



**Michael Alexander Funk**

Licenciatura em Ciências de Engenharia Biomédica

## **Desenvolvimento de um Condicionador de Sinal para Eletroantennografia**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Biomédica

Orientador: Prof. Dr. Paulo António M. F. Ribeiro,  
CEFITEC, DF, FCT-UNL

Co-orientadores:

Prof. Dr. Maria Rosa S. de Paiva  
CEF, ISA, UTL, DCEA, FCT-UNL

Prof. Dr. Eduardo M. H. Pires Mateus,  
DCEA, FCT-UNL

Júri :

Presidente: Prof. Dra. Carla Maria Quintão Pereira

Arguente: Prof. Dr. Luís Filipe Figueira Brito Palma

Vogal: Prof. Dr. Paulo António M. F. Ribeiro



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Outubro de 2014**

**LOMBADA**



Desenvolvimento de um Condicionador de Sinal para Eletroantenografia  
Michael Funk

2014

Copyright © Michael Alexander Funk, FCT/UNL 2014

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e a distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja crédito ao autor e editor.



# Agradecimentos

A finalização desta dissertação não teria sido certamente possível sem o apoio incondicional de todos aqueles que estiveram comigo ao longo do tempo que frequentei o curso, e sobretudo ao longo deste últimos meses.

Em primeiro lugar agradeço ao orientador Professor Doutor Paulo Ribeiro e aos coorientadores Doutor Eduardo Mateus e à Professora Doutora Maria Paiva pela oportunidade de realizar esta dissertação, pelo apoio constante a que se prestaram, sem o qual não teria sido possível melhorar este trabalho gradualmente. Também pelo entusiasmo por este tema que me conseguiram inculcar, o que sempre ajudou a manter a motivação ao longo do trajeto deste trabalho.

Agradeço à Sofia Branco, cujo apoio técnico e teórico foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao pessoal técnico do departamento de Física da FCT-UNL: ao José Mesquita pelo apoio e pela disponibilidade em me ajudar a resolver questões técnicas do trabalho, relacionadas com a eletrotécnica e ao João Faustino pelo auxílio na construção de uma peça fundamental para este trabalho.

À Professora Doutora Cristina Cordas pelo aconselhamento teórico e prático na área da eletroquímica.

Agradeço ao Professor Doutor José Ferreira pela disponibilidade em me ajudar a resolver também determinadas questões técnicas de eletrónica e software.

Ao Jorge Ribeiro, pela ajuda e disponibilidade em me ajudar a resolver também questões com a parte de eletrotécnica e eletrónica e as mais variadas questões relacionadas com a parte do trabalho realizado no Departamento de Física.

Um agradecimento geral a todos os colegas, amigos e amigas que de alguma forma me apoiaram ao longo deste caminho.

Agradeço à minha companheira, Ana Gavancha, pelo enorme apoio que me deu motivando-me tanto ao longo de grande parte do curso, como ao longo do trabalho desta dissertação.

À minha família em geral, por me motivarem com enorme apoio, cada um à sua maneira.

Por fim, aos meus pais, cujo apoio gigantesco e incondicional sempre foram a base fundamental para conseguir chegar a este ponto.



## Resumo

O objetivo principal que motivou este trabalho foi o de construir um condicionador de sinal para medição da resposta elétrica das antenas de insetos devido à recepção de sinais químicos (Eletroantenografia). O estudo da resposta das antenas dos insetos é particularmente relevante para o estudo das pragas de insetos, para a sua monitorização, e também para a descodificação dos mecanismos olfativos nas relações planta-inseto, com consequências para o desenvolvimento de dispositivos biossensores. O trabalho desenvolvido enquadra-se numa área interdisciplinar da física, química, fisiologia, ecologia aplicada e saúde pública. O inseto usado nesta experiência foi o gorgulho do eucalipto (*Gonipterus Platensis*), que tem vindo a dizimar as plantações de eucalipto em Portugal, provocando graves perdas económicas aos proprietários. O condicionador desenvolvido consiste num sistema de “interface” com a antena do inseto e um amplificador operacional de baixo ruído e ganho variável, que permite amplificar o sinal elétrico da antena para níveis adequados à aquisição e tratamento de sinal. A vantagem do aparelho construído é o fácil manuseamento do material biológico e químico, comparado com ensaios de Eletroantenografia tradicionais com recurso a pipetas de “Pasteur”. Este projeto indicou que o sistema desenvolvido poderá ser capaz da medição da resposta da antena do gorgulho a estímulos olfativos de eucalipto.

Palavras-chave: Substâncias voláteis; Eletroantenografia; Biossensores; *Gonipterus Platensis*



## Abstract

The main goal that motivated this work was to build a signal conditioner for measuring the electrical response of the insect antennae when receiving chemical signals (Electroantennography). The study of the response of the insect's antenna is particularly relevant to the study and monitoring of insect pests and also for the decoding of olfactory mechanisms in the various plant-insect relationships with consequences for the development of biosensor devices. The work is part of an interdisciplinary area of physics, chemistry, physiology, applied ecology and public health. The insect used in this experiment was the eucalyptus weevil (*Gonipterus Platensis*), which has been decimating the eucalyptus plantations in Portugal, causing serious economic losses to the owners. The conditioner developed consists of an "interface" system with the insect's antenna and a low noise operational amplifier of variable gain, which amplifies the electrical signal from the antenna to the appropriate treatment levels of signal acquisition and processing. The strength of the unit built is the easy handling of the biological and chemical material comparing with traditional electroantennographic tests using "Pasteur" pipettes. This project indicated that the developed system may allow the measurement of the olfactory response by chemical stimuli of the weevil eucalyptus antenna.

Keywords: Volatile substances; electroantennography; Biosensors; *Gonipterus Platensis*



# Índice de matérias

|   |      |
|---|------|
| Resumo.....   | VII  |
| Índice de figuras.....  | XIII |
| Índice de tabelas.....  | XV   |
| Índice de abreviaturas, siglas e símbolos.....  | XVII |
| 1 - Introdução.....   | 1    |
| 1.1 - Descrição dos objetivos e do âmbito.....  | 1    |
| 1.2 -Aplicações do âmbito.....  | 4    |
| 1.3 - Enquadramento teórico.....  | 7    |
| 1.3.1 -Eléttodos e Preparação da Antena.....  | 9    |
| 1.3.2 -Amplificador Operacional.....  | 11   |
| 1.3.3 - Ensaio de uma medição de Eletroantografia.....  | 15   |
| 2 - Materiais e Métodos.....  | 17   |
| 2.1 -Materiais.....   | 18   |
| 2.1.1 - Circuito referente ao Amplificador Operacional.....   | 18   |
| 2.1.2 -Estrutura de “interface” entre estímulo químico, antena do inseto e eléctodos.....             | 23   |
| 2.1.3 - Eléttodos de Medida.....  | 28   |
| 2.1.4 -Placa de Aquisição da National Instruments modelo NI USB-6210.....                             | 29   |
| 2.1.5 – Software para aquisição e tratamento de dados: LabVIEW SignalExpress 2009 e MatlabR2010a..... | 30   |
| 2.1.6 -Sistema de Entrega da Amostra.....   | 31   |
| 2.1.7 - Material para Procedimentos experimentais e para a produção da solução Eletrolítica....       | 32   |
| 2.2 -Métodos.....   | 34   |
| 2.2.1- Montagem do Circuito elétrico para amplificação.....   | 34   |
| 2.2.2 - Procedimentos.....  | 35   |
| 2.2.3 -Montagem de suporte do sistema e do sistema de entrega do estímulo.....                        | 36   |
| 2.2.4 -Montagem da placa de aquisição de dados.....   | 39   |
| 2.2.5-Aquisição e Tratamento de Dados.....  | 41   |
| 3 - Resultados.....   | 47   |
| 4- Conclusão.....   | 51   |
| 5- Discussão.....   | 53   |



# Índice de figuras

- 1.1- Anatomia da antena de um inseto
- 1.2- Representação fotográfica do gorgulho do eucalipto
- 1.3- Esquemática da Antena do inseto como equivalente a blocos básicos de um circuito elétrico
- 1.4- Esquema do circuito elétrico equivalente da antena
- 1.5- Esquemática dos procedimentos utilizados para preparar a ponta do inseto inserindo-a na micropipeta de “Pasteur”, fixando a base da antena, cortando e humedecendo a ponta.
- 1.6- Representação de sistema portátil para posicionamento da antena feito de disco de “Perspex”
- 1.7- Comparação entre o sinal EAG com a antena em contacto apenas com ar e em contacto com o estímulo
- 1.8- Problemas característicos de um sinal EAG
- 1.9- Representações das ligações de múltiplas antenas em série e em paralelo
- 1.10- Ilustração da estabilização através de “lock-in”
- 1.11- Configuração de estímulo básico e medição.
- 1.12- Esquemática por ordem das várias etapas necessárias para a obtenção de um bom sinal EAG.
  
- 2.1- Esquema em que cada bloco constitui um elemento físico do sistema de medição EAG e as setas indicam a ordem da sequência.
  
- 2.2- Representação do circuito elétrico do INA114
  
- 2.3- Esquema padrão do circuito interno do amplificador
  
- 2.4- Fonte de Alimentação Traco Power TML 15212 com todas as ligações necessárias para conseguir alimentar o INA114
  
- 2.5- Peça que constitui a “interface” entre o eléctrodo, solução eletroquímica e antena do inseto.
  
- 2.6- Peça que fixa os eléctrodos e a parte final do tubo por onde passa o fluxo de ar contendo o estímulo sensorial servindo de suporte à saída do tubo.
  
- 2.7- Desenho técnico de ambas as peças da estrutura de “interface” entre estímulo químico, a antena e o eléctrodo.
  
- 2.8- Representação dos Eléctrodos de medição.
  
- 2.9 – Peça T, oca por dentro quer na parte vermelha quer branca.

**2.10** – Representação da pinça entomológica da seringa para manusear a solução de Ringer e da seringa para introduzir o odor.

**2.11** – Representação da antena posicionada na peça A, em contacto com a solução de Ringer

**2.12** – Suporte e estrutura da “interface” com a antena: suporte da antena, entrega de estímulo de odor e leitura do sinal elétrico da antena.

**2.13** – Esquema das portas de entrada (da 1 ao 16) e saída (da 17 ao 32) da placa de aquisição da National Instruments.

**2.14**- Representação esquemática dos constituintes físicos que constituem a instrumentação usada para a medição do sinal EAG segundo a sua ordem na Figura 2.1

**2.15** - Ambiente de trabalho do programa LabVIEW Express e os procedimentos necessários para configurar uma sessão de leitura de sinal.

**2.16**- Representação da FFT do sinal EAG obtido na medição.

**3.1** – Representação da medição do sinal EAG em que se procedeu à estimulação química da antena e das medições de validação.

**3.2** – Representação da despolarização da antena em resposta ao estímulo de odor

# Índice de tabelas

**2.1-** Valores de ganho e correspondente resistência necessária a usar, usualmente usados com o INA114

**2.2-** Características dos elétrodos de medição

**2.3** -Tempos registados em que foi introduzido o estímulo na experiência.

**2.4** – Os valores dos parâmetros seleccionados no Matlab para a construção de cada filtro.

**3.1** - Tabela onde estão representados os dados acerca dos tempos de estímulo e pico e das voltagens características do sinal EAG registado.



# Índice de abreviaturas, siglas e símbolos

EAG -Eletroantennografia

CG – Cromatografia Gasosa

*s* – segundos

*ms* – milissegundos

*V* – Volt, unidade de potencial elétrico

*mV* – milivolt, ordem de potencial elétrico dividida por mil

$\mu V$  – microvolt, ordem de potencial elétrico dividida por um milhão

$\Omega$  - Ohm, unidade de resistência elétrica

*k $\Omega$*  – kilohm, unidade de resistência elétrica multiplicada por mil

*t*– tempo

*t<sub>0</sub>*– tempo inicial

*Hz* – Hertz, unidade de frequência

AC – “Alternating Current” (Corrente Alternada)

FFT - “Fast Fourier Transform” (Transformada Rápida de Fourier)

SNR- Relação sinal-ruído:  $\frac{Sinal}{Ruido}$

# 1 - Introdução

## 1.1 - Descrição dos objetivos e do âmbito

O objetivo principal que motivou este trabalho foi construir um condicionador de sinal para medição da resposta elétrica das antenas de insetos à recepção de sinais químicos (Eletroantenografia). O estudo da resposta das antenas dos insetos é particularmente relevante para o estudo das pragas de insetos, para a sua monitorização e para a descodificação dos mecanismos olfativos nas relações planta-inseto, com consequências para o desenvolvimento de dispositivos biossensores. O trabalho desenvolvido enquadra-se numa área interdisciplinar da física, química, fisiologia, biologia, ecologia aplicada e saúde pública.

O estudo de fenómenos elétricos em matéria viva, por exemplo correntes elétricas, causadas por um estímulo, faz parte da eletrofisiologia. No sec. XVII Galvani descobre que o funcionamento do sistema nervoso tem por base a atividade elétrica. Desde então têm sido desenvolvidos instrumentos com capacidade de medir e controlar a atividade elétrica. Os instrumentos modernos, devido à sua elevada sensibilidade e resolução temporal, permitem o estudo das propriedades elétricas dos canais iónicos na membrana das células dos seres vivos, e também de fenómenos mais complexos que compreendem centenas de milhares de células que constituem as redes neuronais. A eletrofisiologia abrange, deste modo, todos os níveis de compreensão, desde o nível molecular ao comportamental do funcionamento do sistema nervoso.

Os neurónios são células que integram e propagam sinais elétricos, comunicando entre si, assim como com outros órgãos e músculos. Sendo assim, o conhecimento básico de eletrofisiologia é fundamental para compreender a função dos neurónios e sistemas neuronais.

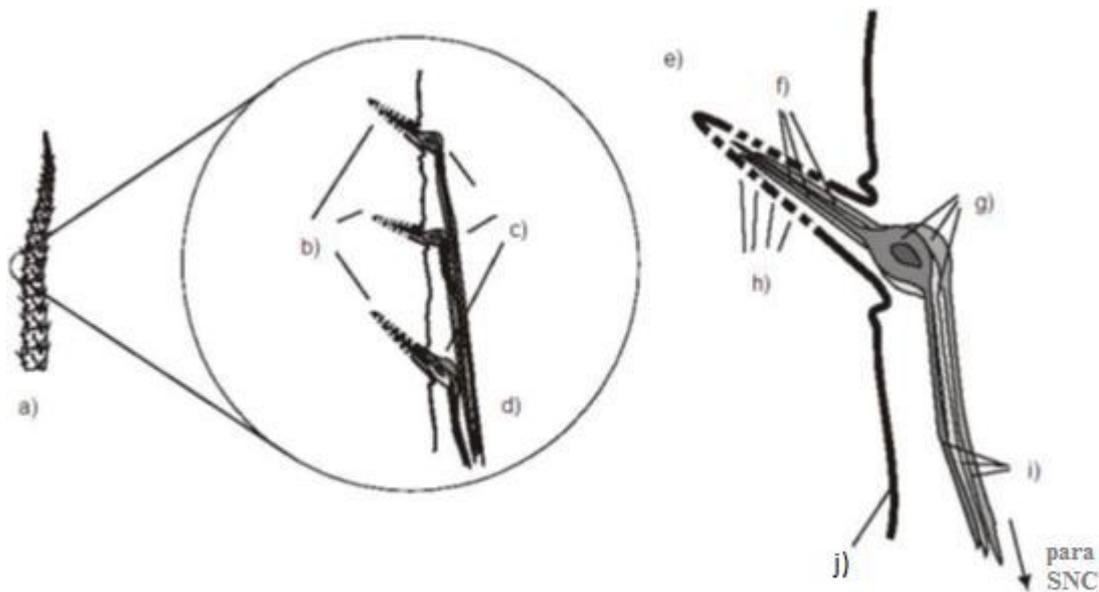
A atividade elétrica a nível celular pode ser descrita como o movimento de cargas (iões) através das superfícies membranares neuronais. Os iões carregados são maioritariamente os de sódio ( $\text{Na}^+$ ), potássio ( $\text{K}^+$ ), cloro ( $\text{Cl}^-$ ) e cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). As superfícies das membranas constituem-se essencialmente por lípidos (elementos resistivos, em termos elétricos) que restringem o fluxo de iões. Estes iões passam por agregados de proteínas especializadas que formam poros ou canais ao longo da membrana lipídica. Para cada um dos iões carregados de carga existem um ou mais grupos proteicos específicos (normalmente mais que um). São exemplo disso certos catiões que conferem uma natureza semipermeável à membrana. Há vários fatores que determinam a abertura desses canais ao fluxo de

iões, como a diferença de potencial através da membrana, o gradiente de iões causado por bombas iónicas existentes na membrana, e a natureza semipermeável dos canais - como a resposta a recetores - proteínas de ligação trifosfato de guanosina (GTP) e mensageiros secundários a neurotransmissores e hormonas. À alteração do equilíbrio entre os iões dentro e fora da célula, criam-se diferenças de potencial eléctrico, como resposta ao estímulo.

Através do uso de eléctrodos de metal, vidro ou silicone, que permitem a leitura de sinais eléctricos associados ao fluxo de iões através das membranas neuronais, é possível escutar a atividade dos neurónios, com um elevado rácio sinal-ruído. A vantagem mais proeminente é o facto de a atividade eléctrica poder ser medida diretamente, e não através de um transdutor (neste contexto um sensor que traduz informação não eléctrica em informação eléctrica, ou seja, mede indiretamente a informação eléctrica).

A partir da segunda metade do sec. XX, o sistema periférico sensitivo dos insetos, as antenas, foi estudado com grande detalhe (Kaissling, 1971, Steinbrecht e Schneider 1980, Kaissling and Thorson, 1980). Schneider efetuou as primeiras experiências eletrofisiológicas sobre o olfato dos insetos com *Bombyx mori* (o bicho da seda), tendo assim dado os primeiros passos para a Eletroantenografia, isto é, o registo de electro-antenogramas (EAG). Foi demonstrado com este inseto que se podem registar diferenças de potencial de acção lenta nos recetores olfativos, posicionando dois microeléctrodos (introduzidos no interior de pipetas “Pasteur” e que podem ser filamentos de um metal como tungsténio) em extremidades opostas duma antena isolada. O sinal eléctrico da antena pode assim ser amplificado e registado. Em 1963 Schneider sugeriu que o sinal eléctrico gerado na antena é a soma de várias diferenças de potencial geradas nos recetores olfativos num dado intervalo de tempo. A diferença de potencial total registada resultante das reacções eléctricas lentas das células olfativas das dendrites foi interpretada como sendo uma despolarização do recetor da membrana. Assim, a amplitude das respostas tem uma relação direta com a frequência dos impulsos nervosos, a qual aumenta proporcionalmente à concentração dos estímulos químicos, até se atingir um nível de saturação. O sinal do EAG é, então, formado pela diferença de potencial eléctrico gerada por dezenas ou até centenas de milhares de diferentes neurónios olfativos existentes na antena de um inseto (Kaya e Stopfer. 2006), medido entre as suas pontas, sinal este que resulta de um estímulo de um composto químico.

A relação entre o EAG, as estruturas químicas e as propriedades elétricas das sensilas olfativas foi compilada por Kaissling e Thorson (1980). As antenas dos insetos machos da maioria das espécies de borboletas têm milhares de “sedas” que têm o nome de sensilas, onde estão contidas as células sensoriais olfativas. Distinguem-se diversos tipos de sensila: por exemplo as que são sensíveis a feromonas das fêmeas de muitas borboletas são designadas por sensila *trichodea*. O lúmen das células recetoras contem hemolinfa onde se encontram as terminações das dendrites de várias células recetoras (Roelofs,1984). As paredes de cada sensillum são perfuradas por milhares de poros tubulares de 100 Å que estão provavelmente envolvidos na difusão de odores a nível molecular, até às dendrites recetoras da célula (e.g. Birch et al. 1982) (Roelofs, 1984). Na Figura 1.1 podem ver-se as várias componentes que constituem a antena do inseto e um sensillum olfativo.



**Figura 1.1**-Anatomia da antena de um inseto. **Legenda:**a) Antena ; b)Três sensila olfativa; c) Células recetoras; d)Axónios; e) Sensillum olfativa f) Dendrites ; g) Células recetoras; h) Poros ; i) Axónios; j) Cutícula; SNC) Sistema Nervoso Central (imagem adaptada do manual “ELETROANTENNOGRAPHY a practical introduction” SYNTECH 2004)

Estudos efetuados com o bicho-da-seda, *Bombyx mori*, indicaram que uma molécula de feromona pode ser suficiente para desencadear um impulso nervoso. Ocorre a transformação de um estímulo químico em estímulo elétrico, fenómeno designado por transdução, do qual resulta a abertura de um canal iónico por despolarização da membrana do sensillum.

Posteriormente, estudos de Kaissling (1979), mostraram que este fenómeno é devido a pequenas flutuações que antecedem qualquer impulso nervoso, em cerca de 10-40ms.

A mais-valia do EAG é o facto de constituir um biossensor que dá uma resposta muito seletiva que depende da espécie de inseto, discriminando de uma forma muito favorável um ou vários compostos

voláteis específicos, dentro de uma mistura de compostos. Por conseguir determinar em relação a uma mistura, as concentrações dos compostos constituintes, em tempo real, o EAG permite relacionar medições de sinal elétrico gerado com a concentração de um estímulo volátil no ar.

