extremamente variados, pelo estabelecimento de protocolos bastante díspares e pela medição incorreta (ou mesmo a sua total ausência, reportando-se estimativas baseadas em pressupostos falaciosos) do campo elétrico aplicado. Todos estes fatores contribuem para a impossibilidade do estabelecimento de relações causais rigorosas entre a ES e os efeitos que se observam após aplicação do estímulo^[3].

A presente dissertação encontra-se inserida no âmbito dos projetos de investigação *FCT-Stimuli2BioScaffolds: Optimização de estímulos em BioScaffolds: da modelação numérica aos testes in vitro* (PTCD/EME-SIS/32254/2017) e *OptiBioScaffold: Optimização de estímulos em scaffolds bitecido: da modelação matemática e computacional à validação experimental* (PTCD/EME- SIS/4446/2020), de momento a decorrerem no CDRSP¹, ambos coordenados pela Professora Doutora Paula Pascoal-Faria, e baseia-se no desenvolvimento de um aparelho de estimulação capacitiva para aplicação em TE, facilmente replicável e com um baixo custo de construção, que seja capaz de alimentar estudos de varrimento em frequência e intensidade do campo elétrico. De uma forma mais particular, a inclusão nos projetos de investigação acima mencionados relaciona-se com a necessidade de desenvolver soluções de fácil acesso e customização para utilização em estudos referentes à aplicação de ES a *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells* (BM-MSCs) e à validação de resultados que destes decorrem.

Além de demonstrar a possibilidade de implementação de um estimulador com estas características, capaz de atingir os valores típicos associados aos campos elétricos aplicados em TE, a natureza *open-source* do projeto promove a transparência e colaboração na área, possibilitando eventuais melhorias/modificações vocacionadas para fins mais específicos por parte da comunidade científica. Adianta-se também o papel crucial que este pode ter no avanço do mapeamento dos mecanismos causais da aplicação de ES em tecidos, por trazer a possibilidade da definição de diversos regimes de estimulação e consequente definição de protocolos uniformes que sirvam como pontos de partida de diferentes estudos e aplicações.

¹Centro para o Desenvolvimento Rápido e Sustentado de Produto, Marinha Grande, Portugal - unidade de investigação financiada pela Fundação para a Ciência e Tecnologia com classificação de excelente (15/15)

2 Introdução

2.1 Engenharia de Tecidos

Como é hoje conhecida, a Engenharia de Tecidos (*Tissue Engineering*, TE) corresponde a "um campo de investigação interdisciplinar que aplica os princípios da engenharia e das ciências da vida rumo ao desenvolvimento de substitutos biológicos que permitam restaurar, manter ou melhorar funções de tecidos"^[4]. Ao contrário do transplante convencional de órgãos ou das abordagens ditadas pela substituição com recurso a biomateriais, a TE tem na sua génese uma compreensão profunda dos processos associados à formação e regeneração de tecidos - por este motivo, apresenta-se como uma área interdisciplinar, na medida em que implementa conhecimento de áreas tão diversas como a física, a química, engenharia, ciência dos materiais, biologia e medicina^{[4],[5]}.

No âmbito de TE, torna-se indispensável a abordagem das estratégias utilizadas para alcançar o fim desejado. De forma muito simples, estas podem ser divididas em técnicas que recorrem a *scaffolds*² (*scaffold-based*), e a técnicas que não necessitam deste tipo de estrutura (*scaffold-free*).

2.1.1 Estratégias em TE

Como mencionado, um dos aspetos fulcrais (senão mesmo a finalidade última) em TE diz respeito à incorporação do tecido formado, que se pretende estrutural e funcionalmente idêntico àquele existente *in vivo*, no corpo do paciente. Para o efeito, torna-se necessária a existência de procedimentos eficazes no que concerne à transplantação do material biológico - por eficazes, entendam-se procedimentos que garantam boas taxas de retenção e sobrevivência das células, integração nos tecidos pretendidos e, idealmente, a ausência completa de efeitos secundários para o paciente^[6].

2.1.1.1 Scaffold-Free

A injeção intra-venosa/intra-arterial^[7], ou a injeção localizada no tecido pretendido^[8] mostram-se, regra geral, como as opções mais simples de serem implementadas. Contudo, ambos os métodos tendem a apresentar taxas de sucesso muita reduzidas - de facto, é hoje sabido que a percentagem de células que permanecem no local pretendido após transplante é < 5%, e que a taxa de sobrevivência destas não ultrapassa 1%^{[9]-[13]}.

Uma alternativa passa pela utilização da matriz extra-celular (*Extra Cellular Matrix*, ECM), parte integrante de tecidos e produzida pelas células, enquanto transportadora e protetora das células a transplantar. O conjunto formado pelas células a transplantar e pela ECM recebe o nome de *cell sheet*. Como facilmente se percebe, a existência exclusiva de estruturas não artificiais mune este método de elevada bio-compatibilidade e de uma baixa probabilidade de rejeição do material biológico, tendo sido efetuado o primeiro transplante em humanos no ano de 1981^[14].

Tanto tecidos como órgãos são formados por diferentes tipos de células com funções distintas, assim como pela ECM, sendo esta específica para cada tecido. A organização densa que apresentam permite a comunicação eficiente célula-célula e célula-ECM, sendo estas que acabam por ditar a função e o futuro das células constituintes do tecido^{[15],[16]}. Na conceção de *cell sheets*, exploram-se estas relações estritas como base de criação do microtecido a transplantar. Geralmente, utiliza-se também um polímero com propriedades dependentes da temperatura, *e.g.*, poli(N-isopropilacrilamida)(pNIPAM); este polímero sofre uma transição de hidrofóbico

²Estrutura para suporte celular, capaz de providenciar às células as condições iniciais que, no caso de tecidos *in vivo*, são fornecidas pela matriz extra-celular

para hidrofílico para a chamada *lower critical solution temperature* (LCST), que neste caso é de 32 °C. Para temperaturas superiores a LCST, a superfície do polímero é hidrofóbica, e permite o desenvolvimento normal das células. À medida que estas se desenvolvem, depositam também proteínas da ECM, formando uma estrutura semelhante àquela presente nos tecidos. Uma redução posterior da temperatura (< 32 °C) torna as moléculas de pNIPAM extremamente hidratadas; concomitantemente, assiste-se a um desprendimento do conjunto ECM e células da superfície do polímero^[17]. Visto permanecerem as proteínas da ECM na superfície dos *cell sheets*, possibilita-se a fixação a superfícies biológicas, pelo que podem ser transportadas até aos tecidos pretendidos sem necessidade de estruturas de fixação externas^[18]. Esta abordagem tem sido utilizada para a criação de *cell sheets* com capacidade de formar as mais diversas estruturas, desde pele a cartilagem, passando por tecido ósseo e tecido do nervo ótico, e a sua segurança e eficácia tem vindo a ser gradativamente comprovada em ensaios clínicos^[6].

2.1.1.2 Scaffold-Based

A ECM é, *in vivo*, um *scaffold* 3D para as células - além de lhes fornecer o ambiente e arquiteturas específicas do tecido a integrar, esta serve como um reservatório de água, nutrientes, citocinas e fatores de crescimento^[19]. Deste modo, muitas aplicações de TE necessitam da existência de um *template*, vulgo *scaffold*, que sirva não só de unidade estrutural temporária que permita a proliferação celular segundo as direções pretendidas, mas também a deposição da nova ECM. Mais ainda, estas estruturas podem inclusive participar ativamente no processo de desenvolvimento celular, através da incorporação, por exemplo, de fatores de crescimento que se encontrem presentes nestas^[20]. Por se tratarem, no caso de TE *in vivo* com recurso a *scaffolds*, de estruturas a serem implementadas no corpo de um paciente, existem certos requerimentos que devem ser cumpridos; estes podem ser subdivididos em requisitos de composição, estruturais, funcionais e quanto ao *modus* de preparação^[23].

- **Composição** - Os *scaffolds* devem ser biocompatíveis, na medida em que não devem despoletar uma resposta imunitária por parte do paciente^{[21],[22]}; obviamente, deve também possuir propriedades bioquímicas estáveis, após implementação no corpo do paciente. A biodegradabilidade é também um aspeto fulcral inerente a estas estruturas - relativamente a este ponto, deve adequar-se a taxa de degradação com a taxa de crescimento do novo tecido, de modo a que no momento em que o novo tecido se encontre completamente formado e integrado no organismo o *scaffold* deve estar completamente degradado^[4]. Deve ainda possibilitar a fixação de células do próprio paciente, de modo a facilitar a formação da ECM^{[23],[24],[27]}.
- **Estrutura** - A estrutura deve ser estratificada, apresentando o *scaffold* camadas com características especificadas em função do fim que se pretende atingir. Deve apresentar poros (sendo que as dimensões e número destes depende das células a utilizar e do resultado pretendido) não só para possibilitar a migração celular, mas também a migração dos produtos biológicos necessários ao desenvolvimento do tecido. No caso de tecidos vascularizados, deve ainda permitir a incorporação de vasos, ou possuir estruturas vascularizadas intrínsecas^{[4],[23]-[27]}.
- **Funcionalidade** - A habilidade de interação com as células do tecido a reparar/substituir deve ser possuída pelos *scaffolds*, assim como a de incorporar mensageiros biológicos e fatores de crescimento que promovam a diferenciação ou proliferação celular. Mais ainda, as propriedades biomecânicas devem replicar na medida do possível as do tecido, de modo a manter a integridade estrutural e funcionalidade^{[4],[24],[27]}.

- **Método de Fabrico** - O processo de fabrico deve ser preciso, de modo a possibilitar a sua reprodução. A versatilidade destes deve ser também um fator a ter em consideração, de modo a poder adaptar os *scaffolds* às características específicas de cada paciente em concreto.

Outra possibilidade é a utilização de *scaffolds in vitro* - nesta vertente, este serve apenas como um dispositivo que oferece suporte às células que estão a ser cultivadas *in vitro*, o que acaba por encorajar as próprias células a depositarem a ECM, que produzirá a base de um tecido passível de ser transplantado^[20].

Em qualquer dos casos, é crucial a articulação entre o *scaffold* produzido e a célula utilizada, de forma a alcançar o propósito desejado, visto as propriedades de composição e estrutura dos primeiros se mostrarem como fatores capazes de influenciar o comportamento das segundas. Esta influência pode ser notada, *e.g.*, através da formação de frentes de mineralização em regiões específicas do *scaffold*^[28], da influência que a tipografia do *scaffold* pode exercer no que concerne à formação do citoesqueleto^[29], ou no papel que o material desempenha para a produção de diferentes níveis de glucosaminoglicanos em TE de cartilagem^[30].

Por outro lado, células distintas dão também origem a comportamentos distintos para um mesmo *scaffold* e para um mesmo meio de cultura^[31]. Por este motivo, discutem-se de seguida os tipos de células mais comuns utilizadas em TE.

2.1.2 Fontes de Células

Para a produção de um tecido *in vitro*, torna-se necessária a ocupação da matriz fabricada com células, que por sua vez formarão uma matriz muito semelhante àquela encontrada no tecido original. Hoje em dia, as células mais utilizadas correspondem a células primárias, *i.e.*, células retiradas do próprio tecido do paciente, devido à sua disponibilidade e segurança^[32]. Os principais sucessos em TE dizem respeito à utilização destas células em conjunto com *scaffolds*, de modo a produzir o tecido que se deseja transplantar.

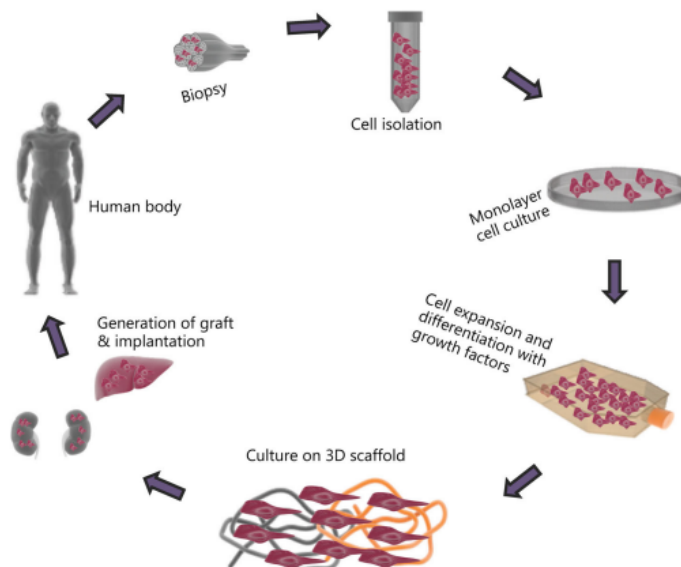


Figura 1: Materiais e processos necessários em TE [adaptado de ^[34]]

Esta estratégia apresenta algumas limitações, não só por causa da natureza invasiva do processo de recolha das células, mas também pela possibilidade de recolha de células em fases

terminais do seu ciclo de vida. Assim, a tendência em TE tem passado pela utilização de células estaminais, facto que deriva do potencial de divisão infinito e de múltipla diferenciação que apresentam^[33]. Destacam-se as células estaminais embrionárias (*Embryonic Stem cells, ESCs*) e as células estaminais mesenquimais (*Mesenchymal Stem Cells, MSCs*).

As ESCs recebem atenção devido à sua pluripotência e ao seu elevado potencial proliferativo, mas também à possibilidade de serem preservadas durante um período temporal (teoricamente) infinito. Este conjunto de características torna-as excelentes candidatas à aplicação em TE para a formação dos mais diversos tipos de tecido. Sabe-se hoje que, na presença de células precursoras, as ESCs possuem a capacidade de se diferenciarem para praticamente qualquer tecido pretendido. Foram já obtidas a partir de ECSs células de cardiomiócitos^[38], células hematopoiéticas^[39], células endoteliais^{[40],[41]}, neurónios^{[42],[43]}, aglomerados de condrócitos^[44], adipócitos^[45], hepatócitos^[46] e pancreáticos^[47]. Contudo, na ausência de diferenciação, o potencial proliferativo elevado torna-se uma propriedade indesejada, dando estas origem a teratomas e terocarcinomas quando injetadas *in vivo*^[27]. Assim, um dos passos cruciais aquando da utilização de ESCs diz respeito ao controlo do processo de diferenciação das células rumo ao tecido pretendido, processo que tem sido conseguido através da modificação de protocolos utilizados em BM-MSCs (*Bone Marrow MSCs*)^{[35],[36]}. O principal problema reside, contudo, na possibilidade de existência de incompatibilidade entre a ESCs de um dador e o paciente a ser injetado. Este impasse poderia ser ultrapassado com recurso à transferência nuclear de células somáticas (SCNT)^[37]. Este procedimento levanta, no entanto, ainda mais entraves do ponto de vista ético, que tendem a mostrar-se como os mais difíceis de serem ultrapassados.

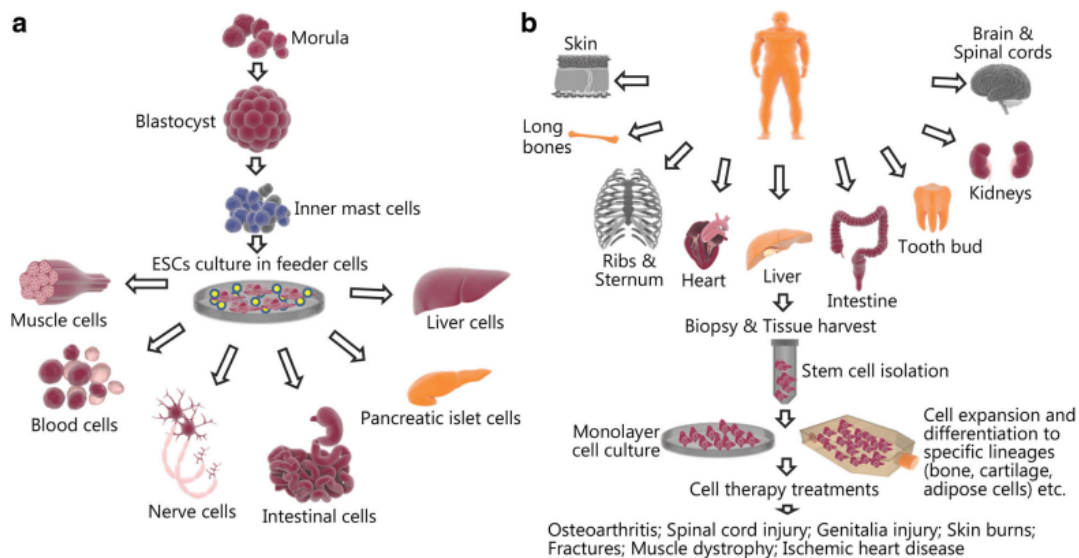


Figura 2: Procedimento de obtenção, cultura, e possíveis usos de células estaminais. **a.** Células estaminais embrionárias (ESCs); **b.** Células estaminais adultas (MSCs) [adaptado de ^[34]]

Quanto às MSCs, sabe-se hoje que este tipo de células existe não só na medula óssea, mas que podem também ser encontradas, por exemplo, no fígado, em tecido adiposo, na pele, em sangue do cordão umbilical, em leite materno, em fluido amniótico ou mesmo nos pulmões^[48]. Apesar de não serem pluripotentes, as MSCs continuam a apresentar um potencial de diferenciação elevadíssimo, enquanto afastam os problemas levantados pelas ESCs. Por este motivo, mostram-se como os candidatos prediletos em TE. Como forma de sustentação desta afirmação, pode focar-se a atenção sobre as BM-MSCs, que se mostraram

promissoras na regeneração de ossos^[49], cartilagem^[50], espinal medula^[51] e pulmões^[52], na cura de doenças como cirrose hepática^[53], síndrome de Asherman^[54], restabelecimento de audição^[55] e reconstrução de nervos periféricos^[55], entre outros. Além do elevado potencial de diferenciação, as MSCs possuem ainda a possibilidade de serem extensivamente expandidas *in vitro*; aponta-se ainda para uma possível existência de capacidade imuno-supressoras *in vivo*^[57]. Destaca-se que, à semelhança das ESCs, o conhecimento relativo aos mecanismos e vias ou estímulos biológicos/físicos que conduzem a determinada diferenciação é muito escasso, sendo este, de facto, o principal entrave à utilização mais amíúde de TE no ramo da medicina regenerativa.

Apesar dos progressos contínuos no que respeita à elaboração de tecidos *in vitro*, continua a observar-se que muitos métodos *in vivo* apresentam maior eficiência^[58]. Este facto prende-se com a existência de diferentes fatores de transcrição e epigenéticos, microRNAs e um microambiente celular distinto quando se comparam o caso *in vivo* e o ambiente criado para a cultura *in vitro*, sendo todos estes entidades que se apresentam fulcrais na definição da evolução comportamental da célula. Por este motivo, os meios de cultura tendem a utilizar um "cocktail" químico, que visa simular com a maior fidedignidade possível o ambiente químico a que estão originalmente sujeitas as células^[59].

2.1.3 Estimulação Elétrica enquanto Fator Sinalizante (*Signaling Factor, SF*)

Como se percebe, a evolução do comportamento celular depende fortemente de um conjunto de fatores bioquímicos e biofísicos, cuja ação conjunta acaba por regular todos os processos que lhe são inerentes, tais como o crescimento ou a diferenciação celular^{[23],[60]}. Apresenta-se de seguida uma visão muito geral da influência que tais processos podem ter para o comportamento apresentado pelas células.

No que à influência de biomoléculas diz respeito, é fulcral o papel dos fatores de crescimento (*growth factors, GF*), polipéptídeos capazes de estimular os mais diversos processos celulares, tais como a proliferação, migração, diferenciação ou a morfogénese multicelular no processo de desenvolvimento de tecidos^[61] (Tabela 1). A compreensão do efeito que exercem no comportamento celular apresenta-se, por este motivo, como um dos fatores centrais em TE. A influência que este tipo de biomoléculas, quando produzidas pelas células, exerce sobre as mesmas, não é novidade; contudo, quando utilizados em TE, os GF ficam sujeitos a um conjunto de condições distintas daquelas configuradas pelo ambiente *in vivo*, o que resulta em fenómenos de instabilidade molecular ou de difusão repentina^[61].

Assim, grande parte da investigação em TE é vocacionada à modelação da bioatividade e estabilidade dos GF a utilizar, e ao controlo dos moldes de interação entre estes e os biomateriais (*e.g.*, definição do tempo de exposição ao GF). É importante ainda notar que GF diferentes apresentam protocolos de aplicação e monitorização distintos. Por apresentar cada GF as suas próprias especificidades, exigências e limitações, e por, em muitos casos, o meio de cultura corresponder a um "cocktail" químico, torna-se, na prática, uma tarefa de elevada complexidade o *tracking* da influência específica de cada GF no comportamento celular^[62].

Tabela 1: GF utilizados em TE e respetivas funções [adaptado de ^[63]]

Fator de Crescimento	Abreviação	Função
Angiopoietin-1	Ang-1	Maturação e estabilidade de vasos sanguíneos
Angiopoietin-2	Ang-2	Desassociação de células endoteliais dos tecidos circundantes
Basic fibroblast growth factor-2	bFGF-2	Sobrevivência, migração e diferenciação de células endoteliais
Bone morphogenetic protein-2	BMP-2	Diferenciação e migração de osteoblastos
Bone morphogenetic protein-7	BMP-7	Diferenciação e migração de osteoblastos, desenvolvimento renal
Fibroblast growth factor	FGF	Desenvolvimento embrionário e angiogénese
Epidermal growth factor	EGF	Crescimento, proliferação e diferenciação de células epiteliais
Insulin-like growth factor-1	IGF-1	Proliferação celular e inibição de apoptose
Nerve growth factor	NGF	Sobrevivência e proliferação de células neuronais
Platelet-derived growth factor	PDGF	Desenvolvimento embrionário, proliferação, migração e crescimento de células endoteliais
Transforming growth factor- α	TGF- α	Proliferação de células neuronais ou basais
Transforming growth factor- β	TGF- β	Proliferação e migração de células osteogénicas, fator anti-proliferativo para células epiteliais
Vascular endothelial growth factor	VEGF	Sobrevivência, migração e proliferação de células endoteliais

A título exemplificativo de fatores físicos enquanto preponderantes para a definição do comportamento celular podemos tomar em linha de conta a estimulação mecânica ^[23]. Os estímulos mecânicos são percebidos pelas células através de um mecanismo denominado mecanotransdução - o estímulo aplicado desencadeia um conjunto de sinais elétricos nas células, dando origem a uma panóplia de respostas específicas^[64]. Sabe-se hoje que este processo é fulcral, por exemplo, para a diferenciação condrogénica de MSCs, bem como para a manutenção da integridade cartilaginosa. Além disto, a estimulação mecânica induz ainda a transferência de oxigénio, nutrientes e resquícios da atividade celular entre a ECM e o meio circundante, o que acaba por tornar indispensável, muitas vezes, a sua aplicação nos bio-reatores para o sucesso da produção de alguns tecidos *in vitro* (e.g., produção de cartilagem^{[23],[65]}).

O último SF a mencionar, e que se apresenta como pedra basilar da presente dissertação, diz respeito à estimulação elétrica (*Electrical Stimulation*, ES). Encontra-se hoje bem estabelecido que inúmeros processos biológicos, desde o desenvolvimento embrionário ao desenvolvimento e reparação de tecidos, passando pela diferenciação celular, se encontram fortemente dependentes da existência de processos bioelétricos. De facto, a bioeletricidade é considerada essencial na manutenção da homeostasia celular, por estar esta dependente de parâmetros físicos tais como o potencial de repouso da membrana, o fluxo de corrente iónica, a resistividade, capacitância ou permitividade, específicos de cada célula^[66].

Olhando para a ES enquanto ferramenta de TE, torna-se possível o controlo dos mais diversos processos celulares, através da aplicação de estimulação elétrica. Como exemplos, podem ser mencionados a estimulação dos processos de proliferação e diferenciação de células estaminais, o aumento do alinhamento celular ou a melhoria das propriedades contráteis de estruturas cardíacas^[67].

Embora estejam comprovados os benefícios que a ES é capaz de proporcionar (inclusive a nível clínico), o conhecimento do conjunto de mecanismos celulares despoletados pela aplicação de estímulos elétricos é ainda hoje muito embrionário. De facto, carece responder se os efeitos são exercidos de uma forma direta sobre a célula, ou se são as alterações provocadas no meio extracelular que desencadeiam os comportamentos observados^[2]. Mais ainda, é também possível que a alteração comportamental induzida pela aplicação de ES seja conflitante com a alteração comportamental ditada pela via bio-química; no caso de tal cenário se verificar,

sabe-se que o efeito introduzido pela ES tende a dominar, embora permaneça desconhecida a razão que assim o determina^[2].

Por seu lado, as células apresentam-se como a fonte energética *in vivo* por excelência, devido ao potencial de repouso da membrana que estabelecem^[67]. Alterações neste potencial tendem a causar movimentações de moléculas carregadas constituintes da membrana, conduzindo a alterações estruturais desta; esta alteração estrutural da membrana pode, por sua vez, conduzir ao rearranjar dos átomos de proteínas membranares. O conjunto de alterações introduzidas em ambas as estruturas acaba por ditar um conjunto distinto de respostas por parte das células^[2]. Por conveniência, apresentam-se na Figura 3 o conjunto de processos celulares e mecanismos que lhes estão subjacentes passíveis de serem despoletados pela aplicação de ES:

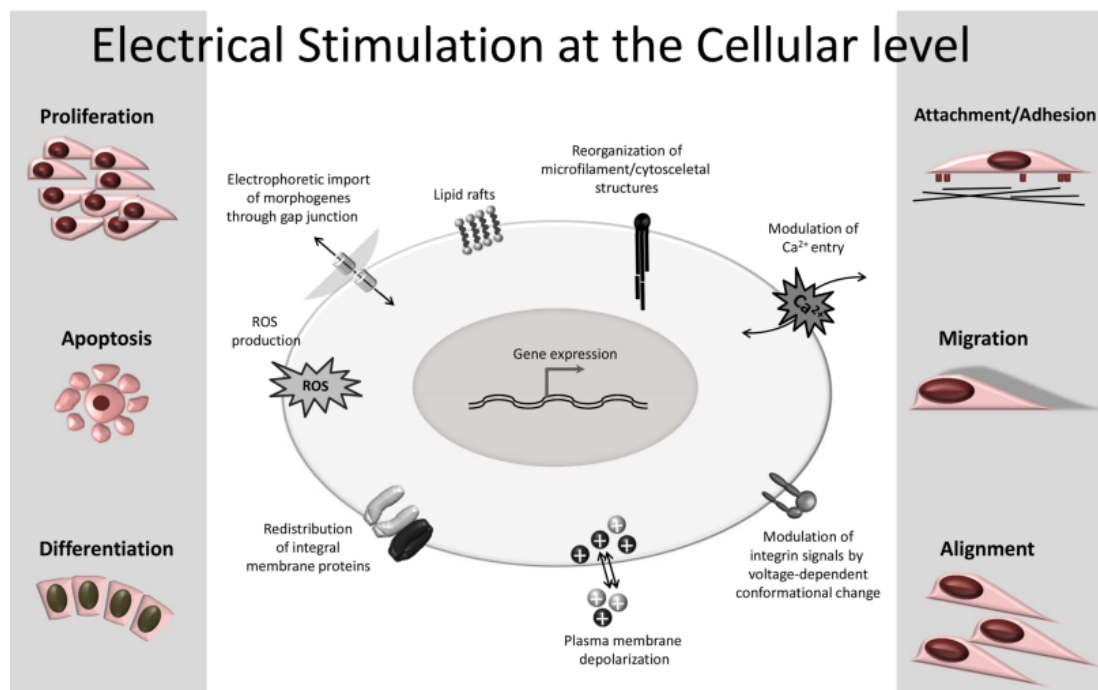


Figura 3: Mecanismos celulares e funções ativadas pela aplicação de ES [adaptado de ^[1]]

O aglomerar do conhecimento fornecido por vários estudos permite hoje conhecer em detalhe os efeitos desencadeados pela aplicação de ES. No que à proliferação diz respeito, a aplicação de estímulos elétricos externos mostra-se capaz de despoletar tanto uma promoção desta, como também uma diminuição, ou mesmo uma ausência de influência. Por este motivo, é imperativa a condução de estudos mais aprofundados^[2]. A tendência relativa à apoptose é praticamente idêntica, visto mostrar-se este processo altamente dependente do regime de estimulação e do próprio tipo de célula^[1]. Em grande parte dos estudos levados a cabo, refere-se que a ES se mostra também capaz de induzir a diferenciação de vários tipos de células distintas^{[2],[66],[68]}. No que concerne à adesão, migração e alinhamento (processos essenciais de serem controlados no desenvolvimento de tecidos), demonstrou-se também por largas vezes o papel que a ES pode ter nestes processos. Mais uma vez, os resultados obtidos encontram-se também dependentes do regime de estimulação e do tipo de células: para alterações introduzidas no estímulo ou na célula utilizada, os comportamentos variam desde o alinhamento paralelo/perpendicular das células em relação ao campo aplicado, bem como da migração em direção ao ânodo/cátodo.

De uma forma geral, percebe-se o potencial que a ES possui para o controlo dos processos

celulares, e o papel preponderante que pode ter no desenvolvimento de TE. Contudo, urge levar a cabo mais estudos relacionados à aplicação de ES, de uma forma mais precisa e metódica, a fim de perceber claramente o efeito que determinado tipo de estímulo pode ter na definição do comportamento de cada célula, num ambiente, também ele, de características (*e.g.*, composição química) bem especificadas^{[1],[66]–[68]}.

Quanto aos mecanismos celulares que estão na base dos comportamentos observados, existe também uma ausência de conhecimento concreto. Existe, contudo, um conjunto deles já avançados, e que vale a pena mencionar. As respostas observadas podem ter na sua gênese apenas um, ou mesmo um conjunto de todos eles, interdependentes e organizados de forma harmoniosa. Estes mecanismos podem estar associados a^{[1],[66]–[68]}:

- Vias de conversão de sinais. Através destas, o sinal elétrico sentido pelas células pode levar à produção de sinalizadores químicos, capazes de despoletar diversas cascatas de eventos e de expressar determinados genes, conduzindo a respostas diversas;
- Um aumento da concentração de Ca^{2+} no meio intracelular, que se apresenta como um importante mediador em processos celulares bem descritos;
- Uma reorganização do cito-esqueleto e re-distribuição de actina, influenciando processos controlados, *per natura*, pelo cito-esqueleto;
- Alterações introduzidas nos recetores presentes na membrana, influenciando os comportamentos celulares em que este tipo de estruturas intervêm;
- Alterações (normalmente, aumento) da taxa de produção de ATP, da taxa de produção de proteínas *Heat-Shock*, conduzindo muitas vezes a situações típicas do regime de *stress* celular; aumento da produção de espécies reativas com oxigénio, cuja participação é relevante em determinados *pathways*;
- Criação de estruturas fosfo-lipídicas (*e.g.*, *lipid rafts*), que intervêm ativamente como sinalizadores de múltiplos processos celulares

2.2 Aplicação de Estimulação Elétrica em TE

2.2.1 Métodos para Aplicação de Estímulos

Em TE, é comum a distinção entre três tipos de possibilidade no que concerne à aplicação de ES, que variam entre si pelo método que é utilizado para aplicação do estímulo - acoplamento direto (*direct coupling*, DC), acoplamento capacitivo (*capacitive coupling*, CC) e acoplamento indutivo (*inductive coupling*, IC)^[68].