Note-se que a técnica do EAG constitui o primeiro passo para a compreensão da resposta de uma determinada espécie de insetos a um estímulo volátil, isto é, permite identificar quais as substâncias que essa espécie é capaz de detetar olfativamente. Independentemente de um estímulo ser detetado com o biossensor, o inseto poderá, ou não, ter uma reacção de aproximação, ou de afastamento, da fonte do odor. O segundo passo consiste na realização de testes comportamentais com insetos vivos, que embora tratando-se de uma metodologia científica cujos resultados são quantitativos e analisados estatisticamente, é muito laboriosa. A técnica do EAG permite assim seleccionar, à partida, os compostos que possuem efeito olfativo sobre os insetos, os quais posteriormente serão testados a nível comportamental. Esta triagem resulta numa enorme economia de tempo e meios.

Devido à resposta rápida a um aumento súbito de concentração dum composto, a sensibilidade das antenas dos insetos revela-se superior a quaisquer sensores artificiais desenvolvidos, que normalmente reagem apenas a uma média da concentração do composto que se pretende detetar num dado intervalo de tempo, e não a um pico de concentração. A rapidez de resposta pode chegar às três despolarizações por segundo (Park, Ochieng, Zhu e Baker 2002). Por isso a antena do inseto é por excelência o melhor sensor na deteção de compostos voláteis, especialmente quando estes estão presentes em pequenas concentrações (Park et al, 2002).

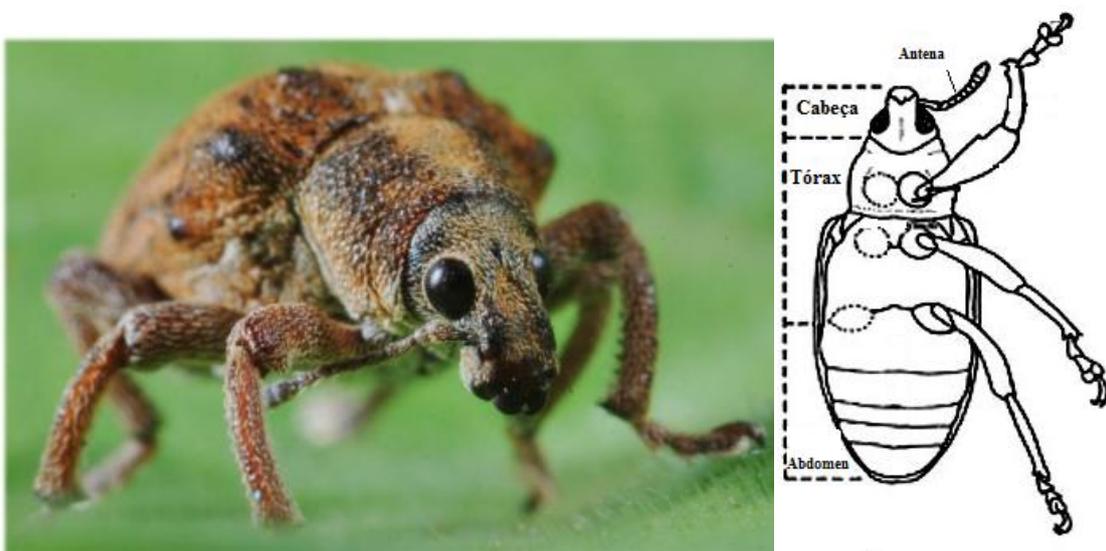
## **1.2 -Aplicações do âmbito**

A deteção de sinal EAG é usada nos mais variados contextos sendo que ao longo dos anos tem sido utilizada repetidamente com sucesso na identificação de odores associados à atração entre sexos opostos. Permite a deteção de compostos voláteis libertados por plantas, que são indicadores do seu estado fisiológico. Utiliza-se por exemplo para controlo de qualidade de produtos agrícolas, tais como as batatas, que libertam odores específicos quando têm alguma doença, servindo assim para controlo de qualidade destes produtos. Também possibilita a deteção de baixas concentrações de produtos explosivos como DNT e TNT, e outros químicos tóxicos como o 2-diisopropilaminoetanol e 2,2-tiodietanol, de forma a promover maior segurança pública.

O estudo da resposta das antenas dos insetos é também particularmente relevante para o estudo e controlo de pragas de insetos responsáveis por impacto ambiental e económico ou vetores de propagação de doenças. Neste trabalho irá se utilizar como objeto de estudo um coleóptero, o gorgulho do eucalito (*Gonipterusplatensis*) causador da destruição dos eucaliptos na Península Ibérica e em

outras partes do mundo, por causar grandes desfolhas. Na Figura 1.2 encontra-se esquematizado o inseto referido.

Estima-se que este inseto reduz em 30% o crescimento dos eucaliptos causando assim perdas económicas anuais de 10,5 milhões de dólares na Galiza (Mansillaand Pérez, 1996; La Voz de Galicia, 2003). Em Portugal é estimada uma diminuição em 51% do volume de madeira produzida nas áreas afetadas pelo gorgulho do eucalipto no período de 2004 a 2006, que foi originada por um aumento exponencial da desfolha das árvores. Para 75% ou 100% desfolha registam-se perdas de volume de madeira respetivamente de 43% e 86%, (Reis, et al, 2012).



**Figura 1.2-** Representação do gorgulho do eucalipto (*Gonipterus platensis*) (Imagem da esquerda adaptada da foto de Paulo Borges, Azorean Biodiversity Group ; Imagem da direita adaptada de (Marvaldi, et al, 2005))

Um outro exemplo de praga que importa ser estudada através de EAG é o bicho da madeira *Hylotrupes bajulus* que destrói a madeira utilizada na construção das estruturas de habitações e em móveis. Este inseto, alimentando-se da madeira na sua fase de larva, fase esta que pode durar entre 2 a 8 anos até que a lagarta se torne num inseto adulto. Este inseto originário da Europa está disperso por todas as regiões do mundo de clima moderado (Weissbecker, 2004). As galerias que a larva escava na madeira ao comê-la, resultam em perdas económicas significativas, nomeadamente nas edificações de madeira. O conhecimento dos odores dos compostos voláteis relevantes na orientação do bicho da madeira, nomeadamente em relação à escolha do local de oviposição, poderá resultar no desenvolvimento de novos métodos para proteção da madeira e controlo desta praga.

Do ponto de vista da saúde pública sabe-se que, até certo ponto e nalgumas circunstâncias, os mosquitos selecionam de entre as várias pessoas que se encontrem num local, algumas delas que são

preferencialmente picadas. Usando a técnica da Eletroantenografia acoplada a Cromatografia gasosa, foi possível identificar alguns odores corporais de pessoas que evitam picadas dos mosquitos transmissores da malária. Supõe-se que tal se deve à emissão de substâncias que mascaram os odores que normalmente atraem os mosquitos (CORDIS RTD-NEWS European. 2006). Esta linha de investigação contribui para o desenvolvimento de repelentes naturais, que poderão ser aplicados na pele sem efeitos nocivos e sem causar impactos ambientais.

Existem muitas outras doenças transmitidas por mosquitos, sendo que em consequência das alterações climáticas, o sul da Europa e em particular Portugal, tenderá a ter um clima mais propício à sua proliferação. Além de infetarem pessoas, infetam ainda o gado, pelo que ameaçam diretamente a saúde pública, e originam um problema adicional que é o da diminuição da produção de alimentos, com o consequente aumento da pobreza das populações.

O combate de pragas de insetos é hoje em dia feito recorrendo-se à aplicação de inseticidas tóxicos de largo espectro, que provoca grande impacto ambiental com consequências para a saúde humana. Além disso, observa-se que ocorre um gradual aumento de resistência aos inseticidas por parte dos insetos alvo. Para contornar estes aspetos negativos, uma solução proposta passa pelo uso de métodos de controlo não tóxicos, de forma a modificar o comportamento e desenvolvimento dos agentes patogénicos.

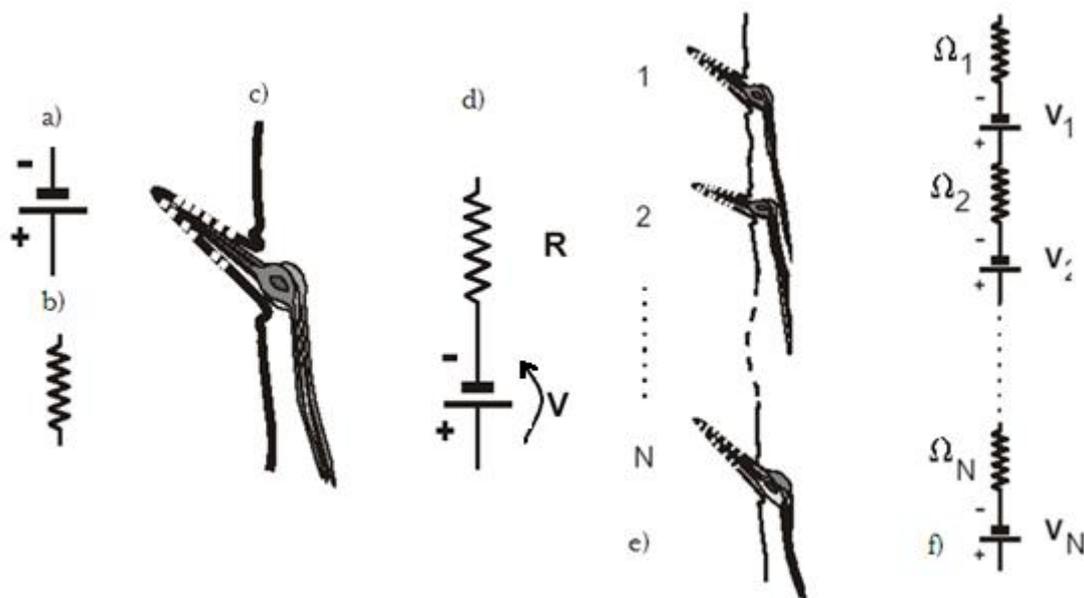
De modo a identificar compostos voláteis que originam respostas fisiológicas nos insetos, o EAG pode ser combinado com cromatografia gasosa (CG) e espectrometria de massa. Na combinação do EAG e do CG, o efluente do CG é dividido, passando simultaneamente em paralelo na antena do inseto e por um detetor de CG, como por exemplo um FID (“Flame Ionization Detector”). Os picos do CG, correspondentes aos compostos que desencadeiam a resposta do inseto, podem então ser detetados (Myrick, 2011). Aplicações anteriores do sistema CG-EAG permitiram a identificação de um largo número de componentes de feromonas, pelo que é ainda utilizado com sucesso para este fim (Myrick, 2011). Recentemente o CG-EAG tornou-se uma ferramenta importante para estudar as interações entre espécies no campo da ecologia química (Myrick, 2011). Vários estudos nesta área têm usado a combinação CG-EAG, para identificar quais os componentes que dão uma resposta fisiológica significativa no caso das moscas da fruta, vários insetos que são pragas florestais, bem como a comunicação química entre insetos, os seus predadores e os voláteis de plantas hospedeiras.

Normalmente o uso de aparelhos EAG, quando acoplados a gás cromatografia, permitem também estimar a quantidade de feromona emitida, em unidades relativas, libertada por determinado inseto.

### 1.3 - Enquadramento teórico

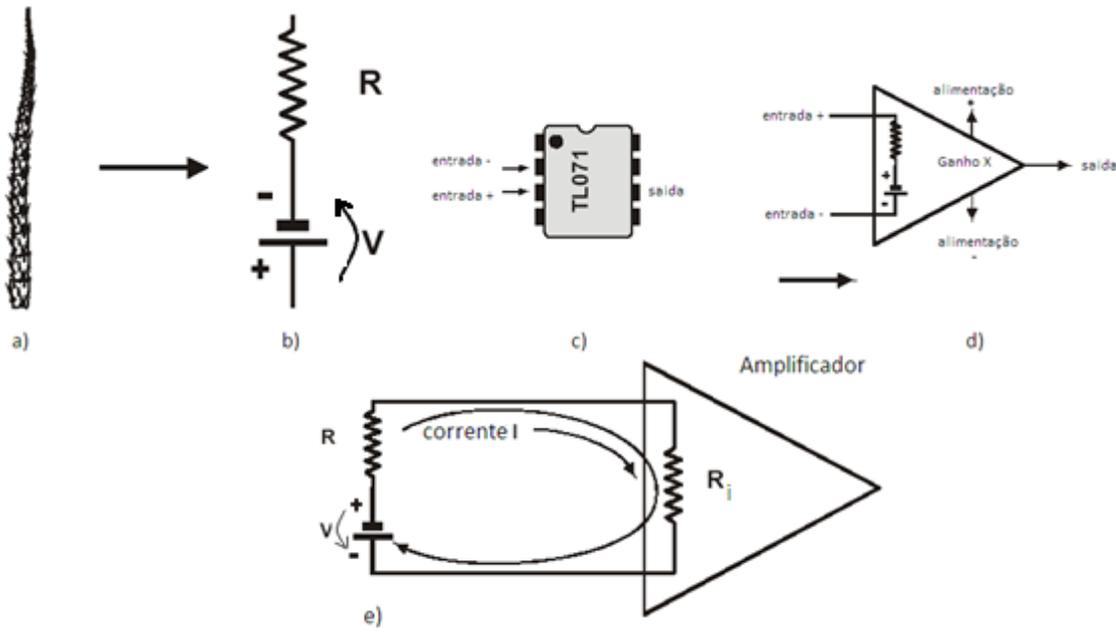
São necessários instrumentos sensíveis para gravar flutuações de potencial tão pequenas como as que se verificam ao longo da antena de um inseto. Estas pequenas flutuações de potencial necessitam de ser acondicionadas e convenientemente amplificadas antes de serem registadas (SYNTECH, 2004).

A fase mais delicada no acondicionamento do sinal EAG é a ligação da antena à entrada do amplificador. De modo a otimizar esta “interface” e compreender o comportamento elétrico da antena, considera-se, esta como sendo constituída por fontes de tensão e resistências elétricas. Cada célula recetora da antena do inseto é representada como o circuito elétrico constituído por uma fonte de tensão e uma resistência elétrica em série (como representado na Figura 1.3.c,d). A antena é então a combinação de várias células olfativas, com este esquema eletrónico, que formam uma linha sequencial constituída por fontes de tensão ( $V_1-V_n$ ) e resistências ( $R_1-R_n$ ) (representado na Figura 1.3.e, f). Estas fontes de tensão somam-se contribuindo para o sinal de EAG. Tem-se assim então a antena como equivalente a uma fonte de tensão e uma resistência elétrica em série tal como representado na Figura 1.3. Uma vez considerando as antenas de um inseto como sendo componentes de um circuito elétrico, podem ser tratados e utilizados para fazer medições em termos de eletricidade como qualquer outro componente de um circuito elétrico “tradicional”, ou seja, de origem não biológica.



**Figura 1.3-** Esquemática da Antena do inseto como equivalente a blocos básicos de um circuito elétrico  
**Legenda:** **a)** Símbolo para fonte de tensão elétrica (medida em *Volt*); **b)** Símbolo para resistência elétrica (medida em *Ohm*); **c)** Sensillum: célula recetora; **d)** Esquema eletrónico equivalente ao da célula recetora; **e)** considera-se a antena de um inseto como um “array” de células recéptoras; **f)** Esquema eletrónico equivalente da antena de um inseto (imagem adaptada do manual *ELEKTROANTENNOGRAPHY a practical introduction* SYNTECH 2004)

A entrada do amplificador é também equivalente a uma fonte de tensão e uma resistência. A fonte de tensão de um bom amplificador é muito baixa e pode ser ignorada na análise do circuito. Na Figura 1.4 encontra-se representado o circuito completo correspondente da ligação da antena com o amplificador.



**Figura 1.4** – Esquema do circuito elétrico equivalente da antena conectada com amplificador. **Legenda:** **a)** Antena; **b)** Equivalente eletrônico da Antena; **c)** Amplificador (catálogo do amplificador TL071); **d)** Diagrama elétrico do amplificador; **e)** Montagem onde:  $V$  é a Fonte de Tensão que gera a corrente  $I$  do circuito de entrada que corre através da resistência  $R$  constituída pela antena e pela resistência interna do amplificador  $R_i$  (imagem adaptada do manual “ELETROANTENNOGRAPHY a practical introduction” SYNTECH 2004)

Aplicando ao circuito apresentado pela Figura 1.4.e, ao substituir na lei de Ohm o valor de resistência pelas resistências em série  $R$  e  $R_i$  e o valor da tensão pela sua fonte de alimentação  $V$  fica-se com:

$$V = I \times [R + R_i] \quad (1)$$

Note-se que a voltagem que passa por  $R$  é  $I * R$  e a voltagem que passa por  $R_i$  é  $I * R_i$  o que nos leva a concluir que  $R_i$  deve ter uma resistência elevada comparada com  $R$ , para que a corrente gerada pela antena seja amplificada. Para uma corrente igual à saída do amplificador é necessário que a sua resistência seja igual à da antena. Uma vez que resistência das antenas dos insetos é tipicamente da ordem de  $10\text{M}\Omega$ , a amplificação do sinal gerado na antena requer amplificadores de elevada impedância de entrada como a dos amplificadores operacionais que é tipicamente superior a  $10^{12}\Omega$ .

A instrumentação subjacente à EAG necessita de eléctrodos para servir de “interface” entre a antena e o amplificador operacional. Para que o sinal seja gravado e posteriormente tratado é necessário um sistema de aquisição de dados ligado à saída do amplificador.

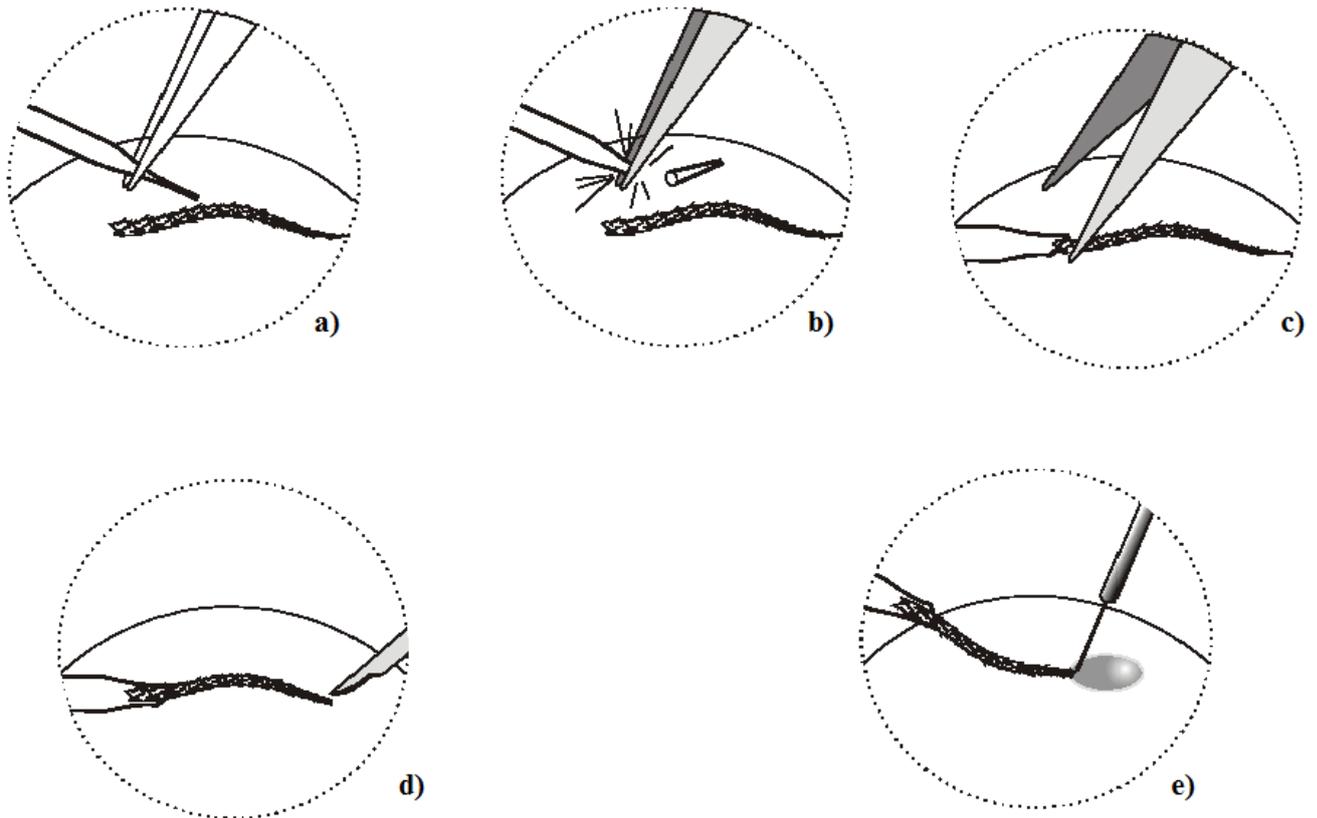
Para fins experimentais é necessário também tomar alguns procedimentos prévios antes de medir um sinal de EAG. É necessário preparar convenientemente a antena de forma a garantir que ao conecta-la aos eléctrodos haja medição do sinal, e consequente transmissão à entrada do amplificador. Além disso para que se possa medir um sinal eléctrico da antena é necessário transmitir para a antena um odor. Para isso é preciso construir um sistema de entrega de odor. É importante então descrever a instrumentação e os procedimentos necessários para os ensaios onde se meça um sinal de EAG.