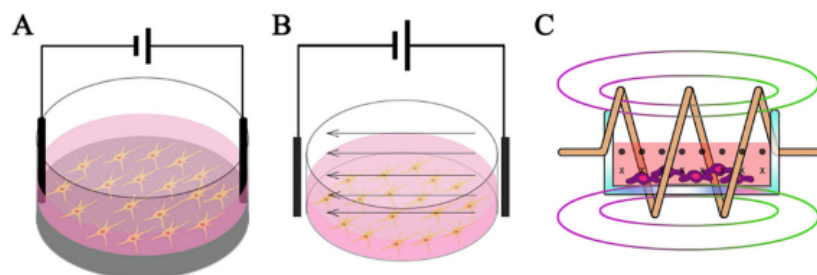


Figura 4: Três métodos para aplicação de ES: **A.** *coupling* direto; **B.** *coupling* capacitivo; **C.** *coupling* indutivo [adaptado de ^[68]]

No caso de DC, os elétrodos são colocados em contacto direto com o meio de cultura (Figura 4.a). O facto de ser aquele cuja aplicação se mostra mais fácil torna-o o mais amplamente utilizado na área. Decorre deste facilitismo, contudo, um conjunto de efeitos secundários indesejados, tais como a toxicidade dos elétrodos utilizados (na medida em que não se apresentam suficientemente biocompatíveis), o aumento da temperatura do meio de cultura e alterações significativas do seu pH, níveis de oxigénio reduzidos e a criação de produtos farádicos indesejados^{[68],[70]}. Mais ainda, aponta-se também que este método conduz à aplicação de estímulos adulterados (*i.e.*, distintos daqueles que se pretendem efetivamente aplicar), devido à formação de uma camada capacitiva^[71].

O *coupling* capacitivo apresenta-se, por sua vez, como um método mais seguro do ponto de vista biológico, na medida em que afasta a criação de produtos farádicos. Como se mostra na Figura 4B, são colocados dois elétrodos frente a frente, em lados opostos do suporte do meio de cultura, gerando-se entre os dois um campo elétrico uniforme. A natureza não invasiva deste processo permite afastar os problemas levantados no parágrafo anterior associados ao DC, ao mesmo tempo em que não requer a aplicação de um suporte condutor para aplicação de ES uniforme^[68]. Contudo, a necessidade de se estabelecerem tensões elevadas entre elétrodos limita, muitas vezes, a sua utilização numa escala mais ampla^[67].

A aplicação de IC (Figura 4.c) permite a criação de campos eletromagnéticos, gerados por bobinas colocadas em torno do meio de cultura. Afastando mais uma vez as desvantagens do DC, este método permite a criação de correntes e potenciais de intensidades reduzidas na área circundante das células, ao invés da aplicação de ES direta^[67]. Muitas vezes utilizados, os aparatos na configuração de Helmholtz permitem a criação de um campo eletromagnético com propriedades uniformes ao longo de todo meio de cultura celular. A variante mais utilizada denomina-se PEMF (*pulsed electromagnetic field stimulation*), em que a estimulação corresponde a pulsos, o que permite a reprodução das condições observadas *in vivo* (*e.g.*, potenciais gerados nos ossos, devidos à piezoelectricidade^[72]). Neste caso, as desvantagens prendem-se não só com a necessidade de aplicação de elevados potenciais para a produção de efeitos significativos, mas também com o consumo elevado de recursos, assim como com a necessidade de aplicação de estimulação durante períodos de tempo elevados^[73].

A Tabela 2 sumaria as principais vantagens e desvantagens associadas a cada método:

Tabela 2: Vantagens e desvantagens dos três métodos de aplicação de ES [adaptado de ^[68]]

Método	Vantagens	Desvantagens
<i>Coupling</i> direto	Facilidade de implementação	Bioincompatibilidade dos elétrodos, aumento de temperatura do meio de cultura, mudanças de pH, criação de subprodutos farádicos
<i>Coupling</i> capacitivo	Biologicamente seguro	Voltagens elevadas entre os elétrodos, elevado tempo de tratamento
<i>Coupling</i> indutivo	Reprodução do potencial de transferência do corpo humano	Tumorigénese em áreas inesperadas, dispendioso em recursos e tempo

2.2.2 Tipos de Estimulação Elétrica

O tipo de sinal mais simples de ser aplicado diz respeito a uma corrente DC, gerada, *e.g.*, com recurso a baterias^[74] - este estímulo corresponde a um fluxo unidirecional de portadores de carga, sendo também o tipo de estímulo elétrico mais observado *in vivo*^[75]. Por este motivo, apresenta-se como o tipo de estímulo mais aplicado em TE. Podem também ser aplicados estímulos mais complexos, como sinais sinusoidais, dente de serra ou quadrados, mono (DC) ou bifásicos (AC), injetados de uma forma contínua ou espaçada no tempo (regimes de pulsos ou *bursts*)^[67]. Estes sinais podem ter como origem geradores de sinais, chips estimuladores, ou

até sistemas terapêuticos dedicados^[76]. Por se distinguírem dos sinais unipolares, na medida em que as correntes geradas mudam constantemente de direção, os sinais AC têm também sido amplamente utilizados, quer para comparação direta com os efeitos induzidos pelos sinais DC, quer para recriação de campos elétricos endógenos^[69] (e.g, exposição dos neurónios a campos elétricos oscilantes^[77]).

Por se tratar de uma área que se propõe ao controlo de uma panóplia de processos associados ao comportamento celular, advém em TE uma necessidade de aplicação dos mais diversos regimes de ES, variáveis entre si quanto à intensidade dos campos elétricos a aplicar, duração da estimulação ou mesmo à frequência associada a um estímulo. Por esse motivo, é também imperativa a utilização de diversas fontes de energia, capazes de gerarem as intensidades de campo elétrico que se pretendem atingir. Até à data, reporta-se, por exemplo, a utilização de fontes DC para gerar correntes na gama de 0.0-0.3 mA e respetivos campos elétricos na gama 0-6 V/cm, fontes programáveis DC de 8 canais para obtenção de campos de intensidades de até 4.5 V/cm, ou a obtenção de campos elétricos na gama dos 0-10 V/cm com recurso à fonte de energia FB600 (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, USA), sendo esta extremamente comum em laboratórios que realizem eletroforese^[69]. No que concerne à medição e variação da corrente fornecida durante a estimulação, é comum a utilização de multímetros^[78]. Para a aplicação de campos elétricos AC, é comum a utilização de geradores de sinais que forneçam os dois tipos de corrente (e.g, Precision 4011A, *PASCO Scientific*, Roseville, CA, USA), sendo que a gama da componente AC se apresenta, regra geral, inferior à da DC (resultando em campos elétricos, regra geral, de intensidade 0-1 V/cm)^[69].

2.2.3 Eléttodos e Biotoxicidade

Como previamente mencionado, a própria estrutura dos métodos de CC e IC afasta o problema da biotoxicidade introduzida pelos eléctrodos, na medida em que não existe contacto entre estes e o meio de cultura. Enquanto que no caso de IC o eléctrodo propriamente dito é inexistente (o estímulo resulta do campo eletromagnético gerado nas imediações do meio de cultura com recurso a bobinas), no caso de CC a escolha de material é efetuada, garantindo que o eléctrodo se apresenta como bom condutor elétrico, com uma distribuição superficial de cargas idealmente uniforme e, se possível, de custo reduzido. Os materiais comumente utilizado para este tipo de eléctrodos (na verdade, placas de um condensador) são metais, como o aço inoxidável ou o ouro, ou o próprio carbono^[67].

Já na presença de DC, decorre a necessidade de desenvolver estratégias que permitam minimizar os efeitos adversos previamente mencionados. A primeira diz respeito ao posicionamento dos eléctrodos em recipientes, contendo uma solução de Steinberg ou uma solução tampão (*phosphate buffered saline*, PBS), evitando assim o contacto direto com o meio celular. O contacto elétrico do ânodo e cátodo com o meio celular é efetuado com recurso a pontes salinas (tubos plásticos ou de vidros, de comprimento 15-20 cm, cheios com uma solução de agarose, de concentração 2-4%)^[69].

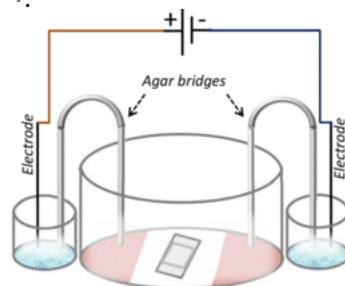


Figura 5: Esquema de ES com recursos a pontes salinas [adaptado de ^[1]]

Além de evitarem a criação de produtos farádicos na superfície de contacto eléctrodo-meio celular (*e.g.* iões metálicos), as pontes salinas impedem também o aquecimento do material biológico devido ao efeito de Joule. Relativamente ao material dos eléctrodos, existem exemplos na literatura em que se recorre ao alumínio^[79], ao carbono^[80], ao cobre^[81], à platina^[82] ou ao aço inoxidável^[83], embora sejam os eléctrodos de prata-cloreto de prata (Ag/AgCl) aqueles mais amplamente utilizados^[84]. A razão prende-se com o facto de serem os iões Cl^- a única espécie química envolvida nas relações eletroquímicas que decorrem na superfície dos eléctrodos, afastando a criação de subprodutos indesejados tipicamente a estes associados^[69].

Uma alternativa possível à utilização das pontes salinas diz respeito à criação de *scaffolds* condutores de electricidade (2D ou 3D), que além de cumprirem a função de suporte físico que lhes está comumente associada, albergam a possibilidade de atuarem como substratos bio-ativos capazes de fornecerem ES de uma forma uniforme e bem controlada^[67]. Até à data, os biomateriais metálicos dizem mais uma vez respeito à platina e ao ouro, devido à elevada resistência mecânica, estabilidade, boa condutividade e biocompatibilidade que ambos apresentam^[68]. Contudo, o facto de ambos serem facilmente oxidáveis e pouco resistentes à corrosão conduz, muitas vezes, ao aparecimento de fenómenos como alergias ou carcinogénese; têm sido avançadas estratégias que visam colmatar este problema, destacando-se a modificação das superfícies em contacto com o biomaterial através de revestimentos e conjugação covalente de moléculas bioativas^[85].

Podem ainda ser apontados outros biomateriais não metálicos que se apresentam promissores enquanto matéria prima de *scaffolds* passíveis de aplicar *per si* ES. Destacam-se os polímeros condutores, tais como o poli (3,4-etileno dioxitiofeno), a polianilina (*polyaniline*, PANI) ou o polipirrol (*PolyPyrrole*, PPY), utilizados em conjunto com outros materiais como o PLA, normalmente num rácio de 95:5^{[67],[68]}. Ultimamente, tem-se optado também pela exploração de materiais carbónicos, tais como o grafeno, nanotubos e aerogéis de carbono, devido às excelentes propriedades eléctricas que apresentam, embora a biocompatibilidade destes derivados seja ainda um desafio^[68].

A Tabela 3 apresenta esta informação de forma resumida, juntamente com a condutividade eléctrica associada a cada biomaterial mencionado:

Tabela 3: Biomateriais utilizados em *scaffolds* para aplicação de ES [adaptado de ^[68]]

Material	Formato	Condutividade Eléctrica	Vantagens	Desvantagens
Liga ouro-platina	Discos	Ouro: 4.52×10^7 S/m Platina: 9.6×10^6 S/m	Elevada resistência mecânica, estável, boa biocompatibilidade e resistente à corrosão	Dispendioso, morte celular causada pela libertação de iões
Ligas magnésio (Mg)	Discos	$\approx 2 \times 10^7$ S/m	Elevada resistência mecânica, resistente a fraturas e boa condutividade	Baixa biocompatibilidade, morte celular causada pela libertação de iões, mudanças locais de pH
PPY	<i>Coating</i>	$10^2 \sim 10^3$ S/cm	Boa biocompatibilidade, facilita a adesão e crescimento celular	Rígido e insolúvel
PANI	Filmes 2D	$5 \sim 10$ S/cm	Estável, baixo custo e boa biocompatibilidade	Baixa resistência mecânica e métodos de fabrico complexos

Material	Formato	Condutividade Elétrica	Vantagens	Desvantagens
Grafeno	<i>Coating</i>	$10^6 \sim 10^8$ S/m	Elevada resistência mecânica, facilidade de bio-funcionalização	Toxicidade moderada
Nanotubos de Carbono	<i>Doping</i> com outros materiais	1.8×10^7 S/m	Boa resistência mecânica, elasticidade e estabilidade química	Baixa biocompatibilidade, baixa dispersão, insolúvel e tóxico para as células

2.2.4 Gama de Parâmetros

Aquando da aplicação de ES, a intensidade e natureza da voltagem aplicada são, sem dúvida, os dois parâmetros que mais influenciam o comportamento celular observado. Apesar de a aplicação de estímulos DC ser extremamente eficaz na polarização de células, os efeitos adversos previamente discutidos que destes decorrem limitam a sua utilização, especialmente em regimes de aplicação de longa duração, visto tornarem-se a acumulação de produtos farádicos, resultantes das reações eletroquímicas nos elétrodos, e o efeito de Joule efeitos que não podem ser desprezados. Neste sentido, para aplicações que exijam intervalos de estimulação mais longos, a aplicação de estímulos AC mostra-se como a opção a ser adotada^[68]. Por outro lado, comportamentos como a migração celular, a orientação e a expressão de genes mostram-se amplamente dependentes da intensidade do campo elétrico, sendo que a aplicação de estímulos mais intensos se mostra como uma tendência benéfica em grande parte dos estudos^{[67],[81]} - Tabela 4. Deve ter-se sempre em conta que a aplicação de campo elétrico de elevada intensidade pode também conduzir à apoptose, pelo que o *threshold* máximo deve rondar os 100 V/cm, intensidade para a qual se assiste à *eletroporation*, com consequente entrada na membrana de uma elevada quantidade de iões Ca^{2+} e espécies altamente reativas com o oxigénio, conduzindo à completa desregulação da homeostasia.^{[88],[89]} Nos casos em que a aplicação de um campo elétrico de intensidade mais reduzida não é possível, deve optar-se pela aplicação de estímulos sob a forma de pulsos^[68].

Tabela 4: Comparação do efeito surtido pela ES para diferentes intensidades de campo elétrico [adaptado de ^[68]]

Intensidade do campo elétrico	Efeitos
0.00000048 V/mm	Osteoclastogénese reduzida, relativamente ao controlo e à aplicação de campos elétricos de maior amplitude ^[92]
0.0000006 V/mm	Redução da proliferação, mas aumento da atividade ALP em osteoblastos ^[93]
0.000002 V/mm	Inibição do crescimento celular de osteoblastos ^[94]
0.002 V/mm	Aumento da proliferação e da expressão do TGF-B1 em osteoblastos ^[95]
0.01 V/mm	Migração de fibroblastos a partir desta intensidade ^[96]
0.15 V/mm	Orientação de fibroblastos a partir desta intensidade ^[96]
0.4 V/mm	Elongamento de fibroblastos a partir desta intensidade ^[96]
6 V/mm	Aumento da mineralização, da proliferação e da atividade ALP em osteoblastos, relativamente ao controlo ^{[97],[98]}

Por sua vez, a intensidade da corrente que atravessa o biomaterial não parece apresentar-se como um fator de especial importância, visto observar-se a ocorrência de fenómenos tais como a deposição de ECM ou um aumento da proliferação para uma elevada gama de variação desta grandeza^[67] - de facto, esta apenas se mostra como um fator limitativo, na medida em que uma corrente acima de um limiar predefinido resulta em morte celular^{[67],[86],[87]}.

Em regime de aplicação de estímulos sob a forma de pulsos, deve adequar-se a largura do mesmo à densidade de corrente existente, visto existir um limite de energia máxima passível de ser absorvido pela célula, *i.e.*, a aplicação de um estímulo mais intenso exige uma menor duração associada^[86]. À data de redação da presente tese, a aplicação de estímulos de larguras variáveis entre 0.025-380 ms não se mostrou inconsequente, observando-se sempre algum efeito após aplicação de ES, nem causadora de dano celular^{[73],[86],[68]}.

No que concerne à gama de frequências, a literatura é díspar, existindo relatos da variação desta grandeza entre os 7.5-60000 Hz, embora a maioria corresponde à aplicação de estímulos abaixo dos 100 Hz^[68] - este facto deriva de ser este o valor máximo dos processos elétricos *in vivo*, sendo portanto o mais provável de fornecer os resultados pretendidos em TE^[87]. Sabe-se hoje que a aplicação de estímulos inferiores a 1 kHz influencia fortemente o ciclo celular, levando a um aumento da síntese de ADN e da proliferação^[90]. Para a formação de osso, avançam-se as frequências abaixo dos 100 Hz como as mais promissoras ^[91].

2.2.5 Necessidade de Uniformidade

A área de ES, no âmbito de TE, apresenta-se como plural e diversa por excelência, na medida em que existe um conjunto significativo de variáveis, todas elas sujeitas a variações e incertezas, passíveis de influenciar o produto final - tanto heterogeneidades no tipo de célula e meio de cultura utilizado, como nos GF, respetivas quantidades e composição química do mesmo meio, como no tipo de estímulo aplicado e no modo de aplicar essa estimulação, acabam por ditar resultados distintos relativamente aos tecidos a obter e aos comportamentos celulares observados. Deste modo, e como em todas as áreas científicas, torna-se necessária a quantificação precisa destas variáveis, a fim de mapear os efeitos produzidos por alterações a estas impostas, mas também de tornar replicáveis os procedimentos desenvolvidos, possibilitando a obtenção dos *outcomes* expectáveis para um conjunto de condições iniciais definidas, também elas, com um determinado nível de rigor.

Neste sentido, o mapeamento dos efeitos surtidos por aplicação de ES exige, desde logo, uma análise *ceteris paribus*, ou seja, um conjunto de condições iniciais em que se garante que todos os outros fatores passíveis de influenciar comportamentalmente das células, à exceção do campo eletromagnético a aplicar, se apresentem idênticos. Este ponto tem-se mostrado desde logo como praticamente impossível de ser verificado, visto que os *setups* experimentais desenvolvidos na área de ES são adaptados, obviamente, aos interesses específicos de cada caso concreto. Por exemplo, o artigo de revisão literária de Portelli *et. al*, 2017^[99], aponta, relativamente a investigações acerca dos efeitos de "*ELF magnetic field exposure on animal or human cellular calcium release, uptake, fluctuations, or homeostasis in vitro without the use of pharmacological inhibitors*", a existência de 33 conjuntos de condições iniciais distintas. No caso de estimulação CC de células osteogénicas, e após a aplicação de um conjunto de critérios de inclusão e de exclusão, Meneses *et.al*, 2022^[3] reportam a existência de 8 *setups* diferentes entre si, de um universo de 20 estudos distintos. Aliado a este facto, a literatura mostra-se também incompleta no que concerne à quantificação (e posterior inclusão da sua influência) de diversos outros parâmetros passíveis de introduzir variabilidade experimental, caso não sejam corretamente monitorizados^[99], *e.g.*, medição de gradientes de temperatura e vibração *in situ*, que introduzem efeitos biológicos quantificáveis^[100], são raramente fornecidos.

Relativamente aos campos eletromagnéticos propriamente ditos, é rara uma medição quantitativa destes, optando-se, na maioria das vezes, pela sua estimativa: "*In all these studies the E-Field values reported were calculated, not measured-* Meneses *et.al*, 2022; "*detailed experimental system descriptions were rare-* Portelli *et. al*, 2017. Cumulativamente, os valores reportados correspondem, regra geral, a sobre-estimativas, em parte pela utilização incorreta de conceitos físicos para estimativa da intensidade dos mesmos^[3]. Como se tal não fosse suficiente, a já

mencionada heterogeneidade de intensidades e frequências associadas aos sinais aplicados, decorrente da adaptação dos regimes de estimulação aos aparatos específicos de cada caso e aos resultados pretendidos torna extremamente difícil o estabelecimento de relações causa-efeito entre o regime de ES fornecido e os comportamentos observados, resultando na profunda incompreensão dos mecanismos que ditam esses mesmos comportamentos que continua a permear a área de TE.

Daqui se percebe a necessidade em existir um esforço da comunidade científica no sentido de uniformizar os regimes de ES aplicados, mas também um fornecimento detalhado das condições experimentais que se possam mostrar biologicamente relevantes. Esta é a única via a ser tomada caso se pretenda que observações consistentes, decorrentes de aplicação de ES a condições iniciais reproduzíveis e replicáveis, possam ser promovidas a conhecimento e a factos científicos aceites. Pode ainda acontecer que as incertezas associadas a determinados parâmetros ultrapassem níveis que permitam a reprodução fidedigna das condições a que é sujeito o biomaterial, o que se pode mostrar como uma fonte de dúvidas relativamente à qualidade dos resultados que são reportados e das relações causais que se pretendem estabelecer. Nesta perspectiva, é incontestável que um dos principais aspetos a ter em linha de conta relativamente a ES diz respeito à minimização de possíveis fontes de incerteza, e ao fornecimento de medidas concretas e rigorosas que permitam quantificar essas mesmas incertezas, de modo a permitir a reprodutibilidade das condições iniciais e a aplicação de regimes de estimulação idênticos, dentro dos limites desejados.

Assim, num futuro próximo, qualquer estudo que se proponha a postular a influência direta que determinado regime de ES surte em tecido celular específico, deve reconhecer *a priori* a complexidade associada ao comportamento celular e aos mecanismos que lhe são subjacentes, mas também ao papel que uma panóplia de fatores externos pode ter na sua definição. É este conjunto enorme de variáveis passíveis de ditar *outcomes* distintos que conduz a conceitos como a necessidade de comparar os resultados experimentais com aqueles fornecidos por simulações numéricas^[99]. Mais ainda, como forma de minimizar a incerteza associada aos campos eletromagnéticos a aplicar, a solução pode passar pelo *design* dos *setups* experimentais com recurso a abordagens numéricas^[3], permitindo antecipar os *ranges* de valores passíveis de serem assumidos por essas grandezas. Outra prática a ser assumida diz respeito à medição direta dos campos formados, e não à sua estimativa; caso tal não se mostre possível, pode proceder-se ao cálculo indireto destas grandezas, com recurso à medição de quantidades físicas que as permitam calcular (*e.g.*, cálculo de tensão aplicada e corrente ao longo do *setup*, em estudos CC^[3]). A uniformidade que pode decorrer de todos os pontos aqui levantados, caso estes sejam respeitados, mostrar-se-á como uma peça central na compreensão dos efeitos que a ES pode ter quando aplicada a tecido celular, possibilitando a redação de protocolos de estimulação que forneçam os resultados pretendidos, dando mais um passo rumo à incorporação dos biotécidos desenvolvidos *in vitro* em seres vivos.

3 Materiais e Métodos

3.1 Biorreator

Pelo facto de a presente dissertação estar inserida no âmbito dos projetos de investigação *FCT-Stimuli2BioScaffolds: Optimização de estímulos em BioScaffolds: da modelação numérica aos testes in vitro* (PTCD/EME-SIS/32254/2017) e *OptiBioScaffold: Optimização de estímulos em scaffolds bitecido: da modelação matemática e computacional à validação experimental* (PTCD/EME-SIS/4446/2020), o biorreator foi previamente disponibilizado.

Este corresponde a dois eléctrodos capacitivos formados por filmes de ITO PET (filmes de poliéster de $175 \mu\text{m}$ revestidos por óxido de índio e estanho), $33 \times 22 \text{ mm}$, separados entre si de 20 mm , que são colados a uma estrutura 3D impressa para o efeito com recurso a dimetil-polissiloxano (Sylgard Elastomer Kit, aplicado numa proporção de 10:1 (m/m) de base para endurecedor). A estrutura 3D é impressa com filamento C8 (3D4Makers, Holanda), e impressa com recurso a uma Ender 3 S1-Pro (Creality, Shenzhen, China). O espaço entre os eléctrodos é preenchido com um meio de cultura basal (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO™, Thermo Fisher Scientific), suplementado com 10% V/V de soro bovino fetal (FBS, GIBCO™, Thermo Fisher Scientific) e 1% V/V de penicilina-estreptomicina (pen-strep, GIBCO™, Thermo Fisher Scientific)), sendo a área de eléctrodo exposta igual a $20 \times 20 \text{ mm}$. Apresentam-se de seguida as vistas frontal e superior do biorreator, assim como as propriedades eléctricas de cada material constituinte do mesmo.

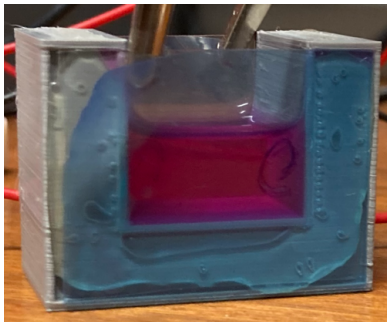


Figura 6: Vista frontal do biorreator



Figura 7: Vista superior do biorreator

Tabela 5: Propriedades eléctricas dos materiais constituintes do biorreator

Material	Propriedades
Meio de Cultura	Condutividade Eléctrica: $1.5 \text{ S} \cdot \text{m}^{-1}$ Permitividade Relativa: $80.1^{[102]}$
Eléctrodo - ITO	Condutividade Eléctrica: $10^6 \text{ S} \cdot \text{m}^{-1}$ Permitividade Relativa: $1^{[103]}$
Eléctrodo - PET	Condutividade Eléctrica: $10^{-21} \text{ S} \cdot \text{m}^{-1}$ Permitividade Relativa: $3^{[103]}$
Estrutura do Biorreator - C8	Condutividade Eléctrica: $10^{-21} \text{ S} \cdot \text{m}^{-1}$ Permitividade Relativa: $2.7^{[104]}$

3.2 Simulações Numéricas

Todas as simulações numéricas são levadas a cabo no *software* TINA-TI (Texas Instruments, Dallas, TX, EUA). Nas que concernem ao módulo de amplificação principal, constituído por 3 OPA462, é necessária a importação do modelo *Spice* para o TINA-TI, disponível em <https://www.ti.com/product/OPA462#design-tools-simulation>. Para cálculo das curvas

características de transferência AC e DC, utilizam-se todos os parâmetros predefinidos de análise. As simulações respeitantes ao pré-amp e à malha de retificação do sinal para injeção no Arduino seguem os mesmos parâmetros predefinidos. Os resultados simulacionais apresentados para o conjunto pré-amplificador e módulo de amplificação principal exigem a alteração da ordem de integração do método para 3.

3.3 Criação de GUI

A GUI desenvolvida corresponde a uma *Windows Forms App* escrita em C#, com recurso ao Microsoft Visual Studio (Microsoft, Albuquerque, NM, EUA). Dada a natureza *open-source* do projeto, é possível a obtenção da mesma mediante contacto com o autor da presente dissertação³.

3.4 Implementação Física do Estimulador

A implementação física do estimulador tem como base o gerador de sinais EVAL-AD9833 (Analog Devices, Wilmington, MA, EUA), cujo controlo é possível graças à placa EVAL-SDP-CB1Z (Analog Devices). Ao pino de saída do primeiro é ligado um adaptador SMB/SMA, seguido de mais um adaptador SMA/BNC, e finalmente de um adaptador BNC/CAT5. Deste último retira-se o sinal a injetar no pré-amp. O pré-amp corresponde a um OPA637 (Texas Instruments) de encapsulamento PDIP, utilizando-se em conjunto com este um condensador de tântalo $47 \mu F$, $6.3 V$ (Philips, Amesterdão, Países Baixos). O módulo de amplificação principal é constituído por 3 OPA462EVM (Texas Instruments), que operam em conjunto com um condensador $0.1 \mu F$, $400 V$ (Vishay, Malvern, PA, EUA). Para o potenciómetro utiliza-se um 3590S-2-104, $2 W$, $100 k\Omega$ (Bourns, Riverside, CA, EUA); como relé, opta-se pelo V23026-A1001-B201 (Siemens AG, Munique, Alemanha), e o díodo de retificação e Zener da malha de realimentação correspondem a um UF4007 (Vishay) e a um BZM55C4V7 (Vishay), respetivamente. Utiliza-se ainda um Arduino UNO (Arduino, Monza, Itália). Todo o conjunto pré-amp, amp e malha de retificação são montados numa *breadboard* RH-53 (K&H, Nova Taipé, Taiwan).

3.5 Determinação da Largura de Banda

A exequibilidade do conjunto gerador de sinais e circuito de amplificação escolhidos é testada com base na BW configurada pela implementação prática do conjunto. A qualidade da implementação parte da análise dos diagramas de Bode de magnitude e fase, sendo que os pontos experimentais que os configuram são obtidos com recurso a um osciloscópio digital MSO4022 (Rigol, Suzhou, China) através dos métodos que a seguir se descrevem.

3.5.1 Diagrama de Bode de Magnitude

Ao canal 1 do osciloscópio conecta-se o sinal à entrada do pré-amp, V_{in} , sendo o sinal a ser injetado nos elétrodos, V_{out} , conectado ao canal 2 do mesmo. É efetuado um varrimento em frequência, para $f \in [1, 50000] Hz$, obtendo-se a amplitude de V_{in} e V_{out} para todas as frequências. Para cada frequência, é guardada num dispositivo de armazenamento externo a forma de cada um dos sinais num ficheiro .CSV, a fim de efetuar posterior ajuste. O ajuste é efetuado para todos os sinais recuperados a uma função da forma $a \cdot \sin(bx + c) + d$, para a , b , c e d parâmetros do ajuste, segundo o método dos mínimos quadrados, a fim de retirar novo valor de amplitude. O valor final de amplitude apresentado corresponde à média dos valores dados pela medição direta no osciloscópio e pelo ajuste, sendo o erro associado dado pela soma em quadratura da incerteza associada a cada um dos valores.

³Email: hugo2311.ht@gmail.com

3.5.2 Diagrama de Bode de Fase

É conectado o sinal à entrada do pré-amp ao canal 1 do osciloscópio, enquanto que o sinal a ser injetado nos elétrodos é conectado ao canal 2. Efetua-se um varrimento em frequência, para $f \in [1, 100000]$ Hz, obtendo-se, para cada f , o desvio Δt [s] configurado por dois pontos de V_{in} e V_{out} em igual fase de oscilação. A conversão para o desvio de fase em graus é feita segundo a fórmula habitual

$$p_{shift}(\circ) = 360 \cdot \Delta t \cdot f \quad (1)$$

3.6 Campo Elétrico no Biorreator

Começa por se efetuar uma medição da impedância do biorreator com recurso ao circuito de *auto-balancing bridge* que se apresenta de seguida:

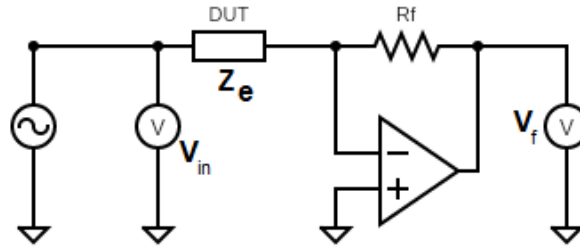


Figura 8: Circuito de *auto-balancing bridge*. DUT representa o dispositivo em teste (neste caso o biorreator), e V_{in} e V_f as tensões a amostrar para determinação de Z_e

Denominando por I_e a corrente através do biorreator e por I_f a corrente que flui através da resistência R_f , e lembrando que o op-amp opera mantendo a sua entrada inversora a GND, pode escrever-se

$$I_e = \frac{V_{in}}{Z_e} = I_f = \frac{V_f}{R_f} \quad (2)$$

, permitindo calcular o módulo da impedância do biorreator através de

$$|Z_e| = R_f \frac{V_{in}}{V_f} \quad (3)$$

O op-amp utilizado corresponde a um OPA637 (Texas Instruments) encapsulamento TO-99, utilizando-se para R_f resistências de valores $2 M\Omega$, $100 k\Omega$ e $10 k\Omega$ (diminui-se o valor de R_f à medida que diminui a impedância do elétrodo, de forma a obter maior precisão nas medições; regra geral, o valor de R_f deve estar compreendido entre $0.1 \times$ e $10 \times$ o valor do módulo da impedância a medir^[101]). V_{in} e V_f são amostrados nos canais 1 e 2 do osciloscópio, respetivamente, para um varrimento de frequências $f \in [10, 28000]$ Hz. Para cada frequência, adquirem-se dados para $V_{in} = \{10, 7.5, 5, 2.5, 1\}$ V. Obtido o módulo da impedância do biorreator para as diversas frequências, calcula-se a corrente I através do elétrodo para aplicação de uma tensão V ($I = V/|Z_e|$), sendo a magnitude do campo elétrico no meio de cultura $|E_{mc}|$ dada por

$$|E_{mc}| = \frac{|Z_{mc}|}{l_{mc}} I \quad (4)$$

, para $|Z_{mc}|$ e l_{mc} o módulo da impedância e a espessura do meio de cultura, respetivamente.

4 Resultados e Discussão

4.1 Projeto do Circuito de Amplificação

4.1.1 Campo Elétrico no Biorreator

Pelo facto de a presente dissertação estar inserida no âmbito dos projetos de investigação *FCT-Stimuli2BioScaffolds: Optimização de estímulos em BioScaffolds: da modelação numérica aos testes in vitro* (PTCD/EME-SIS/32254/2017) e *OptiBioScaffold: Optimização de estímulos em scaffolds bitecido: da modelação matemática e computacional à validação experimental* (PTCD/EME-SIS/4446/2020), ambos coordenados pela Professora Doutora Paula Pascoal-Faria, foi previamente disponibilizado o biorreator e meio de cultura aos quais o estímulo elétrico seria aplicado. Como avançado por *Meneses et. al, 2017, "o setup experimental pode ser modelado como um sistema multicamadas com geometria cilíndrica, com duas placas metálicas separadas do meio de cultura por isolantes elétricos (...)"*^[3]. Assim, recuperam-se de seguida as implicações mais relevantes que tal facto configura.

Neste tipo de geometria, o campo elétrico presente numa camada é uniforme, o que configura as seguintes expressões para a resistência, R_i , e capacitância, C_i , de uma qualquer camada i

$$R_i = \rho_i \frac{l_i}{A} \quad (5)$$

$$C_i = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r A}{l_i} \quad (6)$$

, onde ϵ_0 é a constante de permissividade do vácuo, e onde ρ , l_i , A e ϵ_r são, respetivamente, a resistividade, espessura, área de secção transversal cilíndrica e permissividade elétrica da camada em questão.

Resulta também que a corrente I que atravessa o sistema é, devido à conservação de carga, idêntica em todas as camadas, relacionando-se com a diferença de potencial V em cada camada através da lei de Ohm:

$$V_i = Z_i I \quad (7)$$

, onde Z_i é a impedância da camada i . Por sua vez, cada camada pode ser eletricamente modelada como uma resistência e um condensador em paralelo, resultando

$$\frac{1}{Z_i} = \frac{1}{Z_{R_i}} + \frac{1}{Z_{C_i}} \quad (8)$$

, para Z_R e Z_C a impedância de uma resistência e condensador genéricos. Sendo

$$Z_R = R \quad (9)$$

$$Z_C = \frac{1}{j\omega C} \quad (10)$$

, onde $j \equiv \sqrt{-1}$ e $\omega = 2\pi f$ representa a frequência angular do sinal sinusoidal aplicado ao sistema, $[f] = \text{Hz}$. Resulta, substituindo em (8), que

$$Z_i = \frac{R_i(1 - j\omega C_i R_i)}{1 + \omega^2 C_i^2 R_i^2} \quad (11)$$

Assim, todo o sistema pode ser visto como 5 circuitos RC em série, um por cada camada - Figura 9.a. No que concerne à impedância total, Z_{total} , esta é apenas a soma da impedância de cada camada,

$$Z_{total} = \sum_i Z_i \quad (12)$$

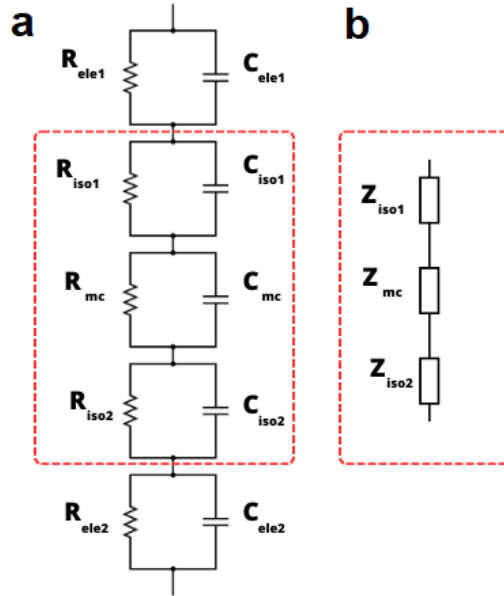


Figura 9: a. Modelo de circuito RC para as 5 camadas do biorreator; b. o circuito completo pode ser reduzido às suas três partes constituintes mais relevantes sem perda de exatidão. Legenda: ele-elétrodo, iso-isolante, mc-meio de cultura [adaptado de [3]]

Sabe-se ainda que a impedância dos elétrodos é extremamente reduzida, facto que deriva da elevada condutividade dos metais, pelo que a queda de potencial ao longo destes pode ser desprezada^[3] - Figura 9.b. Podemos recuperar a lei de Ohm para obter a corrente que flui no sistema em função da diferença de potencial aplicada entre elétrodos, ou seja

$$V = Z_{total} I \quad (13)$$

, o que permite ainda escrever (recuperando (7))

$$V_i = \frac{Z_i}{Z_{total}} V \quad (14)$$

Finalmente, a magnitude do campo elétrico na camada i é dada por

$$|E_i| = \frac{|V_i|}{l_i} = \frac{|Z_i|}{l_i} I \quad (15)$$

Como apontado na Secção 2.2.4, os campos elétricos a aplicar em TE devem poder alcançar magnitudes de 10000 V/m, enquanto que o sinal sinusoidal que lhes dá origem deve ter a sua frequência compreendida no intervalo de 7.5-60000 Hz. Assim, e utilizando o formalismo teórico até aqui apresentado, pode ser calculada a magnitude do campo elétrico existente no meio de cultura em função da área de secção do biorreator, da permitividade elétrica, condutividade elétrica e espessura de cada camada e da amplitude e frequência do sinal sinusoidal aplicado. Relembra-se que a condutividade σ se relaciona com a resistividade através de $\sigma = 1/\rho$. A Tabela 6 apresenta o cálculo da amplitude do sinal a injetar para obtenção de alguns valores típicos de magnitude do campo elétrico em TE, para o biorreator em questão.

Tabela 6: Cálculo da amplitude do sinal sinusoidal necessária para obtenção de campos elétricos típicos de TE no biorreator, para várias frequências, f . As células a vermelho representam amplitudes muito difíceis de obter na prática. Todos os valores estão em V(Volt)

$f[\text{Hz}]$	$ E [\text{V}/\text{m}]$			
	3×10^{-4}	5×10^{-2}	2	10^4
10	94.5	1.575×10^4	10^6	3.18×10^9
10^2	9.45	1.575×10^3	6.28×10^4	3.16×10^8
10^3	0.945	157.2	6.28×10^3	3.15×10^7
10^4	9.45×10^{-2}	15.12	628	3.15×10^6
6×10^4	1.575×10^{-2}	2.62	105	5.25×10^5

A análise rápida da Tabela 6 permite concluir desde já que o limite avançado para a ocorrência de eletroporação é, no caso do biorreator em questão, praticamente impossível de ser atingido para a gama de frequências dentro da qual o estimulador deve ser capaz de operar. Descarta-se a possibilidade de atingir a magnitude de campo elétrico necessária à ocorrência do fenómeno para o estimulador em questão, visto tal facto exigir, na prática, um dimensionamento completamente distinto - relembra-se que o estimulador deve ser o mais abrangente possível no que concerne a varrimentos de ganho e frequência de forma independente; caso se pretendesse observar-se o fenómeno de *eletroporation*, o estímulo a aplicar deveria ter origem numa onda sinusoidal de frequência bem mais elevada que o limite postulado.

Pretende-se, portanto, um varrimento em frequências que atinja um máximo de aproximadamente $f_{max} = 60$ kHz, e um varrimento em ganho que permita obter sinais sinusoidais com amplitudes de até $V_{max} = 150$ V .

4.1.2 Dimensionamento do Amplificador

Pretendendo alcançar um sinal sinusoidal com as características supra-mencionadas, torna-se imperativa a escolha de um amplificador capaz de produzir saídas de ± 150 V para frequências próximas dos 60 kHz. Após extensa pesquisa, optou-se pela utilização do OPA462 - a escolha justifica-se pelo suprir das exigências do projeto a um nível considerado satisfatório por um valor monetário relativamente baixo (≈ 20 €), não colocando em cheque a natureza *low-cost* embuída na génese da presente dissertação. Destacam-se da sua *datasheet*^[105] as seguintes características:

$$V_S = \pm 90 \text{ V}$$

$$I_O = \pm 45 \text{ mA}$$

$$A_{OL} = 135 \text{ dB}$$

$$GBWP = 6.5 \text{ MHz}$$

$$SR = 32 \text{ V}/\mu\text{s}$$

$$C_{LOAD} = 200 \text{ pF}$$

O primeiro parâmetro merecedor de destaque diz respeito à tensão de alimentação do OP-AMP, $V_S = \pm 90$ V. Obviamente que tal parâmetro configura, na prática, a impossibilidade de serem alcançados os ± 150 V desejados com um único amplificador. Contudo, e utilizando o mesmo amplificador de alta-tensão, existem métodos que permitem aumentar a gama da saída. Uma dessas soluções passa pela utilização de 3 OP-AMPs, com recurso a *bootstrapping*⁴, na configuração que a seguir se descreve.

⁴utilização do termo no sentido lato, significando apenas que se utiliza parte da saída como entrada de um mesmo sistema

Começamos por notar que, relativamente a GND, a magnitude de V_S pode exceder o valor máximo apresentado na *datasheet*, desde que a diferença de potencial entre os dois pinos de alimentação não exceda esse mesmo valor. De forma mais explícita, é possível alimentar o OP-AMP com $V_+ = 300$ v e $V_- = 120$ V, por exemplo, visto a diferença de potencial entre os dois pinos ser ainda de 180 V. Contudo, ao utilizar este tipo de configuração, é importante notar que tanto a entrada como a saída do circuito têm que estar contidas dentro da região de operação definida por essas mesmas tensões de alimentação, sob risco de dano permanente do amplificador. Assim sendo, pode ser utilizado o seguinte circuito:

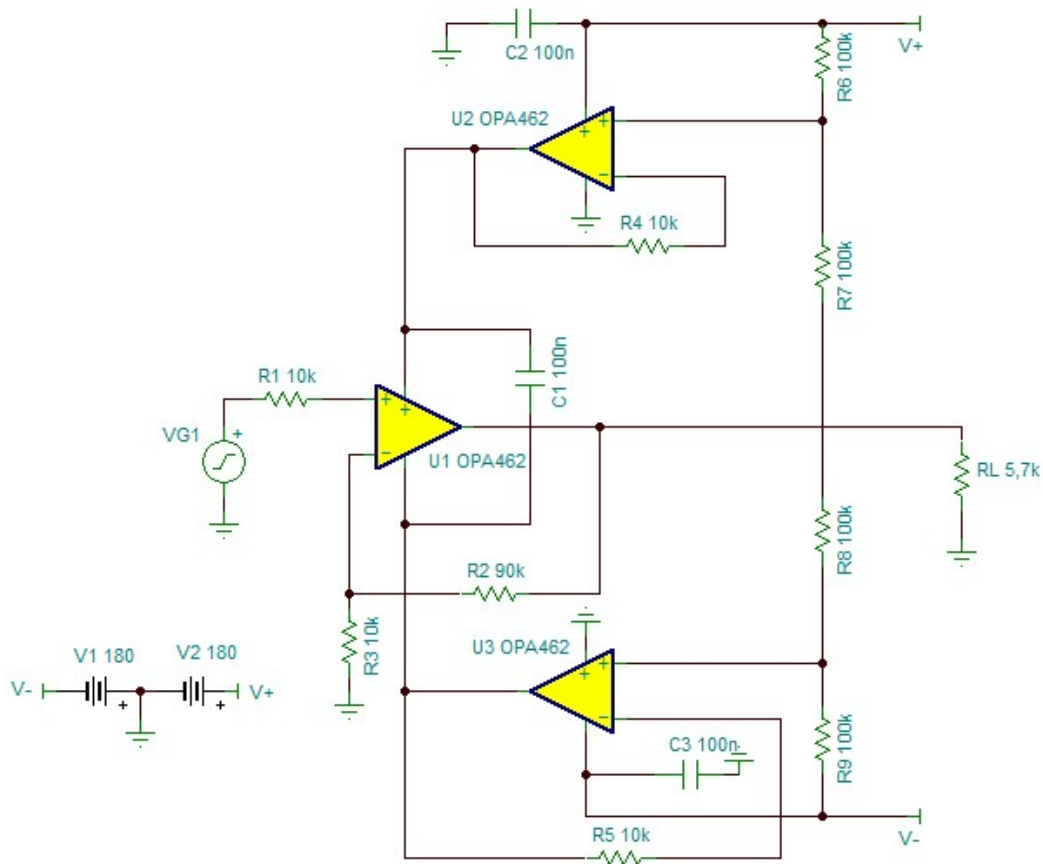


Figura 10: Solução para o amplificador de HV com utilização de três OPA462

O amplificador principal diz respeito a U1, e é responsável por amplificar o sinal de entrada aqui representado por VG1. Este encontra-se em configuração não-inversora, com uma malha de realimentação dimensionada para obter um ganho de 10 V/V. Relembre-se que, para a presente configuração, o ganho é simplesmente dado por

$$A_V = 1 + \frac{R_2}{R_3} \quad (16)$$

Os pinos de alimentação V_+ e V_- de U1 estão, por sua vez, conectados às saídas dos outros dois OP-AMPS, U2 e U3, que se encontram responsáveis por definir a gama de tensões de alimentação, e consequentemente o intervalo de magnitudes que podem ser assumidas pelo sinal a ser amplificado. No que concerne a U2 e U3, estes encontram-se configurados como seguidores de tensão, sendo essa tensão configurada pelos divisores de tensão (formados pelos pares R_6/R_7 e R_8/R_9) presentes entre o *output* de U1 e as tensões de alimentação externas (V_{S+}

no caso de U2, V_{S-} no caso de U3). Deste modo, para V_O o *output* de U1 e $V_{S_{+/-}}$ as tensões de alimentação externa do circuito, resulta para as suas tensões de alimentação V_+ e V_-

$$V_{+/-} = \frac{V_{S_{+/-}} - V_0}{2} \quad (17)$$

A equação anterior permite conceber o mecanismo através do qual o circuito possibilita alcançar saídas para lá dos ± 90 V postulados por um único OP-AMP: se U1 tentar fornecer, por exemplo, uma tensão à saída V_O para lá dos 90 V, o numerador de (17) garante que, por um lado, $V_+ < 90$ V e que, por outro, $V_- > -90$ V ; como o ponto de referência para definição de ambas as tensões é o mesmo (V_0), ocorre na prática um desvio vertical do intervalo de tensões de alimentação de U1, garantindo que a saída é sustentada. Podemos corroborar este raciocínio com recurso a uma simulação no TINA-TI.

Para o efeito, reproduz-se o circuito da Figura 10 no simulador. Apresentam-se de seguida os resultados da simulação para a injeção de um sinal sinusoidal de amplitude ± 15 V e frequência $f = 100$ Hz.

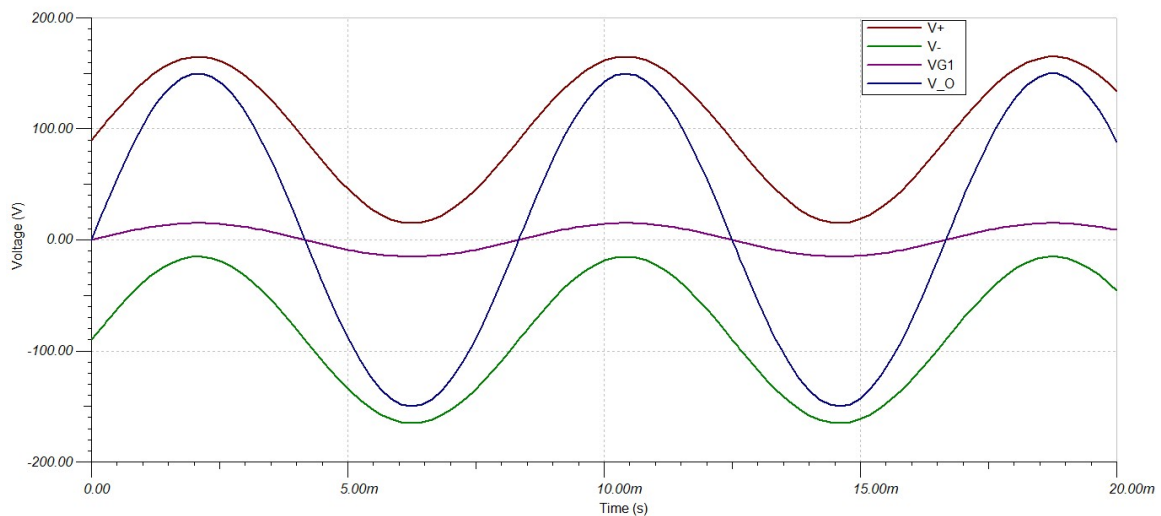


Figura 11: Tensões no circuito para injeção de sinal da forma $s(t) = 15 \sin(2\pi ft)$. $V_{+/-}$ representam, respetivamente, as tensões de alimentação do amp principal; VG1 diz respeito ao sinal injetado, enquanto que V_O corresponde ao sinal à saída do circuito de amplificação.

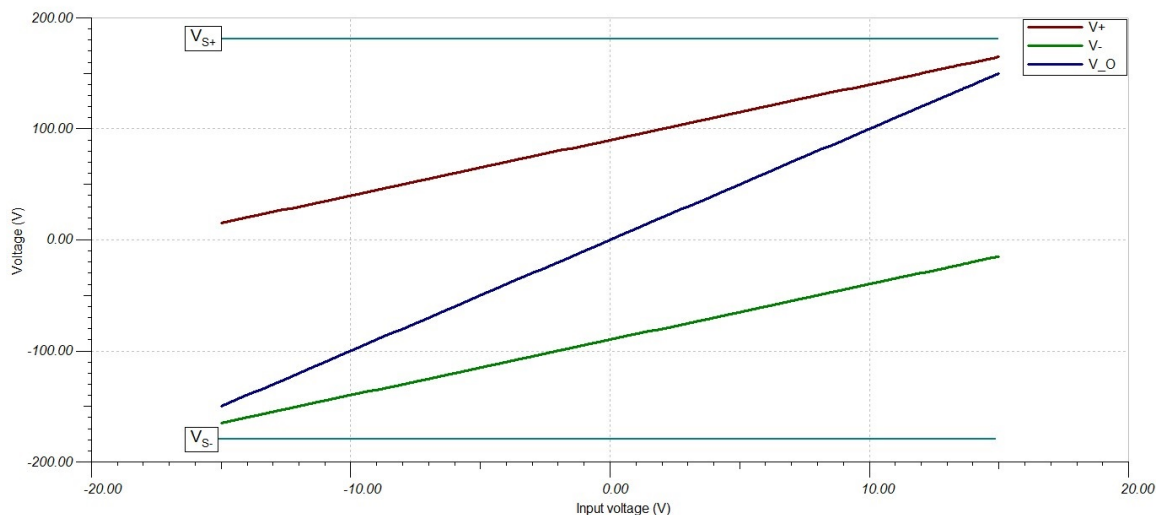


Figura 12: Curva característica de transferência DC para o circuito de 3 OP-AMPs, para o intervalo de $V_{in} \in [-15, 15]$ V - resultado da simulação.

Relativamente ao circuito dos três OP-AMPS, destaca-se ainda o papel do condensador de contorno C1, que garante tensões de alimentação mais estáveis a U1 pela filtragem de qualquer oscilação não desejada que esteja presente na saída de U2 e U3. O valor de 100 nF deriva apenas de resultados estáveis do circuito tanto em contexto simulacional como prático, não tendo existido nenhum dimensionamento específico para o componente em questão.

Afastado o problema das tensões de saída, podemos concentrar-nos na BW que o amplificador poderá configurar para o ganho escolhido (10 V/V). Recuperamos o valor do GBWP, que no presente caso assume o valor de 6.5 MHz. Resulta que

$$BW = \frac{GBWP}{Gain} = \frac{6.5 \text{ MHz}}{10} = 650 \text{ kHz}$$

, valor uma ordem de grandeza superior ao desejado. Contudo, tem que ser também tomado em linha de conta o valor de SR, para garantir uma saída com ausência de distorção. Para o OP-AMP em causa, e relembrando que, graças à configuração da Figura 10 é agora possível obter sinais à saída de amplitude $V_{max} = \pm 150 \text{ V}$, resulta

$$f_{max} = \frac{Slew \text{ Rate}}{2\pi V_{max}} = \frac{32}{2\pi \cdot 150 \times 10^{-6}} \approx 33954.06 \text{ Hz}$$

Este fator apresenta-se portanto como o mais impeditivo no que concerne à largura de banda BW passível de ser atingida pelo estimulador, resultando que

$$BW \approx 34 \text{ kHz}$$

4.1.2.1 Resistência de Carga e Corrente Pedida ao OP-AMP

Outro parâmetro a analisar diz respeito à corrente máxima que o OP-AMP é capaz de fornecer, que assume o valor de $I_O = \pm 45 \text{ mA}$. Para perceber a viabilidade de utilização do presente circuito de amplificação em conjunto com o biorreator disponível, é necessária a análise teórica da resistência de carga que este introduz. Mais ainda, e visto pretender-se também o varrimento em ganho por parte do estimulador (recordando que a amplitude do sinal de saída do amplificador é constante e igual a 150 V) será introduzido um potenciômetro à saída do módulo de amplificação como forma de controlar a tensão a ser injetada nos elétrodos:

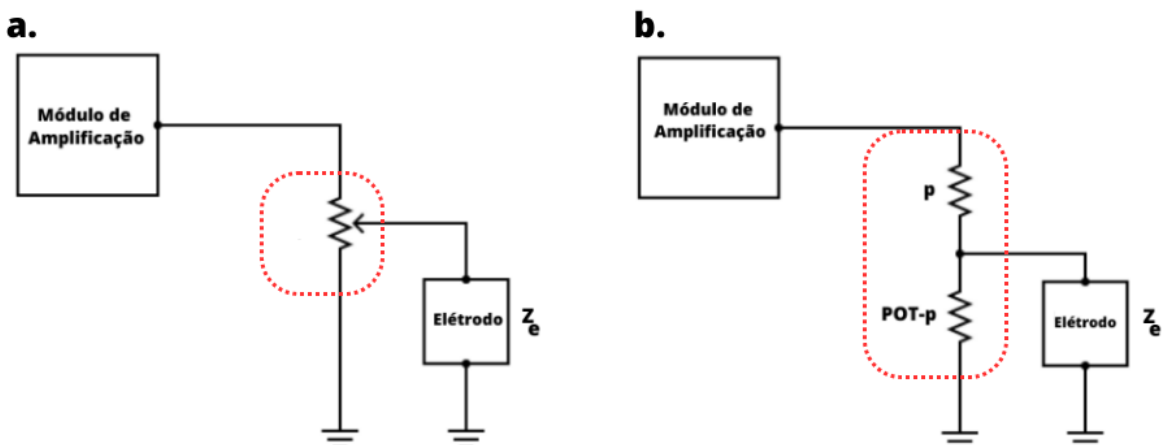


Figura 13: a. Representação esquemática da resistência de carga na saída do módulo de amplificação; b. Circuito equivalente, onde se visualiza o potenciômetro como duas resistências distintas. Legenda: POT-valor de resistência máxima do potenciômetro, p -valor da resistência assumida pelo potenciômetro, Z_e -impedância de um eléctrodo

Para p o valor de resistência a ser assumido pelo potenciômetro, pode ser feita a análise dos dois casos limite:

- no caso em que $p = 0 \Omega$,

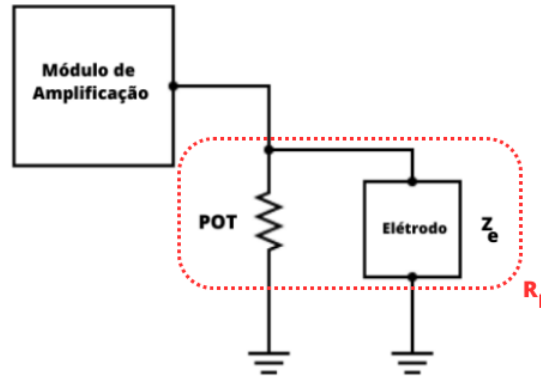


Figura 14: Cálculo da resistência de carga R_L para $p = 0 \Omega$. Resulta que $R_L = (Z_e \parallel \text{POT}) \implies I = V/R_L = 150/(Z_e \parallel \text{POT})$. Legenda: POT-valor de resistência máxima do potenciômetro, Z_e -impedância de um elétrodo

- no caso em que $p = \text{POT} \Omega$,

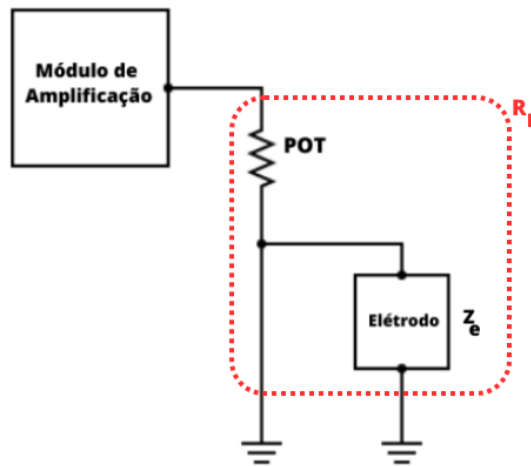


Figura 15: Cálculo da resistência de carga R_L para $p = \text{POT} \Omega$. Resulta que $R_L = \text{POT}$ (visto o elétrodo estar curto-circuitado). A implicação é que $I = V/R_L = 150/\text{POT}$. Legenda: POT-valor de resistência máxima do potenciômetro, Z_e -impedância de um elétrodo

Para $p \in [0, \text{POT}]$, a análise é mais complexa. O circuito da Figura 13 pode começar por ser interpretado como um divisor de tensão:

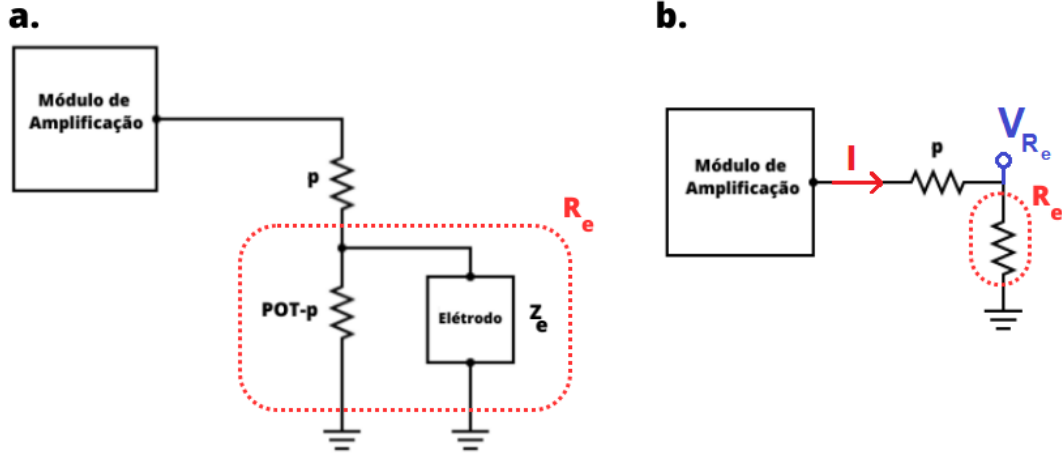


Figura 16: **a.** Pode ser definida a resistência equivalente $R_e = [(POT - p) || Z_e]$; **b.** Divisor de tensão. V_{R_e} representa a tensão ao longo de R_e e I a corrente pedida ao módulo de amplificação. Legenda: POT-valor de resistência máxima do potenciômetro, p -valor da resistência assumida pelo potenciômetro, Z_e -impedância de um eléctrodo

Relembra-se que Z_e é uma impedância complexa, podendo ser representada por $Z_e = |Z_e|e^{j\varphi}$. Resulta que

$$R_e = \frac{Z_e(POT - p)}{Z_e + POT - p} = \frac{|Z_e|(POT - p)[\cos\varphi + j \cdot \sin\varphi]}{|Z_e|(\cos\varphi + j \cdot \sin\varphi) + (POT - p)} \equiv \frac{\alpha}{\beta} \quad (18)$$