### **1.3.1 -Eléttodos e Preparação da Antena**

Os eléctrodos podem ser de tungsténio, ou mais comumente de Ag/AgCl como os que usualmente se utilizam em eletroquímica. Neste último caso, o fio de cloreto de prata é usado como eléctrodo de menor potencial, sendo imerso numa solução salina, fazendo assim contacto eléctrico com a base da antena enquanto que o fio de prata é usado como o eléctrodo de potencial mais elevado.

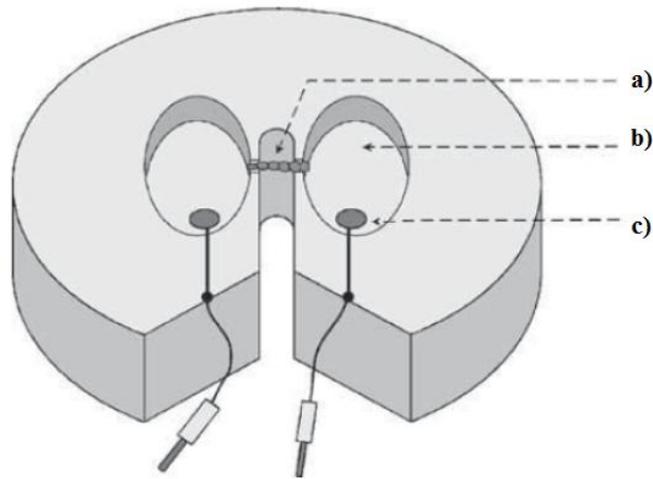
A forma mais usual de se posicionar a antena consiste em inserir uma ponta, ou as duas, dentro duma pipeta “Pasteur”, onde se introduz também o eléctrodo que é imerso numa solução salina. Este procedimento está esquematizado na Figura 1.5.

A antena, depois de excisada da cabeça do inseto, é premida contra um leito de “Tackiwax” (cera). Na maioria dos casos alguns segmentos distais da antena são cortados com micro tesouras, e de seguida o eléctrodo de medição é micromanipulado por cima da ponta da antena (como mostrado esquematicamente na Figura 1.5). Em lepidópteros descobriu-se que quase todas as soluções salinas podem ser usadas como meio de transmissão resultando todas elas em sinais de EAG registados nítidos (Roelofs, 1984). Um exemplo de solução salina muitas vezes usada é a seguinte: NaCl (7,5g/litro); CaCl<sub>2</sub> (0,21 g/litro); KCl (0,35 g/litro) e NaHCO<sub>3</sub> (0,2 g/litro).



**Figura 1.5** – Esquemática dos procedimentos utilizados para preparar a ponta do inseto inserindo-a na micropipeta de “Pasteur”, fixando a base da antena, cortando e humedecendo a ponta. **Legenda:** **a)** Partir a ponta da micropipeta; **b)** Fazer com que o diâmetro da ponta resulte ligeiramente mais larga que o diâmetro da base da antena; **c)** Colocar com cuidado a base da antena dentro da ponta da pipeta; **d)** Cortar alguns segmentos da pipeta; **e)** Humedecer a ponta com uma pequena quantidade de solução salina (imagem adaptada do manual “ELETROANTENNOGRAPHY a practical introduction” SYNTECH 2004)

Outras alternativas existem, que não envolvem necessariamente o uso de pipetas “Pasteur”. Um exemplo disso será a construção de uma estrutura especialmente desenhada para facilitar o processo de fazer a “interface” da antena com o elétron e a própria preparação deste último. Na Figura 1.6 vê-se um modelo portátil de suporte da antena e interface com os elétrons feito a partir de um disco de “Perspex”, onde existe uma cavidade onde a antena pode ser posicionada mais facilmente do que se tivesse que ser inserida na ponta de uma pipeta de “Pasteur”. As extremidades da antena estão em contacto com soluções eletrolíticas (que estão dentro de dois poços adjacentes à cavidade, cada um respetivamente para cada extremidade das antenas) que fazem conduzir o sinal elétrico, desde a antena até a um elétron de Ag/AgCl, por sua vez, que vai ser amplificado posteriormente. A longevidade da antena é em média de 60 minutos.

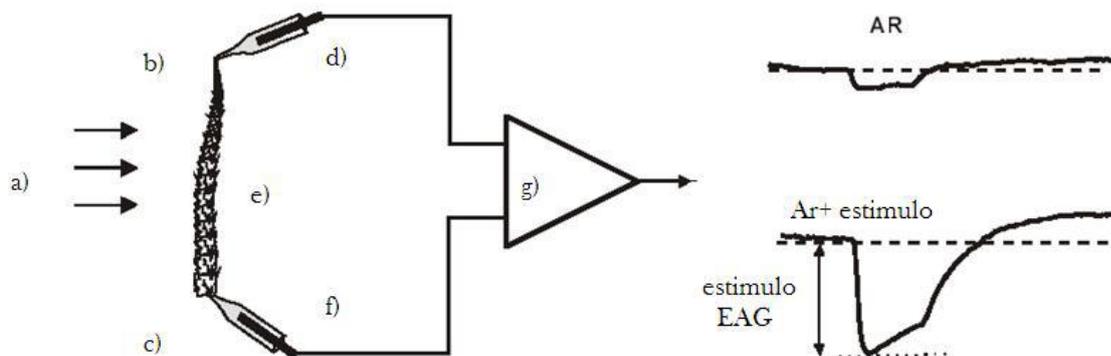


**Figura 1.6** – Representação de um sistema portátil para posicionamento da antena feita de disco de “Perspex” (diâmetro 27mm, altura 12mm); **Legenda:** **a)** Antena esticada posicionada na fenda central; **b)** Solução eletrolítica dos poços em contacto com as pontas das antenas; **c)** Eletrodos AgCl/Ag em contacto com solução eletrolítica que conduz o sinal via cabos de prata (imagem adaptada de (Weissbecker, et al, 2004))

### 1.3.2 -Amplificador Operacional

Uma vez que os potenciais gerados nas antenas são entre alguns microvolts e milivolts, geralmente amplifica-se cerca de 100 vezes o sinal. O exemplo de um amplificador usado para este fim é o amplificador operacional jFET TL071.

Na Figura 1.7, encontra-se representada uma montagem possível para a recolha de sinal de EAG. Neste caso, a antena é sujeita ao contacto com o ar sem estímulo, e posteriormente o estímulo é bruscamente introduzido misturando no ar o composto estimulante, registando-se então a despolarização elétrica resultante.

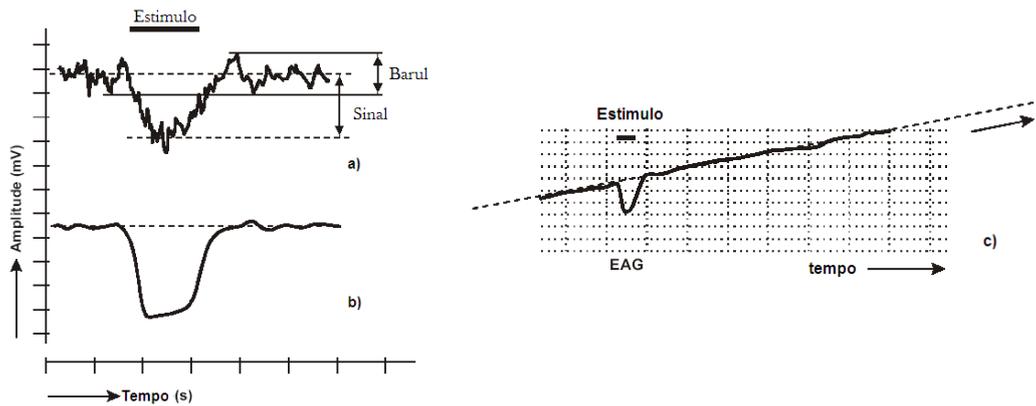


**Figura 1.7** – Comparação entre o sinal EAG com a antena em contacto apenas com ar e em contacto com o estímulo. **Legenda:** **a)** Estimulo misturado no ar; **b)** Ponta; **c)** Base; **d)** Eléctrodo da ponta; **e)** Antena; **f)** Eléctrodo da base; **g)** Amplificador (imagem adaptada do manual de “ELETROANTENNOGRAPHY a practical introduction” SYNTECH 2004)

O que determina a qualidade de um EAG é o seu SNR. A amplificação do sinal EAG requer assim alguns cuidados já que o ruído extrínseco pode-se sobrepor-se ao sinal intrínseco do EAG. O ruído pode ter várias origens, nomeadamente:

- Ruído gerado nas resistências da antena e entrada do amplificador;
- Ruído biológico;
- Movimento na antena causado por contrações musculares, flutuações de ar e vibração mecânica a partir do circuito;
- Humidade ambiental;
- Outros odores desconhecidos presentes no ambiente que ativem a antena;
- Ruído eletromagnético proveniente de fontes externas interferindo com os circuitos;
- Deriva lenta do sinal (aumento ou diminuição) ao longo do tempo, como representado na Figura 1.8.c;
- Diferenças de qualidade dos contactos entre eléctrodos e antenas;
- Outros sinais EAG muito pequenos (como por exemplo originados por compostos voláteis que não feromonas, provenientes de plantas) que podem ser mascarados pelo ruído;

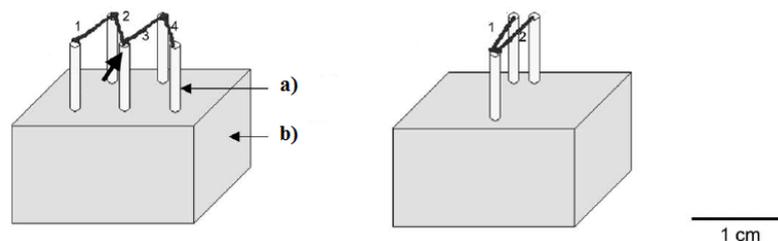
Assim se entende facilmente que um dos objetivos principais, ao medir um sinal EAG, será maximizar o SNR até ao ponto em que o sinal correspondente ao estímulo seja distinguível. Na Figura 1.8 pode-se ver o exemplo de dois sinais diferentes de EAG: um com um rácio baixo de S/N e outro com rácio alto S/N. É prática comum recorrer-se a filtros eletrónicos adequados, e blindagem elétrica adequada para se minimizar o ruído extrínseco. Exemplos deste tipo de ruído são os 50 ou 60 Hz da rede elétrica e ruído eletromagnético circundante, gerado por outros aparelhos eletrónicos em redor.



**Figura 1.8** – Problemas característicos de um sinal EAG **Legenda:** a) Exemplo de sinal com baixo SNR (muito ruído); b) Exemplo de sinal com elevado SNR (pouco ruído); c) Deriva da “Baseline” para cima (imagem adaptada do manual “ELETROANTENNOGRAPHY a practical introduction” SYNTECH 2004)

O uso de gaiola de Faraday é adequado para blindar o circuito de entrada (da antena e amplificador), reduzindo-se assim o ruído aí induzido, o que pode ser complementado, com os já referidos filtros eletrônicos, nomeadamente passa-baixo, típicos de ruído eletromagnético, enquanto deixam passar as frequências mais baixas com períodos maiores que 1 s e inferiores que 10 s, ou seja com frequências entre 0.1 e 1 Hz.

Outras técnicas têm vindo a ser utilizadas para suprimir o ruído e aumentar o SNR. Uma dessas técnicas consiste na montagem de, em vez de só uma, várias antenas, o que permite aumentar a sensibilidade total sem alterar a forma de onda do EAG. A utilização de várias antenas provoca um aumento tanto do ruído como do sinal, porém verifica-se que o sinal aumenta mais que o ruído, aumentando assim o SNR. Existem duas formas de ligar várias antenas entre si: em série ou em paralelo. Na ligação em série a sensibilidade geral aumenta (geralmente num fator de 10) em relação ao uso de uma só antena, o que possibilita a deteção de compostos com concentrações mais baixas. Na ligação em paralelo é possível reduzir o ruído de grande amplitude, apesar de não melhorar o rácio geral de S/N. Na Figura 1.9 estão representadas ligações de antenas em série e em paralelo.

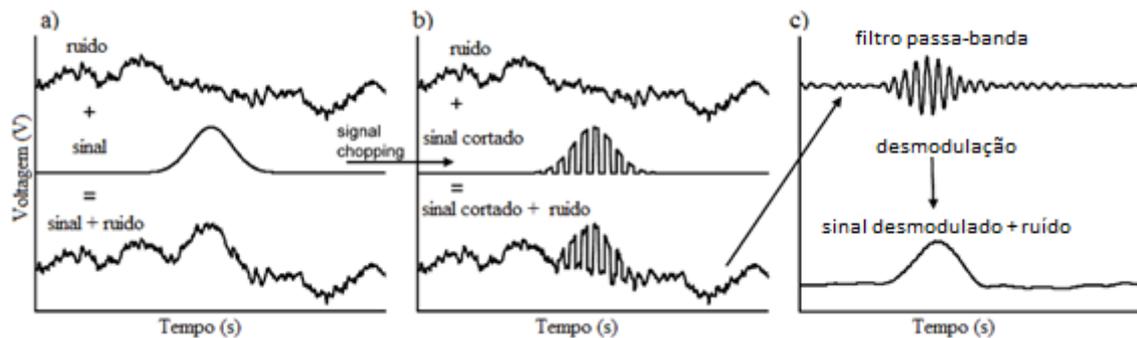


**Figura 1.9** – Representações das ligações de múltiplas antenas em série em (esquerda) e em paralelo (direita), onde em cada representação as antenas estão designadas por números; **Legenda:** a) Tubos de vidro; b) Bloco de plasticina. (imagem adaptada de artigo Park, 2002)

Outra técnica implementada no contexto da combinação GC-EAG consiste em discriminar o verdadeiro sinal do ruído associado, usando algoritmos que filtrem o sinal ao reconhecer a forma característica e comprimento de onda do sinal EAG. Tradicionalmente o pico do sinal EAG a tempos de retenção (tempo em que o composto foi identificado pelo GC) seria identificado pela consistência da repetição do pico de EAG no mesmo tempo de retenção, depois de múltiplas repetições sucessivas do mesmo teste. Também o ruído seria discriminado devido à improbabilidade estatística de um pico gerado por este ocorrer simultaneamente no mesmo sítio e ultrapassar um nível limite. Esta forma de discriminar o ruído implica inserir uma incerteza, devido ao sinal de EAG ser discriminado visualmente pelo operador, além de nesta maneira se negligenciar a forma do sinal, visto ser apenas tida em conta a sua amplitude. Uma vez que o sinal analógico do EAG é geralmente convertido em sinal digital, e guardado em computador, é possível aplicar filtros, de modo a discriminar o sinal do ruído, em qualquer altura após a gravação do EAG. Em alguns sistemas mais avançados de EAG existe software com algoritmos de suavização, filtros passa-baixa e de média móvel, que são também, como o filtro passa-baixo, adequados para discriminar o sinal com baixas e médias frequências do ruído de frequência elevada. A forma dos sinais EAG gerados pelo olfato são distintos significativamente, comparado com a forma do sinal proveniente de ruído, para permitir a sua discriminação baseada em características mais precisas da forma de onda. Por isso é possível efetuar um refinamento adicional de tais filtragens “post-hoc” de ruído (Slone e Sullivan , 2007). O estudo feito por Slone e Sullivan (2007) baseou-se em três algoritmos, respetivamente denominados "PeakHeight", apenas para a amplitude do sinal, "Additivemethod", para a amplitude do sinal e comprimento de onda e "Minimummethod", para a amplitude do sinal, comprimento de onda e simetria. O primeiro algoritmo é aquele que apresenta resultados menos bons, quer no que diz respeito à rejeição de ruído, quer na discriminação do sinal. O "Additivemethod" é o mais eficiente para detetar o número máximo de ocorrências de sinais que são realmente originados pelo olfatado inseto. Porém, o terceiro método é o melhor na rejeição de sinais que não são verdadeiros, virtualmente nunca retornando um falso positivo, ou seja, uma despolarização ocorrida que não é originada pelo estímulo. Além disso mostrou-se o melhor método para rejeição de ruído. Ao retornar um maior número de verdadeiros positivos, apesar de retornar também alguns falsos positivos, o "Additivemethod" pode ser importante para encontrar novos compostos, à partida desconhecidos, que de outra forma não seriam reconhecidos. Reconhece também mais sinais EAG verdadeiros do que seria possível comparando visualmente os picos do EAG.

Ainda no contexto da combinação GC-EAG, para suprimir ruído é usada a técnica de amplificação “lock-in” em conjunto com filtragem adaptativa (que usa o conhecimento, mais uma vez, da forma da despolarização do EAG e ainda da covariância do ruído, estimando assim convenientemente amplitude do sinal). Esta técnica permite aumentar a qualidade de deteção num factor de  $10^4$  em relação aos

métodos tradicionais, sendo que apresenta uma melhor resolução temporal da resposta do sinal da antena do inseto. A amplificação através de “lock-in” geralmente consiste na redução de ruído encontrado em aparelhos eletrônicos e amplificadores, conectando e desconectando (cortando) o sinal da entrada do amplificador. Transfere assim uma significativa parte da frequência da energia do sinal para a frequência de corte, onde existe menos ruído. Na Figura 1.10 encontra-se representado como funciona geralmente esta operação sobre o sinal de entrada.



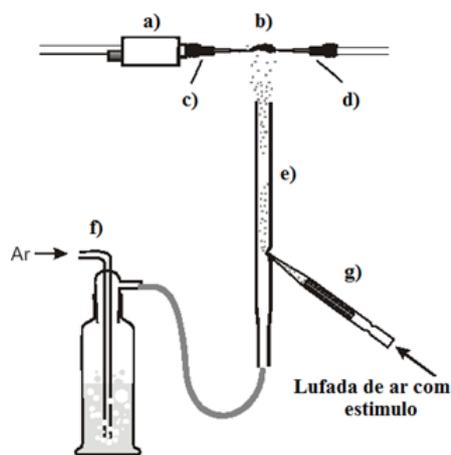
**Figura 1.10-** Ilustração da estabilização através de “lock-in”. **Legenda:** **a)** Ruído de forma de onda do tipo Browniano, forma de onda do sinal, e a sua soma; **b)** Ruído de forma de onda do tipo Browniano, forma de onda do sinal cortado, e a sua soma; **c)** Sinal cortado ao qual foi aplicado filtro passa-banda mais a forma de onda mostrando menor ruído na frequência de corte e o sinal desmodulado (imagem adaptada de artigo de Myrick, 2011)

A antena do inseto representa porém uma fonte de ruído maior do que a inerente ao amplificador. Uma vez que a antena responde num tempo na ordem dos milissegundos ao estímulo, é possível cortar o sinal transmitido pelo efluente de estímulo, transmitido pelo sistema de entrega deste (como representado na Figura 1.11), é cortado com uma determinada frequência, resultando num sinal EAG cortado (como representado na figura 1.10). Este sinal pode ser filtrado nas frequências baixas do ruído, restando apenas o sinal e pouco ruído na frequência de corte. Este sinal é então recuperado com uma desmodulação, ficando muito mais nítido, do que o anterior sinal misturado com ruído. Este método é especialmente interessante quando do uso de insetos de pequenas dimensões, cuja preparação das antenas resultam num sinal com muito ruído.

### 1.3.3 - Ensaios de uma medição de Eletroantenografia

Para os ensaios de EAG submetem-se as antenas a uma dada concentração de um estímulo, composto volátil, durante um determinado intervalo de tempo. No esquema da Figura 1.6 encontra-se ilustrado um exemplo de como o estímulo pode ser transportado até à antena. Neste caso o estímulo é pulverizado nas imediações da antena através dum tubo de mistura, representado na Figura 1.11.e, por

onde atravessa um fluxo de ar humificado. Num orifício lateral do tubo de mistura insere-se uma pipeta de “Pasteur”, representado na Figura 1.11.e, onde foi inserida uma tira de papel de filtro ao qual foi aplicado, por exemplo 10 a 100 microlitros dum solvente contendo uma concentração específica do estímulo. O solvente de teste costuma ser hexano ou óleo de parafina, quando os estímulos (voláteis) são respetivamente, feromonas ou compostos originários de plantas. Com uma lufada de ar faz-se o estímulo dessa pipeta “Pasteur” atravessar o orifício do tubo de mistura entrando para dentro deste. Uma vez dentro do tubo de mistura, o estímulo é transportado pelo fluxo de ar humificado até à saída deste, sendo finalmente difundida no volume de ar em redor da antena, estimulando-a ao contactar finalmente com esta.



**Figura 1.11** – Configuração de estímulo básico e medição. **Legenda:** a) Sonda; b) Antena; c) Pega do eletrodo diferencial d) Pega do eletrodo não diferencial; e) Tubo de mistura; f) Humidificador; g) Origem do estímulo. (imagem adaptada do manual “ELETROANTENNOGRAPHY a practical introduction” SYNTECH 2004)

A Figura 1.12 resume esquematicamente todos os eventos, por ordem, que se dão num ensaio EAG.

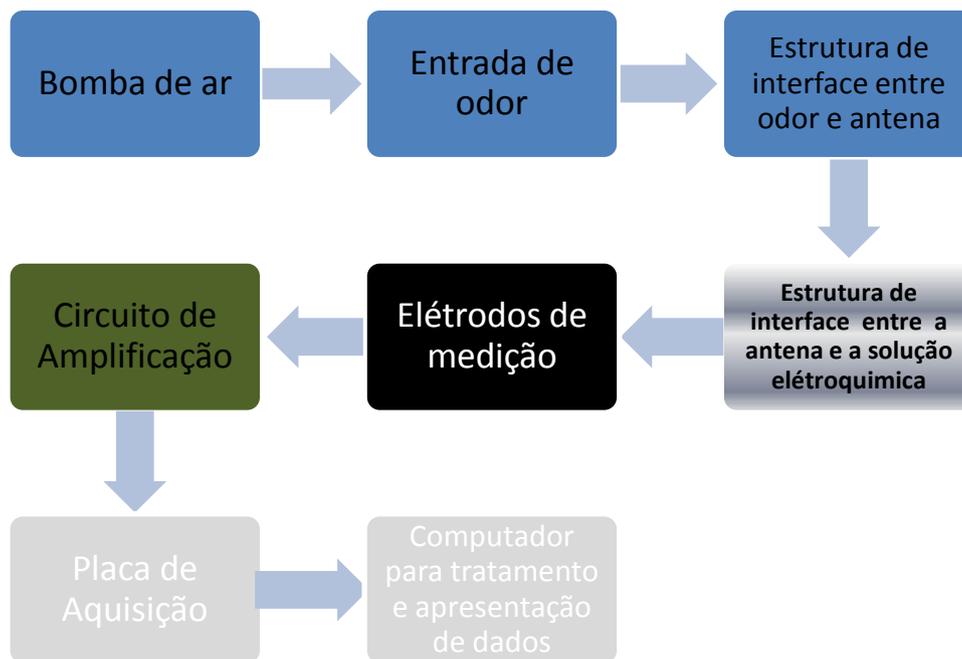


**Figura 1.12**– Esquematização por ordem das várias etapas necessárias para a obtenção de um bom sinal EAG.

## 2 - Materiais e Métodos

Foi projetado e construído um sistema físico de forma a medir, amplificar e fazer a aquisição e tratamento do sinal EAG, resultante da estimulação da antena excisada de um *Gonipterus* ao odor verbenona. Na Figura 2.1 está representada a arquitetura do projeto, onde os diferentes constituintes físicos do sistema estão designados por blocos, ordenados de acordo com o instante em que desempenham a sua função durante a sequência temporal de eventos esperados de uma sessão de medição EAG, já antes esquematizado na Figura 1.12. Note-se que da Figura 2.1 cada bloco tem uma das mesmas cores usada na constituição dos vários blocos do esquema da Figura 1.12: desta forma faz-se a correspondência de cada um dos constituintes físicos do sistema à respetiva etapa em que desempenha a sua função.

A bomba de ar emite um fluxo de ar, que por sua vez passa por um tubo capilar que termina a cerca de 1cm por cima da antena, sendo aí a saída do fluxo de ar. Por sua vez, o ar transportado espalha-se aí no volume de ar à volta da antena, vindo de cima para baixo, entrando assim em contacto com a antena. Neste tubo existe uma entrada onde entra o estímulo, através de uma seringa, sendo de seguida transportado com o fluxo de ar para a antena, estimulando-a. As pontas da antena estão em contacto com uma solução eletrolítica, que por sua vez está em contacto com uns eléctrodos. Estes medem o sinal, e uma vez que estão ligados a um amplificador, o sinal é amplificado e enviado para uma placa de aquisição, que está ligada ao amplificador. Da placa de aquisição o sinal é lido com um software no computador e os dados gravados, representados e tratados.



**Figura 2.1** – Arquitetura do projeto em que cada bloco constitui um elemento físico do sistema de medição EAG e as setas indicam a ordem da sequência. A ordem respeita o instante em que tomam a sua função, ao longo de uma medição EAG. As cores dos blocos correspondem à ordem, das representadas na Figura 1.12, a que pertencem.

Para usar este sistema é necessário fazer outros procedimentos prévios à medição do EAG, como a preparação do odor, de forma a que possa ser introduzido no sistema, a preparação da solução salina eletrolítica e a excisão da antena do inseto de forma a que possa ser colocado na “interface” entre esta e o eléctrodo de medição. Para tal são necessárias outras ferramentas, que apesar de não constituírem o sistema projetado e construído, são auxiliares indispensáveis ao seu funcionamento sendo por essa razão importante referi-las e descrevê-las.

## 2.1 -Materiais

### 2.1.1 - Circuito referente ao Amplificador Operacional

O amplificador escolhido foi o Amplificador INA114, cujas características são as seguintes:

-Baixa Voltagem de “offset”, máximo  $50\mu\text{V}$

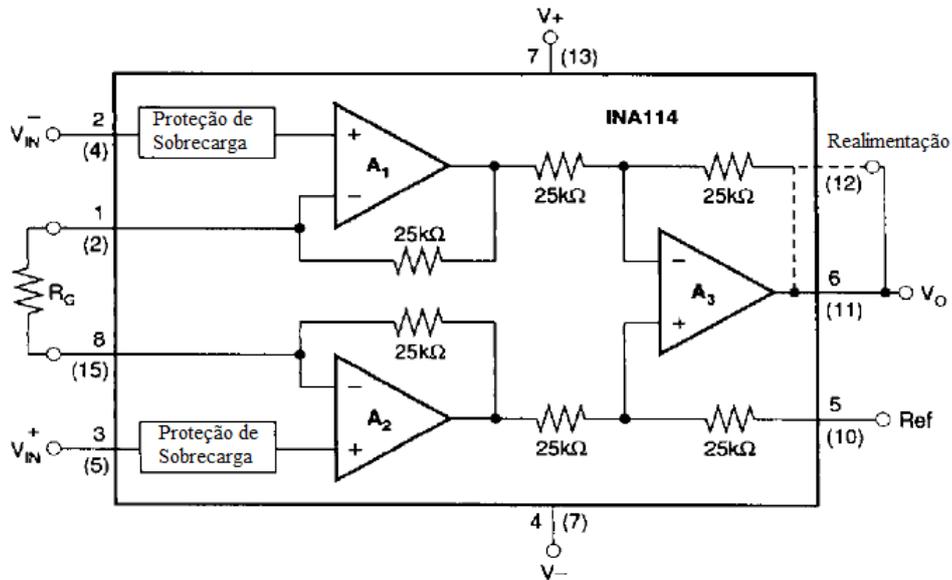
-Pouca deriva: máximo de  $0,25 \frac{\mu\text{V}}{^\circ\text{C}}$

- Viés de corrente de entrada baixa: máximo de  $2\text{nA}$
- Elevada rejeição de modo comum mínimo de  $115\text{ dB}$
- Proteção de excesso de voltagem de entrada  $\pm 40\text{V}$
- Elevada Gama de Tensão de Alimentação:  $\pm 2,25\text{V}$  até  $\pm 18\text{V}$

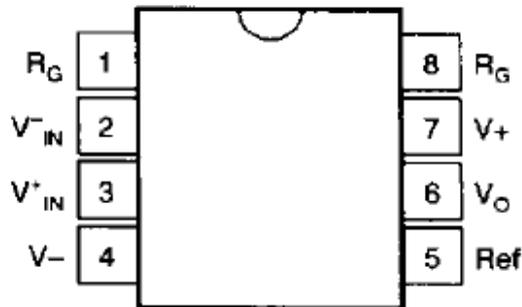
O INA114 é um amplificador de instrumentação para uso geral de baixo custo que oferece excelente precisão (datasheet INA- ampop). Contém três amplificadores operacionais integrados versáteis de pequeno tamanho que os fazem ser ideais para uma elevada variedade de aplicações.

Para fazer variar o ganho faz-se uso de uma resistência externa, sendo a gama de variação deste ganho entre 1 a  $10^3$ . A proteção interna pode suportar  $\pm 40\text{V}$  de tensão de entrada sem que o amplificador sofra qualquer dano. O INA114 é afinado por laser de forma a ter uma voltagem de “offset” muito baixa ( $50\mu\text{V}$ ), baixa deriva ( $0,25\mu\text{V}/\text{°C}$ ) e elevada rejeição de modo comum ( $115\text{dB}$  a  $G = 1000$ ). Opera com fontes de tensão com valores tão baixos como  $\pm 2,25\text{V}$  sendo que o máximo da corrente em repouso é de  $3\text{mA}$ .

A Figura 2.2 mostra as conexões básicas necessárias para operar o amplificador: resistência, o sinal de entrada e a alimentação do amplificador. Mostra também como é o circuito interno do amplificador. A Figura 2.2 mostra também o esquema que mostra como identificar essas portas. Aplicações com ruído ou fontes de alimentação com elevada impedância podem requerer condensadores de desacoplamento perto das portas do dispositivo (datasheet INA- ampop).



Vista de cima



**Figura 2.2** –Representação do circuito elétrico do INA114. **Em Cima:** Esquema do circuito interno do INA 114 e como estas se ligam às portas externas; **Em Baixo:** Esquema ilustrativo útil para identificar os pinos correspondentes a cada porta de entrada do amplificador.

As saídas estão em referência ao terminal da saída de referência (Ref) ao qual estão ligadas à terra. Esta tem de ser uma conexão de baixa impedância para assegurar uma boa rejeição de modo-comum (datasheet INA- ampop). Uma resistência de  $5\Omega$  causa tipicamente um dispositivo a degradar-se aproximadamente em  $80\text{dB}$  CMR ( $G = 1$ ) (datasheet INA- ampop).

Como já referido, o ganho do INA114 é ajustado ao conectar-lhe um resistor externo. A equação que faz corresponder o valor do ganho  $G$  à resistência externa  $R_G$  usada é a seguinte:

$$G = 1 + \frac{50}{R_G} \quad (2)$$

O valor de ganho e resistência usualmente usados estão mostrados na Tabela 2.1.

| Ganho Desejado | $R_G$ ( $\Omega$ ) |
|----------------|--------------------|
| 1              | Sem conexão        |
| 2              | 50.00k             |
| 5              | 12.50k             |
| 10             | 5.556k             |
| 20             | 2.632k             |
| 50             | 1.02k              |
| 100            | 505.1              |
| 200            | 251.3              |
| 500            | 100.2              |
| 1000           | 50.05              |
| 2000           | 25.01              |
| 5000           | 10.00              |
| 10000          | 5.001              |

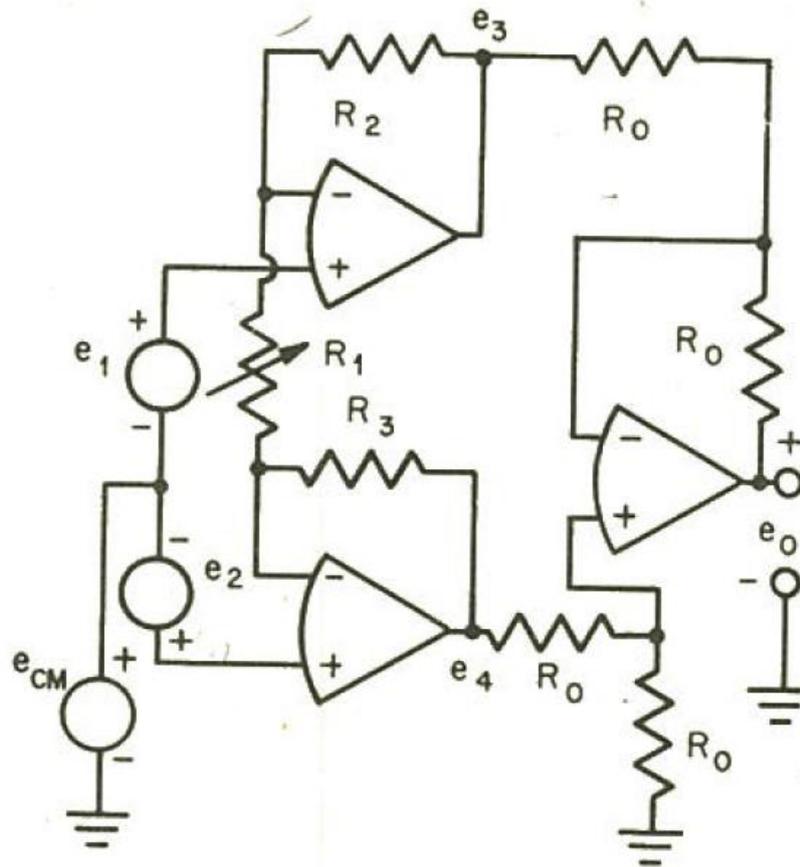
**Tabela 2.1** -Valores de ganho e correspondente resistência usual e necessária dos resistores utilizados com o INA114 (imagem adaptada do Datasheet do INA 114)

Os valores de  $50k\Omega$  da equação (2) são estabelecidos pela soma de dois resistores internos de realimentação. Estas resistências de filme metálico têm os valores nominais acertados por um laser de modo a tornarem precisos os seus valores absolutos.

A estabilidade da deriva e a temperatura da resistência  $R_G$  que regula o ganho também o afeta. A contribuição de  $R_G$  para a precisão e deriva pode ser diretamente inferida a partir da equação (2) do ganho. A resistência dos fios elétricos pode ser significativa quando são usadas resistências com valores baixos, requeridas para se ter um valor alto de ganho do amplificador. As tomadas contribuem adicionalmente para elevar o valor da resistência dos fios de ligação, aumentando assim o erro do ganho (possivelmente um erro de ganho instável) para casos em que o ganho tem o valor de 100 ou mais (datasheet INA- ampop).

O nível de ruído de baixas frequências do INA114 é aproximadamente de  $0,4\mu V$  medido no intervalo de  $0,1-10$ Hz. Isto é aproximadamente um décimo do ruído de amplificadores de estabilização de recorte (“chopper-stabilized”).

O circuito interno é um amplificador diferencial de elevada impedância de entrada (“high input impedance differential amplifier”) e a configuração padrão deste está representada na Figura 2.3.



**Figura 2.3** - Esquema padrão do circuito interno do amplificador.

No INA114 todas as resistências, à exceção da resistência  $R_G$  (na Figura 2.3 corresponde ao potenciômetro  $R_1$ ) deste circuito, estão fixadas internamente. A equação (3), que usa as denominações da Figura 2.3 para os resistores  $R_1$  e  $R_2$ , potenciais de entrada do  $e_1$  e  $e_2$  e potencial de saída do amplificador, fornece o ganho deste circuito de amplificação:

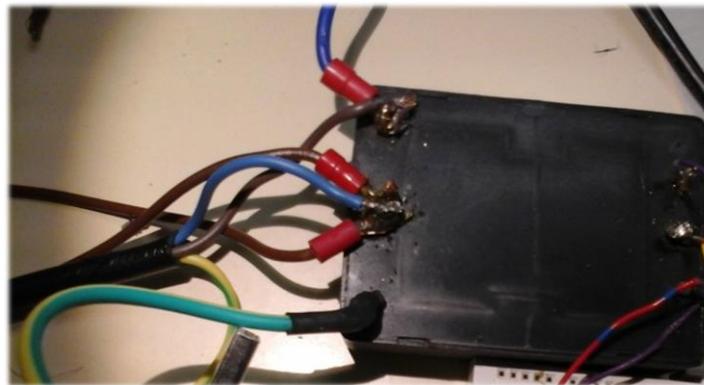
$$e_0 = \left[1 + \frac{2R_2}{R_1}\right][e_2 - e_1] \quad (3)$$

Note-se que seria também possível com este circuito modificar o ganho, alterando a resistência de  $R_2$  em vez da resistência  $R_1$ . Além disso os resistores  $R_2$  e  $R_3$  não têm de necessariamente ter o mesmo valor, nem ter os mesmos valores que os resistores  $R_0$ , contrariamente ao que acontece no INA114, para que este circuito funcione e permita tanto amplificar como conseguir variar o ganho para valores desejados.

Os dois amplificadores de entrada constituem um andar de amplificador de isolamento com ganho de  $1 + 2\frac{R_2}{R_1}$  para sinais diferenciais, e ganho unitário para sinais de modo comum (“common mode signals”). A configuração não-inversora desses amplificadores de entrada assegura uma impedância elevada de entrada em ambas. O ganho é facilmente variável com uma simples resistência,  $R_1$ . Os efeitos dos valores das resistências  $R_1$  e  $R_3$  serem diferente são simplesmente a indução de um erro de

ganho sem afetar a rejeição de ganho comum do circuito. As resistências  $R_0$  do amplificador de saída têm de estar combinadas de forma precisa, ou seja, ter o mesmo valor, para assegurar que haja rejeição de sinais de modo comum a este ponto. O amplificador final age simplesmente como um diferencial de entrada para conversor de saída único. Normalmente, todo o ganho deste amplificador diferencial está no estágio de entrada, assim assegurando que apenas tensões de “offset” destes dois amplificadores operacionais sejam significantes em determinar o “offset” final. Uma vez que o “offset” da voltagem de saída é proporcional à diferença entre os “offsets” das voltagens de saída destes dois amplificadores, é preferível usar modelos de amplificadores cujos “offsets” de voltagem tendam a estabilizar com a temperatura.

Para alimentar o amplificador foi usada uma Fonte de Alimentação TracoPower, TML 15212. A série TML, representada na Figura 2.4, são fontes de alimentação AC/DC extremamente compactas numa caixa de plástico completamente encapsulada. Tem versões com terminais em parafuso ou pinos para soldar, de forma a permitir fácil instalação para montagem directa de PCB (Traco Power\_TML15212Datasheet).



**Figura 2.4** - Fonte de Alimentação TracoPower TML 15212 com todas as ligações necessárias para conseguir alimentar o INA114.

Outras características desta Fonte de Alimentação são as seguintes:

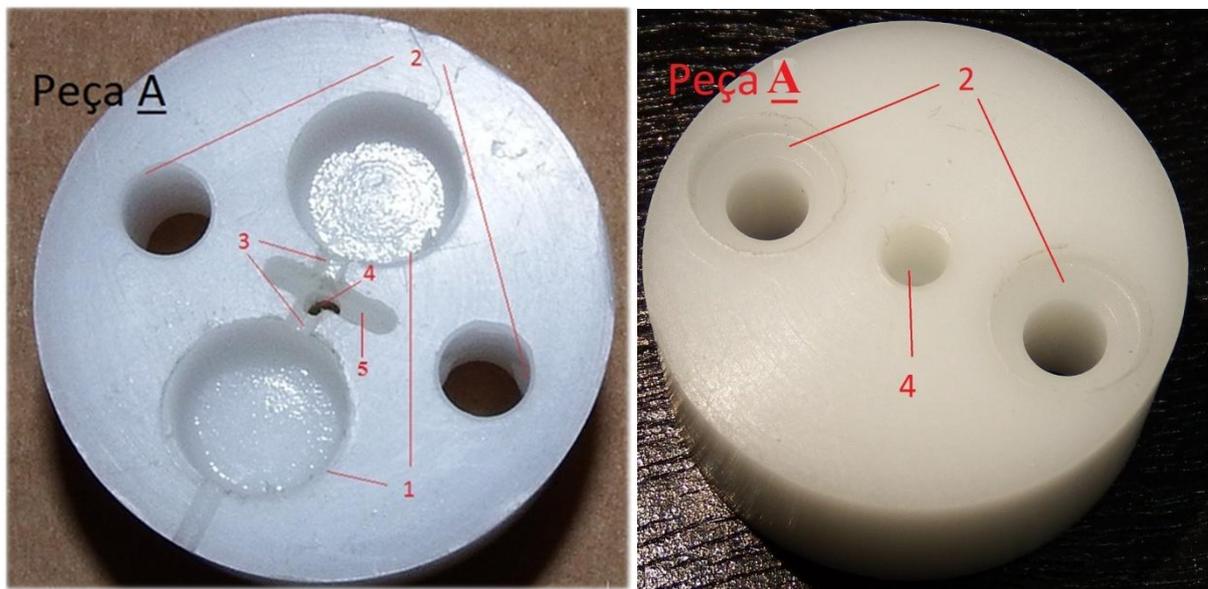
- Input Universal 85 – 264 VAC, 47 – 440 Hz;
- Baixo ruído e ripple (agitação);
- Proteção contracurto-circuito e sobrecarga;

### **2.1.2 -Estrutura de “interface” entre estímulo químico, antena do inseto e eléctrodos**

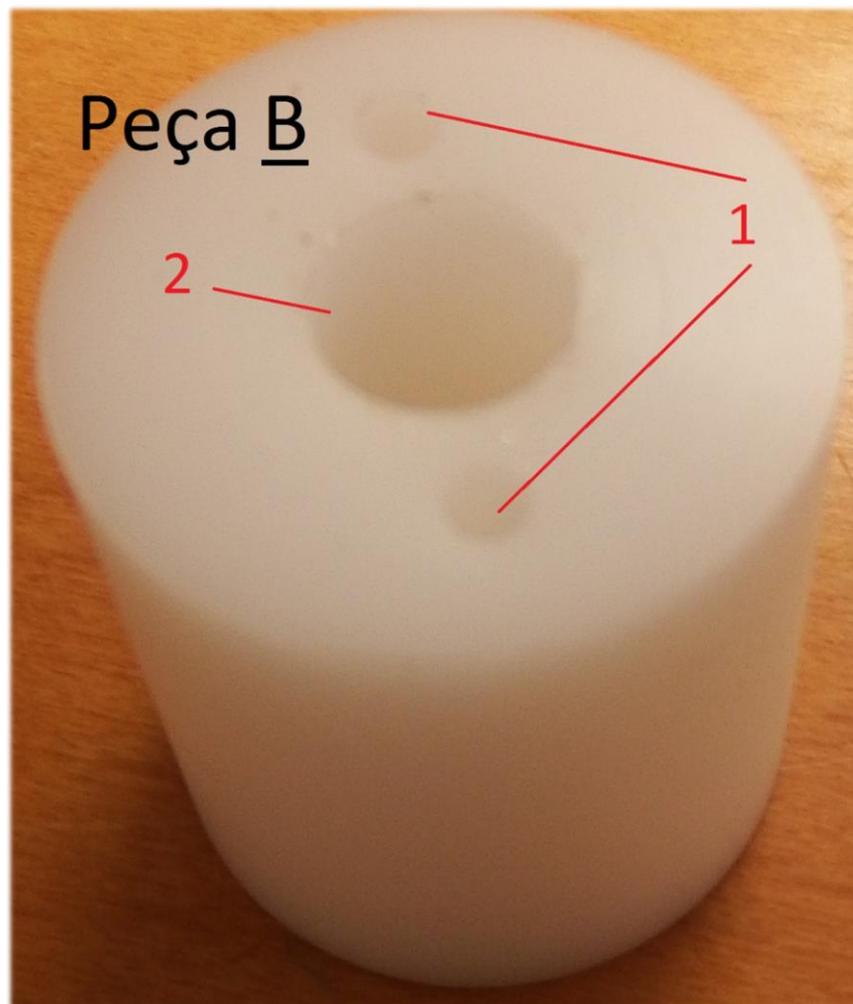
Foi construída uma estrutura que facilita o posicionamento da antena do inseto, por forma a estar em contacto com uma solução condutora, sendo assim feita a “interface” entre a antena e os eléctrodos. Esta estrutura facilita também a fixação e suporte tanto dos eléctrodos, como do tubo que irá transportar o

estímulo químico através de um fluxo de ar, estando representada na Figura 2.5. Neste trabalho foi utilizada a solução de Ringer por fazer condução elétrica, que pode ser medida por elétrodos especialmente feitos para medir o fluxo iónico em soluções eletroquímicas. Desta forma, torna-se desnecessário fazer um elétrodo com uma pipeta de “Pasteur”. Isto garante a estabilidade e devido posicionamento na “interface” dos elétrodos com o estímulo, e da entrega do estímulo químico ao volume de ar por cima da antena.