, onde

$$|\alpha| = |Z_e|(POT - p) \quad (19)$$

$$|\beta| = \sqrt{(|Z_e|\cos\varphi + POT - p)^2 + (|Z_e|\sin\varphi)^2} \quad (20)$$

$$\theta_\beta = \arctan\left(\frac{|Z_e|\sin\varphi}{|Z_e|\cos\varphi + (POT - p)}\right) \quad (21)$$

Podemos reescrever R_e como

$$R_e = \left|\frac{\alpha}{\beta}\right| e^{j(\varphi - \theta_\beta)} \quad (22)$$

Aplicando agora o divisor de tensão, e definindo a tensão ao longo de R_e como \vec{V}_{R_e} , a tensão à saída do módulo de amplificação como $\vec{V} = Ve^{j\omega t}$, e $Z = (p + R_e) \equiv \epsilon e^{j\gamma}$

$$\vec{V}_{R_e} = \vec{V} \frac{R_e}{p + R_e} = \vec{V} \left|\frac{\alpha}{\beta}\right| \frac{1}{\epsilon} e^{j(\varphi - \theta_\beta - \gamma)} = Ve^{j\omega t} \left|\frac{\alpha}{\beta}\right| \frac{1}{\epsilon} e^{j(\varphi - \theta_\beta - \gamma)} = \frac{V}{\epsilon} \left|\frac{\alpha}{\beta}\right| e^{j(\varphi + \omega t - \theta_\beta - \gamma)} \quad (23)$$

Como mencionado, $Z = (p + R_e) \equiv \epsilon e^{j\gamma}$, onde

$$\epsilon = \sqrt{\left(\left|\frac{\alpha}{\beta}\right|\cos(\varphi - \theta_\beta) + p\right)^2 + \left(\left|\frac{\alpha}{\beta}\right|\sin(\varphi - \theta_\beta)\right)^2} \quad (24)$$

$$\gamma = \arctan\left(\frac{\left|\frac{\alpha}{\beta}\right|\sin(\varphi - \theta_\beta)}{\left|\frac{\alpha}{\beta}\right|\cos(\varphi - \theta_\beta) + p}\right) \quad (25)$$

Finalmente, vem

$$V_{R_e} = Re[\vec{V}_{R_e}] = \frac{V}{\epsilon} \left| \frac{\alpha}{\beta} \right| \cos(\varphi + \omega t - \theta_\beta - \gamma) \quad (26)$$

$$\vec{I} = \frac{\vec{V}_{R_e}}{R_e} = \frac{V}{\epsilon} \left| \frac{\alpha}{\beta} \right| e^{j(\varphi + \omega t - \theta_\beta - \gamma)} \cdot \left| \frac{\beta}{\alpha} \right| e^{-j(\varphi - \theta_\beta)} = \frac{V}{\epsilon} e^{j(\omega t - \gamma)} \quad (27)$$

$$I = Re[\vec{I}] = \frac{V}{\epsilon} \cos(\omega t - \gamma) \quad (28)$$

Sendo característica desejável do estimulador a possibilidade de existirem várias saídas idênticas, a corrente pedida pela introdução de n elétrodos em paralelos pode ser calculada de forma quase instantânea após o formalismo até aqui desenvolvido. O primeiro passo será definir uma nova resistência equivalente R'_e :

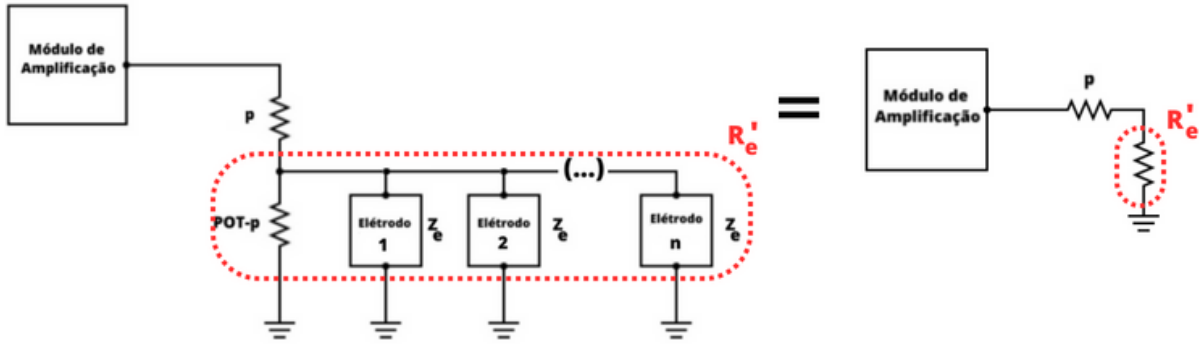


Figura 17: Introdução da resistência R'_e para n elétrodos. Legenda: POT-valor de resistência máxima do potenciômetro, p -valor da resistência assumida pelo potenciômetro, Z_e -impedância de um elétrodo

Resulta que

$$R'_e = [(POT - p) \parallel Z_{e_1} \parallel Z_{e_2} \parallel (\dots) \parallel Z_{e_n}]$$

No presente caso, todos os elétrodos são idênticos, pelo que vem

$$R'_e = \frac{|Z_e|(POT - p)[\cos\varphi + j \cdot \sin\varphi]}{|Z_e|[\cos\varphi + j \cdot \sin\varphi] + n \cdot (POT - p)} \quad (29)$$

Assim, a introdução de n elétrodos apenas implica a redefinição dos valores de $|\beta|$ (equação (20)) e de θ_β (equação (21)) como

$$|\beta'| = \sqrt{(|Z_e|\cos\varphi + n \cdot (POT - p))^2 + (|Z_e|\sin\varphi)^2} \quad (30)$$

$$\theta'_\beta = \arctan\left(\frac{|Z_e|\sin\varphi}{|Z_e|\cos\varphi + n \cdot (POT - p)}\right) \quad (31)$$

Apresentam-se de seguida os resultados para o potenciômetro em uso e o biorreator em questão, para a utilização de até 10 elétrodos. Na determinação dos resultados, tem-se em conta o valor mais alto de tensão passível de ser atingido pelo estimulador, assim como a utilização de uma frequência de $f \approx 28$ kHz (frequência máxima de funcionamento), visto ser esta a combinação de parâmetros que configura maior corrente pedida ao módulo de amplificação, segundo (28).

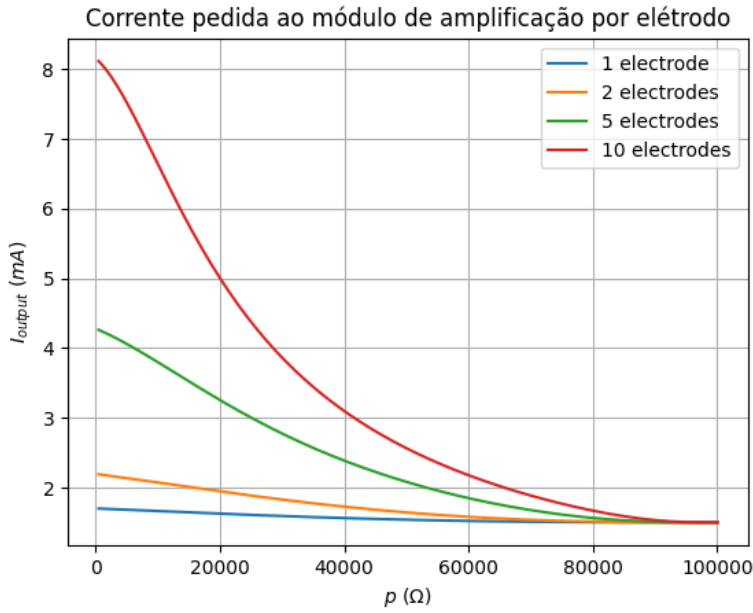


Figura 18: Corrente pedida ao OP-AMP pelo conjunto potenciômetro + n eletrodos como função do valor do potenciômetro, p , com $n_{max} = 10$. Utiliza-se $Z_e = 16.32 - j \cdot 5.237 \times 10^5 \Omega$ para cálculo das curvas

Relembrando que $I_O = \pm 45$ mA, conclui-se a possibilidade de utilização do OPA462 para alimentação do biorreator em uso. De facto, e efetuando o cálculo para o potenciômetro em uso, para um número n de eletrodos idêntico àquele disponível, o OP-AMP apenas deixa de conseguir fornecer corrente ao conjunto para $n = 56$, o que vai muito além do número de *outputs* idênticos de um estimulador comum.

É ainda imperativo perceber os limites do potenciômetro em uso, especialmente no que se refere à corrente máxima que pode o pode atravessar. Num circuito AC, a potência complexa \vec{S} é dada por (subcapítulo 11.6 de ([108])):

$$\vec{S} = \frac{V_{rms}^2}{Z^*} \quad (32)$$

, onde Z^* é o complexo conjugado da impedância. No presente caso, já vimos que $Z = (p + R_e) \equiv \epsilon e^{j\gamma}$, resultando

$$\vec{S} = \left(\frac{V}{\sqrt{2}} \right)^2 \frac{1}{\epsilon e^{-j\gamma}} = \frac{V^2}{2\epsilon} e^{j\gamma}$$

A potência real é

$$P = \text{Re}(\vec{S}) \equiv V_{eff} I_{eff} \cos(\theta_V - \theta_I) \quad (33)$$

Neste caso, resulta, pela definição de potência real

$$P = \frac{V^2}{2\epsilon} \cos\gamma = \frac{V}{\sqrt{2}} \frac{I}{\sqrt{2}} \cos\gamma$$

, o que implica que

$$I_{max\text{potentiometer}} = \frac{2P}{V} \frac{1}{\cos\gamma} \quad (34)$$

O potenciômetro em uso apresenta $P = 2 \text{ W}$, logo $I_{max_{potentiometer}} \approx 26.67 \text{ mA}$, valor inferior à corrente máxima fornecida pelo módulo de amplificação, concluindo-se que o presente potenciômetro apenas pode ser utilizado em conjunto com 32 elétrodos.

4.1.2.2 Capacitância Introduzida pelos Elétrodos

A introdução de elétrodos à saída do módulo de amplificação introduz também uma capacitância não desprezável. Resta saber se o OP-AMP possui capacidade para alimentar essa mesma capacitância. Recuperando a Figura 9.a, resulta que, para um único eletrodo ($C_{iso1} = C_{iso2} = C_{iso}$),

$$\frac{1}{C_{electrode}} = \frac{1}{C_{iso1}} + \frac{1}{C_{mc}} + \frac{1}{C_{iso2}} \implies C_{electrode} = \frac{C_{iso}C_{mc}}{2C_{mc} + C_{iso}} = 4.73 \text{ pF} \quad (35)$$

A utilização de n elétrodos em paralelo apenas configura um conjunto de capacitâncias em paralelo, resultando para a capacitância total

$$C_{load} = n \cdot C_{electrode} \quad (36)$$

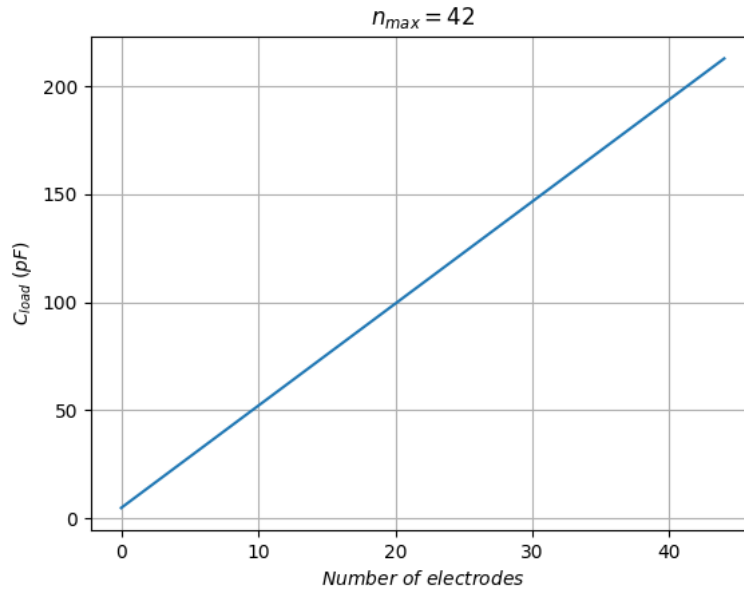


Figura 19: C_{load} vs. n . Como supra-mencionado, $C_{LOAD} = 200 \text{ pF}$. No que à capacitância diz respeito, o OPA462 poderia alimentar até 42 elétrodos em paralelo. Contudo, lembrando o resultado obtido na seção prévia, conclui-se que a potência do potenciômetro em uso limita este número a um máximo de 32.

4.1.3 Dimensionamento do Pré-Amplificador

Para a escolha e dimensionamento do pré-amplificador (*abv.* pré-amp) existe também uma panóplia de requisitos que têm que ser cumpridos. Para além do baixo custo, é imperativo garantir que este tem a capacidade de amplificar o sinal original até uma tensão de $\pm 15 \text{ V}$, de forma a alimentar o circuito amplificador de alta-tensão para obtenção dos $\pm 150 \text{ V}$ à saída do mesmo. Ao mesmo tempo, o pré-amp deve ser também capaz de garantir a ausência de distorção do sinal para a gama de frequências a utilizar. Ponderando todos estes fatores, a escolha recaiu sobre o OPA637 ($\approx 92 \text{ €}$), cujos parâmetros mais relevantes, com origem na *datasheet*^[106], são apresentados de seguida:

$$V_S = \pm 15 V$$

$$GBWP = 80 MHz$$

$$A_{OL} = 120 dB$$

$$SR = 135 V/\mu s$$

O pré-amp é utilizado em configuração não inversora:

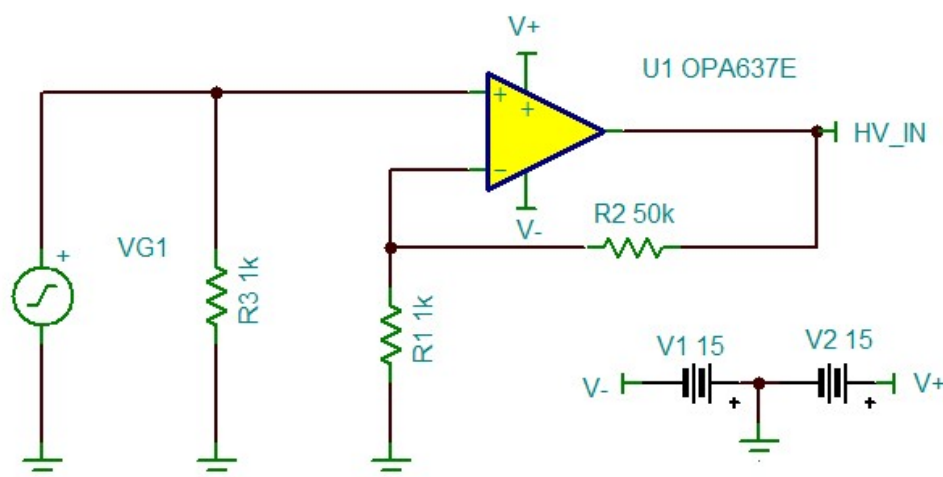


Figura 20: Circuito do pré-amplificador

A escolha dos valores das resistências da malha de realimentação tem obviamente em conta a necessidade de ser obtido um ganho específico. No presente caso, o sinal sinusoidal é gerado por um AD9833. Consultando a página 12 da *datasheet* do componente em questão^[107], percebe-se que a tensão da saída do gerador de sinais se situa por volta dos $0.6 V_{pp}$, ou seja, amplitude de $0.3 V$, o que implica um ganho de $50 V/V$.

Com o ganho em malha fechada de $50 V/V$, resulta para a frequência de corte f_c do pré-amp

$$f_c = \frac{GBWP}{Ganho} = \frac{80 \times 10^6 MHz}{50 V/V} \approx 1.6 MHz$$

A BW configurada apresenta-se bastante superior à pretendida pelo estimulador, pelo que se prossegue o dimensionamento. Na presença de *feedback*, a frequência de corte do amplificador para ganho em malha aberta, f_0 , é alterada segundo

$$f_c = f_0(1 + A_{OL} \cdot \beta) \quad (37)$$

, onde β é o fator de realimentação da malha de *feedback*. Calcula-se f_0 através do ganho em malha-aberta,

$$f_0 = \frac{GBWP}{A_{OL}} = \frac{80 \times 10^6 MHz}{10^6 V/V} = 80 Hz$$

, o que permite, por sua vez, calcular β . Rearranjando (37) resulta

$$\beta = \left(\frac{f_c}{f_0} - 1 \right) \cdot \frac{1}{A_{OL}} \approx 0.019999 \quad (38)$$

Para a configuração utilizada, tem-se que

$$\beta = \frac{R_1}{R_1 + R_2} \quad (39)$$

Escolhendo $R_1 = 1 \text{ k}\Omega$, vem que $R_2 = R_1(1/\beta - 1) \approx 49 \text{ k}\Omega$. R_3 está presente no circuito para eliminar as correntes de polarização I_B , relacionadas com a saída do pré-amp V_O através de

$$V_O = I_B[(1 + R_2/R_1)R_3 - R_2] \quad (40)$$

Tal implica garantir V_O nulo, resultando que

$$R_3 = \frac{R_1 R_2}{R_1 + R_2} \quad (41)$$

No caso do presente dimensionamento, $R_3 = 980 \Omega$.
Relativamente ao SR do pré-amp, basta verificar que

$$f = \frac{SR}{2\pi V} = \frac{135 \times 10^6}{2\pi \cdot 15} \approx 1.38 \text{ MHz}$$

, limitando f_c a este valor ao invés dos 1.6 MHz previamente avançados.

Para corroborar o correto dimensionamento, apresentam-se mais uma vez os resultados obtidos com o TINA-TI, para simulação do circuito da Figura 20, para frequências da fonte $f = 10 \text{ Hz}$ e $f = 60 \text{ kHz}$:

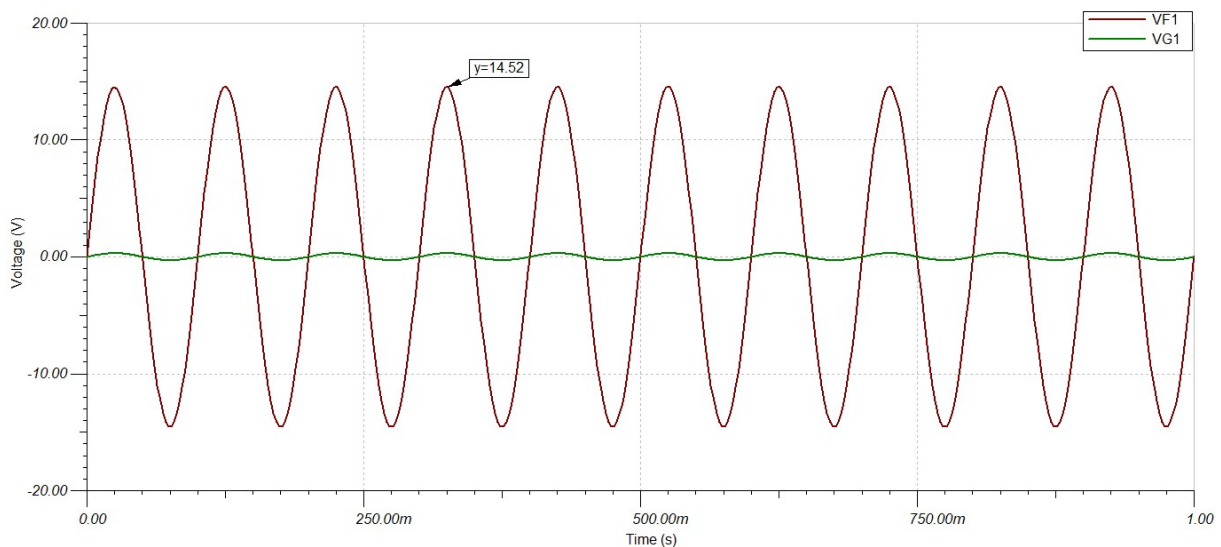


Figura 21: Resultados da simulação para $f = 10 \text{ Hz}$ e $V_{in} = 300 \text{ mA}$. VG1 e VF1 são, respetivamente, o sinal injetado na entrada não-inversora do pré-amp e o sinal à saída do mesmo.

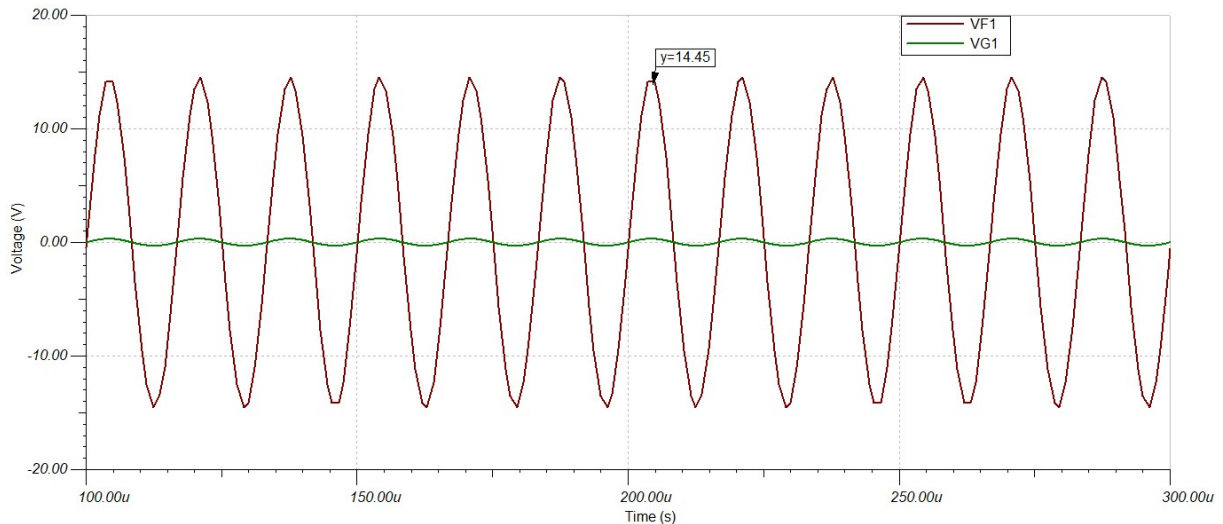


Figura 22: Resultados da simulação para $f = 60 \text{ kHz}$ e $V_{in} = 300 \text{ mA}$. V_{G1} e V_{F1} são, respetivamente, o sinal injetado na entrada não-inversora do pré-amp e o sinal à saída do mesmo.

A análise dos resultados simulacionais permite observar uma discrepância de $0,48 \text{ V}$ para $f = 10 \text{ Hz}$ e de $0,55 \text{ V}$ para $f = 60 \text{ kHz}$ entre as amplitudes de 15 V pretendidas e aquelas obtidas em ambos os casos. Contudo, relembra-se que, por se tratar de uma simulação numérica, existem sempre erros de arredondamento inerentes à mesma, que podem em última instância conduzir à diferença observada. Estes arredondamentos podem ser observados de forma clara após uma análise mais atenta da Figura 22, onde se nota a definição de picos com formas ligeiramente distintas, fenómeno indicativo dessas mesmas aproximações aquando da resolução dos sistemas de equações que permitem observar a saída em causa. Além do mais, durante todo o dimensionamento, existem também arredondamentos no cálculo das resistências necessárias, que podem contribuir para o comportamento observado nas figuras. Relembra-se que a etapa simulacional apenas pretende confirmar o dimensionamento correto, não podendo ser interpretada como uma representação correta da realidade pelos simples facto de não acautelar todo o tipo de fenómenos que nesta se processam, *e.g.* a alteração do ganho como função da temperatura. Por este motivo, e pela facilidade em corrigir esta pequena alteração face ao postulado teórico aquando da implementação física do circuito de pré-amplificação (através da substituição da resistência de realimentação R_2 por uma de valor ligeiramente maior), considera-se o dimensionamento como correto e prossegue-se para a próxima etapa.

4.1.3.1 Acoplamento com o Gerador de Sinais e com o Estágio de HV

O gerador de sinais em uso apresenta um *offset* DC não desprezável relativamente a GND, pelo que é necessário garantir que o fenómeno é suprimido. Tal pode ser alcançado recorrendo ao condensador de acoplamento, alterando o circuito do pré-amp para

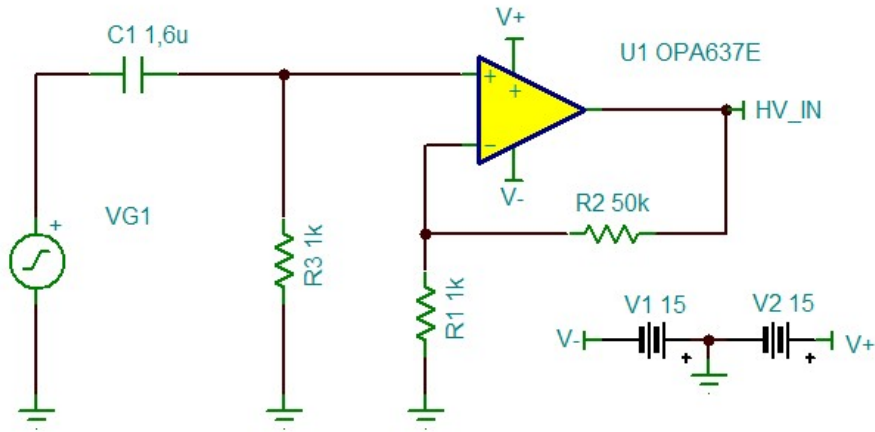


Figura 23: Inclusão de um condensador de acoplamento no pré-amp para remoção do *offset* DC introduzido pelo AD9833

O valor do condensador C_1 tem em conta que a frequência de *cut-off* f_l ocorre para

$$X_C = \frac{1}{2\pi f_l C} = R_3 \implies C = \frac{1}{2\pi f_l R} \quad (42)$$

Como $R_3 = 980 \Omega$ e pretendemos $f_l \approx 10 \text{ Hz}$, resulta que $C_1 \approx 1.62 \mu\text{F}$.

Para a conexão do *output* do pré-amp com o *input* do estágio de HV, a mesma metodologia é seguida. Trata-se agora de calcular a resistência de entrada do circuito de HV. Relembrando a Figura 10, percebe-se que o amplificador está mais uma vez em montagem não inversora, pelo que a sua resistência de entrada R_{if} vem

$$R_{if} = R_i(1 + A_{OL}\beta) \quad (43)$$

, onde R_i diz respeito à resistência de entrada na ausência de *feedback* e β ao fator de *feedback*. Como $R_i = R_S + R_{id} + (R_1 || R_2)$, onde R_S , R_{id} e R_1 e R_2 são, respetivamente, a resistência de entrada do sinal, a resistência de entrada diferencial do amp e as resistências constituintes da malha de realimentação, e como $(1 + A_{OL}\beta) \equiv A_{OL}/A_f$, resulta que

$$R_{if} = \left[10 \text{ k}\Omega + 10^{13} \Omega + \frac{90 \text{ k}\Omega \cdot 10 \text{ k}\Omega}{90 \text{ k}\Omega + 10 \text{ k}\Omega} \right] \frac{135 \text{ dB}}{10 \text{ V/V}} \approx 10^{13} \Omega$$

O cálculo do condensador de acoplamento entre os dois estágios, C_C , é também efetuado recorrendo a (42), resultando, para $f_l = 10 \text{ Hz}$ $C_C \approx 2.6 \times 10^{-15} \text{ F}$; contudo, e visto o valor ser tão baixo (e impossível de implementar na prática) a necessidade de utilização do mesmo condensador de acoplamento é descartada.

Finalmente, resulta para o circuito de amplificação completo:

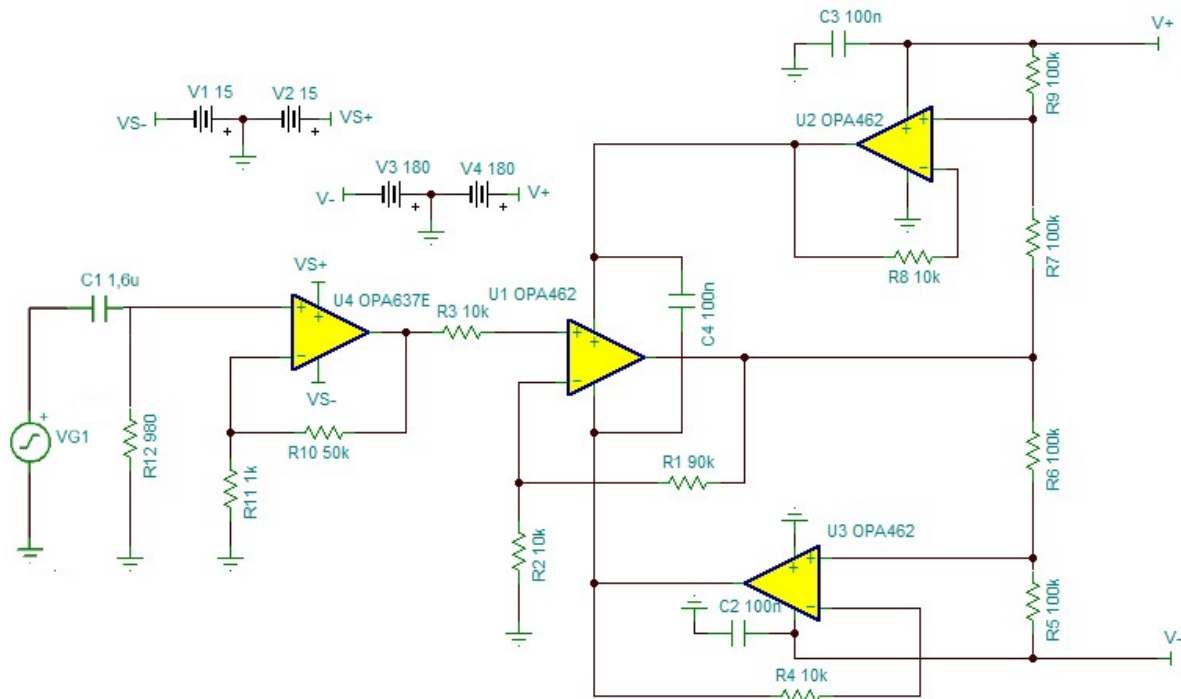


Figura 24: Circuito de Amplificação completo

Apresentam-se de seguida os resultados da simulação para $f = 120$ Hz e $f = 27$ kHz. Em ambas as simulações é introduzido um *offset* DC de 2 V para verificar a funcionalidade do condensador de acoplamento.