A estrutura referida é feita a partir de material cilíndrico de “teflon” que se divide em duas peças, ambas perfuradas. Ambas as peças têm o mesmo diâmetro de  $27\text{ mm}$  na face plana. A peça onde é feito o contacto entre a antena, solução eletrolítica e elétrodo está representada na Figura 2.5, sendo denominada por "peça A". A peça onde são fixados os elétrodos e o tubo que transporta o estímulo químico está representada na Figura 2.6 sendo denominada por "peça B".



**Figura 2.5** - Peça que constitui a “interface” entre o elétrodo, a solução eletroquímica e a antena do inseto. **Em cima:** peça vista de cima. **Em baixo:** peça vista de baixo. **Legenda:** 1) poços onde se insere a solução eletroquímica. Cada um destes poços faz o contacto entre uma das pontas do inseto e um dos elétrodos; 2) Orifícios para os parafusos, que ligam esta peça com a peça B; 3) as ranhuras em que cada ponta da antena fica apoiada e onde é feito o contacto com a solução eletroquímica no respetivo poço adjacente; 4) orifício feito para garantir que a solução eletroquímica não passe de um poço para o outro. Este orifício atravessa a peça de cima abaixo, permitindo o líquido escorrer para fora da peça para não passar de um poço para o outro. É necessária esta separação para que cada poço tenha um potencial diferente, podendo se medir assim uma diferença de potencial entre eles, aquando do estímulo elétrico da antena. No volume de ar por cima deste orifício está suspensa a parte central da antena do inseto, sendo esta a zona de “interface” entre este e o estímulo químico, ou seja o odor; 5) perfuração perpendicular à direção em que fica posicionada a antena, de forma a garantir que a solução não faça um contacto em forma de bolha entre os poços.



**Figura 2.6** - Peça que fixa os elétrodos e a parte final do tubo por onde passa o fluxo de ar contendo o estímulo sensorial servindo de suporte à saída do tubo. Esta peça é montada por cima da peça "A", havendo apenas 1 cm de altura livre a separar uma peça e a outra. Os orifícios mostrados atravessam a peça de um lado ao outro. Do lado oposto à da superfície plana da peça que se vê na figura, a única diferença é a existência de orifícios para os parafusos. **Legenda:** 1) orifícios onde entram os elétrodos, de forma a ficarem fixos, ficando com a ponta saída na parte de baixo; 2) Orifício para a parte final do tubo capilar que transporta o odor, cuja saída fica na parte de dentro da peça

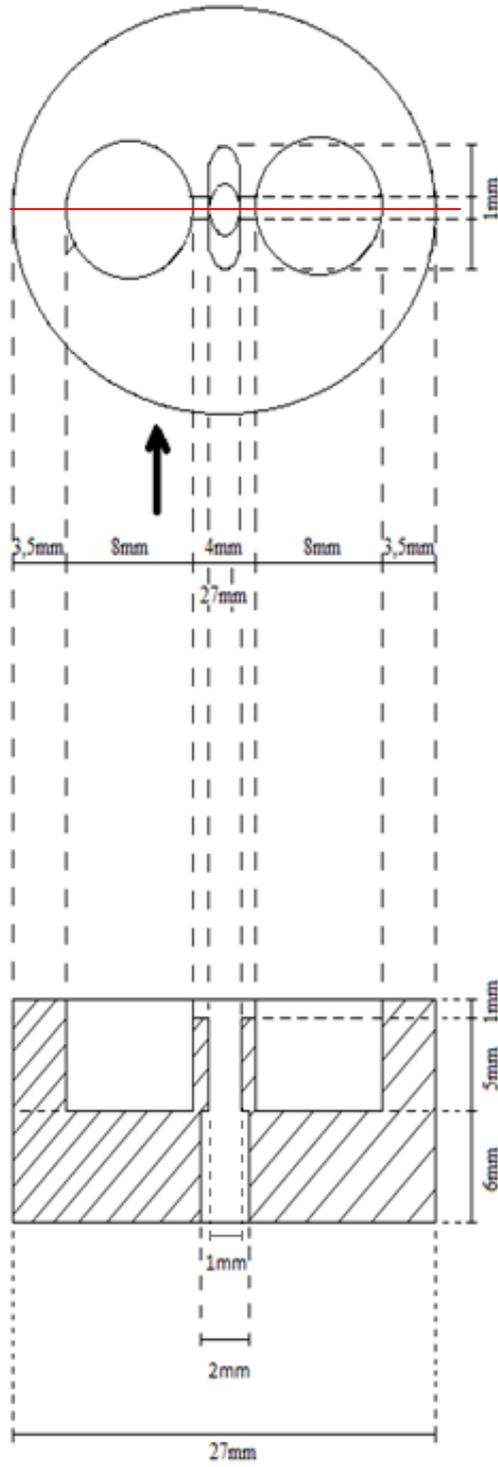
A peça A tem 12mm de altura, tem dois poços, cada um com 8mm de diâmetro e 6mm de profundidade até metade da altura da peça, ambos destinados a conter a solução de Ringer e uma ranhura que une de forma estreita e superficial embora apenas parcialmente estes dois poços, que será onde finalmente irá ser colocada a antena do inseto. Esta ranhura está feita para que cada ponto do inseto esteja em contacto com a solução de Ringer inserida em cada um dos poços. No espaço da

ranhura, no centro desta, existe uma perfuração até ao fundo da peça, de  $2\text{ mm}$  de diâmetro que vai desde o topo da ranhura até a meia altura da peça, e  $3\text{ mm}$  de diâmetro a partir daí até ao fundo da peça. Esta perfuração, representada na Figura 2.5, e descrita na legenda com o algarismo “4”, foi feita porque verificou-se que a solução de Ringer passava pela ranhura toda emergindo a antena completamente, impossibilitando assim de se estabelecer uma diferença de potencial entre uma ponta e a outra. Inicialmente a perfuração foi apenas feita em forma de cilindro, mas uma vez que se verificou que a solução de Ringer continuava a passar por capilaridade pela ranhura de um poço para o outro, ao fazer uma bolha na entrada da perfuração, teve-se de perfurar lateralmente à zona da perfuração cilíndrica para que esta bolha deixasse de surgir ao inserir a solução nos poços. Desta forma conseguia-se chegar ao pretendido. Mesmo assim continuou a haver problemas de capilaridade: a solução ligava ambos os poços, apesar da perfuração funcionar como um poço que supostamente impediria a solução de passar pelo fundo da ranhura, esta continuava a passar, mas por capilaridade pelas paredes laterais da ligação entre os dois poços formando uma bolha no volume em cima da perfuração. Para resolver isso fez-se outra perfuração em linha, representada na Figura 2.5 e descrita na legenda com o algarismo “5”, perpendicular à linha da ranhura que liga ambos os poços, eliminando assim a possibilidade da solução passar por capilaridade. Com esta modificação a solução praticamente não contactava mais os dois poços, como requerido.

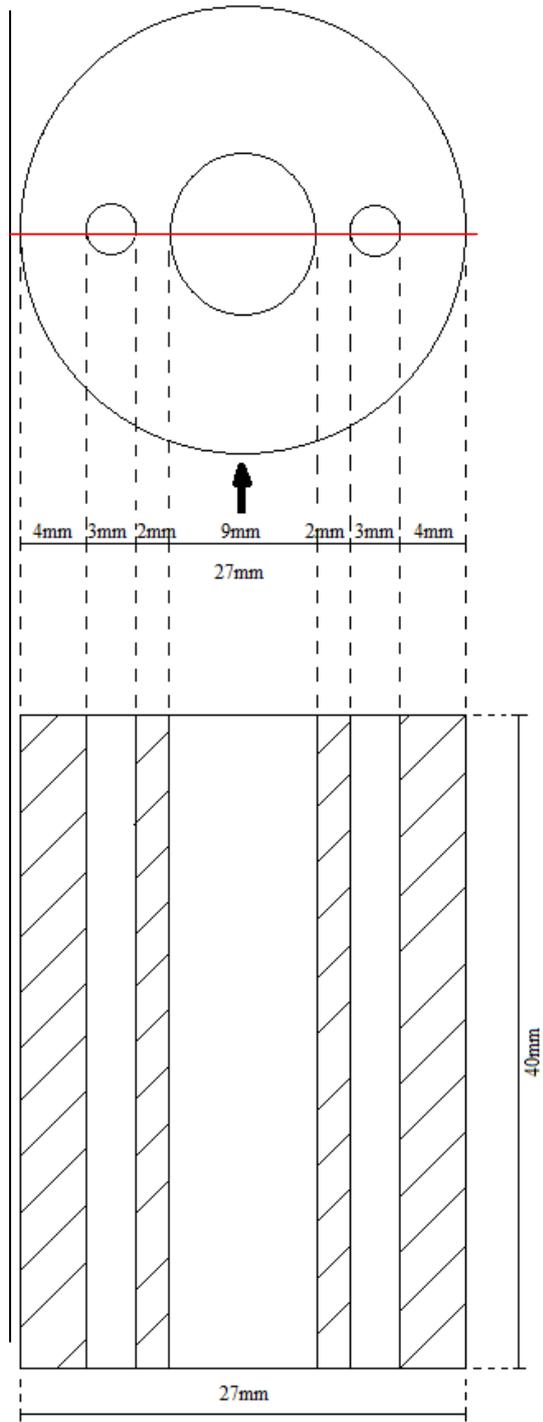
A peça B tem  $40\text{ mm}$  de altura, contém três canais em forma de tubo circular que atravessam a estrutura de um lado ao outro, ou seja, de uma face plana à outra. Um dos canais tem maior diâmetro que os outros,  $9\text{ mm}$ , estando representado na Figura 2.6 e descrito na legenda com o algarismo “2”, sendo o central. Neste é inserido a parte terminal do tubo capilar que transporta o estímulo. Assim o tubo fica fixado com a saída fixa para que o estímulo flua na direção certa para ir entrar em contacto com a antena. Os outros dois canais têm ambos o mesmo diâmetro, de  $3\text{ mm}$ . Em cada um é inserido um eletrodo, para que apenas a sua ponta final fique mergulhada num dos poços da peça A que contém a solução eletrolítica. O resto do eletrodo fica então encaixado neste canal garantindo que o eletrodo fique estavelmente fixo.

Para que se perceba melhor a descrição anterior com as medidas da peça, encontra-se o desenho técnico de ambas as peças representado na Figura 2.7 vistas de cima, e, para se perceber melhor a estrutura interna da peça. Na representação da vista de lado esta é feita com um corte que passa no eixo central vertical de quando a peça está colocada com a face plana numa superfície, estando este corte representado através de uma linha vermelha na Figura 2.7.

Peça A



Peça B



**Figura 2.7** – Desenho técnico de ambas as peças da estrutura de “interface” entre o estímulo químico, a antena e o eletrodo. **À esquerda:** Representação da peça A onde se coloca a antena e os correspondentes poços, onde a solução de Ringer é inserida em cada um, fazendo assim o contato com uma das pontas da antena do inseto. **Em cima:** representação da vista de cima quando a peça A está colocada na montagem. Vê-se a ranhura onde se coloca a antena e a perfuração que vai até ao fundo da peça e os poços onde é inserida a solução. **Em baixo:** Representação da vista de lado da peça, sendo aquela que se vê na direção da seta preta assinalada para cima na representação da peça vista de cima. O corte é aquele cuja seção está representada pela linha vermelha: esta representa o corte visto de cima. **À direita:** Representação da peça B onde entra o fluxo de ar e onde se encaixam os eletrodos para os suportar. **Em cima:** Representação da vista de cima, quando a peça B montada na experiência. A perfuração central, de maior diâmetro, é aquela onde é inserido o tubo que transporta o fluxo de ar contendo o estímulo, enquanto as duas perfurações de menor diâmetro e mais laterais são onde em cada uma é inserido cada um dos dois eletrodos. **Em baixo:** Representação da vista de lado da peça, sendo aquela que se vê na direção da seta preta assinalada para cima na representação da peça vista de cima. O corte é aquele cuja secção está representada pela linha vermelha: esta representa o corte visto de cima. (**Nota final:** em ambas as peças a representação dos orifícios dos parafusos não foram desenhados, uma vez que finalmente não foram necessários usar na experiência)

### 2.1.3 - Eletrodos de Medida

Os eletrodos de referência livres de fugas, representados na Figura 2.8, foram desenvolvidos para eliminar problemas associados com o uso de eletrodos de referência de base de junção convencional como o entupimento, contaminação de amostras, perda de eletrólito, mudança da força iônica da amostra e as dificuldades com solvente de base orgânica. Usam uma junção única que é altamente condutiva (<10 K) mas não porosa (Leak Free Microminiature Reference Electrodes). Não existe migração através da junção em nenhuma das direções (Leak Free Microminiature Reference Electrodes). A referência é totalmente livre de fugas (Leak Free Microminiature Reference Electrodes). A junção é resistente à maior parte dos solventes orgânicos normalmente usados (Leak Free Microminiature Reference Electrodes). Oferece uma excelente resistência a Acetonitrila ( $C_2H_3N$ ), DMSO, THF, MEK, acetona, diclorometano, esteréis, álcoois e cetonas, ácido fluorhídrico ou ácidos diluídos normalmente e bases (Leak Free Microminiature Reference Electrodes). Ao contrário de eletrodos de referência convencionais, não é necessário guardá-los numa solução de cloreto (Leak Free Microminiature Reference Electrodes). Se os eletrodos são deixados secos por um longo tempo, devem ser imersos em água por umas horas para recuperar. Existem dois tamanhos deste eletrodo: o que se escolheu para a experiência, de 2mm de diâmetro, e um segundo de 5mm de diâmetro. Na tabela 2.2 estão referidas algumas características do eletrodo

|                           |                             |
|---------------------------|-----------------------------|
| Armazenamento             | Água destilada              |
| Gama de temperaturas      | 5 a 80 °C                   |
| Comprimento do Eléctrodo  | 65 mm                       |
| Diâmetro do Eléctrodo     | 2 mm                        |
| Eléctrolito de enchimento | 3 M KCl                     |
| Conexão eléctrica         | 1 mm pinos banhados em ouro |

**Tabela 2.2)** Características dos eléctrodos de medição



**Figura 2.8** – Representação dos Eléctrodos de medição.

#### **2.1.4 -Placa de Aquisição da National Instruments modelo NI USB-6210**

Esta placa de aquisição está representada na Figura 2.13 e 2.14, tendo esta as seguintes características:

- Até 32 entradas analógicas de 16 bits, até 400 kS / s (digitalização 250 kS / s)
- Até 2 saídas analógicas de 16 bits
- Até / CMOS digital I linhas 32 TTL / S
- Dois, 80 MHz contadores / temporizadores de 32 bits
- NI-PGIA 2 e NI-MCal tecnologia de calibração de precisão de medição melhorada
- NI Signal Streaming para 4 dados em alta velocidade córregos em USB
- Disponível com CAT I isolamento

### **2.1.5 – Software para aquisição e tratamento de dados: LabVIEW SignalExpress 2009 e MatlabR2010a**

Para fazer a aquisição de dados e análise foi adquirido o LabVIEW SignalExpress 2009. Este programa é útil para sistemas de medição automáticos baseados em computadores e plataformas de padrão da indústria. O SignalExpress otimiza instrumentação virtual para projetos de engenharia oferecendo medições interativas instantâneas que não requerem nenhuma programação (LabVIEW SignalExpress Manual).

O Signal Express pode ser usado para adquirir, gerar, analisar, comparar, importar e gravar sinais (LabVIEW SignalExpress Manual). Pode-se comparar dados de projetos com medições com dados de medição num só passo (LabVIEW SignalExpress Manual). O SignalExpress estende a facilidade de uso e desempenho da instrumentação virtual quando se precisa de adquirir ou analisar sinais sem programar aplicações (LabVIEW SignalExpress Manual).

O SignalExpress é adequado para projetar e simular o desenvolvimento de um produto (LabVIEW SignalExpress Manual) tendo as seguintes vantagens:

- Investe-se mais tempo em projetar, em vez de programar
- Faz medições para verificar se o protótipo trabalha como esperado
- Faz caracterização detalhada e medidas de validação em projetos

Pode-se usar o SignalExpress para importar sinais de um simulador SPICE e compará-los com medições físicas nos mesmos gráficos (LabVIEW SignalExpress Manual) assim como configurar medidas de desempenho de um projeto através da medição do espectro de frequências do sinal, amplitude ou gamas de alimentação (LabVIEW SignalExpress Manual). Também é possível exportar sinais para ficheiros ASCII ou aplicações spreadsheets como o Microsoft Excel para posterior análise (LabVIEW SignalExpress Manual), que foi a funcionalidade que se usou para exportar os dados para o programa de tratamento de dados neste trabalho. Pode-se completar todas estas ações num ambiente de instrumentação virtual interativo sem necessitar de programar (LabVIEW SignalExpress Manual).

Para fazer o processamento de sinal posterior à aquisição como a aplicação de filtragem de sinal, entendeu-se o Matlab o programa mais conveniente. O MATLAB® é uma linguagem de alto nível e ambiente interativo para computação numérica permitindo analisar dados, desenvolver algoritmos e criar modelos e aplicações. A linguagem, ferramentas e funções matemáticas embutidas permitem-lhe explorar múltiplas abordagens e chegar a uma solução mais rápida do que com linguagens de programação tradicionais, como C / C ++ ou Java®. Pode utilizar-se o MATLAB para uma variedade

de aplicações, incluindo o processamento do sinal e comunicações, processamento de imagem e vídeo, sistemas de controlo, teste e medição, finanças computacionais, e biologia computacional.

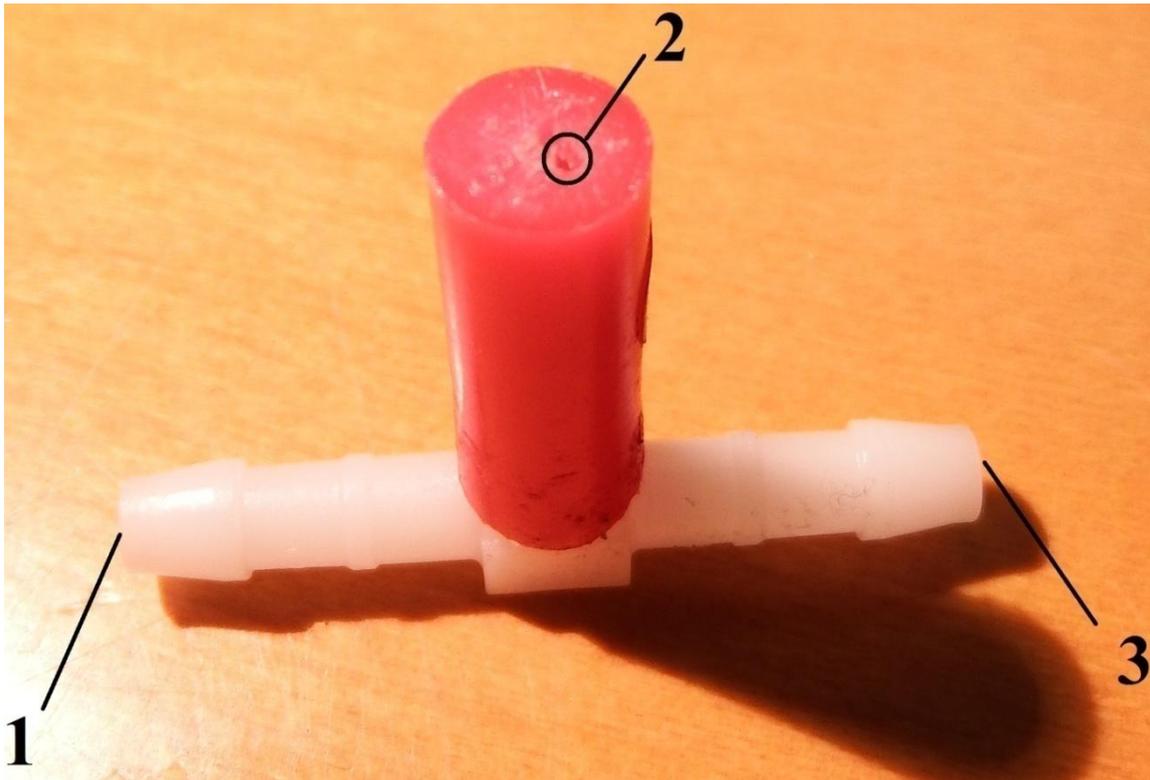
### **2.1.6 -Sistema de Entrega da Amostra**

Para transportar o fluxo de ar foi utilizada uma Bomba de Ar da Knf Laboport de modelo Neuberger com um fluxo máximo de ar: 0,5 LPM (litros por minuto).