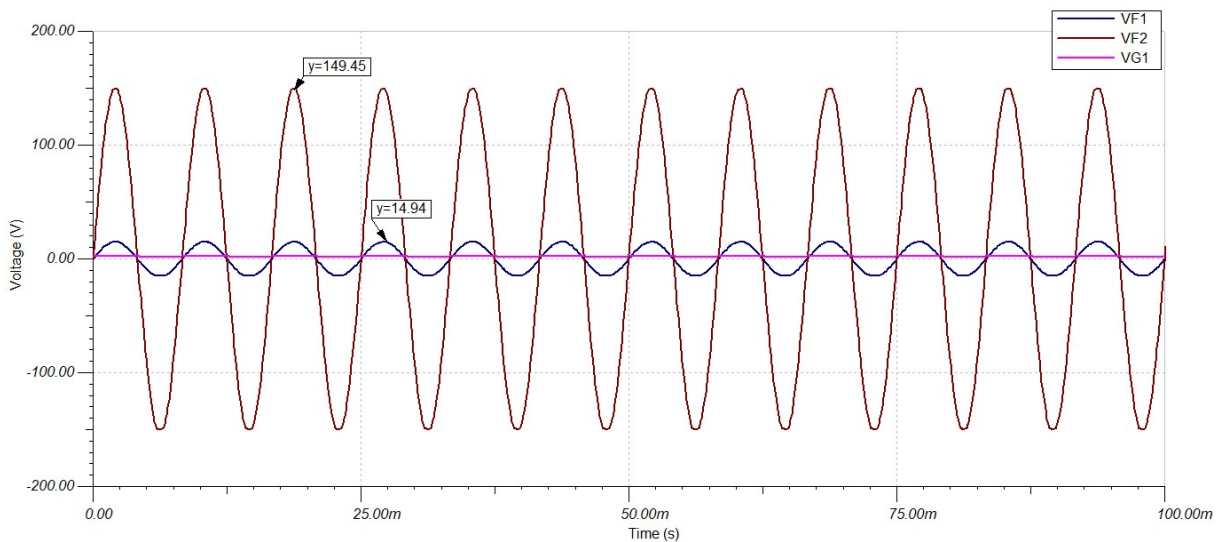


Figura 25: Resultados da simulação do amplificador completo, $f = 120$ Hz. Obtém-se, tal como previsto, um sinal à saída de amplitude $V \approx 150$ V. VG1, VF1 e VF2 correspondem, respetivamente, à tensão do sinal injetado no pré-amp, à tensão obtida à saída do pré-amp e à tensão no final do circuito de amplificação completo.

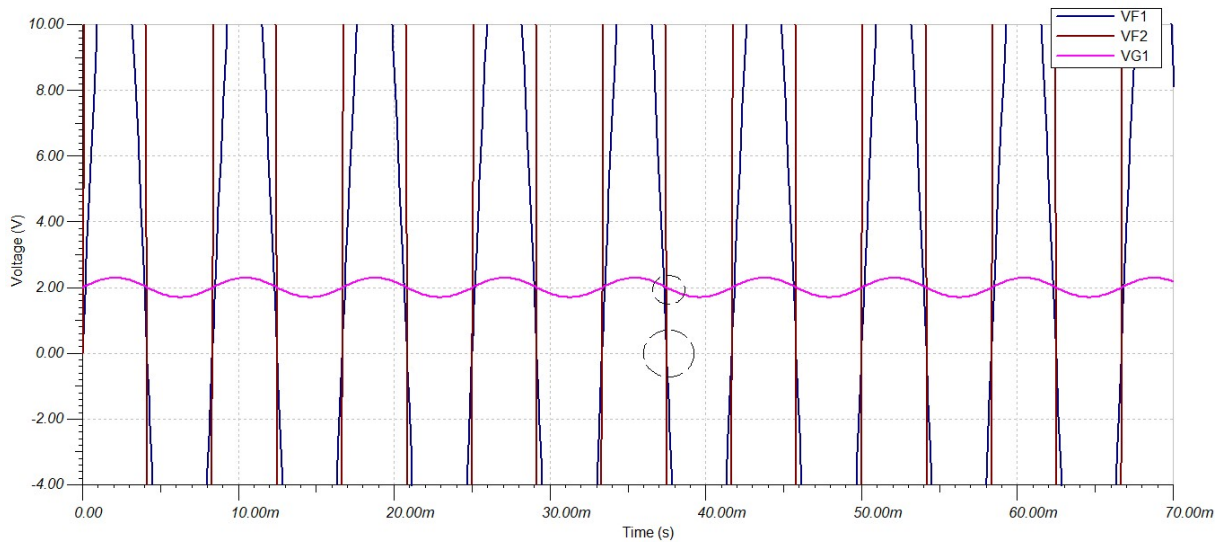


Figura 26: Resultados da simulação do amplificador completo, $f = 120$ Hz. Corroboração da remoção da componente de *offset* DC. Na imagem é visível a interseção dos sinais de saída do pré-amp e amp HV para $y = 0$ V. O mesmo ponto vertical corresponde a $y = 2$ V no sinal original, o que prova a contribuição do condensador de acoplamento para bloqueio da componente DC proveniente do AD9833. VG1, VF1 e VF2 correspondem, respectivamente, à tensão do sinal injetado no pré-amp, à tensão obtida à saída do pré-amp e à tensão no final do circuito de amplificação completo.

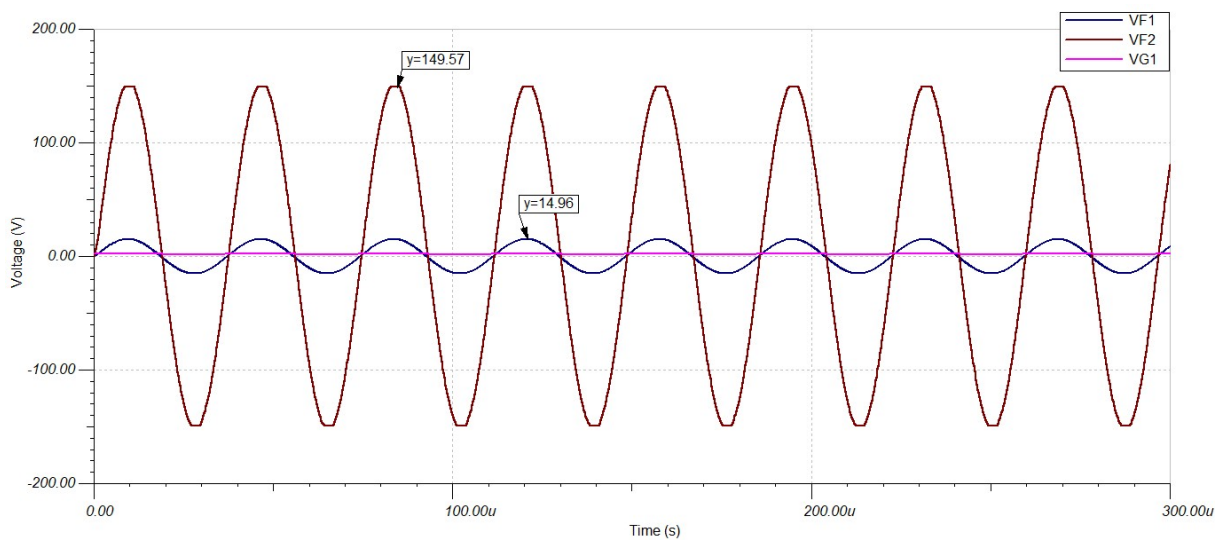


Figura 27: Resultados da simulação do amplificador completo, $f = 27$ kHz. Mais uma vez, o sinal a ser injetado nos elétrodos apresenta uma amplitude de $V \approx 150$ V. VG1, VF1 e VF2 correspondem, respectivamente, à tensão do sinal injetado no pré-amp, à tensão obtida à saída do pré-amp e à tensão no final do circuito de amplificação completo.

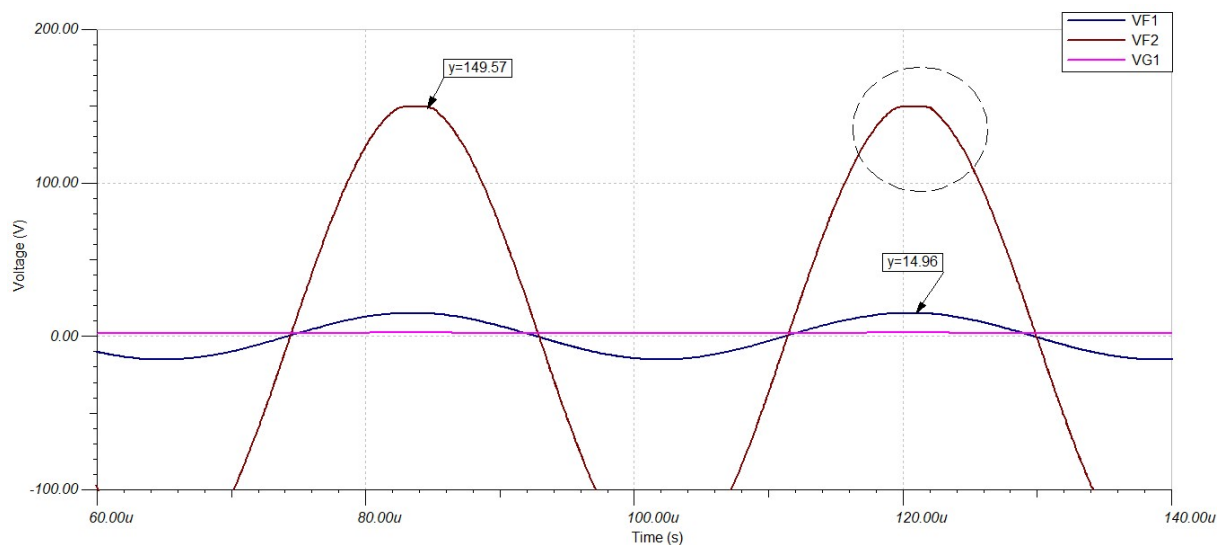


Figura 28: Resultados da simulação do amplificador completo, $f = 27$ kHz. Detalhe do fenômeno de *clipping*. Para frequências mais elevadas, a simulação tende a configurar um maior ganho para os amplificadores. Contudo, a gama da saída é limitada às tensões de alimentação do amp, o que degenera numa deformação dos extremos dos sinais, num fenômeno denominado *clipping*. VG1, VF1 e VF2 correspondem, respetivamente, à tensão do sinal injetado no pré-amp, à tensão obtida à saída do pré-amp e à tensão no final do circuito de amplificação completo.

4.2 Visualização do Estado do Módulo de Amplificação - *Interfacing* com GUI

Neste ponto, o circuito de amplificação encontra-se completamente dimensionado e pronto para ser implementado fisicamente. Além de possuir a capacidade de um varrimento de frequências no intervalo de $[10, 34000]$ Hz sem qualquer tipo de degradação do sinal sinusoidal a ser injetado nos elétrodos, o estimulador possibilita também um varrimento em ganho para amplitudes de até 150 V através do ajuste manual do potenciômetro. Relativamente a este último ponto, torna-se necessário conhecer em tempo real o ganho corrente no circuito de amplificação, de modo a melhor monitorizar as características do sinal a ser injetado no biorreator. Para o efeito, é indispensável aceder à saída do módulo de amplificação e perceber a amplitude que o mesmo sinal possui. A solução desenvolvida passa pela injeção do sinal num Arduino UNO, responsável por detetar o valor de tensão correspondente ao pico do sinal e transmitir essa mesma informação ao computador via interface série; depois de recebida, a informação é traduzida para os valores de tensão correspondentes e apresentada numa GUI desenvolvida para o efeito. Contudo, o sinal a ser injetado no Arduino não pode ser uma réplica fiel da saída do módulo de amplificação, visto estarem as entradas analógicas do micro-controlador limitadas à entrada de sinais na gama dos $[0, 5]$ V⁵, e o mesmo sinal corresponder, no caso limite, a uma senoide com valores compreendidos entre os $[-150, 150]$ V.

4.2.1 Processamento da Saída

O primeiro passo para possibilitar a injeção do sinal no Arduino diz respeito à sua atenuação para uma tensão máxima de 5 V. Tal pode ser conseguido com recurso a um simples divisor de tensão formado por duas resistências genéricas R_1 e R_2 , que relacionam a tensão de amostragem

⁵<https://www.arduino.cc/reference/en/language/functions/analog-io/analogread/>

V_i e a tensão de saída V_o através de

$$V_o = V_i \frac{R_2}{R_1 + R_2}$$

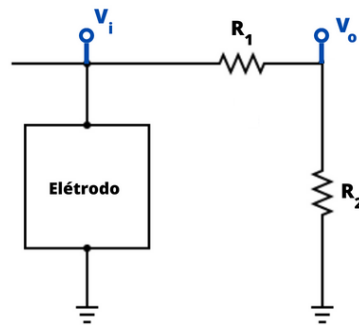


Figura 29: Divisor de tensão para injeção do sinal de saída do módulo de amplificação no Arduino. V_i e V_o são, respetivamente, as tensões de amostragem e a tensão à saída do divisor de tensão.

Como $V_i = 150$ V e se pretende $V_o = 5$ V, para $R_1 = 30$ k Ω resulta que $R_2 \approx 1035$ Ω .

A eliminação da componente negativa do sinal poderia ser conseguida com recurso a uma ponte de retificação, que possibilitaria a transformação do sinal AC dos elétrodos num sinal DC a ser injetado no Arduino. Neste cenário, todo o processamento do sinal seria feito de forma analógica, e o valor injetado na entrada analógica do micro-controlador seria apenas uma tensão DC com ligeiras variações, mas que poderia ser lida de uma forma direta e praticamente imediata. Tal cenário não é exequível no presente caso, visto ser a tensão DC desenvolvida entre dois pontos da ponte de retificação, e o Arduino ser alimentado via USB - significa isto que, na prática, os valores de tensão medidos nas entradas analógicas serão sempre referentes a GND, não podendo esta referência ser alterada (visto ser dada pela comunicação USB que garante também o fluxo de informação Arduino-PC). Deste modo, afasta-se a ponte de retificação, e implementa-se um retificador de meia onda com recurso a um diódo de retificação UF4007, responsável por eliminar a componente negativa do sinal. É utilizado ainda um diódo idêntico entre a saída e GND, de modo a eliminar qualquer componente negativa no sinal a injetar que possa resultar de uma eventual retificação defeituosa por parte do diódo, e um Zener com $V_Z < 5$ V de modo a acautelar eventuais *overshoots* na tensão e proteger a entrada analógica do micro-controlador.

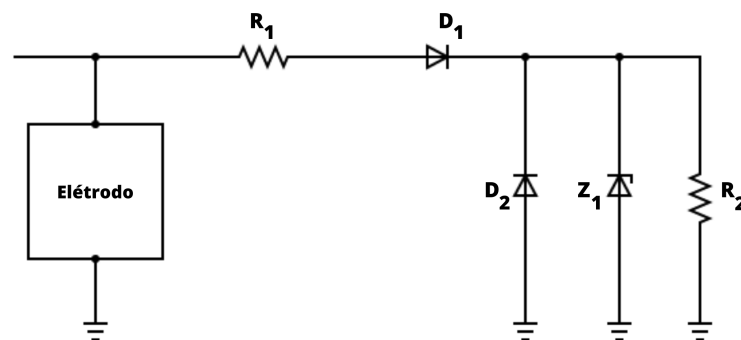


Figura 30: Representação esquemática do circuito para processamento do sinal para posterior injeção no Arduino

Assim, o sinal a dar entrada no Arduino apresenta-se como um conjunto de sinusoides com amplitudes $< 5\text{ V}$ e com a componente negativa truncada:

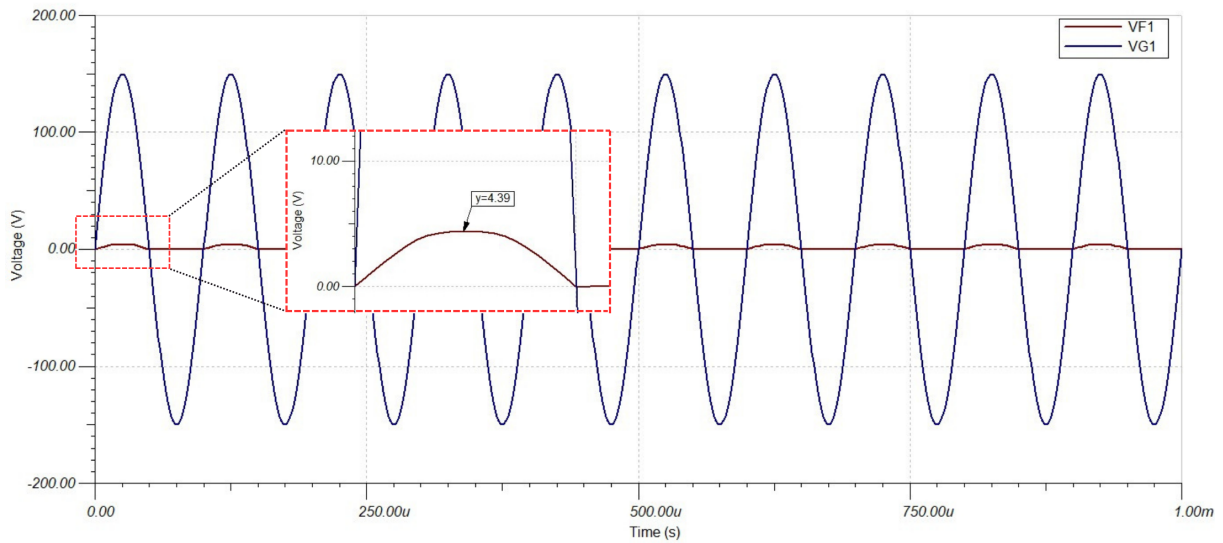


Figura 31: Resultados da simulação no TINA-TI para o circuito da Figura 30, onde se percebe claramente o efeito de retificação introduzido pelo circuito. Utiliza-se $R_1 = 30\text{ k}\Omega$, $R_2 = 1\text{ k}\Omega$; para D_1 e D_2 são escolhidos os componentes 1N4935; para Z_1 escolhe-se o componente 1N5231B. VG1 corresponde à tensão de entrada e VF1 à tensão medida nos terminais de R_2 .

Pretende-se ainda que o sinal apenas seja injetado no Arduino se este se encontrar ligado, como forma de proteger o DAC do mesmo. Tal pode ser implementado com recurso a um relé (Siemens V23023-A1001-B201, no presente caso) cuja bobine pode ser alimentada por um *output* do Arduino; a malha de retificação é então conectada ao terminal NO do relé, resultando finalmente, para o conjunto *Malha de retificação+Arduino*:

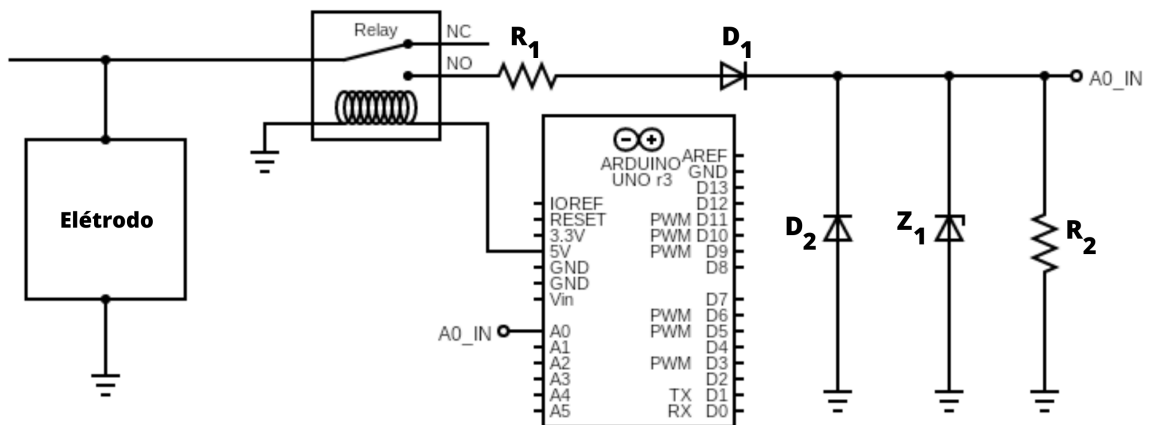


Figura 32: Malha de retificação para injeção de sinal no Arduino

Obviamente que a inclusão desta malha introduz uma corrente adicional pedida ao módulo de amplificação. Esta pode ser facilmente calculada lembrando que essa mesma corrente, I_{ad} , corresponde àquela que flui através de R_1 e D_1 ; podemos desprezar a impedância de D_1 (visto que $Z_{D_1} \ll R_1$), resultando, para I_{ad} (V_o e V_i correspondem às mesmas tensões definidas na

Figura 29),

$$I_{ad} = \frac{V_o - V_i}{R_1} = \frac{V_i}{R_1} \left(\frac{R_2}{R_1 + R_2} - 1 \right) \quad (44)$$

I_{ad} atinge o valor máximo para $V_i = 150$ V, resultando $I_{ad}|_{max} \approx -4.84$ mA.

Recuperando o sinal a ser injetado no Arduino - da forma daquele representado na Figura 31 - é óbvia a necessidade de interpretação do mesmo sinal: por se tratar de um conjunto de pulsos sinusoidais, é necessário desenvolver um algoritmo capaz de identificar o valor máximo presente em cada pico (correspondente à amplitude da senoide) a fim de perceber qual a amplitude do sinal que se encontra a ser injetado nos elétrodos. Por este motivo, desenvolve-se um script *.ino*, presente no Anexo A.1., de onde se destacam os pontos mais significativos para compreensão do algoritmo:

```
value[1] = analogRead(Pin); //Read the current value
// Using thres as the "zero" value helps to filter out noise that might act
//as a false positive for a zero signal

if (value[1] > thres && value[0] <= thres) //start of a non zero signal
{
  LastPeak = Peak; //reseting last peak
  Peak = value[1]; // the first value sets the Peak baseline
}
```

Começa por se ler o valor presente no pino analógico (número entre 0 e 1023). Caso este valor seja superior a um *threshold* previamente definido, assumimos o valor à entrada do Arduino como o novo valor máximo. A condição $value[0] \leq thres$ garante que estamos no começo de um novo pico.

```
else if (value[1] > thres && value[0] > thres) // we are still reading the
//signal
{
  if (value[1] > Peak) //if the recorded value is higher than any other in
//the same signal - record it as a peak
  {
    Peak = value[1];
  }
}
```

No caso de estarmos já a obter informação acerca de um pico (garantida pelas condições impostas a $value[0]$ e $value[1]$), e caso o valor corrente seja superior ao guardado em memória, o valor máximo do pico é atualizado.

```
if ( abs(Peak - LastPeak) > 0.5 * thres
    && abs(Peak - LastPeak) < thres
    && Peak != LastPeak) //writing the peak value to serial
{
  sprintf(buf, "%04d", int(Peak)); //making sure our number has always
//4 digits

  val = String(buf);
  Serial.print("V");
  Serial.println(val);
}
```

Finalmente, e se o valor máximo encontrado para o pico for distinto do último máximo comunicado ao PC, envia-se via interface série o novo valor encontrado. Esta operação é efetuada sempre que existir uma diferença significativa entre estes dois valores máximos, cenário quantificado pelas condição $abs(peak - LastPeak) > 0.5 * thres$; além do mais, garante-se que os novos valores de pico encontrados são comunicados de uma forma não abrupta (o que espelha a alteração gradual dos valores do potenciômetro manual), através da condição $abs(peak - LastPeak) < thres$. A comunicação via interface série é sempre precedida de um identificador (carater "V"), e o número comunicado apresenta sempre 4 algarismos, de modo a facilitar a interpretação da *string* numa instância futura. Segue abaixo o diagrama de fluxo:

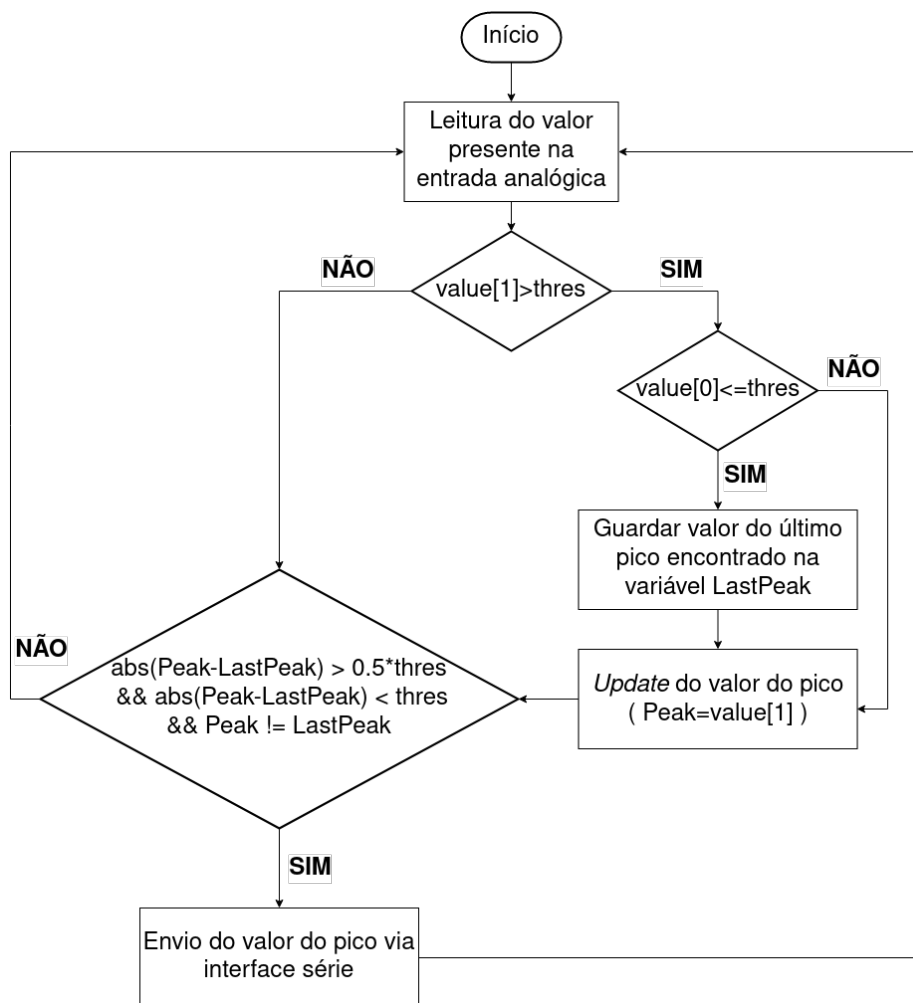


Figura 33: Diagrama de fluxo do *script* para deteção de picos

O algoritmo pode ainda ser visualizado de forma gráfica:

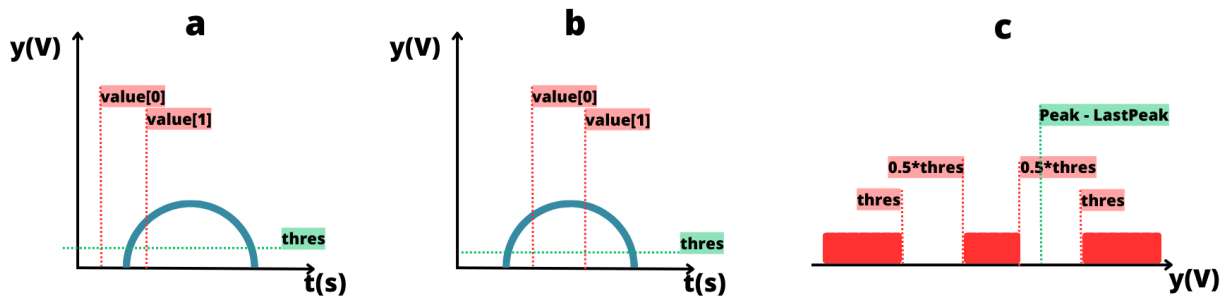


Figura 34: Interpretação gráfica do *script* para deteção de picos. **a.** $value[1] > thres$ e $value[0] \leq thres$ garante que estamos no início de um novo pico; **b.** se $value[1] > thres$ e $value[0] > thres$, continuamos a ler valores de um pico. Caso se verifique que $value[1] > Peak$, atualiza-se o valor do pico; **c.** O novo valor de pico só é comunicado ao PC caso a diferença entre este e o último valor comunicado se encontre numa gama de valores que garanta uma diferença significativa, mas também uma evolução gradual. Legenda: $value[0]$ e $value[1]$ - valores de tensão medidos pelo Arduino, sendo que $value[0]$ corresponde ao antigo valor de $value[1]$, $thres$ -valor de *threshold* para afastamento de eventual ruído, $Peak$ -valor máximo do pico atualmente em análise, $LastPeak$ -valor do último pico analisado.

4.2.2 Criação de GUI

A GUI desenvolvida corresponde a uma *Windows Forms App* escrita em C#. O primeiro ponto a ser tomado em linha de conta diz respeito à necessidade de verificação da existência de uma comunicação Serial ativa entre o PC e o Arduino. Só na eventualidade de tal premissa se verificar verdadeira é que se procede à interpretação dos dados enviados pelo Arduino e à sua apresentação. Assim, a primeira parte integrante da GUI diz respeito a um painel de comunicação, cujo aspeto, funcionalidade e excertos relevantes do código base se apresentam de seguida:

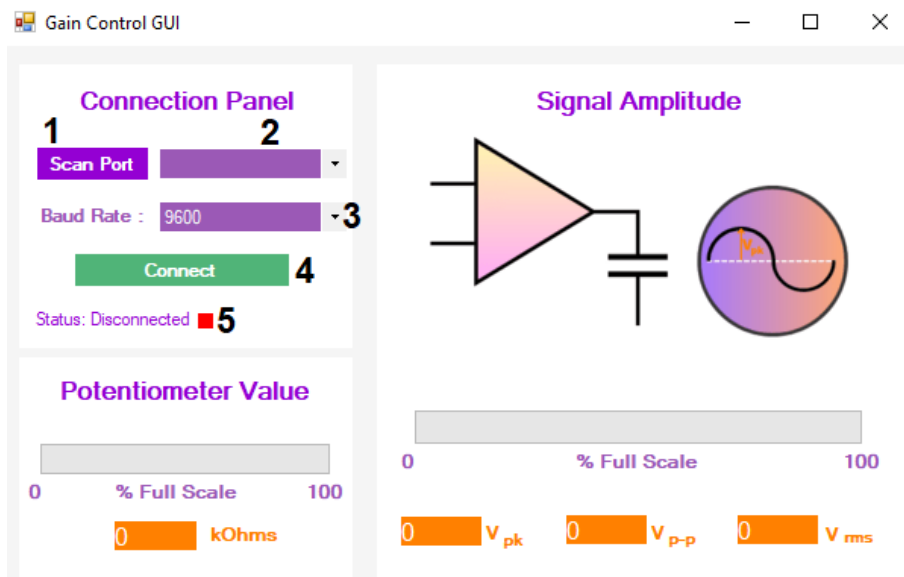


Figura 35: GUI desenvolvida para visualização do ganho atual - pormenor do painel de comunicação.