Estas bombas secas são adequadas para filtração de frasco, coletor de vácuo, dissecação de vácuo e aplicações de degaseificação. Estas bombas contêm diafragmas de resina de polímero de flúor resistentes à corrosão, cabeça de Ryton®, e válvulas de resina Kalrez® para lidar com corrosivos agressivos sem risco de dano para a bomba. Não há partes de metal ou cobertas de metal molhadas dentro das cabeças da bomba.

As bombas de filtragem estão disponíveis com um sensor de vácuo e regulador adicionado para controlo. O sensor feito de bronze levemente humedecido e uma válvula reguladora fornecem bom ajustamento do nível de vácuo.

Para fazer a ligação entre a bomba e a antena, para que o fluxo de ar chegue à antena contendo o estímulo, é necessário ligar-lhe um tubo capilar que dê saída na zona da antena. É necessário, adicionalmente, procurar uma forma de se introduzir nele o estímulo, para que o fluxo de ar nele contido o transporte para a antena. Para tal usou-se uma peça com a forma da letra “T” cujas três pontas são abertas com um diâmetro adequado para fazer a ligação aos tubos capilares referidos. Esta peça está representada na Figura 2.9. Pretende-se usar a ponta única da parte da peça que corresponde ao traço vertical da letra “T” (indicada como algarismo 2 na Figura 2.9 e revestida com uma capa vermelha com um furo na superfície) para introdução do estímulo. Para simplificar, denominemos-lhe entrada 2, e denominemos como entrada 1 e saída 3 (ou vice-versa) às outras duas entradas tal como estão designadas na representação da Figura 2.9. A intenção é que o estímulo entre pela entrada 2 e chegue à interseção da parte central da peça onde se cruzam as três entradas. Espera-se então que o estímulo químico (odor) seja a partir daí empurrado na direção da antena por um fluxo que entre na entrada 1 que estará ligada à bomba, passando na zona de cruzamento das três entradas, e saía na saída 3 (ou vice-versa) que está conectada a um tubo que dá saída na zona de contacto com a antena. Em cada uma das duas junções 1 e 3 será colada fita isolante para garantir que não haja fugas de ar ou odor. De forma a garantir que, enquanto não se introduzir o estímulo, o fluxo de ar não saía pela saída lateral, ou seja a entrada 2, reveste-se esta por uma capa, de cor vermelha, em que foi perfurada um pequeno orifício com um diâmetro apenas o suficiente para poder ser enfiada uma agulha. Esta agulha é a da seringa que introduz o estímulo químico.



**Figura 2.9** – Peça T, oca por dentro quer na parte vermelha quer branca. As duas pontas brancas representadas em **1** e **3** estão totalmente abertas possibilitando a ligação com tubos capilares. É indiferente se a ponta **1** liga ao tubo que vem da bomba e a ponta **3** liga ao tubo que transporta o estímulo até à antena, ou vice-versa. A única abertura da capa vermelha é o orifício representado por **2**, com apenas um diâmetro suficiente para entrada da agulha de uma seringa

### **2.1.7 - Material para Procedimentos experimentais e para a produção da solução Eletrolítica**

A seguinte lista designa os materiais necessários para retirar a antena do *Gonipterus platensis*:

-Pinça entomológica (para retirar a antena do inseto e coloca-la na estrutura de suporte). Esta pinça está representada fotograficamente na Figura 2.10.

- Lupa (para ver o inseto e a sua antena de forma ampliada): Stemi SV6, Zeiss

Para preparar o estímulo é necessário uma seringa e introduzir dentro da seringa um papel de filtro contendo o estímulo dissolvido. Este papel de filtro tem um lado contendo cola, o que possibilita que seja colado à parede interna da seringa. Ficando assim fixo pode-se injetar o estímulo sem interferir mecanicamente com o papel de filtro.

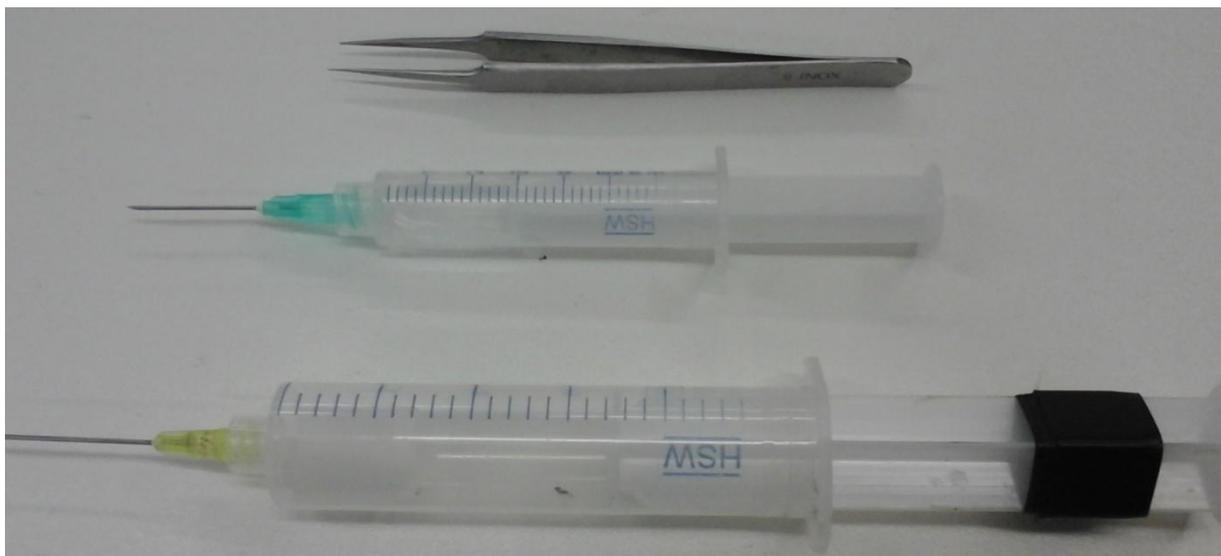
O odor de teste é a Verbenona uma vez que se sabe que o *Gonipterus Platensis* consegue detetar. O solvente usado para a dissolver é a Parafina Líquida, sendo dissolvida numa concentração de

$$\frac{1 \text{ Volume}_{\text{odor}}}{10^3 \text{ Volume}_{\text{solvente}}}$$

A solução eletrolítica usada é a solução de Ringer de Kaissling que usa é constituído pelos seguintes compostos com as respetivas quantidades: NaCl, 7.5g; CaCl<sub>2</sub> - 0.21g; KCl -0.35g; NaHCO<sub>3</sub> - 0.20g; 1L Água (H<sub>2</sub>O) Destilada ;

É necessária também uma seringa para introduzir a solução de Ringer no poço da peça de posicionamento da antena, uma vez que a quantidade é muito pequena.

Na Figura 2.10 estão representadas a seringa para manusear a solução de Ringer, a seringa para introduzir o odor ea pinça entomológica.



**Figura 2.10** – Representação da pinça entomológica (em cima), da seringa para manusear a solução de Ringer (no meio) e da seringa para introduzir o odor (em baixo).

## 2.2 -Métodos

### 2.2.1- Montagem do Circuito elétrico para amplificação

Para começar a montagem do sistema global optou-se pela parte dos componentes eletrônicos. Assim facilmente se pôde testar esta parte isoladamente se cada um dos componentes constituintes, isto é, a bateria, o amplificador, a resistência, a “breadboard” e os próprios fios de ligação estariam em bom estado a funcionar a conetar entre eles corretamente.

Uma vez que o amplificador necessita de alimentação, foi necessário ligá-lo a uma fonte de alimentação. Optou-se pela fonte de alimentação TracoPower, TML 15212 uma vez que já havia em stock no Departamento de Física da FCT/UNL. Esta fonte fornece tensões de +15 e -15 V, sendo adequadas para o amplificador usado.

Montou-se o INA114 numa "breadboard". Para ligar convenientemente as suas entradas consultou-se no datasheet do amplificador o esquema ilustrativo dos seus pinos de entrada, como representado na Figura 2.2.

Para ajustar o coeficiente de ganho foi ligada uma resistência de  $389\Omega$  aos pinos 1 e 8, ou seja os dois pinos  $R_G$ . O coeficiente resultante é dado pela equação 2 substituindo  $R_G$  pelo valor da resistência usada.

$$G = 1 + \frac{50}{389} \Leftrightarrow G \approx 130 \quad (4)$$

O coeficiente de ganho é então de aproximadamente 130.

De seguida soldou-se fio multifilar com certa de  $1m$  de comprimento, com uma ponta descarnada e soldada na ponta contrária à da soldada nos elétrodos, de forma a entrar no nó na “breadboard” dos pinos de entrada de sinal do amplificador.

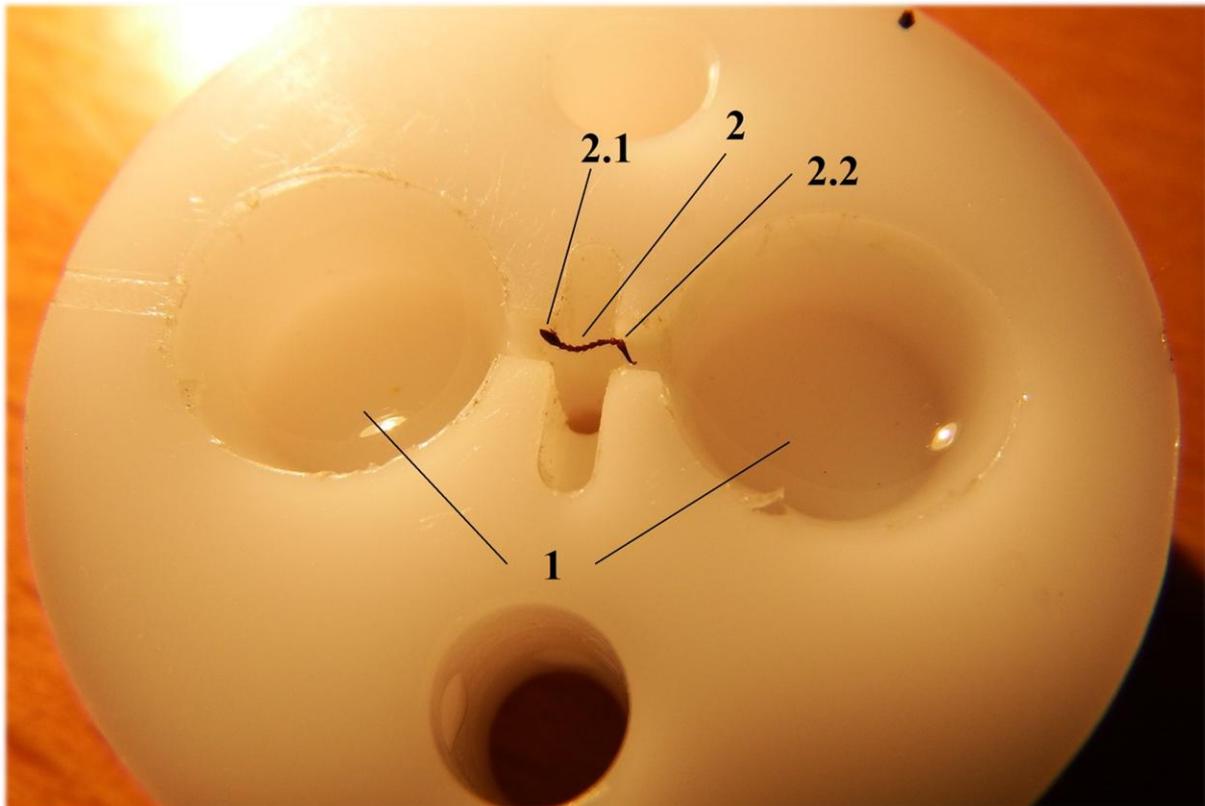
Fez-se uma ligação entre o circuito e os elétrodos. Para tal soldou-se em dois conectores de ouro de diâmetro de 1 mm, em cada um deles, um fio multifilar de cor azul de  $1m$  de comprimento. Na ponta contrária de cada um dos fios descarnou-se e soldou-se com estanho, de forma a entrarem no nó na “breadboard” dos pinos de entrada de sinal do amplificador. Posto isto, para fazer a ligação entre o circuito e o elétrodo basta então ligar o pino de cada elétrodo ao conector de ouro, e ligar os fios no mesmo nó que as portas de entrada de leitura de sinal do amplificador.

### 2.2.2 - Procedimentos

Conforme já foi referido, para que seja feita a leitura do estímulo elétrico proveniente da antena até aos elétrodos, é necessário uma solução eletrolítica que faça a condução entre estes. Para tal foi feita a solução de Ringer já descrita.

Para retirar a antena do inseto, foi usada uma pinça entomológica com pontas finas o suficiente para que se consiga tirar a antena toda adequadamente, fazendo-se uso da lupa *Stemi SV6 Zeiss* para ampliar o inseto, uma vez que sendo a antena muito pequena, é praticamente impossível ao olho retirar a antena desde a base da mesma. É importante que se retire a antena toda, ou pelo menos a maior parte porque caso contrário não terá comprimento suficiente para fazer a conexão de um poço ao outro, o que pode adicionalmente comprometer a qualidade do sinal. Depois de retiradas têm de ser convenientemente posicionadas na ranhura adjacente a ambos os poços, como representado na Figura 2.11.

A solução de Ringer é colocada com uma seringa de agulha nos dois poços da peça A. Terá de se encher os poços com solução até à altura em que esta entre em contacto com a ponta da antena em cada um dos poços. Porém, uma vez que na montagem é imersa a ponta dos elétrodos em cada poço da peça, é necessário ter o cuidado de não encher demasiado porque senão o líquido transborda, podendo destabilizar o posicionamento da antena. Na Figura 2.11 estão representados os dois poços contendo a solução que por sua vez, em cada poço, toca com a ponta do inseto, antes de se introduzir os elétrodos nos poços. A quantidade necessária de solução para respeitar todas estas condições é inferior a 1ml.



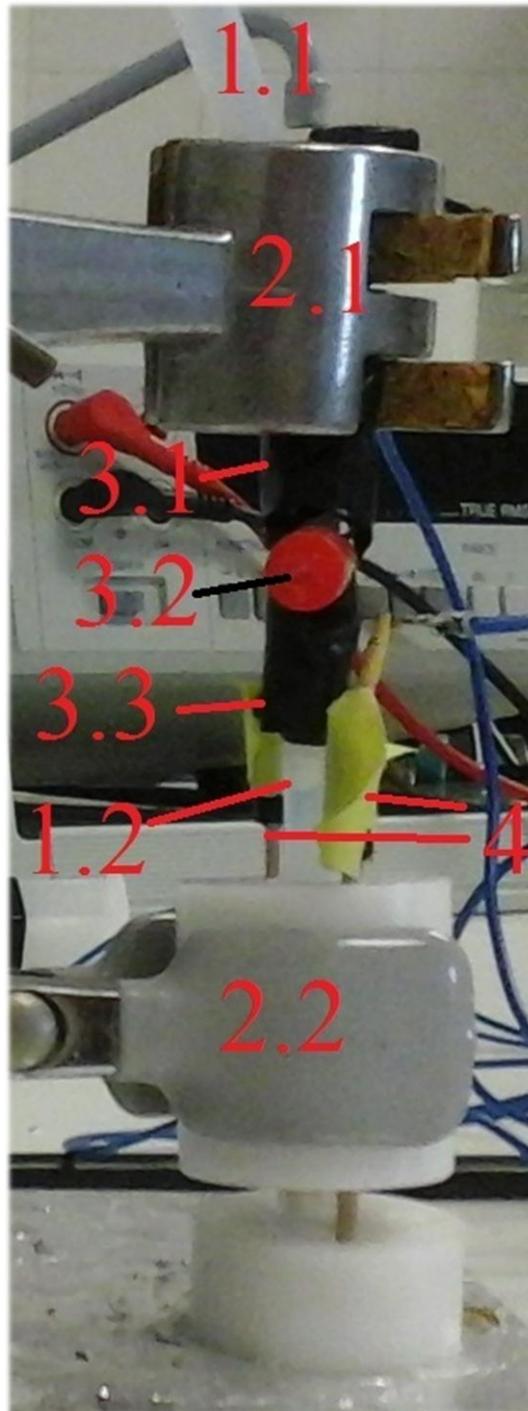
**Figura 2.11** – Representação da antena posicionada na peça A, em contacto com a solução de Ringer. **Legenda:** 1) Solução de Ringer nos poços a fazer contacto com a antena; 2) Antena posicionada na ranhura: 2.1) Ponta da antena; 2.2) Base da antena

### 2.2.3 -Montagem de suporte do sistema e do sistema de entrega do estímulo

Para conseguir medir um sinal originado na antena é necessário ligar os eléctrodos aos poços que contêm a solução de Ringer, que por sua vez estão, cada um, em contacto com cada uma das pontas da antena do inseto. Os eléctrodos vão então medir uma diferença de potencial entre estes dois poços, uma vez que existe condutividade eléctrica entre estes e a antena do inseto. É necessário então uma configuração para que os eléctrodos fiquem montados de uma forma estável. É necessário que a ponta dos eléctrodos fique em contacto com a solução de Ringer, devendo estar submersos dentro do poço, ficando estes então na vertical. Para tal a peça referida anteriormente e representada na Figura 2.5 onde se encaixam os eléctrodos, tem de ficar diretamente por cima da peça de posicionamento da antena, de modo que encaixando os eléctrodos pelos dois canais por cima, as pontas destes saiam por baixo e toquem os poços com a solução de Ringer.

Tentou-se primeiro encaixando as duas peças, ou seja, a tocarem-se com as suas superfícies, mas acabou-se por verificar existirem problemas de capilaridade ao fazer desta forma, uma vez que a solução de Ringer transbordava. Concluiu-se então que as peças não se podem tocar, ficando apenas ligeiramente separadas, para que a ponta dos elétrodos consiga ainda chegar em contacto com os poços. Para fazer isso utilizou-se umas pegas que ficam posicionadas na horizontal, que estão fixas numa barra metálica vertical, para estruturar as duas peças da forma necessária, como representado na Figura 2.12: a garra segura na peça B, para que fique acima da peça A, com apenas um pequeno espaço vazio entre as duas peças para não se tocarem. As peças estão separadas com uma distância de cerca de 1 *cm*.

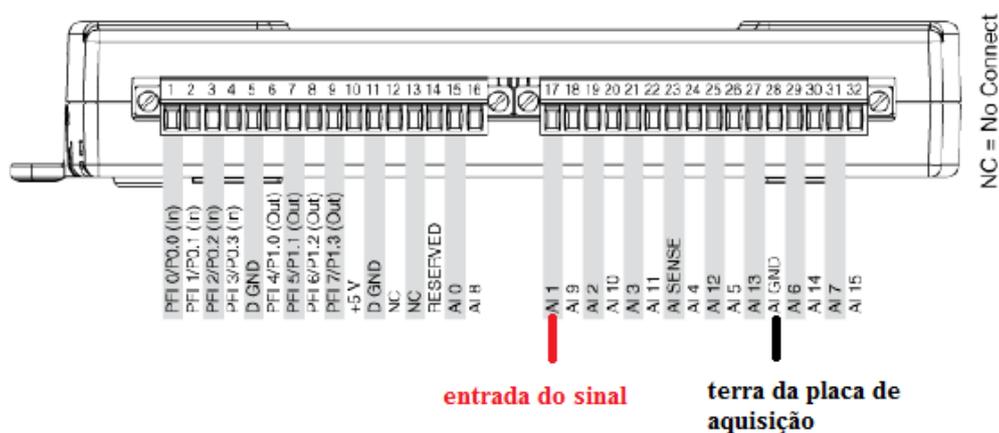
Para dirigir o estímulo à antena é necessário criar um caminho onde haja um fluxo de ar, originado de uma bomba de ar, e onde a certo ponto deste caminho seja inserido o estímulo. Para tal é necessário ligar um tubo capilar à bomba de forma a conduzir-se o estímulo até ao volume de ar à volta da antena, sendo que nesta montagem a saída do tubo capilar fica por cima a cerca de um centímetro de uma distância na vertical. Assim, o fluxo de ar vem de cima para baixo aquando sai do tubo para a zona de espalhamento. O tubo é inserido no canal de maior diâmetro e central da mesma peça que é usada para fixar os elétrodos. Na montagem o tubo é inserido na entrada em cima do canal e a ponta do tubo vai praticamente até ao final do canal, ficando porem dentro deste. Para inserir-se o estímulo no tubo, foi utilizada a peça em forma da letra “T” como já antes descrita e representada na Figura 2.9. Na Figura 2.12 está representado como foram ligadas às entradas 1 o tubo que vem da bomba de ar e à saída 3 o tubo que transporta o odor à antena, de acordo como já antes foi descrito. Para que o tubo transportador fique estavelmente encaixado na peça B usou-se uma garra extra, como representado na Figura 2.12. Verificou-se que se o tubo não estivesse fixo com uma garra, faria demasiada pressão sobre peça, uma vez que a puxava no sentido da gravidade, o que tornava a configuração da montagem instável e pouco segura. Isto dificultaria também, por sua vez, a introdução do estímulo pela entrada 2 da peça em “T”, uma vez que a entrada da agulha não estaria na horizontal, mas sim torta em relação às linhas paralelas à superfície da bancada.