Para comunicação com o Arduino, é necessário começar por clicar no botão *Scan Port*. A funcionalidade deste cinge-se à procura de todas as comunicações Serial existentes e à sua apresentação na caixa de texto 2 (Figura 37). Caso não exista nenhuma comunicação listada, é mostrada uma mensagem de erro.

```
Private Sub ButtonScanPort_Click(sender As Object, e As EventArgs)
Handles ButtonScanPort.Click
    (...)
    ComboBoxPort.Items.Clear()
    Dim myPort As Array
    Dim i As Integer
    myPort = IO.Ports.SerialPort.GetPortNames()
    ComboBoxPort.Items.AddRange(myPort)
    i = ComboBoxPort.Items.Count
    i = i - 1
    Try
        ComboBoxPort.SelectedIndex = i
        ButtonConnect.Enabled = True
    Catch ex As Exception
        MsgBox("Com port not detected", MsgBoxStyle.Critical, "Warning !!!")
        ComboBoxPort.Text = ""
        ComboBoxPort.Items.Clear()
        Return
    End Try
    ComboBoxPort.DroppedDown = True
End Sub
```

A *baud-rate* pode também ser alterada com recurso ao menu *drop-down* 3 antes de estabelecida a comunicação, sendo 9600 o valor predefinido. A conexão com o Arduino inicia-se com o clique no botão *Connect*, que tem como função o estabelecimento da conexão, com recurso à invocação das funções *SerialPort1.Open()* e *TimerSerial.Start()*. No caso de estabelecimento correto da conexão, o mostrador de estado 5 muda para *Connected* e a cor do quadrado para verde. Caso não seja possível estabelecer comunicação, é mostrada nova mensagem de erro.

```
Private Sub ButtonConnect_Click(sender As Object, e As EventArgs) Handles
ButtonConnect.Click
    ConnectionPanel.Focus()
    Try
        SerialPort1.BaudRate = ComboBoxBaudRate.SelectedItem
        SerialPort1.PortName = ComboBoxPort.SelectedItem

        If SerialPort1.IsOpen = False Then
            SerialPort1.Open()
        End If

        TimerSerial.Start()

        LabelStatus.Text = "Status : Connected"
        (...)
        PictureBoxConnectionStatus.BackColor = Color.Green
    Catch ex As Exception
```

```

        MsgBox("Please check the Hardware, COM, Baud Rate and try again.",
        MsgBoxStyle.Critical, "Connection failed !!!")
    End Try
End Sub

```

Estabelecida a conexão, aparece o botão de *Disconnect*, que possui a função oposta, *i.e.*, encerrar a comunicação Serial com recurso às funções *TimerSerial.Stop()* e *SerialPort1.Close()*, e alterar o mostrador de estado para *Disconnected*.

```

Private Sub ButtonDisconnect_Click(sender As Object, e As EventArgs) Handles
ButtonDisconnect.Click
    ConnectionPanel.Focus()
    TimerSerial.Stop()

    If SerialPort1.IsOpen = True Then
        SerialPort1.Close()
    End If

    (...)
    LabelStatus.Text = "Status : Disconnect"
    PictureBoxConnectionStatus.Visible = True
    PictureBoxConnectionStatus.BackColor = Color.Red
End Sub

```

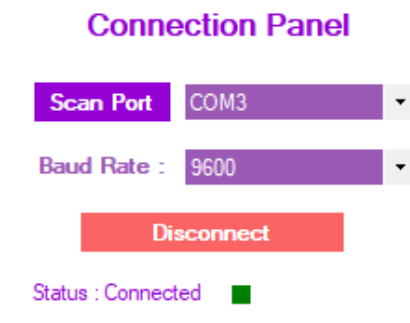


Figura 36: GUI desenvolvida para visualização do ganho atual - estado do painel de comunicação para ligação estabelecida com sucesso

Garantido o correto estabelecimento da conexão, passa-se à interpretação propriamente dita dos dados enviados pelo Arduino. Como supra-mencionado, toda a informação enviada corresponde a *strings* previamente formatadas, da forma '*V####*', onde '*####*' representa um número de 4 dígitos no intervalo [0 , 1023] (*range* de leitura das portas analógicas do Arduino). Este facto permite identificar que os dados enviados correspondem a valores de tensão (através do carácter precedente '*V*'), característica que se pode tornar útil caso, numa instância futura, se decida enviar informação adicional com o Arduino para o PC. Identificada a informação, procede-se ao armazenamento dos dados fornecidos pelo Arduino numa variável destinada ao efeito (no presente caso, *Voltage*), bastando para tal subdividir a *string* (a informação corresponde a 4 caracteres, sendo que começa na posição 2 da *string*). Obtida a informação de tensão, torna-se necessária a sua conversão para as tensões reais, isto é, aquelas presentes nos elétrodos - tal é conseguido recorrendo a escalonamentos com valores *hard-coded*, e definidos

através do formalismo até aqui desenvolvido. No escalonamento dos valores de tensão transmitidos pelo Arduino, a divisão é feita por 963, facto que decorre da utilização do Zener (ao limitar a tensão de entrada a $V_Z = 4.7\text{ V}$, a gama de leitura do pino analógico do Arduino passa de 1024 para $4.7/5 \cdot 1024 \approx 963$). Para a amplitude máxima utiliza-se 150 V, e o valor do potenciómetro utilizado é de 100 k Ω . Calcula-se também a tensão pico-a-pico, V_{pp} e o valor RMS desta, sendo toda esta informação apresentada em *boxes* destinadas ao efeito:

```
Private Sub TimerSerial_Tick(sender As Object, e As EventArgs) Handles
TimerSerial.Tick
    Try
        StrSerialIn = SerialPort1.ReadExisting

        Dim TB As New TextBox
        TB.Multiline = True
        TB.Text = StrSerialIn

        If TB.Lines.Count > 0 Then
            (...)

            '====Extracting Values from incoming data ====='
            StrSerialInRam = TB.Lines(0).Substring(0)

            Dim fchar
            fchar = Mid(StrSerialInRam, 1, 1)

            If (fchar = "V" And Mid(StrSerialInRam, 2).Length = 4) Then
                Voltage = Mid(StrSerialInRam, 2, 4)
                VoltageL = Voltage.Length
            Else
                Voltage = Voltage
            End If

            'converting to the 0k-100k interval
            PotValue = Convert.ToSingle(-Voltage + 963) * 100 / 963
            'converting to the 0-150V interval
            AmpValue = Convert.ToSingle(Voltage) * 150 / 963
            VppValue = AmpValue * 2
            VrmsValue = AmpValue / 1.4142

            '====Enter the values into the potentiometer panel====
            PotValBox.Text = String.Format("f", PotValue)
            'progress bar only accepts int . setting its range to[0,1023]
            ProgressBar.Value = Convert.ToInt16(PotValue)
            AmpBox.Text = String.Format("f", AmpValue)
            VppBox.Text = String.Format("f", VppValue)
            VrmsBox.Text = String.Format("f", VrmsValue)
            ProgressBarAmp.Value = Convert.ToInt16(Voltage)

        End If
        (...)
    End Try
End Sub
```

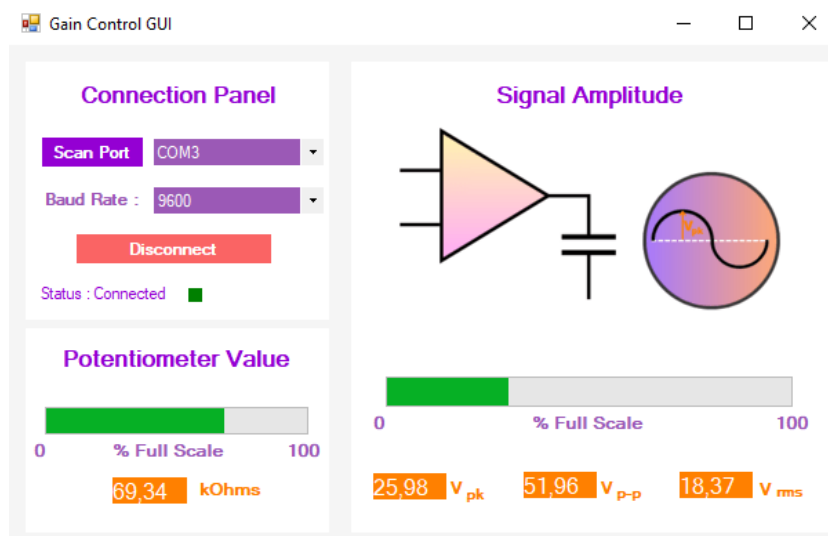


Figura 37: GUI desenvolvida para visualização do ganho atual completamente operacional

4.3 Implementação Física do Estimulador

Para a implementação física do estimulador parte-se, como supra-mencionado, do gerador de sinais AD9833. Por a utilização do *chip* propriamente dito exigir o estabelecimento de uma comunicação SPI e posterior desenvolvimento de uma interface que permita controlar a mesma, opta-se pela utilização do *kit* de avaliação EVAL-AD9833 (≈ 100 €), em conjunto com a placa controladora EVAL-SDP-CB1Z (≈ 120 €). O *kit* de avaliação do AD9833 possui também um CD que inclui uma GUI destinada ao controlo do mesmo, motivo pelo qual se optou pela escolha de ambos os componentes.

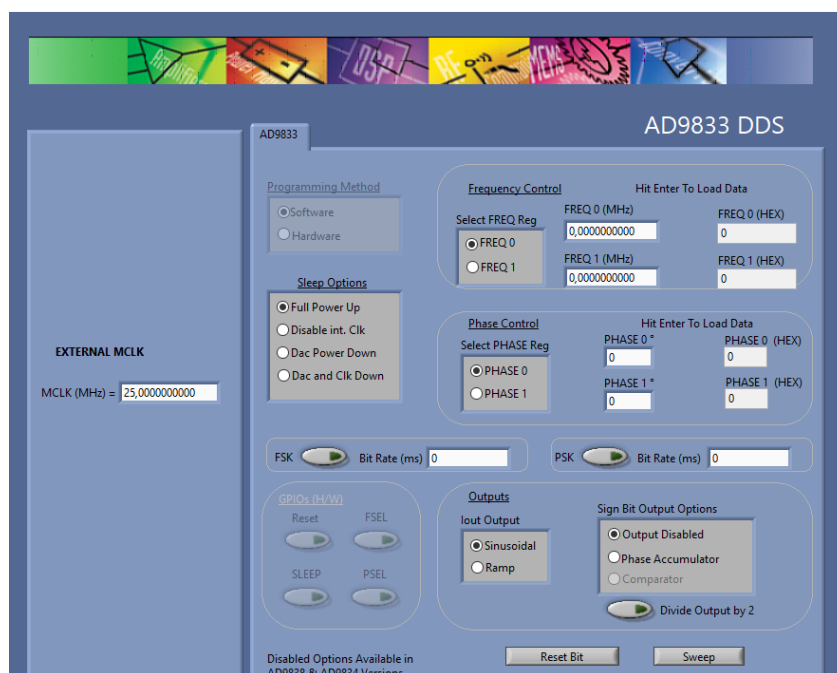


Figura 38: GUI para controlo do AD9833

Outro componente merecedor de destaque é o módulo de amplificação principal, constituído por 3 OPA462, segundo a configuração da Figura 10. Para a sua implementação, opta-se também pelo *kit* de avaliação do componente em questão (OPA462EVM, \approx 130 €), por possuir este a integração do OPA462 num circuito amplificador de ganho 11, que permite alcançar a configuração desejada com algumas simples modificações. Consultando o guia de utilização deste componente⁶, podemos ver o circuito base que constitui o módulo:

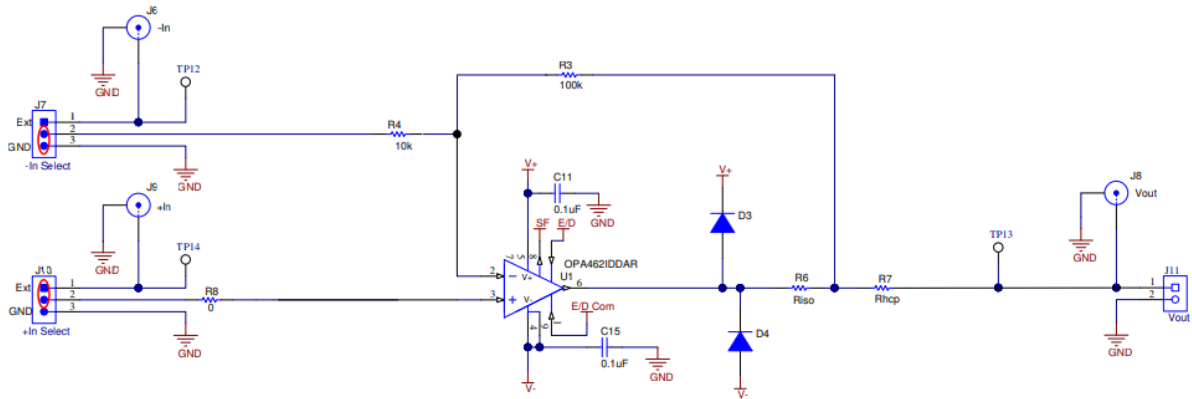


Figura 39: Configuração padrão do OPA462EVM - adaptado do guia de utilização do mesmo, disponível em <https://www.ti.com/lit/ug/sbou175/sbou175.pdf>

Para a implementação das resistências de realimentação dos amplificadores U2 e U3 da Figura 10, basta ligar o pino V_{out} de cada um dos módulos à resistência R_4 (possível através do pino 2 do *juniper* J7, revise-se a Figura 39) - deste modo, a resistência de realimentação do módulo deixa de ser R_3 , passando a ser $(R_3 \parallel R_4) \approx 9.09 \text{ k}\Omega$.

Relativamente a U1, é apenas necessária a remoção dos condensadores de acoplamento C_{11} e C_{15} . O estabelecimento das ligações do restante circuito exigem também a utilização de adaptadores BNC-CAT5 nas entradas/saídas In^+ e V_{out} de cada módulo de avaliação.

O último ponto merecedor de atenção diz respeito ao circuito destinado a controlar as tensões de alimentação fornecidas aos módulos:

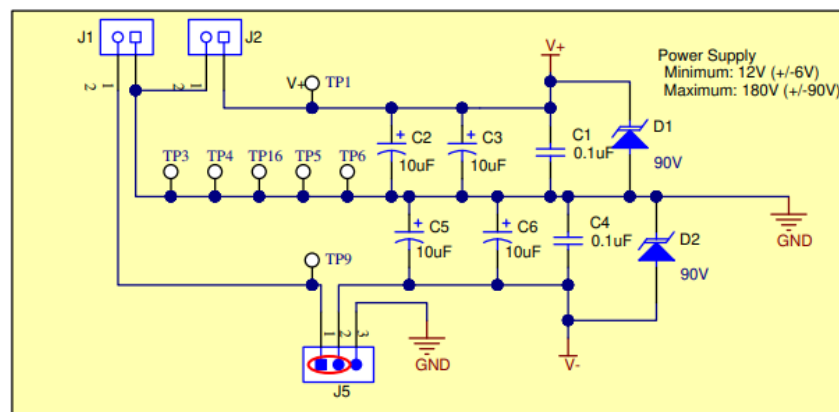


Figura 40: Circuito de alimentação do OPA462EVM - adaptado do guia de utilização do mesmo, disponível em <https://www.ti.com/lit/ug/sbou175/sbou175.pdf>

⁶<https://www.ti.com/lit/ug/sbou175/sbou175.pdf>

Destaca-se a presença dos zener D_1 e D_2 , que garantem, teoricamente, que as tensões de alimentação fornecidas ao OPA462 não ultrapassem os limites máximos presentes na *datasheet*. A alteração entre os regimes de *single-supply* e *dual-supply* faz-se pela ligação dos pinos 2 e 3 ou 1 e 2 do *jumper* J5, respetivamente. Para a implementação do circuito de 3 módulos, desejar-se-ia o funcionamento sob o primeiro regime para os módulos responsáveis por implementar U2 e U3, e sob o segundo regime para o módulo responsável por implementar U1. Contudo, na prática, verificou-se que, efetuando o procedimento aqui descrito, juntamente com a ausência de ligação de GND ao respetivo sítio nos *jumpers* J1 e J2 (garantindo que D_2 não é curto-circuitado), as tensões de alimentação continuaram limitadas a +90 V ou -90 V para os módulos a operar em regime de *single-supply*. Por servir a presente implementação física como prova de conceito da exequibilidade do estimulador até aqui projetado, ultrapassa-se este entrave através do redimensionamento do pré-amplificador, alterando o valor de R_2 (revisite-se a Figura 20) para 30 k Ω , o que configura um sinal à entrada do módulo de amplificação principal com $\approx 18 V_{pp}$. Numa fase futura, e caso se deseje obter um sinal com os ± 150 V teoricamente alcançáveis, a solução pode passar pelo afastamento dos módulos de avaliação - ao adotar esta via, afasta-se não só o circuito de proteção das tensões de alimentação, e com ele o problema da limitação aos +90/ -90 V observado, mas também se diminui o preço final da solução em $\approx 100\text{€}$ por cada OPA462 utilizado no lugar do módulo de avaliação.

4.3.1 Largura de Banda

Como mencionado em 3.5.1, a análise dos dados referentes ao ganho exige um ajuste referente a ambas as sinusoides observadas no osciloscópio. Este facto deriva da existência de oscilações inerentes aos valores de pico de ambos os sinais, originadas pela existência de alguma instabilidade nos mesmos:

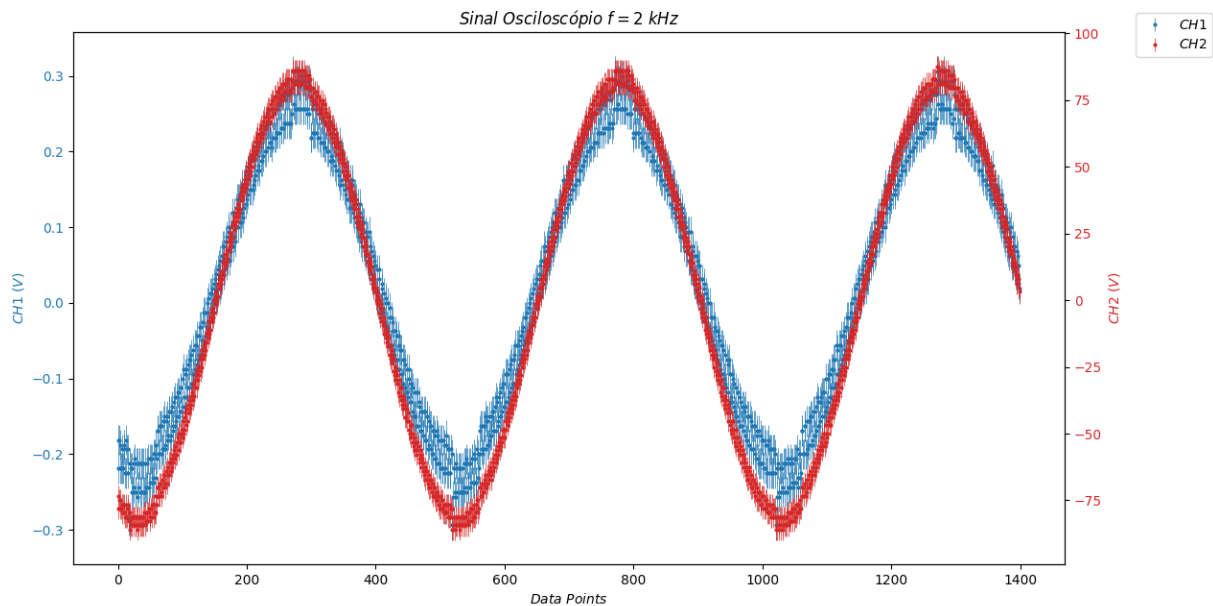


Figura 41: Sinal recuperado do osciloscópio para obtenção do diagrama de Bode de ganho, $f = 2$ kHz

Para ϵ_{inst} a incerteza associada ao osciloscópio e ϵ_{fit} a incerteza que decorre do ajuste, a incerteza para o valor máximo assumido por cada onda vem

$$\epsilon_{V_{max}} = \sqrt{\epsilon_{inst}^2 + \epsilon_{fit}^2} \quad (45)$$

A propagação do erro resulta em

$$\epsilon_{Gain(V/V)} = \sqrt{\left(\frac{V_{out}}{V_{in}}\epsilon_{V_{in}}\right)^2 + \left(\frac{1}{V_{in}}\epsilon_{V_{out}}\right)^2} \quad (46)$$

$$\epsilon_{Gain(dB)} = \frac{20}{Gain(V/V)}\epsilon_{Gain(V/V)} \quad (47)$$

Segue abaixo a representação dos resultados obtidos sob a forma gráfica:

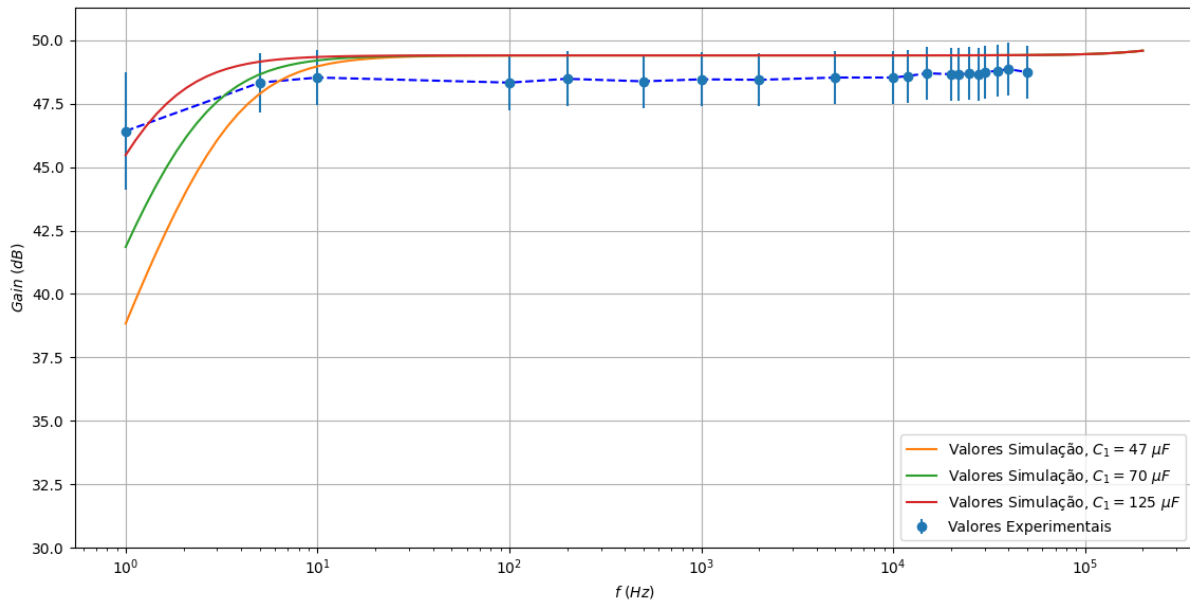


Figura 42: Diagrama de Bode de ganho

Os resultados experimentalmente obtidos apresentam-se coerentes com os resultados simulacionais e com o dimensionamento realizado recorrendo ao formalismo teórico. De maneira mais particular, é notória a adequação entre as curvas experimentais e simulacionais para $f > 10 \text{ Hz}$, onde, apesar de obtido menor ganho na prática, a incerteza associada a cada ponto acaba por albergar o valor teórico; esta diminuição do ganho observada na prática pode estar relacionada a fatores tais como resistências parasitas introduzidas por cabos de ligação, conectores, ou até mesmo com origem nos próprios componentes constituintes de cada op-amp. Indo de encontro ao postulado teórico, o ganho permanece constante a partir da frequência de corte f_1 introduzida pelo condensador de acoplamento C_1 , diminuindo apenas a partir da frequência de corte f_c introduzida pelo pré-amp ou pelo módulo de amplificação principal. Recuperando os resultados das secções 4.1.2 e 4.1.3, relembra-se que temos para o pré-amp e módulo de amplificação principal $f_c = 1.6 \text{ MHz}$ e $f_c = 650 \text{ kHz}$ de forma respetiva, assumindo portanto a frequência de corte o segundo valor. Deixa-se presente que não foram retirados valores experimentais para frequências tão elevadas pelo facto de o SR do OPA462 limitar não só o ganho do módulo de amplificação completo para $f > 34 \text{ kHz}$ (o que iria resultar numa diminuição do ganho para frequências mais reduzidas que f_c), mas também pelo facto de conduzir a uma degradação da onda sinusoidal numa onda triangular. Não sendo este o tipo de sinal que se pretende injetar nos elétrodos, fixa-se a região de operacionalidade do estimulador para $f_{max} = 34 \text{ kHz}$. Para corroborar esta última afirmação, apresenta-se o sinal recuperado do osciloscópio para $f = 80 \text{ kHz}$:

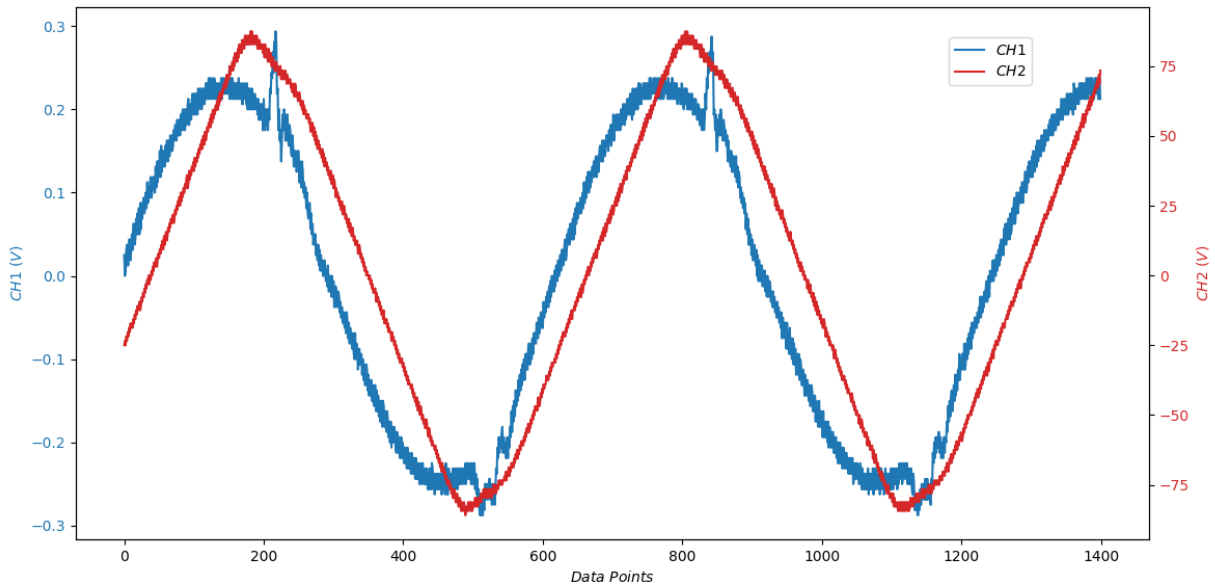


Figura 43: Sinal recuperado do osciloscópio para $f = 80 \text{ kHz}$. Para frequências superiores a 34 kHz , o SR do OPA462 não só distorce o sinal sinusoidal numa onda triangular, como limita também a amplitude máxima do sinal à saída.

Focando agora a atenção na zona $f < 10 \text{ Hz}$, é visível alguma desadequação entre os valores experimentais e aqueles fornecidos pela simulação para o valor do condensador de acoplamento $C_1 = 47 \mu\text{F}$ utilizado, sendo o ganho configurado pelo circuito de amplificação do estimulador mais elevado na prática. Tal discrepância pode ser analisada recuperando (42), e notando que para $C_1 = 47 \mu\text{F}$ resulta $f_1 = 0.34 \text{ Hz}$. Ora, recuperando os resultados experimentais, notamos que para $f = 1 \text{ Hz}$ ainda não foi atingida a frequência f_1 visto a diferença entre o ganho para esta frequência e o ganho na 'banda' de ganho constante ser ainda inferior a 3 dB , o que é coerente com a teoria. Contudo, os resultados simulacionais mostram que f_1 ocorre para frequências mais elevadas. Este facto pode ser explicado pela modelação da fonte de sinal no TINA-TI como tendo uma resistência interna de 50Ω , que acaba por diminuir a constante RC do denominador de (42) e deslocar a frequência f_1 para valores mais elevados - este facto desemboca no desvio do zero da função de transferência para valores de f mais elevados, o que leva à definição de uma curva muito semelhante a um filtro passa-banda, com um declive inicial de $+20 \text{ dB/déc}$. Como já discutido, a existência de resistências parasíticas no *setup* experimental faz com que esta constante seja mais elevada, mantendo o valor de f_1 próximo dos 0.34 Hz . Esta afirmação pode ser comprovada pelo aumento da constante RC na simulação: no presente caso, aumentando o valor de C , nota-se a adequação cada vez maior da curva simulacional com a experimental, e a passagem progressiva do regime de passa-banda a uma curva típica de um amplificador (passa-baixo, sendo que no presente caso f_c não se encontra representada no gráfico pelos motivos já discutidos).

Refere-se ainda que, na prática, a obtenção de um ganho praticamente constante se mostra benéfica, na medida em que permite obter uma senoide com bastante amplificação ($\approx 49 \text{ dB}$ projetados) para a totalidade da BW (34 kHz) o que permite criar campos elétricos de magnitudes relativamente elevadas mesmo para baixas frequências, caso assim se deseje.

Relativamente à determinação do diagrama de Bode de fase, segue-se o procedimento descrito em 3.5.2. A determinação do intervalo Δt necessita de garantir que se consideram, em cada onda, pontos em igual fase de oscilação. Tal é possível considerando, por exemplo, as abcissas em que cada onda atinge o seu mínimo. Lembra-se que, no presente caso, $|p_{\text{shift}}| \leq 90^\circ$.

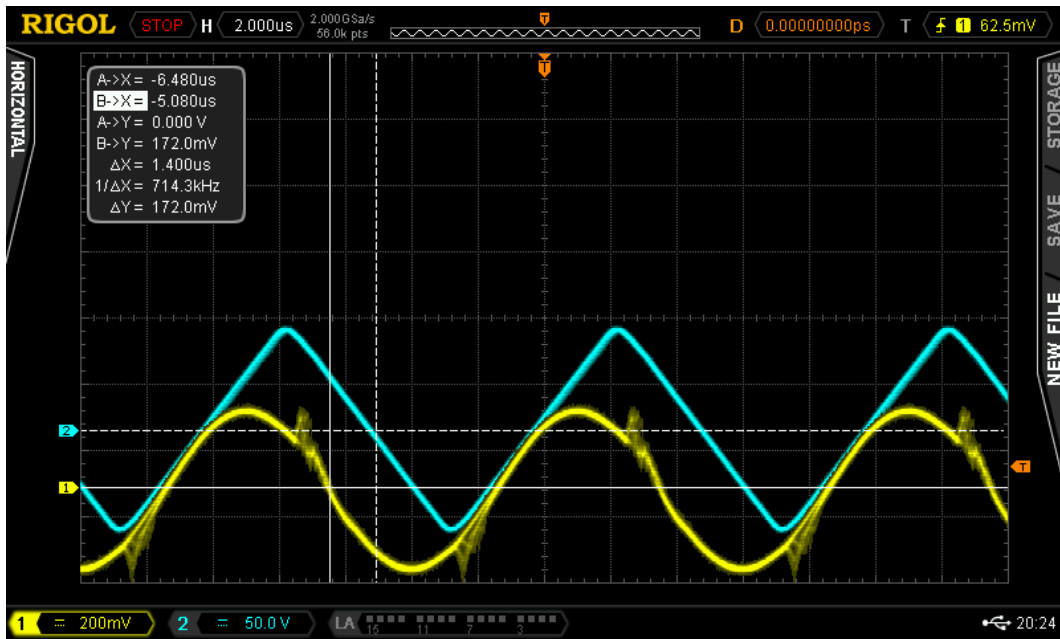


Figura 44: Determinação do desvio Δt , que pode ser lido diretamente no ecrã do osciloscópio na variável Δx . No presente caso, $f = 100 \text{ kHz}$. Mais uma vez, e como expectável, para $f > 34 \text{ kHz}$ a natureza limitadora do SR do OPA462 torna-se presente, configurando o aparecimento de uma onda triangular

Resulta então para o diagrama de Bode de fase:

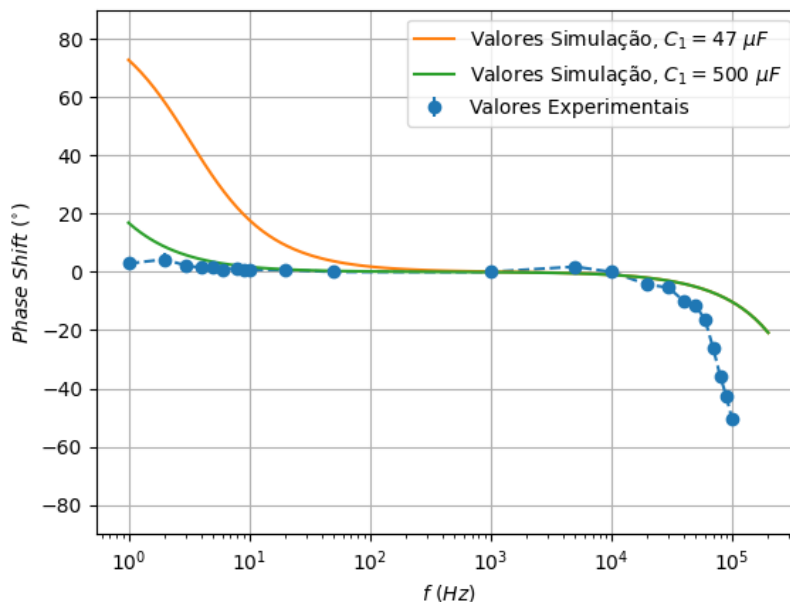


Figura 45: Diagrama de Bode de fase

A análise imediata do diagrama de fase obtido permite observar, mais uma vez, a desadequação entre os resultados experimentais e os simulacionais para $C_1 = 47 \mu F$ para frequências reduzidas. Recupera-se a discussão relativa ao diagrama de magnitude, no que ao comporta-

mento do circuito de amplificação simulado como um filtro passa-banda diz respeito - esta afirmação pode ser mais uma vez comprovada pela curva definida no diagrama de fase, que começa não nos 0° de desvio de fase típicos de um amplificador, mas sim perto dos 90° típicos de um passa-banda. Já no que aos pontos experimentais diz respeito, é seguida mais uma vez uma tendência coerente com a teoria, *i.e.*, um começo da curva do diagrama de fase perto dos 0° , tais como um passa-baixo. Esta discrepância é mais uma vez explicada pela menor constante RC da simulação relativamente ao caso real pelos motivos supra-descritos, e pode ser reduzida, mais uma vez, pelo aumento da mesma (opta-se novamente vez pelo aumento do condensador de acoplamento C_1 para demonstração). Para valores de até $\approx 30 \text{ kHz}$ todos os resultados são congruentes e praticamente idênticos, mantendo-se o desvio de fase nulo em ambos os cenários (expectável, pois a região corresponde à banda de passagem tanto no caso de um passa-baixo como de um passa-banda), notando-se apenas comportamentos distintos para frequências superiores a estas. A justificação prende-se, mais uma vez, com o SR do OPA462 - recuperando a discussão, este limita o ganho passível de ser obtido e degrada a senoide para $f > 34 \text{ kHz}$ como resultado de uma capacidade de resposta cada vez mais lenta, conduzindo ao aparecimento mais precoce de f_c e a um aumento do desvio de fase. Comenta-se ainda que, até à última frequência testada, $f = 100 \text{ kHz}$, o módulo de amplificação do estimulador se apresenta estável, visto nunca ser configurada um desvio de fase de -180° ; mais ainda, estando a região de operacionalidade do mesmo definida para $f \in [1, 28000] \text{ Hz}$, conclui-se a estabilidade do mesmo para toda a gama de operação (é inclusivamente cumprida a recomendação de margem de fase de 45° relativamente aos -180° , o que na prática corresponde a afirmar que o desvio de fase nunca ultrapassa os -135°).

4.3.2 Campo Elétrico no Meio de Cultura

A determinação de EF no meio de cultura é feita de forma indireta. Começa-se pela determinação de $|Z_e|$ segundo o método descrito em 3.6. Obtêm-se pontos para $f = \{10, 50, 100, 500, 1000, 2000, 5000, 10000, 12000, 15000, 18000, 20000, 22000, 25000, 28000\} \text{ Hz}$. Apenas se apresentam de seguida, sob a forma gráfica, os resultados para algumas destas frequências, por serem representativos de um padrão de comportamento seguido por todos os outros valores.

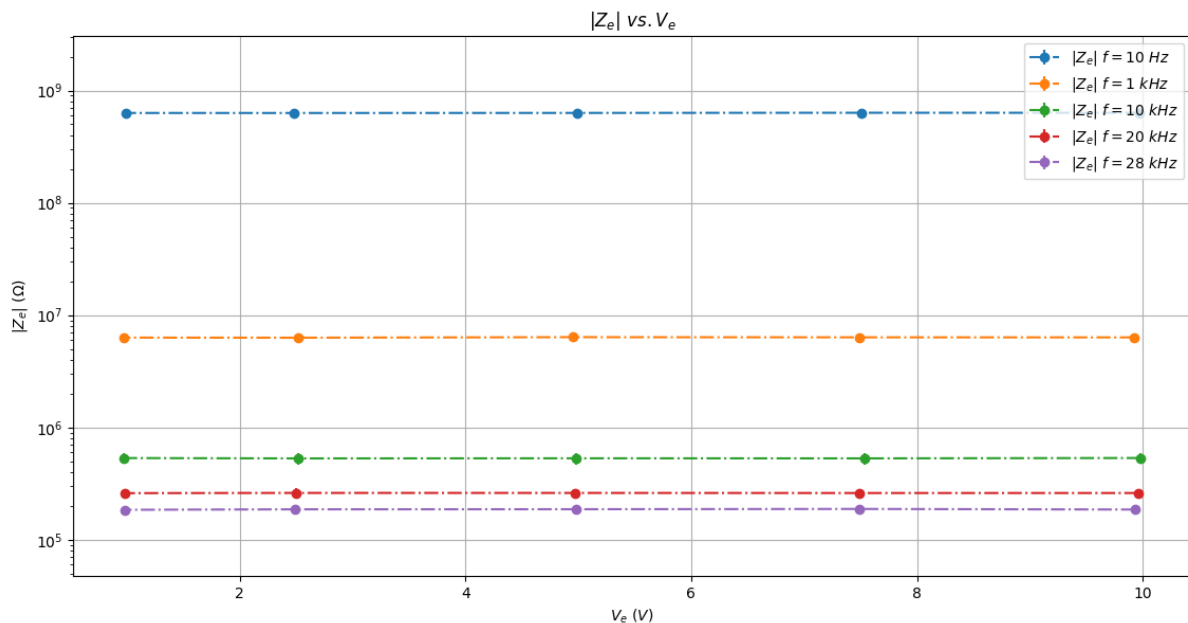


Figura 46: Módulo da impedância do biorreator $|Z_e|$ em função da tensão aplicada V_e

Como é visível, $|Z_e|$ apresenta-se praticamente constante para a aplicação de diferentes tensões entre os elétrodos V_e , tendo-se obtido um desvio máximo relativamente à média de 3.55 % para $f = 500 \text{ Hz}$. Basta relembrar que este é o comportamento expectável, pois, recuperando (11) e (12), vemos que $y = |Z_e| \neq g(V_e)$, para g uma função genérica definida em $\mathbb{R} \rightarrow \mathbb{R}$.

Existindo portanto alguma variação nos valores obtidos para o módulo da impedância, opta-se pela definição do seu valor experimental para cada f como a média dos valores obtidos. O erro de $|Z_e|_{exp}$ obedece às regras de propagação habituais, resultando que $\epsilon_{|Z_e|_{exp}}$ é também a média dos erros de $|Z_e|$. Apresenta-se de seguida a dependência de $|Z_e|_{exp}$ com a frequência f e a sua comparação com o valor teórico:

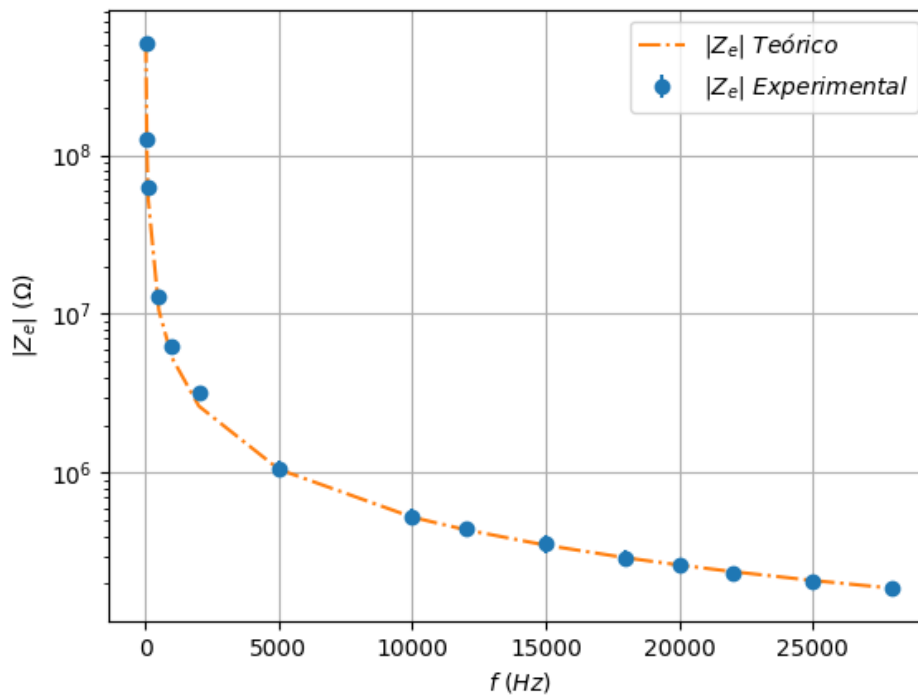


Figura 47: Comparação do módulo da impedância $|Z_e|$ obtido experimentalmente com os valores teóricos, dados por (11) e (12), para um varrimento de frequências $f \in [10, 28000] \text{ Hz}$

É aparente a adequação entre os resultados experimentalmente obtidos e a previsão teórica, facto que pode traduzir a elevada exatidão fornecida pelo protocolo experimental utilizado. Mais uma vez, optou-se pela representação dos dados numa escala logarítmica, numa tentativa de suavizar a função $y = |Z_e| = g(f)$; não sendo contudo notória a diferença existente entre os valores experimentais e os postulados teoricamente apresenta-se essa informação na Tabela 7.

Tabela 7: Desvio de $|Z_e|_{exp}$ relativamente ao valor teórico

f [Hz]	Desvio [%]
10	20.20
50	20.10
10	20.17
500	21.47
1000	20.36
2000	20.45
5000	1.30
10000	1.13
12000	0.93
15000	1.63
18000	0.26
20000	0.88
22000	1.17
25000	0.56
28000	0.76

A análise dos dados em Tabela torna evidente algo que o gráfico não permite: a grande diferença existente em termos absolutos de desvio para os valores mais baixos de frequência relativamente àqueles configurados para $f > 2$ kHz. Os desvios iniciais (para os pontos $f = 10, 50$ e 100 Hz) podem ser explicados pelo facto de $|Z_e|$ se apresentar superior a $10 \times$ o valor de resistência R_f utilizado, configurando uma perda de exatidão nas medições efetuadas. Contudo, a maior resistência disponível para efetuar medições correspondia à de 2 M Ω , motivo pelo qual se opta pela apresentação destes mesmos dados. Relativamente aos dados obtidos para $f = 500, 1000$ e 2000 Hz, o mesmo raciocínio não pode ser aplicado, visto ser já $|Z_e|_{teo}$ inferior a $10 \times$ o valor de R_f , mas continuar a observar-se um desvio da mesma ordem de magnitude. A explicação para o sucedido pode estar relacionada à própria resistência utilizada para R_f (com valor medido de $(2.380 \pm 0.002) \times 10^6$ Ω), residindo no facto de não ser este o valor de resistência que esta oferece aquando da passagem da corrente, configurando-se como um erro sistemático (este raciocínio apoia-se na magnitude praticamente constante do desvio relativamente ao valor teórico). O ponto de viragem ocorre para $f = 5$ kHz, valor a partir do qual os erros relativos descem de forma abrupta - a partir deste ponto, nenhum valor apresenta um desvio absoluto relativo ao valor teórico superior a 3%. Convém mencionar que este é o ponto a partir do qual se substitui a resistência R_f por outras de menor valor, de modo a cumprir as exigências apresentadas no protocolo experimental. Este facto pode servir como argumento abonatório no que concerne a corroborar a justificação dada para os valores discrepantes obtidos para as frequências anteriores, na medida em que a remoção do elemento que supostamente introduz um erro sistemático afasta esse mesmo erro.

Tendo presente que os valores experimentais para $f \leq 2$ kHz se encontram ligeiramente desfasados do valor teórico, prossegue-se para o cálculo de EF no meio de cultura para os mesmos. O erro associado ao campo elétrico no meio de cultura vem dado por

$$\epsilon_{|E_{mc}|} = \frac{|Z_{mc}|}{I_{mc}} \frac{V}{|Z_e|_{exp}^2} \epsilon_{|Z_e|_{exp}} \quad (48)$$

Apresentam-se abaixo os resultados obtidos. Opta-se novamente pela apresentação dos desvios relativamente a $|E_{mc}|_{teo}$ na Tabela 8:

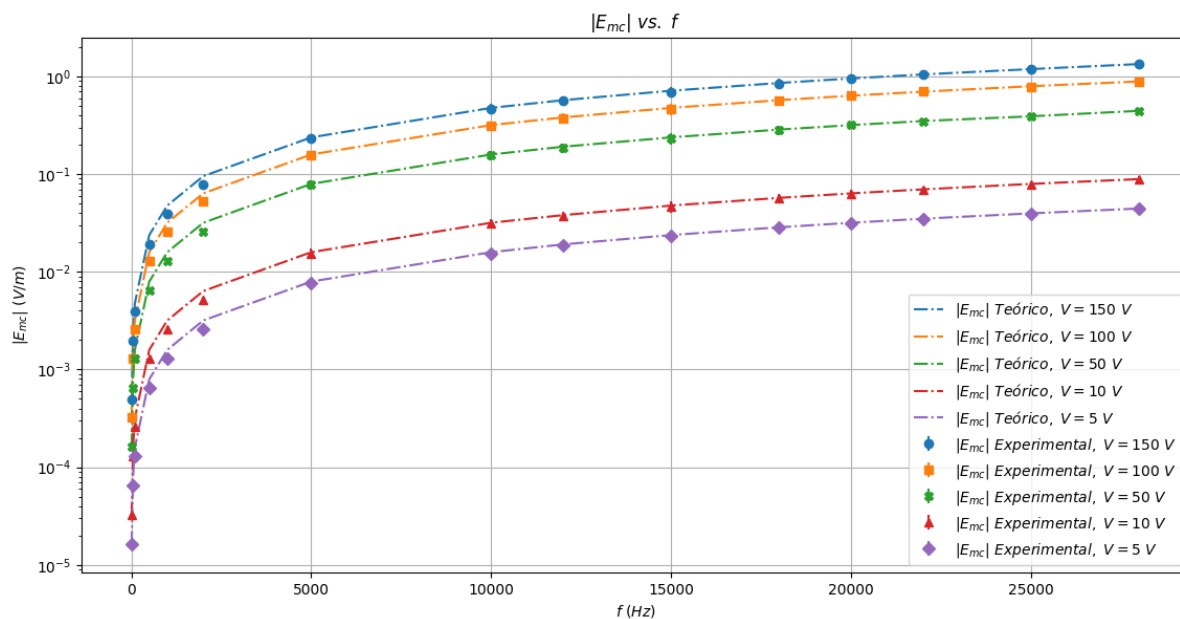


Figura 48: Valores experimentais para o campo elétrico no meio de cultura como função da frequência, para aplicação de tensões $V_e = \{150, 100, 50, 10, 5\} V$

Tabela 8: Desvio de $|E_{mc}|_{exp}$ relativamente ao valor teórico. As células coloridas a vermelho correspondem aos maiores desvios relativamente ao valor teórico ($> 17\%$), sendo que os valores de $|Z_e|_{exp}$ foram calculados com $R_f = 2 M\Omega$. As células a laranja correspondem a desvios intermédios ($< 3\%$), onde se calculou $|Z_e|_{exp}$ com $R_f = 100 k\Omega$. A verde estão as células com menores desvios, onde o cálculo dos valores é feito para $R_f = 10 k\Omega$.

$f[Hz]$	Desvio [%]				
	$V_e = 150 [V]$	$V_e = 100 [V]$	$V_e = 50 [V]$	$V_e = 10 [V]$	$V_e = 5 [V]$
10	17.88	17.88	17.87	17.88	17.87
50	17.61	17.79	17.79	17.79	17.79
100	17.85	17.85	17.85	17.85	17.85
500	18.54	18.72	18.72	18.72	18.72
1000	17.98	17.98	17.98	17.98	17.98
2000	18.04	18.04	18.04	18.04	18.04
5000	2.33	2.53	2.53	2.53	2.53
10000	2.38	2.38	2.38	2.38	2.38
12000	2.12	2.04	2.29	2.04	2.29
15000	2.79	2.86	2.66	2.86	2.66
18000	1.47	1.47	1.47	1.47	1.47
20000	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
22000	0.17	0.02	0.17	0.02	0.17
25000	0.50	0.71	0.94	0.71	0.58
28000	0.85	0.48	0.48	0.48	0.48

Mais uma vez, a tendência evolutiva das curvas experimentais coincide com o postulado teórico. Na prática, o estimulador desenvolvido possui a capacidade de criar no meio de cultura campos elétricos de magnitudes que variam entre os $(1.3058 \pm 0.0966) \times 10^{-5} V/m$ (de forma aproximada, visto ser aqui efetuado o cálculo para $V_e = 5 V$; na prática, o potenciômetro permite alcançar ainda tensões mais baixas entre os elétrodos) e os $(1.3286 \pm 0.0920) V/m$, podendo ser alcançados todos os valores intermédios pela combinação ponderada das variáveis V_e e f . Se relembarmos os objetivos propostos no início desta secção (revisite-se a Tabela 6) podemos concluir o sucesso da solução até aqui desenvolvida, visto terem sido atingidas

as intensidades de campo elétrico projetadas para o meio de cultura, que é ao fim ao cabo a finalidade última de toda esta dissertação.

O último ponto meritório de análise diz respeito aos desvios do campo elétrico no meio de cultura relativamente ao valor teórico, presentes na Tabela 8. Neste ponto percebe-se claramente a influência que R_f tem na definição do quão exatas são as medições para a impedância Z_e . Relativamente à alteração observada dos 2 kHz para os 5 kHz já foi efetuada a discussão e encontrada a provável causa do problema; resta perceber o porquê de se observar a mesma tendência de aumento de exatidão aquando da passagem de $R_f = 100\text{ k}\Omega$ para $R_f = 10\text{ k}\Omega$. Se analisarmos a expressão para V_f

$$V_f = R_f \frac{V_e}{|Z_e|_{exp}} \quad (49)$$

conclui-se que um menor valor de R_f configura uma menor queda de tensão na resistência de *feedback*. Tal facto resulta numa menor gama de medição e, por conseguinte, numa perda de exatidão, que é exatamente o oposto do observado.

Contudo as tensões de pico foram, mais uma vez, retiradas com recurso ao osciloscópio; a existência de oscilações com magnitudes mais elevadas exige a redefinição dos Volt/divisão para visualização do sinal pico-a-pico. Aquando da obtenção dos valores experimentais, não existiu, por lapso, o cuidado de garantir que a escala do osciloscópio permanecia constante, e de utilizar o cursor para retirar o valor de pico. Ao invés, o mesmo valor foi retirado com recurso à funcionalidade integrada do osciloscópio de deteção de pico, que implica o ajuste da senoide à janela com consequente perda de precisão, como já discutido. Explica-se então o aumento de precisão para a diminuição de R_f como resultante do processo de obtenção do valor de pico do sinal V_f , que não se apresentou como o mais correto. Assim, qualquer execução futura do protocolo experimental descrito deve ter em conta este mesmo ponto, e garantir que a medição é efetuada com o maior rigor possível; se possível, o pico deve ser isolado para a menor escala vertical passível de ser atingida no osciloscópio, de modo a diminuir o erro associado ao instrumento de medida.

5 Conclusões e trabalho futuro

A presente dissertação descreve a implementação de um estimulador de baixo-custo e *open-source* para aplicações em TE, partindo da fase de dimensionamento de todo o circuito de amplificação, passando pela sua implementação física e pelo seu *interfacing* com um PC, culminando na medição indireta dos campos elétricos que são passíveis de ser atingidos num biorreator comum para estímulos originários neste. A solução obtida permite a injeção de sinais sinusoidais com amplitudes de até 90 V para uma BW de 34 kHz, embora seja possível a obtenção de amplitudes de até 150 V mediante uma pequena alteração - o afastamento dos módulos de avaliação do OPA462 utilizados na implementação física do módulo de amplificação principal. Na presença de um sistema de entrega de ES por acoplamento capacitivo, os campos elétricos configurados no meio de cultura podem atingir intensidades de até $(1.3286 \pm 0.0920) V/m$.

A possibilidade de obtenção de campos elétricos com as características próprias daquelas reportadas em diversos estudos da área tornam o estimulador desenvolvido como um bom exemplar da exequibilidade de uma ferramenta económica e acessível, capaz de impulsionar a transparência e colaboração na área através da sua natureza *open-source*. Mais ainda, esta característica torna-o extremamente personalizável, dando a qualquer um a capacidade de o adaptar às suas necessidades específicas, *e.g.*, caso um estudo pretenda observar o fenómeno de eletroporação pode seguir o procedimento detalhado ao longo do documento, mas adaptando os componentes utilizados de forma a garantir que o estimulador entrega sinais de elevada intensidade e para frequências muito mais elevadas que as aqui descritas, permitindo alcançar os campos elétricos de intensidades 100 V/cm característicos do processo. Além do redimensionamento, outra via a ser tomada pode passar pela reformulação do biorreator, visando diminuir a impedância dos isolantes.

O preço final da solução apresentada é estimado em 794 €, podendo contudo este valor ser reduzido para algumas alterações já discutidas. A primeira diz respeito ao afastamento dos módulos de avaliação do OPA462, permitindo reduzir o custo do módulo de amplificação principal de 390 € para 60 €. A segunda diz respeito ao gerador de sinais, neste caso o EVAL-AD9833 em conjunto com a placa controladora EVAL-SDP-CB1Z - a sua substituição pelo *chip* AD9833 propriamente dito reduziria o custo em mais 108 €, enquanto abriria outras possibilidades interessantes. Optando por esta via, é necessário fazer o *interfacing* com o próprio *chip*, mas possibilita-se, por exemplo, o aglomerar das duas GUI aqui utilizadas numa só, capaz de controlar o gerador de sinais e de visualizar a amplitude instantânea do sinal de saída; seria também possível a inclusão de um módulo de relógio programável, que se mostraria extremamente útil por possibilitar a definição de regimes e períodos de estimulação previamente definidos, afastando a necessidade de controlo manual constante.

A criação de PCB para o pré-amp e módulo de amplificação principal é também uma etapa merecedora de reflexão, por possibilitar uma redução das capacitâncias e resistências parasíticas do estimulador como um todo, mas especialmente por tornar a solução mais compacta e elegante. Aliado à necessidade de ser efetuada simulação numérica para o biorreator em uso para uma aplicação de estímulos com características idênticas àquelas até então discutidas, este último ponto mostra-se prioritário para ser empreendida a tarefa para a qual foi desenvolvido o estimulador: a sua utilização em culturas de BM-MSCs, na tentativa de mapear os mecanismos que estão na base do comportamento observado aquando da aplicação de ES a tecidos. Por se encontrar inserida no âmbito dos projetos FCT FCT-*Stimuli2BioScaffolds: Optimização de estímulos em BioScaffolds: da modelação numérica aos testes in vitro* (PTCD/EMESIS/32254/2017) e *OptiBioScaffold: Optimização de estímulos em scaffolds bitecido: da modelação matemática e computacional à validação experimental* (PTCD/EMESIS/4446/2020) prevê-se a testagem do biorreator e estimulador aqui descritos durante o decorrer dos mesmos, aliada à

publicação dos resultados obtidos, de forma a apresentar e promover este projeto dentro da comunidade científica.

Referências

- [1] L. Leppik, K. M. C. Oliveira, M. B. Bhavsar, and J. H. Barker, "Electrical stimulation in bone tissue engineering treatments," *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*, vol. 46, no. 2. Springer Science and Business Media LLC, pp. 231–244, Feb. 20, 2020. doi: 10.1007/s00068-020-01324-1.
- [2] G. Thrivikraman, S. K. Boda, and B. Basu, "Unraveling the mechanistic effects of electric field stimulation towards directing stem cell fate and function: A tissue engineering perspective," *Biomaterials*, vol. 150. Elsevier BV, pp. 60–86, Jan. 2018. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.10.003.
- [3] J. Meneses, S. Fernandes, N. Alves, P. Pascoal-Faria, and P. C. Miranda, "How to correctly estimate the electric field in capacitively coupled systems for tissue engineering: a comparative study," *Scientific Reports*, vol. 12, no. 1. Springer Science and Business Media LLC, Jun. 30, 2022. doi: 10.1038/s41598-022-14834-2.
- [4] R. Langer and J. P. Vacanti, "Tissue Engineering," *Science*, vol. 260, no. 5110. American Association for the Advancement of Science (AAAS), pp. 920–926, May 14, 1993. doi: 10.1126/science.8493529.
- [5] C. T. Laurencin, A. M. A. Ambrosio, M. D. Borden, and J. A. Cooper Jr., "Tissue Engineering: Orthopedic Applications," *Annual Review of Biomedical Engineering*, vol. 1, no. 1. Annual Reviews, pp. 19–46, Aug. 1999. doi: 10.1146/annurev.bioeng.1.1.19.
- [6] A. De Pieri, Y. Rochev, and D. I. Zeugolis, "Scaffold-free cell-based tissue engineering therapies: advances, shortfalls and forecast," *npj Regenerative Medicine*, vol. 6, no. 1. Springer Science and Business Media LLC, Mar. 29, 2021. doi: 10.1038/s41536-021-00133-3.
- [7] P. Burra et al., "Systemic administration of a novel human umbilical cord mesenchymal stem cells population accelerates the resolution of acute liver injury," *BMC Gastroenterology*, vol. 12, no. 1. Springer Science and Business Media LLC, Jul. 12, 2012. doi: 10.1186/1471-230x-12-88.
- [8] S. Kitahara et al., "In Vivo Maturation of Scaffold-free Engineered Articular Cartilage on Hydroxyapatite," *Tissue Engineering Part A*, vol. 14, no. 11. Mary Ann Liebert Inc, pp. 1905–1913, Nov. 2008. doi: 10.1089/ten.tea.2006.0419.
- [9] M. Salvadori, N. Cesari, A. Murgia, P. Puccini, B. Riccardi, and M. Dominici, "Dissecting the Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of MSCs to Overcome Limitations in Their Clinical Translation," *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, vol. 14. Elsevier BV, pp. 1–15, Sep. 2019. doi: 10.1016/j.omtm.2019.05.004.
- [10] J. Gao, J. E. Dennis, R. F. Muzic, M. Lundberg, and A. I. Caplan, "The Dynamic in vivo Distribution of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells after Infusion," *Cells Tissues Organs*, vol. 169, no. 1. S. Karger AG, pp. 12–20, 2001. doi: 10.1159/000047856.
- [11] A. D. Becker and I. V. Riet, "Homing and migration of mesenchymal stromal cells: How to improve the efficacy of cell therapy?," *World Journal of Stem Cells*, vol. 8, no. 3. Baishideng Publishing Group Inc., p. 73, 2016. doi: 10.4252/wjsc.v8.i3.73.
- [12] M. H. Amer, F. R. A. J. Rose, K. M. Shakesheff, M. Modo, and L. J. White, "Translational considerations in injectable cell-based therapeutics for neurological applications: concepts, progress and challenges," *npj Regenerative Medicine*, vol. 2, no. 1. Springer Science and Business Media LLC, Aug. 10, 2017. doi: 10.1038/s41536-017-0028-x.
- [13] E. Abdelwahid, A. Kalvelyte, A. Stulpinas, K. A. T. de Carvalho, L. C. Guarita-Souza, and G. Foldes, "Stem cell death and survival in heart regeneration and repair," *Apoptosis*, vol. 21, no. 3. Springer Science and Business Media LLC, pp. 252–268, Dec. 19, 2015. doi: 10.1007/s10495-015-1203-4.
- [14] Nicholas E. O'Connor, John B. Mulliken, S. Banks-Schlegel, O. Kehinde, and H. Green, "GRAFTING OF BURNS WITH CULTURED EPITHELIUM PREPARED FROM AUTOLOGOUS EPIDERMAL CELLS," *The Lancet*, vol. 317, no. 8211. Elsevier BV, pp. 75–78, Jan. 1981. doi: 10.1016/s0140-6736(81)90006-4.