**Figura 2.12**– Suporte e estrutura da “interface” com a antena: suporte da antena, entrega de estímulo de odor e leitura do sinal elétrico da antena. **Legenda:** **1) tubo onde passa o fluxo de ar:** **1.1**- parte do tubo que liga diretamente à bomba de ar **1.2**- parte do tubo onde é entregue diretamente à antena o estímulo **2- Pegas de suporte.** **2.1)** pega de baixo que segura a peça A; **2.2)** a pega de cima que segura o tubo de forma a estar de forma vertical ao entrar no orifício da peça antes referida **3) Peça em T vermelha** (vista na direção por onde é enfiada a seringa com o estímulo): **3.1)** parte da peça cujo fluxo de ar ainda não contém o estímulo, colada com fita aderente preta à ponta da parte do tubo de 2.1; **3.2)** parte da peça com um orifício (vê-se aqui no centro da superfície circular vermelha) por onde é inserida com uma agulha de seringa o estímulo; **3.3)** parte da peça cujo fluxo de ar já contém o estímulo, colada com fita aderente preta à ponta da parte do tubo de 2.2; **4) Eléttodos**

## 2.2.4 -Montagem da placa de aquisição de dados

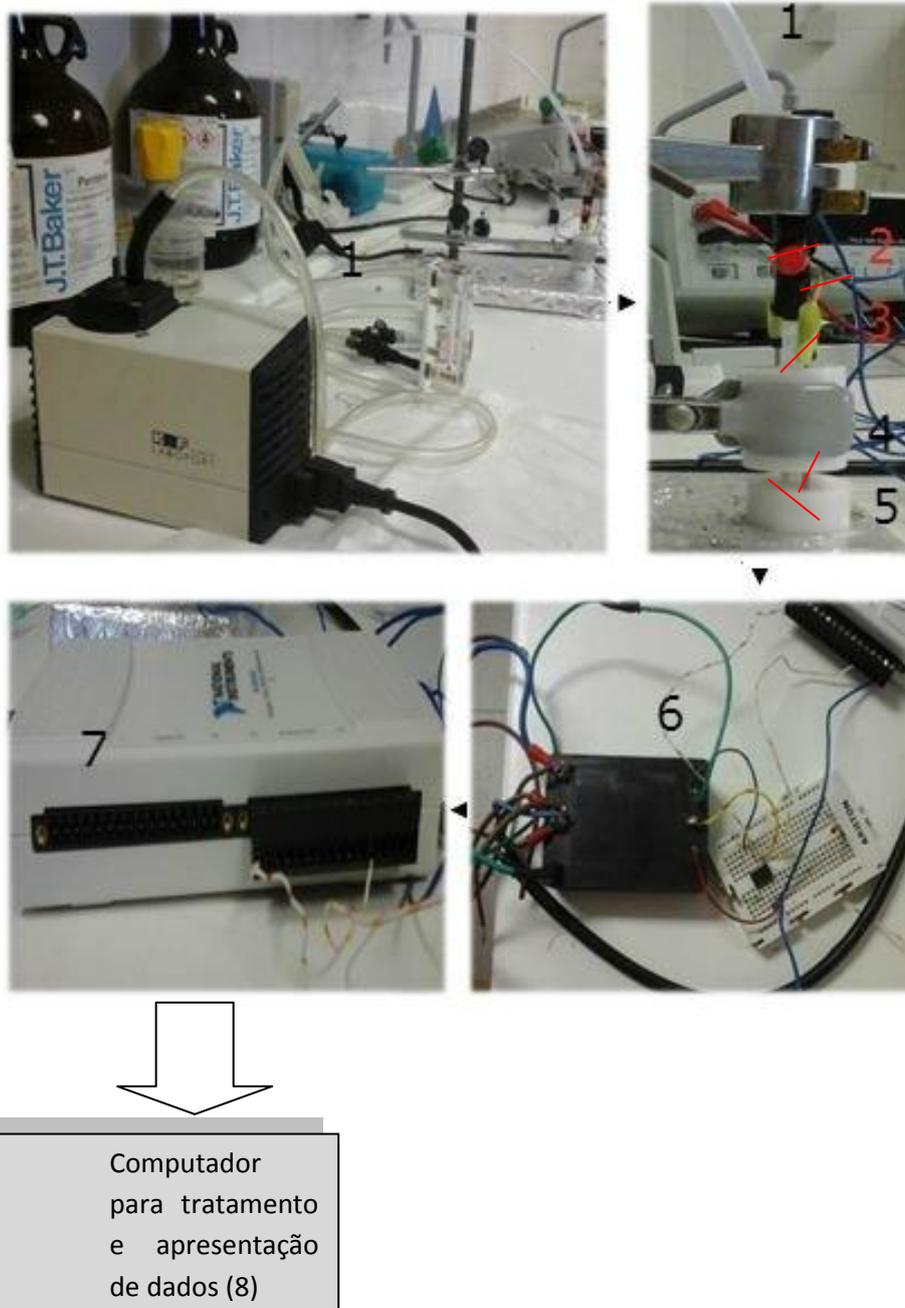
De seguida foi ligada a placa de aquisição *NI USB-6210* ao PC e ao amplificador. Para ligação ao amplificador foram usadas as seguintes portas de leitura da placa de aquisição: a 17 (AI 1) para ligar (no mesmo nó na “breadboard”) ao pino 5 do amplificador ( $V_0$ ) e a 28 (AI GND) para ligar (no mesmo nó na “breadboard”) ao pino de Referência, ou seja pino 6 (Ref). A representação do esquema das várias portas da placa de aquisição está na Figura 2.13.



**Figura 2.13** – Esquema das portas de entrada (da 1 ao 16) e saída (da 17 ao 32) da placa de aquisição da National Instruments. Marcada a vermelho está a porta que se ligou à saída do amplificador. Marcada a preto a terra que se ligou ao pino de Referência (Ref) do Amplificador

Ao ligar a placa de aquisição ao computador, fica assim concluída a montagem do sistema físico para leitura do sinal EAG.

Na Figura 2.14 encontram-se esquematizados os vários constituintes físicos e a forma como estes se conetam entre si, segundo a ordem a que estes foram teoricamente projetados na Fig.2.1.

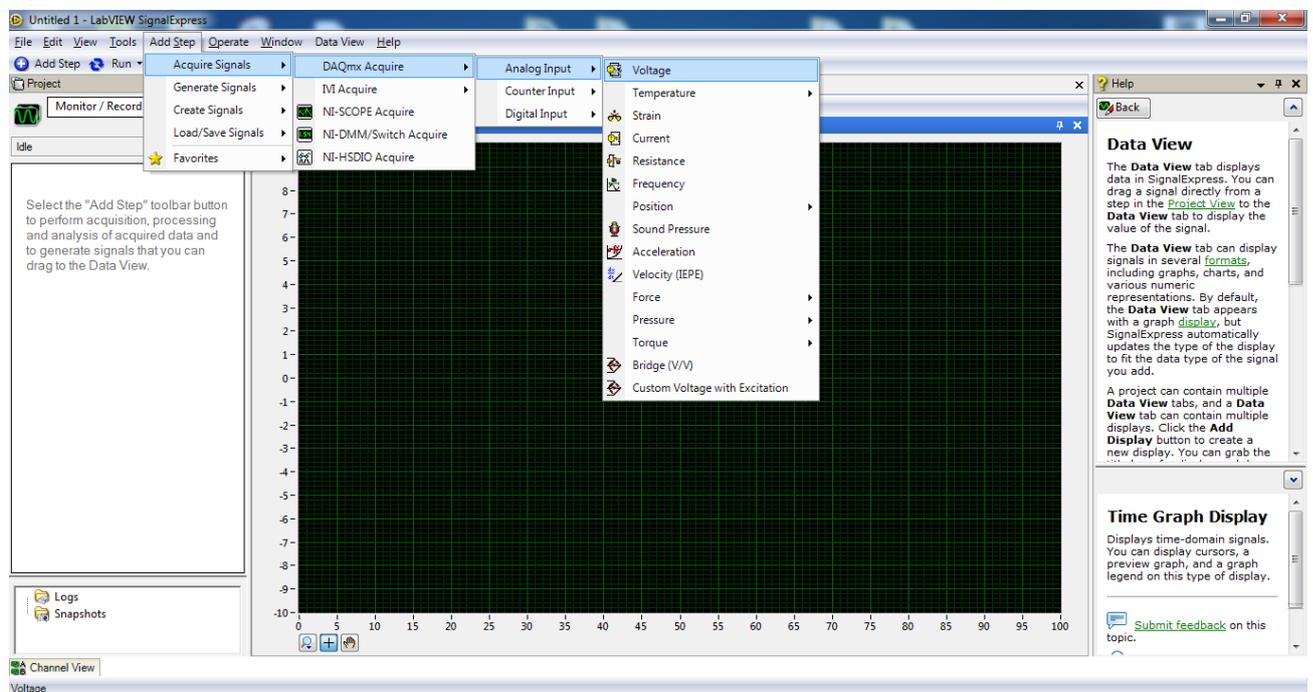


**Figura 2.14-** Representação esquemática dos constituintes físicos que constituem a instrumentação utilizada para a medição do sinal EAG segundo a sua ordem na Figura 2.1: cada algarismo corresponde à ordem em que o bloco esquemático a que o constituinte físico corresponde na Figura 2.1. **Legenda:** 1) Bomba de ar (e respetivo caminho de condução do fluxo de ar); 2) Entrada de odor; 3) Estrutura e “interface” entre o odor e a antena; 4) Estrutura de “interface” entre a antena e a solução eletroquímica; 5) Eléktros de medição; 6) Circuito de Amplificação; 7) Placa de Aquisição

## 2.2.5-Aquisição e Tratamento de Dados

Para leitura de dados utilizou-se o programa LabVIEW SignalExpress. Para efetuar uma medição, aberto o programa seleciona-se a seguinte sequência de opções como representada na Figura 2.15: “Add Step”, “DAQmx Acquire”, “Analog Input”, “Voltage”. Abrir-se-á uma caixa de diálogo para escolher, de uma lista, de que canais físicos se quer ler o sinal. A porta a que está ligado na experiência, a porta 17 (AI 1) corresponde ao ai0. Seleciona-se a porta e clica-se "Ok". De seguida basta clicar no botão superior com o círculo vermelho denominado de "Record". Após parar a gravação, para rever o sinal basta ir ao "Logs" no canto inferior esquerdo. Para rever o sinal, após sair do programa deve-se seleccionar " Save Project" do "File". A frequência de aquisição de dados é de 1kHz, sendo que nas abcissas foi representado o tempo e nas ordenadas a voltagem correspondente.

Para eventual processamento de sinal tem de se ajustar, abaixo da barra azul lateral da esquerda denominada de “Project” que se pode ver na Figura 2.15, e selecionara opção “Playback”. De seguida pode clicar-se com o botão esquerdo do rato na zona branca diretamente abaixo da já antes referida barra azul e aparece uma lista de opções. Usou-se a opção “Power-Spectrum” que fornece a representação de uma Transformada Rápida de Fourier (ou seja Intensidade em decibéis em função da Frequência) Para escolha da funcionalidade “Power-Spectrum”, na lista referida, seleciona-se a seguinte sequência de opções: “Analysis”, “Frequency-Domain Measurements”, “Power Spectrum”.



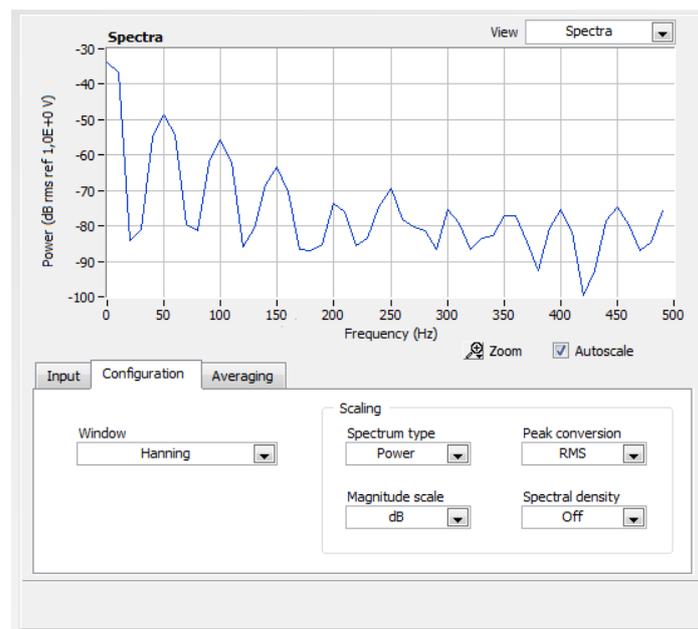
**Figura 2.15** -Ambiente de trabalho do programa LabVIEW Express e os procedimentos necessários para configurar uma sessão de leitura de sinal.

Foi feita uma medição com uma antena, de duração de 7 minutos e 47 segundos, em que a antena foi estimulada 6 vezes, com um espaçamento de aproximadamente um minuto de uma vez para a seguinte. A hora a que foi injetado cada estímulo encontra-se na Tabela 2.2. Uma vez que na representação do sinal no Matlab o eixo do tempo é representado pelo  $\Delta t$ , é conveniente calcular este valor. Temos então que:

$$\Delta t = t_f - t_i \quad (5)$$

Diferentes volumes de estímulo foram testados, como representado na Tabela 2.2.

De seguida foram feitas medições e processamento de sinal, nomeadamente uma análise do espectro da frequência através de uma FFT (Fast Fourier Transform) e filtragem passa-baixo e rejeita-banda tipo *notch*. Descobriu-se assim que o sinal, através da análise do espectro de frequência do sinal representado na Figura 2.16, que este continha algum ruído principalmente nas baixas frequências, à volta dos 50 Hz (frequência da rede) e dos 100 Hz (múltiplo da frequência da rede), daí ter-se feito tentativas de filtragem.



**Figura 2.16** - Representações da FFT do sinal EAG obtido na medição.

| Quantidade de estímulo | Tempo    | $\Delta tempo$ (s) |
|------------------------|----------|--------------------|
| Início da experiência  | 17:38:26 | 0                  |
| 1ml                    | 17:39:21 | 55                 |
| 1ml                    | 17:40:00 | 94                 |
| 2ml                    | 17:41:10 | 164                |
| 2ml                    | 17:43:05 | 279                |
| 3ml                    | 17:44:30 | 364                |
| 3ml                    | 17:46:00 | 454                |
| Fim da experiência     | 17:46:13 | 467                |

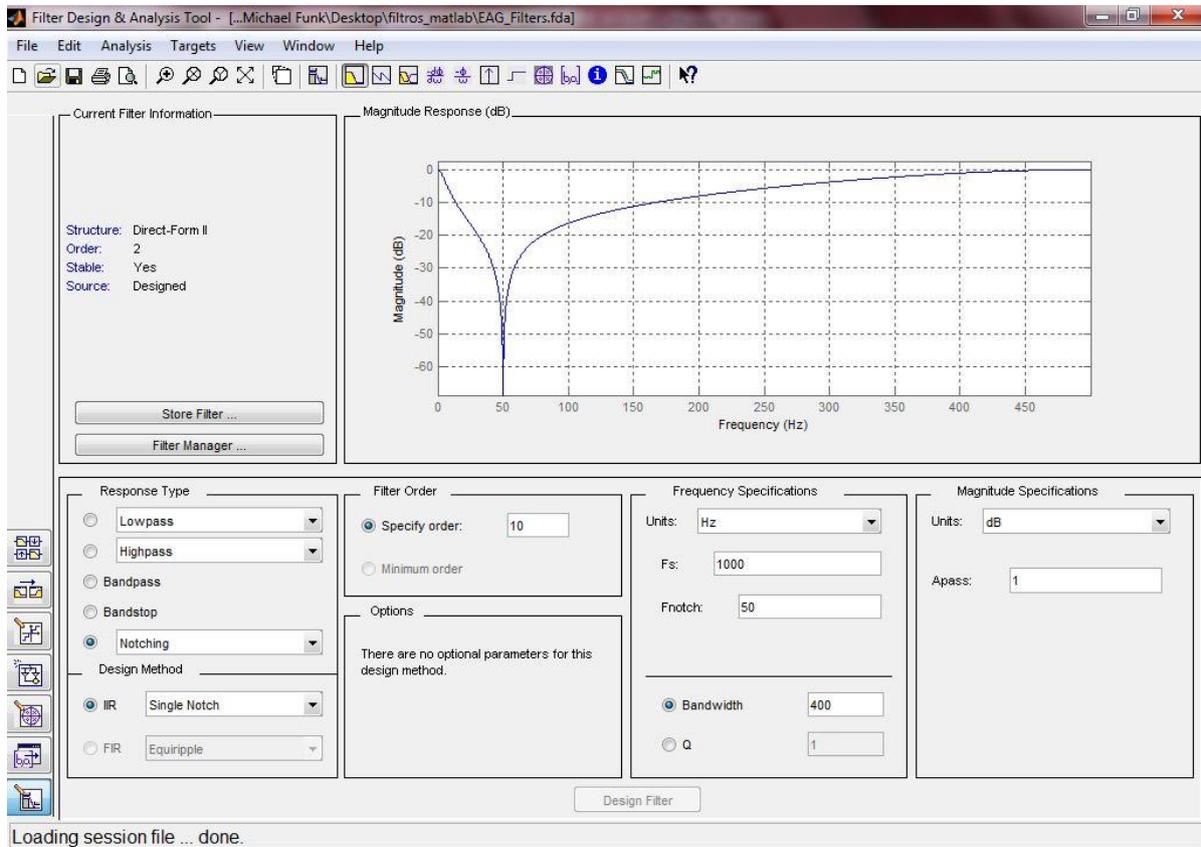
**Tabela 2.3** - Tempos registrados em que foi introduzido o estímulo na experiência.

De forma a filtrar o sinal posteriormente, e conseguir adequada visualização utilizou-se o Matlab. Em primeiro lugar é necessário exportar os dados do programa de aquisição resultando isto num ficheiro excel que contém os dados do sinal, formato em que é possível tratar os dados no Matlab. Para filtrar o sinal recorreu-se a uma das ferramentas do programa, nomeadamente o “Filter Design & Analysis Tool” representada no Figura 2.16. Esta é uma ferramenta versátil que facilita o projeto de filtros. Por sua vez é facilitado assim a experimentação de vários filtros até se encontrar aquele ou aqueles que resultam num sinal considerado mais adequado.

Para que o sinal ficasse com o mínimo ruído possível para se ver nitidamente a “Baseline” do EAG, tiveram que se projetar alguns filtros e utilizá-los para atenuar o sinal obtido. Estes foram experimentalmente obtidos, e projetados segundo as informações dadas pela FFT quanto à frequência do sinal.

Foi projetado um Filtro passa-baixo de 40 Hz, uma vez que as frequências de interesse são as baixas, à volta de 0.1 a 1 Hz, como já antes foi referido ser a zona que se tem interesse que fique. Assim atenua todas as frequências mais altas. Uma vez que continua a haver grande prevalência das frequências de 50 Hz e 100 Hz depois da aplicação deste filtro passa-baixo, foram desenhados dois filtros rejeita-banda do tipo “notch” (que cortam à volta de uma determinada frequência): um de 50 Hz e 100 Hz. Os valores dos parâmetros escolhidos no programa para a projeção destes filtros encontram-se na Tabela 2.4. Depois de atenuar o sinal com estes filtros já se notava uma “Baseline” bastante mais próxima do esperado na medição de um EAG, notando ainda assim claramente os picos de EAG. Porém, conseguiu-se melhorar ainda mais a apresentação do sinal desenhando um filtro “notch” de 49,96 Hz: isto fez-se porque na FFT ainda havia uma componente saliente desta frequência sendo interessante

tirá-la. Após isto, a “Baseline” ficou bastante mais próxima daquilo que se espera de uma medição EAG, continuando a ser nítidas as despolarizações, ou seja os picos EAG.



**Figura 2.17** -Ambiente de trabalho do Matlab: representação da ferramenta “Filter Design & Analysis Tool” usada para desenhar filtros necessários: nesta imagem está representada a construção e análise de um dos filtros usados neste trabalho, um filtro “notch” para cortar a frequência da rede elétrica nacional de 50 Hz. Posteriormente os filtros aqui construídos são exportados e aplicados aos sinais na janela de comandos do Matlab.

Adicionalmente foram feitas algumas medições de validação para comparar com o sinal EAG, para garantir que o perfil e forma deste, que está deveras parecido com o esperado, não é apenas uma coincidência. Logo se o perfil e a forma do sinal e dos eventuais picos, que se registre da medição dos testes de validação, forem significativamente diferentes, pode-se concluir com maior certeza que os picos que se possam obter da medição EAG não são falsos positivos nem coincidência.

Foram feitas duas medições de validação. A primeira tinha um fio de cobre a fazer a conexão entre os dois poços, em vez da antena: esta seria a situação em que a resistência entre os dois poços tende para o infinito. A segunda tinha um fio de náilon: esta seria a situação em que a resistência entre os dois poços tende para zero.