- [15] V. M. Weaver and C. D. Roskelley, "Extracellular matrix: the central regulator of cell and tissue homeostasis," *Trends in Cell Biology*, vol. 7, no. 1. Elsevier BV, pp. 40–42, Jan. 1997. doi: 10.1016/s0962-8924(97)30078-6.
- [16] J. M. Muncie and V. M. Weaver, "The Physical and Biochemical Properties of the Extracellular Matrix Regulate Cell Fate," *Current Topics in Developmental Biology*. Elsevier, pp. 1–37, 2018. doi: 10.1016/bs.ctdb.2018.02.002.
- [17] N. Matsuda, T. Shimizu, M. Yamato, and T. Okano, "Tissue Engineering Based on Cell Sheet Technology," *Advanced Materials*, vol. 19, no. 20. Wiley, pp. 3089–3099, Oct. 17, 2007. doi: 10.1002/adma.200701978.
- [18] Y. Haraguchi et al., "Fabrication of functional three-dimensional tissues by stacking cell sheets in vitro," *Nature Protocols*, vol. 7, no. 5. Springer Science and Business Media LLC, pp. 850–858, Apr. 05, 2012. doi: 10.1038/nprot.2012.027.
- [19] U. Kneser, D. J. Schaefer, B. Munder, C. Klemt, C. Andree, and G. B. Stark, "Tissue engineering of bone," *Minimally Invasive Therapy & Allied Technologies*, vol. 11, no. 3. Informa UK Limited, pp. 107–116, Jan. 2002. doi: 10.1080/136457002320174177.
- [20] D. Howard, L. D. Buttery, K. M. Shakesheff, and S. J. Roberts, "Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds," *Journal of Anatomy*, vol. 213, no. 1. Wiley, pp. 66–72, Jul. 2008. doi: 10.1111/j.1469-7580.2008.00878.x.
- [21] K. F. Leong, C. M. Cheah, and C. K. Chua, "Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs," *Biomaterials*, vol. 24, no. 13. Elsevier BV, pp. 2363–2378, Jun. 2003. doi: 10.1016/s0142-9612(03)00030-9.
- [22] S. Yang, K.-F. Leong, Z. Du, and C.-K. Chua, "The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors," *Tissue Engineering*, vol. 7, no. 6. Mary Ann Liebert Inc, pp. 679–689, Dec. 2001. doi: 10.1089/107632701753337645.
- [23] W. Wei and H. Dai, "Articular cartilage and osteochondral tissue engineering techniques: Recent advances and challenges," *Bioactive Materials*, vol. 6, no. 12. Elsevier BV, pp. 4830–4855, Dec. 2021. doi: 10.1016/j.bioactmat.2021.05.011.
- [24] A. R. Armiento, M. J. Stoddart, M. Alini, and D. Eglin, "Biomaterials for articular cartilage tissue engineering: Learning from biology," *Acta Biomaterialia*, vol. 65. Elsevier BV, pp. 1–20, Jan. 2018. doi: 10.1016/j.actbio.2017.11.021.
- [25] J. E. Davies, "In vitro modeling of the bone/implant interface," *The Anatomical Record*, vol. 245, no. 2. Wiley, pp. 426–445, Jun. 1996. doi: 10.1002/(sici)1097-0185(199606)245:2<426::aid-ar21>3.0.co;2-q.
- [26] A. T. and J. C., "Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration," *European Spine Journal*, vol. 10, no. 0. Springer Science and Business Media LLC, pp. S96–S101, Oct. 01, 2001. doi: 10.1007/s005860100282.
- [27] A. J. Salgado, O. P. Coutinho, and R. L. Reis, "Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends," *Macromolecular Bioscience*, vol. 4, no. 8. Wiley, pp. 743–765, Aug. 09, 2004. doi: 10.1002/mabi.200400026.
- [28] U. Ripamonti, "Soluble, insoluble and geometric signals sculpt the architecture of mineralized tissues," *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 8, no. 2. Wiley, pp. 169–180, Apr. 2004. doi: 10.1111/j.1582-4934.2004.tb00272.x.
- [29] D. O. Meredith, L. Eschbach, M. O. Riehle, A. S. G. Curtis, and R. G. Richards, "Microtopography of metal surfaces influence fibroblast growth by modifying cell shape, cytoskeleton, and adhesion," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 25, no. 11. Wiley, pp. 1523–1533, Nov. 2007. doi: 10.1002/jor.20430.

- [30] L. E. Freed, J. C. Marquis, A. Nohria, J. Emmanuel, A. G. Mikos, and R. Langer, "Neocartilage formation *in vitro* and *in vivo* using cells cultured on synthetic biodegradable polymers," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 27, no. 1. Wiley, pp. 11–23, Jan. 1993. doi: 10.1002/jbm.820270104.
- [31] S.-E. Francioli et al., "Growth Factors for Clinical-Scale Expansion of Human Articular Chondrocytes: Relevance for Automated Bioreactor Systems," *Tissue Engineering*, vol. 13, no. 6. Mary Ann Liebert Inc, pp. 1227–1234, Jun. 2007. doi: 10.1089/ten.2006.0342.
- [32] M. B. Fisher and R. L. Mauck, "Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Recent Innovations and the Transition to Translation," *Tissue Engineering Part B: Reviews*, vol. 19, no. 1. Mary Ann Liebert Inc, pp. 1–13, Feb. 2013. doi: 10.1089/ten.teb.2012.0723.
- [33] R. S. Mahla, "Stem Cells Applications in Regenerative Medicine and Disease Therapeutics," *International Journal of Cell Biology*, vol. 2016. Hindawi Limited, pp. 1–24, 2016. doi: 10.1155/2016/6940283.
- [34] C. C. Ude, A. Miskon, R. B. H. Idrus, and M. B. Abu Bakar, "Application of stem cells in tissue engineering for defense medicine," *Military Medical Research*, vol. 5, no. 1. Springer Science and Business Media LLC, Feb. 26, 2018. doi: 10.1186/s40779-018-0154-9.
- [35] L. D. K. Buttery et al., "Differentiation of Osteoblasts and *In Vitro* Bone Formation from Murine Embryonic Stem Cells," *Tissue Engineering*, vol. 7, no. 1. Mary Ann Liebert Inc, pp. 89–99, Feb. 2001. doi: 10.1089/107632700300003323.
- [36] R. C. Bielby, A. R. Boccaccini, J. M. Polak, and L. D. K. Buttery, "In *Vitro* Differentiation and *In Vivo* Mineralization of Osteogenic Cells Derived from Human Embryonic Stem Cells," *Tissue Engineering*, vol. 10, no. 9–10. Mary Ann Liebert Inc, pp. 1518–1525, Sep. 2004. doi: 10.1089/ten.2004.10.1518.
- [37] M. R. Alison, R. Poulson, S. Forbes, and N. A. Wright, "An introduction to stem cells," *The Journal of Pathology*, vol. 197, no. 4. Wiley, pp. 419–423, 2002. doi: 10.1002/path.1187.
- [38] J. A. M. Wobus and K. Guan, "Embryonic Stem Cell-Derived Cardiac Differentiation: Modulation of Differentiation and 'Loss-of-Function' Analysis *In Vitro*," *Trends in Cardiovascular Medicine*, vol. 8, no. 2. Elsevier BV, pp. 64–74, Feb. 1998. doi: 10.1016/s1050-1738(97)00129-1.
- [39] M. V. Wiles and G. Keller, "Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture," *Development*, vol. 111, no. 2. The Company of Biologists, pp. 259–267, Feb. 01, 1991. doi: 10.1242/dev.111.2.259.
- [40] R. Wang, R. Clark, and V. L. Bautch, "Embryonic stem cell-derived cystic embryoid bodies form vascular channels: an *in vitro* model of blood vessel development," *Development*, vol. 114, no. 2. The Company of Biologists, pp. 303–316, Feb. 01, 1992. doi: 10.1242/dev.114.2.303.
- [41] J. Yamashita et al., "Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors," *Nature*, vol. 408, no. 6808. Springer Science and Business Media LLC, pp. 92–96, Nov. 2000. doi: 10.1038/35040568.
- [42] K. Guan, H. Chang, A. Rolletschek, and A. M. Wobus, "Embryonic stem cell-derived neurogenesis," *Cell and Tissue Research*, vol. 305, no. 2. Springer Science and Business Media LLC, pp. 171–176, Jun. 06, 2001. doi: 10.1007/s004410100416.
- [43] M. Schuldiner et al., "Induced neuronal differentiation of human embryonic stem cells," *Brain Research*, vol. 913, no. 2. Elsevier BV, pp. 201–205, Sep. 2001. doi: 10.1016/s0006-8993(01)02776-7.
- [44] J. Kramer, C. Hegert, K. Guan, A. M. Wobus, P. K. Müller, and J. Rohwedel, "Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation *in vitro*: activation by BMP-2 and BMP-4," *Mechanisms of Development*, vol. 92, no. 2. Elsevier BV, pp. 193–205, Apr. 2000. doi: 10.1016/s0925-4773(99)00339-1.
- [45] C. Dani, "Embryonic Stem Cell-Derived Adipogenesis," *Cells Tissues Organs*, vol. 165, no. 3–4. S. Karger AG, pp. 173–180, 1999. doi: 10.1159/000016697.
- [46] T. Hamazaki et al., "Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells *in vitro*," *FEBS Letters*, vol. 497, no. 1. Wiley, pp. 15–19, May 18, 2001. doi: 10.1016/s0014-5793(01)02423-1.

- [47] A. Shiroy et al., "Identification of Insulin-Producing Cells Derived from Embryonic Stem Cells by Zinc-Chelating Dithizone," *STEM CELLS*, vol. 20, no. 4. Oxford University Press (OUP), pp. 284–292, Jul. 2002.
doi: 10.1634/stemcells.20-4-284.
- [48] J. Liu et al., "Concise Reviews: Characteristics and Potential Applications of Human Dental Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells," *Stem Cells*, vol. 33, no. 3. Oxford University Press (OUP), pp. 627–638, Feb. 17, 2015.
doi: 10.1002/stem.1909.
- [49] J. Peng et al., "Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and Endothelial Progenitor Cells Co-Culture Enhances Large Segment Bone Defect Repair," *Journal of Biomedical Nanotechnology*, vol. 15, no. 4. American Scientific Publishers, pp. 742–755, Apr. 01, 2019. doi: 10.1166/jbn.2019.2735.
- [50] L. Zhang et al., "Regeneration of human-ear-shaped cartilage by co-culturing human microtia chondrocytes with BMSCs," *Biomaterials*, vol. 35, no. 18. Elsevier BV, pp. 4878–4887, Jun. 2014. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.02.043.
- [51] Y. Lu et al., "Bone Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Promote Recovery Following Spinal Cord Injury via Improvement of the Integrity of the Blood-Spinal Cord Barrier," *Frontiers in Neuroscience*, vol. 13. Frontiers Media SA, Mar. 12, 2019. doi: 10.3389/fnins.2019.00209.
- [52] Y. Feng et al., "The therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the acute lung injury induced by sulfur mustard," *Stem Cell Research & Therapy*, vol. 10, no. 1. Springer Science and Business Media LLC, Mar. 12, 2019. doi: 10.1186/s13287-019-1189-x.
- [53] R. Rajaram, B. Subramani, B. J. J. Abdullah, and S. Mahadeva, "Mesenchymal stem cell therapy for advanced liver cirrhosis: A case report," *JGH Open*, vol. 1, no. 4. Wiley, pp. 153–155, Dec. 2017. doi: 10.1002/jgh3.12027.
- [54] L. Gao, Z. Huang, H. Lin, Y. Tian, P. Li, and S. Lin, "Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells (BMSCs) Restore Functional Endometrium in the Rat Model for Severe Asherman Syndrome," *Reproductive Sciences*, vol. 26, no. 3. Springer Science and Business Media LLC, pp. 436–444, Mar. 2019. doi: 10.1177/1933719118799201.
- [55] S. Kada, K. Hamaguchi, J. Ito, K. Omori, and T. Nakagawa, "Bone Marrow Stromal Cells Accelerate Hearing Recovery via Regeneration or Maintenance of Cochlear Fibrocytes in Mouse Spiral Ligaments," *The Anatomical Record*, vol. 303, no. 3. Wiley, pp. 478–486, Feb. 18, 2019. doi: 10.1002/ar.24063.
- [56] C. Xue et al., "Bone marrow mesenchymal stem cell-derived acellular matrix-coated chitosan/silk scaffolds for neural tissue regeneration," *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 5, no. 6. Royal Society of Chemistry (RSC), pp. 1246–1257, 2017. doi: 10.1039/c6tb02959k.
- [57] J.S. M. Devine, "Mesenchymal stem cells: Will they have a role in the clinic?," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 85, no. S38. Wiley, pp. 73–79, 2002. doi: 10.1002/jcb.10046.
- [58] T. Sadahiro, S. Yamanaka, and M. Ieda, "Direct Cardiac Reprogramming," *Circulation Research*, vol. 116, no. 8. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health), pp. 1378–1391, Apr. 10, 2015. doi: 10.1161/circresaha.116.305374.
- [59] W. Li et al., "Generation of Rat and Human Induced Pluripotent Stem Cells by Combining Genetic Reprogramming and Chemical Inhibitors," *Cell Stem Cell*, vol. 4, no. 1. Elsevier BV, pp. 16–19, Jan. 2009.
doi: 10.1016/j.stem.2008.11.014.
- [60] C. Vinatier, D. Mrugala, C. Jorgensen, J. Guicheux, and D. Noël, "Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors," *Trends in Biotechnology*, vol. 27, no. 5. Elsevier BV, pp. 307–314, May 2009.
doi: 10.1016/j.tibtech.2009.02.005.

- [61] X. Ren, M. Zhao, B. Lash, M. M. Martino, and Z. Julier, "Growth Factor Engineering Strategies for Regenerative Medicine Applications," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 7. Frontiers Media SA, Jan. 21, 2020. doi: 10.3389/fbioe.2019.00469.
- [62] A. C. Mitchell, P. S. Briquez, J. A. Hubbell, and J. R. Cochran, "Engineering growth factors for regenerative medicine applications," *Acta Biomaterialia*, vol. 30. Elsevier BV, pp. 1–12, Jan. 2016. doi: 10.1016/j.actbio.2015.11.007.
- [63] B. Bakhshandeh et al., "Tissue engineering: strategies, tissues, and biomaterials," *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, vol. 33, no. 2. Informa UK Limited, pp. 144–172, Jul. 03, 2017. doi: 10.1080/02648725.2018.1430464.
- [64] S. M. Naqvi and L. M. McNamara, "Stem Cell Mechanobiology and the Role of Biomaterials in Governing Mechanotransduction and Matrix Production for Tissue Regeneration," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 8. Frontiers Media SA, Dec. 14, 2020. doi: 10.3389/fbioe.2020.597661.
- [65] K. Li, C. Zhang, L. Qiu, L. Gao, and X. Zhang, "Advances in Application of Mechanical Stimuli in Bioreactors for Cartilage Tissue Engineering," *Tissue Engineering Part B: Reviews*, vol. 23, no. 4. Mary Ann Liebert Inc, pp. 399–411, Aug. 2017. doi: 10.1089/ten.teb.2016.0427.
- [66] M. Hronik-Tupaj and D. L. Kaplan, "A Review of the Responses of Two- and Three-Dimensional Engineered Tissues to Electric Fields," *Tissue Engineering Part B: Reviews*, vol. 18, no. 3. Mary Ann Liebert Inc, pp. 167–180, Jun. 2012. doi: 10.1089/ten.teb.2011.0244.
- [67] R. Balint, N. J. Cassidy, and S. H. Cartmell, "Electrical Stimulation: A Novel Tool for Tissue Engineering," *Tissue Engineering Part B: Reviews*, vol. 19, no. 1. Mary Ann Liebert Inc, pp. 48–57, Feb. 2013. doi: 10.1089/ten.teb.2012.0183.
- [68] C. Chen, X. Bai, Y. Ding, and I.-S. Lee, "Electrical stimulation as a novel tool for regulating cell behavior in tissue engineering," *Biomaterials Research*, vol. 23, no. 1. Springer Science and Business Media LLC, Dec. 2019. doi: 10.1186/s40824-019-0176-8.
- [69] C. N. M. Ryan, M. N. Doulgeroglou, and D. I. Zeugolis, "Electric field stimulation for tissue engineering applications," *BMC Biomedical Engineering*, vol. 3, no. 1. Springer Science and Business Media LLC, Jan. 05, 2021. doi: 10.1186/s42490-020-00046-0.
- [70] D. R. Merrill, M. Bikson, and J. G. R. Jefferys, "Electrical stimulation of excitable tissue: design of efficacious and safe protocols," *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 141, no. 2. Elsevier BV, pp. 171–198, Feb. 2005. doi: 10.1016/j.jneumeth.2004.10.020.
- [71] J. A. Spadaro and R. O. Becker, "Function of implanted cathodes in electrode-induced bone growth," *Medical & Biological Engineering & Computing*, vol. 17, no. 6. Springer Science and Business Media LLC, pp. 769–775, Nov. 1979. doi: 10.1007/bf02441560.
- [72] Y.-C. Fu et al., "A Novel Single Pulsed Electromagnetic Field Stimulates Osteogenesis of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and Bone Repair," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 3. Public Library of Science (PLoS), p. e91581, Mar. 14, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0091581.
- [73] Y. Antov, A. Barbul, H. Mantsur, and R. Korenstein, "Electroendocytosis: Exposure of Cells to Pulsed Low Electric Fields Enhances Adsorption and Uptake of Macromolecules," *Biophysical Journal*, vol. 88, no. 3. Elsevier BV, pp. 2206–2223, Mar. 2005. doi: 10.1529/biophysj.104.051268.
- [74] A. C. Mendonça, C. H. Barbieri, and N. Mazzer, "Directly applied low intensity direct electric current enhances peripheral nerve regeneration in rats," *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 129, no. 2. Elsevier BV, pp. 183–190, Oct. 2003. doi: 10.1016/s0165-0270(03)00207-3.
- [75] C. D. McCaig, B. Song, and A. M. Rajnicek, "Electrical dimensions in cell science," *Journal of Cell Science*, vol. 122, no. 23. The Company of Biologists, pp. 4267–4276, Dec. 01, 2009. doi: 10.1242/jcs.023564.

- [76] R. Huo et al., "Noninvasive Electromagnetic Fields on Keratinocyte Growth and Migration," *Journal of Surgical Research*, vol. 162, no. 2. Elsevier BV, pp. 299–307, Aug. 2010. doi: 10.1016/j.jss.2009.02.016.
- [77] S. Shapiro et al., "Oscillating field stimulation for complete spinal cord injury in humans: a Phase 1 trial," *Journal of Neurosurgery: Spine*, vol. 2, no. 1. Journal of Neurosurgery Publishing Group (JNSPG), pp. 3–10, Jan. 2005. doi: 10.3171/spi.2005.2.1.0003.
- [78] P.-H. G. Chao, R. Roy, R. L. Mauck, W. Liu, W. B. Valhmu, and C. T. Hung, "Chondrocyte Translocation Response to Direct Current Electric Fields," *Journal of Biomechanical Engineering*, vol. 122, no. 3. ASME International, pp. 261–267, Feb. 06, 2000. doi: 10.1115/1.429661.
- [79] M. L. Lalli and A. R. Asthagiri, "Collective Migration Exhibits Greater Sensitivity But Slower Dynamics of Alignment to Applied Electric Fields," *Cellular and Molecular Bioengineering*, vol. 8, no. 2. Springer Science and Business Media LLC, pp. 247–257, Mar. 08, 2015. doi: 10.1007/s12195-015-0383-x.
- [80] B. Lin, S. Tsao, A. Chen, S.-K. Hu, L. Chao, and P. G. Chao, "Lipid rafts sense and direct electric field-induced migration," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 114, no. 32. Proceedings of the National Academy of Sciences, pp. 8568–8573, Jul. 24, 2017. doi: 10.1073/pnas.1702526114.
- [81] X. Wang, Y. Gao, H. Shi, N. Liu, W. Zhang, and H. Li, "Influence of the intensity and loading time of direct current electric field on the directional migration of rat bone marrow mesenchymal stem cells," *Frontiers of Medicine*, vol. 10, no. 3. Springer Science and Business Media LLC, pp. 286–296, Jun. 20, 2016. doi: 10.1007/s11684-016-0456-9.
- [82] M. Liu et al., "Protective Effect of Moderate Exogenous Electric Field Stimulation on Activating Netrin-1/DCC Expression Against Mechanical Stretch-Induced Injury in Spinal Cord Neurons," *Neurotoxicity Research*, vol. 34, no. 2. Springer Science and Business Media LLC, pp. 285–294, Apr. 07, 2018. doi: 10.1007/s12640-018-9885-3.
- [83] H. T. Nguyen, C. Wei, J. K. Chow, L. Nguy, H. K. Nguyen, and C. E. Schmidt, "Electric field stimulation through a substrate influences Schwann cell and extracellular matrix structure," *Journal of Neural Engineering*, vol. 10, no. 4. IOP Publishing, p. 046011, Jul. 10, 2013. doi: 10.1088/1741-2560/10/4/046011.
- [84] B. Song, Y. Gu, J. Pu, B. Reid, Z. Zhao, and M. Zhao, "Application of direct current electric fields to cells and tissues in vitro and modulation of wound electric field in vivo," *Nature Protocols*, vol. 2, no. 6. Springer Science and Business Media LLC, pp. 1479–1489, Jun. 2007. doi: 10.1038/nprot.2007.205.
- [85] G. Hu, K. Guan, L. Lu, J. Zhang, N. Lu, and Y. Guan, "Engineered Functional Surfaces by Laser Microprocessing for Biomedical Applications," *Engineering*, vol. 4, no. 6. Elsevier BV, pp. 822–830, Dec. 2018. doi: 10.1016/j.eng.2018.09.009.
- [86] I. S. Kim et al., "Novel Effect of Biphasic Electric Current on In Vitro Osteogenesis and Cytokine Production in Human Mesenchymal Stromal Cells," *Tissue Engineering Part A*, vol. 15, no. 9. Mary Ann Liebert Inc, pp. 2411–2422, Sep. 2009. doi: 10.1089/ten.tea.2008.0554.
- [87] I. S. Kim et al., "Biphasic electric current stimulates proliferation and induces VEGF production in osteoblasts," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1763, no. 9. Elsevier BV, pp. 907–916, Sep. 2006. doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.06.007.
- [88] R. Tzoneva, "Influence of electric field on cell behavior. Electrotreatment of cells for biomedical applications" *Asian Journal of Physics*. vol 23. pp. 789-814., 2014
- [89] U. Pliquett, R. P. Joshi, V. Sridhara, and K. H. Schoenbach, "High electrical field effects on cell membranes," *Bioelectrochemistry*, vol. 70, no. 2. Elsevier BV, pp. 275–282, May 2007. doi: 10.1016/j.bioelechem.2006.10.004.
- [90] A. Yadollahpour and M. Jalilifar "Electromagnetic Fields in the Treatment of Wound: A Review of Current Techniques and Future Perspective" *Journal of Pure and Applied Microbiology*, vol.8, pp. 2863-2877, 2014

- [91] McLeod, K.J., and Rubin, C.T. The effect of low-frequency electrical fields on osteogenesis. *J Bone Joint Surg Am* 74, 920, 1992.
K. J. McLeod and C. T. Rubin "The effect of low-frequency electrical fields on osteogenesis" *The Journal of bone and joint surgery, American* vol 74, no 6, pp. 920–929, Jul 1992
- [92] K. Chang, W. H.-S. Chang, S. Huang, S. Huang, and C. Shih, "Pulsed electromagnetic fields stimulation affects osteoclast formation by modulation of osteoprotegerin, RANK ligand and macrophage colony-stimulating factor," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 23, no. 6. Wiley, pp. 1308–1314, Nov. 2005. doi: 10.1016/j.orthres.2005.03.012.1100230611.
- [93] K. J. McLeod, H. J. Donahue, P. E. Levin, M.-A. Fontaine, and C. T. Rubin, "Electric fields modulate bone cell function in a density-dependent manner," *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 8, no. 8. Wiley, pp. 977–984, Dec. 03, 2009. doi: 10.1002/jbmr.5650080811.
- [94] M. A. Vander Molen, H. J. Donahue, C. T. Rubin, and K. J. McLeod, "Osteoblastic networks with deficient coupling: differential effects of magnetic and electric field exposure," *Bone*, vol. 27, no. 2. Elsevier BV, pp. 227–231, Aug. 2000. doi: 10.1016/s8756-3282(00)00315-x. 2000.
- [95] H. Zhuang, W. Wang, R. M. Seldes, A. D. Tahernia, H. Fan, and C. T. Brighton, "Electrical Stimulation Induces the Level of TGF- β 1 mRNA in Osteoblastic Cells by a Mechanism Involving Calcium/Calmodulin Pathway," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 237, no. 2. Elsevier BV, pp. 225–229, Aug. 1997.
doi: 10.1006/bbrc.1997.7118.
- [96] C. A. Erickson and R. Nuccitelli, "Embryonic fibroblast motility and orientation can be influenced by physiological electric fields.," *Journal of Cell Biology*, vol. 98, no. 1. Rockefeller University Press, pp. 296–307, Jan. 01, 1984.
doi: 10.1083/jcb.98.1.296.
- [97] H.-P. Wiesmann, M. Hartig, U. Stratmann, U. Meyer, and U. Joos, "Electrical stimulation influences mineral formation of osteoblast-like cells in vitro," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1538, no. 1. Elsevier BV, pp. 28–37, Feb. 2001. doi: 10.1016/s0167-4889(00)00135-x.
- [98] M. Hartig, U. Joos, and H.-P. Wiesmann, "Capacitively coupled electric fields accelerate proliferation of osteoblast-like primary cells and increase bone extracellular matrix formation in vitro," *European Biophysics Journal*, vol. 29, no. 7. Springer Science and Business Media LLC, pp. 499–506, Aug. 30, 2000. doi: 10.1007/s002490000100.
- [99] L. A. Portelli, K. Falldorf, G. Thuróczy, and J. Cuppen, "Retrospective estimation of the electric and magnetic field exposure conditions in in vitro experimental reports reveal considerable potential for uncertainty," *Bioelectromagnetics*, vol. 39, no. 3. Wiley, pp. 231–243, Nov. 24, 2017. doi: 10.1002/bem.22099.
- [100] C. F. Blackman, S. G. Benane, and D. E. House, "The influence of temperature during electric- and magnetic-field-induced alteration of calcium-ion release from in vitro brain tissue," *Bioelectromagnetics*, vol. 12, no. 3. Wiley, pp. 173–182, 1991. doi: 10.1002/bem.2250120305.
- [101] T. Shirakawa, R. Sakai and S. Nakatake, "On-chip Impedance Evaluation with Auto-calibration based on Auto-balancing Bridge," 2018 IEEE 61st International Midwest Symposium on Circuits and Systems (MWSCAS), Windsor, ON, Canada, 2018, pp. 262-265. doi:10.1109/MWSCAS.2018.8623881
- [102] Gabetti, S., Masante, B., Cochis, A., Putame, G., Sanginario, A., Armando, I., Fiume, E., Scalia, A.C., Daou, F., Bains, F., Salati, S., Morbiducci, U., Rimondini, L., Bignardi, C., Massai, D., "An automated 3d-printed perfusion bioreactor combinable with pulsed electromagnetic field stimulators for bone tissue investigations". *Sci. Rep.* 12 (1), 13859. , 2022. doi: 10.1038/s41598-022-18075-1.
- [103] MIT, 2023. "Review of material properties". n.d. 6.777j/2.751j material properties database. URL: <https://www.mit.edu/~6.777/matprops/matprops.htm>
- [104] V. J. Hegde, O. Gallot-Lavallée and L. Heux, "Overview on thermal and electrical properties of biodegradable polymers," 2015 IEEE 11th International Conference on the Properties and Applications of Dielectric Materials (ICPADM), Sydney, NSW, Australia, 2015, pp. 540-543, doi: 10.1109/ICPADM.2015.7295328

- [105] "OPA462 High-Voltage (180-V), High-Current (30-mA) Operational Amplifier", OPA462, Rev. A, Texas Instruments, 2019. [Online]. Available: <https://www.ti.com/lit/ds/symlink/opa462.pdf>
- [106] "OPA627 and OPA637 Precision High-Speed Difet® Operational Amplifiers", OPA627, OPA637, Rev. A, Texas Instruments, 2015. [Online]. Available: <https://www.ti.com/lit/ds/symlink/opa627.pdf>
- [107] "Low Power, 12.65 mW, 2.3 V to 5.5 V, Programmable Waveform Generator", AD9833, Rev. G, Analog Devices, 2019. [Online]. Available: <https://www.analog.com/media/en/technical-documentation/data-sheets/ad9833.pdf>
- [108] Alexander, C. K., Sadiku, N. O., "Fundamentals of Electric Circuits", 4th Edition, Mc Graw Hill, 2009

Anexos

A.1. Script Arduino para Detecção de Picos

```
const int Pin = 0; // Analog pin to read value from potentiometer
double value[] = {0, 0}; // Array to store the last read value and the most
                        //recent one
double Peak;           // The peak of each impulse
double LastPeak = 0;  //Buffer for peak value
int thres = 10; //threshold to not fire the read all the time
String val;
char buf[5];

void setup() {
  Peak = 0; // initialize the peak value to 0
  Serial.begin(9600); // Start the Serial Monitor
}

void loop() {
  FindPeak();
}

void FindPeak(void) {

  value[0] = value[1]; // Shift the reading down by 1 in the
                      //array

  value[1] = analogRead(Pin); // Read in the current value
  delay(20); // Write a small delay (ms) into the sample time

  if ( abs(Peak - LastPeak) > 0.5 * thres
      && abs(Peak - LastPeak) < thres
      && Peak != LastPeak) //writing the peak value to serial
  {
    sprintf(buf, "%04d", int(Peak)); //making sure our number has always 4 digits
    val = String(buf);
    Serial.print("V");
    Serial.println(val);
  }

  // Using thres as the "zero" value helps to filter out noise that might act
  //as a false positive for a zero signal

  if (value[1] > thres && value[0] <= thres) //start of a non zero signal
  {
    LastPeak = Peak; //reseting last peak
    Peak = value[1]; // the first value sets the Peak baseline
  }

  else if (value[1] > thres && value[0] > thres) // we are still reading the signal
  {
    if (value[1] > Peak) //if the recorded value is higher than any other in
```

```
        //the same signal - record it as a peak
    {
        Peak = value[1];
    }

}

else if (value[1] <= thres && value[0] > thres) // end of peak
{
    // DO NOTHING
}

else {
    // This is the 0 state - when both value[1] and value[0] are < thres.
    // DO NOTHING
}
}
```