Os mesmos procedimentos de tratamento de sinal foram feitos com os dados do sinal proveniente destas medições de controlo, já que apresentavam, à partida um perfil muito ruidoso.

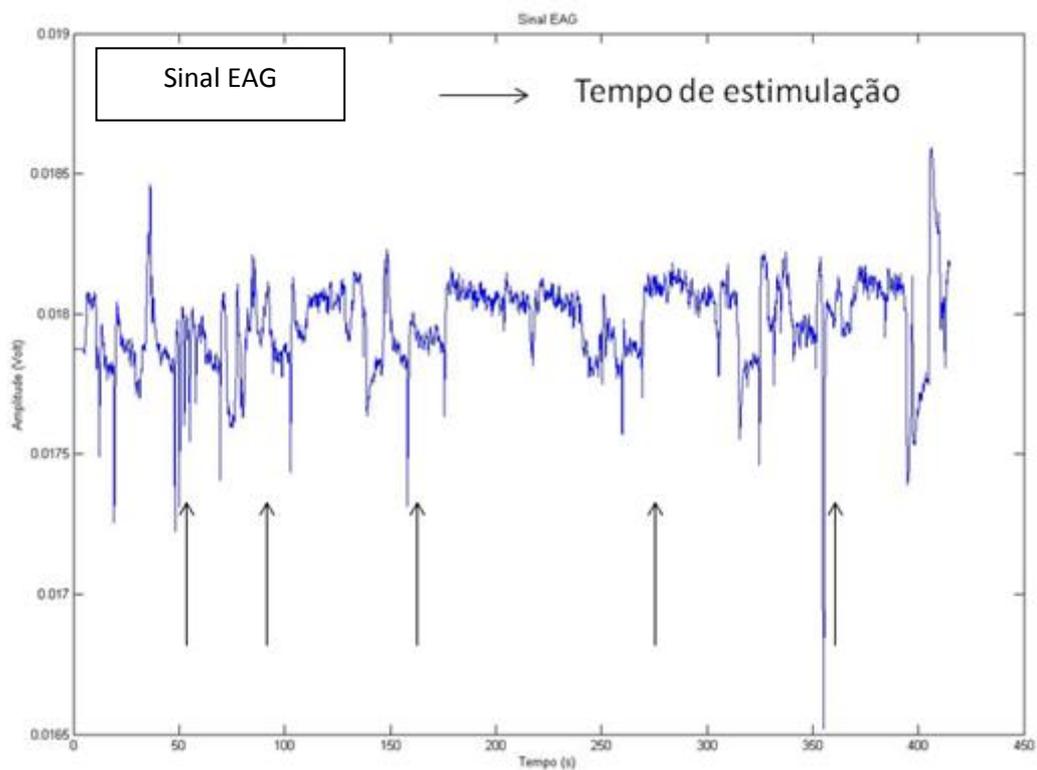
|                          | Parâmetros Filtros     | Filtros Desenhados |                    |                     |                       |
|--------------------------|------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|-----------------------|
|                          |                        | Passa-baixo 40 Hz  | Rejeita-banda 50Hz | Rejeita-banda 100Hz | Rejeita-banda 49.96Hz |
|                          | Response Type          | LowPass            | Notching           | Notching            | Notching              |
| Design Method            | IIR: Chesbyshev Type I | IIR: Single Notch  | IIR: Single Notch  | IIR: Single Notch   |                       |
| Frequency Specifications | Units                  | Hz                 | Hz                 | Hz                  | Hz                    |
|                          | Filter Order           | 10                 | 10                 | 10                  | 10                    |
|                          | Fs                     | 1000               | 1000               | 1000                | 1000                  |
|                          | Fpass                  | 40                 | -                  | -                   | -                     |
|                          | Fnotch                 | -                  | 50                 | 100                 | 49.96                 |
|                          | Bandwidth              | -                  | 400                | 450                 | 495                   |
|                          | Q                      | -                  | 1                  | 1                   | 1                     |
| Magnitude Specifications | Units                  | dB                 | dB                 | dB                  | dB                    |
|                          | Apass                  | 1                  | 1                  | 1                   | 1                     |

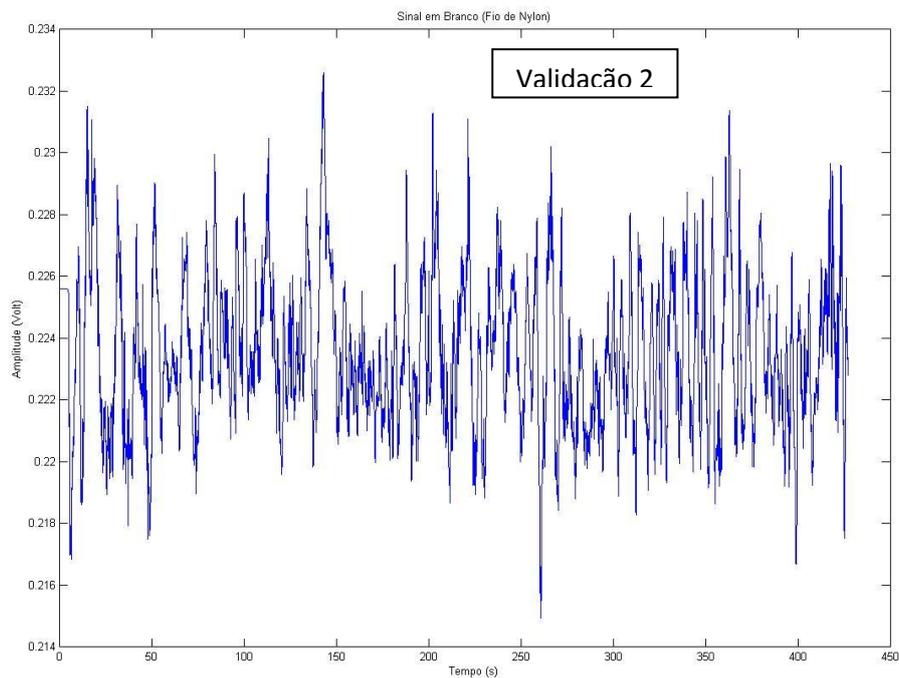
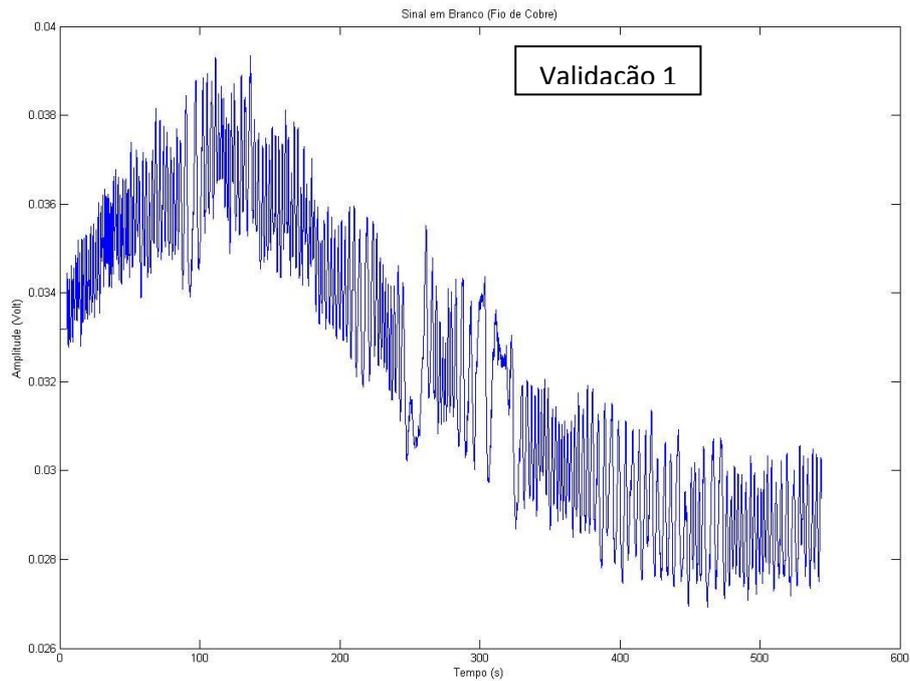
**Tabela 2.4** – Os valores dos parâmetros seleccionados no Matlab para a construção de cada filtro. Os parâmetros estão a verde-escuro, os filtros a castanho, e os valores dos parâmetros a verde claro. De notar que para a construção do filtro é necessário seleccionar primeiro o valor de “Responde Type”, e em segundo o valor de “Design Method”. A partir daí é possível construir o filtro com os parâmetros restantes, havendo diferentes parâmetros para outros tipos de filtros que aqueles construídos neste trabalho.



### 3 - Resultados

Na Figura 3.1 estão representados os sinais medidos amplificados da experiência em que antena é estimulada pelo odor (Sinal EAG) e as experiências que servem de validação para comparar com o perfil do sinal EAG: as setas azuis indicam os tempos de introdução do estímulo, e a vermelha o tempo da resposta da antena face a este. Para efeitos de análise consideremos o tempo a contar do momento em que se começou a experiência, ou seja o valor de  $\Delta t$  da expressão 4. Chamemos-lhe tempo.



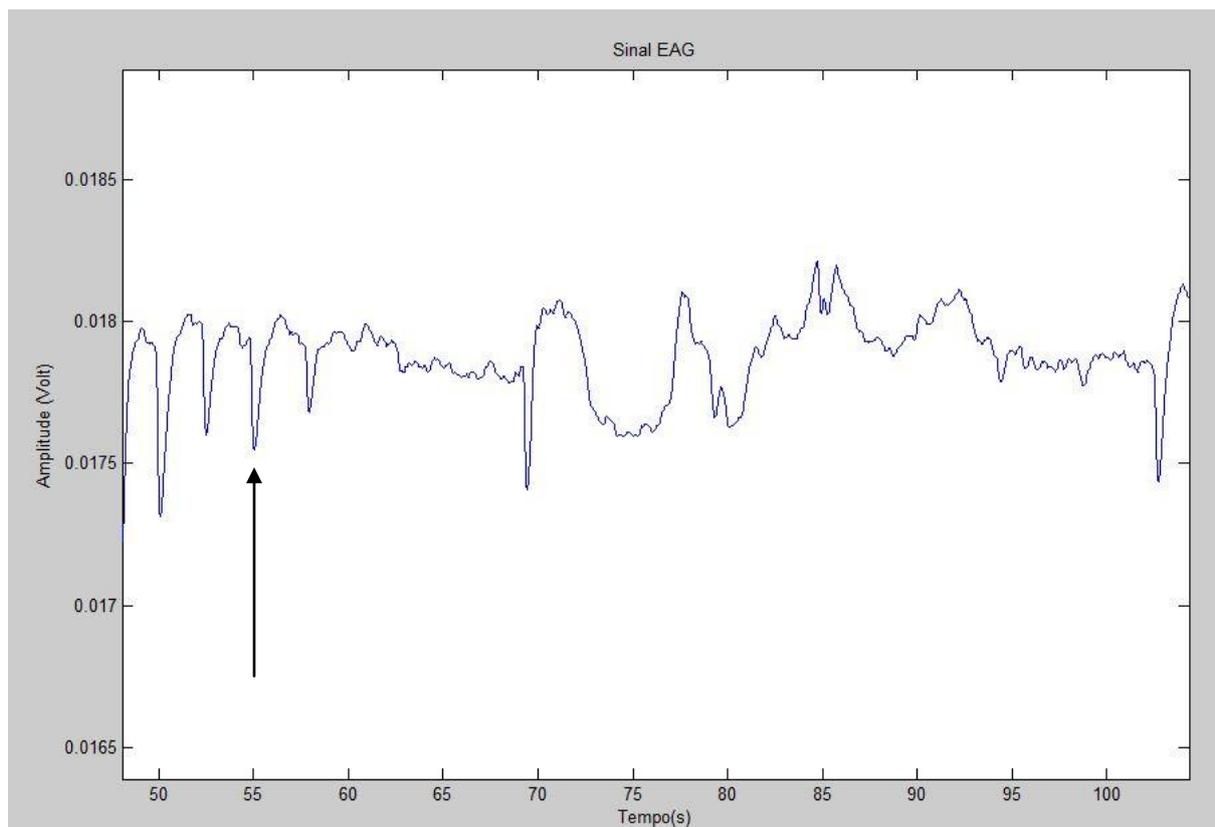


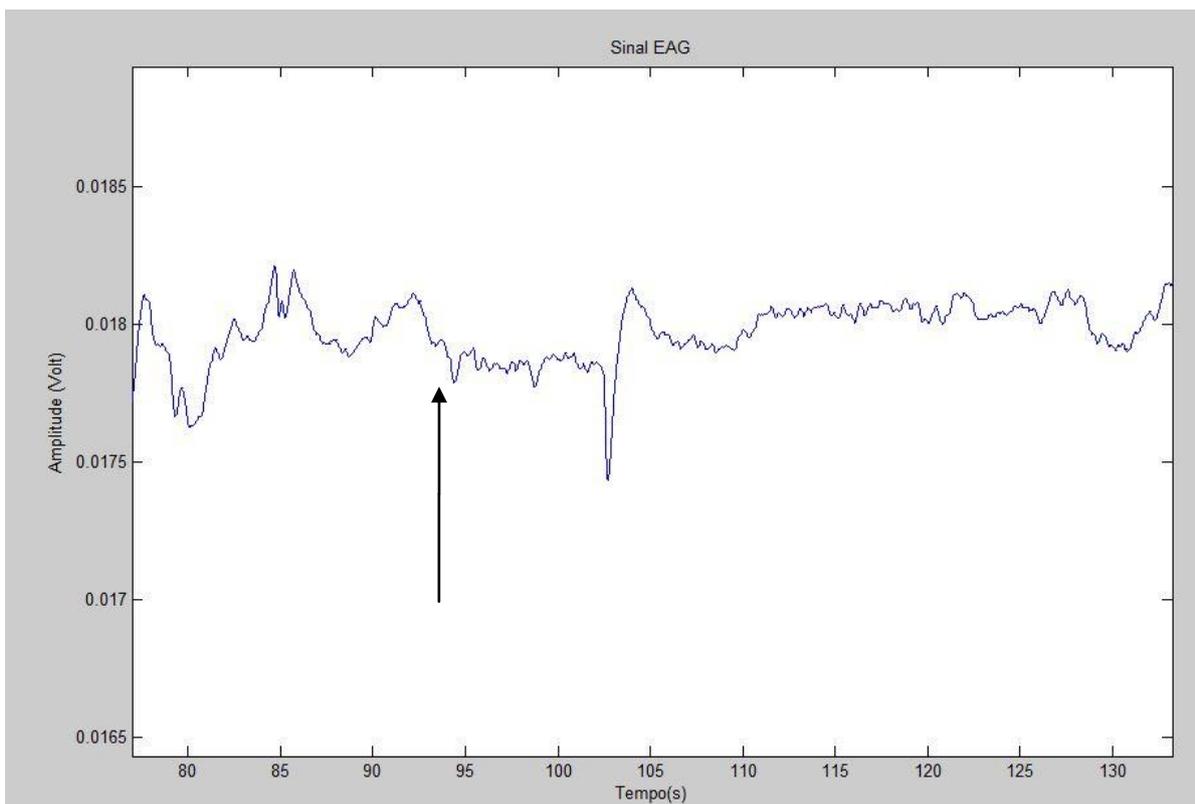
**Figura 3.1** – Representações da medição do sinal EAG em que se procedeu à estimulação química da antena e das medições de validação. **Legenda - Sinal EAG** ; **Validação 1**) Representação da medição de controlo (medição em branco) em que está um fio de cobre a unir os dois poços com solução eletrolítica; **Validação 2**) Representação da medição de validação (medição em branco) em que está um fio de náilon a unir os dois poços com solução eletrolítica.

O sinal obtido, representado na Figura 3.1, depois de terem sido aplicados os filtros, revelou ter um perfil muito parecido ao que se espera de um sinal EAG com uma “Baseline” nítida e estável, à volta do valor mostrando picos de despolarização pouco tempo depois. O sinal deixa de aparecer representado no tempo do último estímulo devido ao procedimento de filtração (descrito na secção de “Aquisição e Tratamento de Dados” do Capítulo 2) que retirou esta parte do sinal, aparecendo porém nos dados do sinal registados na aquisição do mesmo, ou seja antes de serem filtrados.

Comparando o perfil deste sinal, com o perfil dos dois sinais de validação verifica-se que em nenhum destes se verificou o aparecimento de despolarizações tão abruptas, características de uma despolarização em que a antena foi estimulada, como as que aparecem no sinal EAG.

Na Figura 3.2 estão representadas as zonas do sinal EAG registado maximizadas em torno dos primeiros dois picos resultantes de estimulação, podendo-se observar o que indica ser uma resposta da antena imediata ao estímulo introduzido. A resposta tem uma largura de cerca de 1 segundo, tendo assim o sinal uma recuperação relativamente lenta, como esperado segundo a literatura, na ocorrência de uma despolarização típica de um EAG.





**Figura 3.2** – Representação da despolarização da antena em resposta ao estímulo de odor. **Em cima:** sinal EAG focado entre os instantes imediatamente antes em que foi emitido o 1º estímulo (aos 55 *segundos*, marcado pela seta preta) com a correspondente despolarização da antena como resposta. **Em baixo:** sinal EAG focado entre os instantes imediatamente antes em que foi emitido o 2º estímulo (aos 94 *segundos*, marcado pela seta preta) com a correspondente despolarização da antena como resposta.

Na introdução do terceiro, quarto e quinto estímulo, verificou-se que os picos se registaram imediatamente antes da introdução do estímulo químico, análogamente aos picos registados imediatamente antes ao primeiro estímulo. Uma vez que o instante considerado para introdução do estímulo coincide com o da introdução da agulha, suspeita-se então que a agulha esteja contaminada de verbonona, uma vez que não se trocaram as agulhas entre experiências. Desta forma os vestígios de verbonona seriam transportados pelo fluxo de ar imediatamente para a antena causando assim uma resposta imediata. Isto poderá ser uma possível causa para a ocorrência do pico de EAG mesmo antes de premir o êmbolo da seringa, sendo apenas após esta acção que o estímulo deveria ser introduzido segundo o planeado na experiência. Caso seja isto o que aconteceu, os picos seguintes poderão ser respostas com algum atraso, uma vez que a antena necessita de algum tempo para recuperar para que reestabeleça a sensibilidade ao estímulo químico.

Fez-se uma microextração de fase sólida, com a ponta da agulha, de forma a podermos verificar com a CG se existe realmente contaminação de verbonona. A leitura de CG, representada no Anexo 1, revelou que existe de fato vestígios de verbonona na ponta da antena, sendo assim esta a possível causa dos picos registados imediatamente antes da introdução experimental do estímulo químico.

## 4- Conclusão

Ao efetuar a medição EAG e respectivo tratamento de dados, verificou-se que após o tempo de introdução dos estímulos químicos (odor da verbenona) foram registados picos de sinal com a forma característica de um sinal gerado por um impulso elétrico de uma célula nervosa: uma brusca despolarização seguida de uma leve hiperpolarização antes da voltagem do sinal voltar ao nível da linha de base. No primeiro e segundo estímulo a despolarização regista-se no instante da estimulação.

Foram também registadas despolarizações imediatamente antes à introdução do estímulo, que poderão ser causados pela contaminação da agulha com vestígios de verbonona, o que levou a que este composto fosse transportado para as imediações da antena, antes de premir o êmbolo da seringa para introdução do estímulo. Uma vez que se verificou experimentalmente que existem realmente vestígios de verbonona na agulha da seringa utilizada para introdução do estímulo, esta é uma possível causa para que não se verifiquem os picos após a introdução do estímulo, como pretendido na experiência, mas possivelmente imediatamente antes.

Chegou-se à conclusão que há indícios de que o aparelho de medição de Eletroantenografia construído seja capaz de medir o sinal elétrico da antena na presença de odores que a estimulem tendo-se assim atingido o objetivo deste trabalho.



## 5- Discussão

Uma das grandes vantagens deste trabalho foi a possibilidade da construção de um sistema que indica ser capaz de ler o sinal elétrico proveniente da antena do inseto quando esta é estimulada pelo contacto com um odor que seja conhecido que a estimule, ou seja consegue medir um sinal EAG. Isto é possibilitado em grande parte pela boa conceção do sistema de aquisição, apresentação e de tratamento de dados. Outra vantagem que é de salientar neste sistema é a possibilidade de fácil posicionamento e manuseamento do material biológico, comparado com ensaios EAG em que seja necessário introduzir as pontas da antena do inseto na ponta de pipetas, tendo que usar um micromanipulador, processo este dispendioso de tempo. Também o posicionamento dos eléctrodos é bastante mais prático que o tradicional uso de pipetas na construção do eléctrodo, poupando muito tempo de experiência comparando, novamente, com o uso de micropipetas, que necessitam que se prepare os materiais de condução elétrica dentro destes. Os eléctrodos são de fácil armazenamento e de fácil colocação na montagem. Além disso este trabalho tem potencial para a construção de um modelo portátil do sistema físico. Permite ainda estudos com o uso de várias antenas em paralelo, o que já antes foi referido ter potencial para melhorar ainda mais a deteção de odores, é possível colocar mais que uma antena na ranhura da peça A.

Um das falhas ocorridas neste trabalho foram os instantes em que ocorreram despolarizações imediatamente antes da introdução do estímulo em instantes correspondentes ao momento em que se introduziu a agulha no local de entrada do estímulo químico. A causa disto poderá ter sido a contaminação de verbonona que se verificou existir na ponta da agulha da antena. Tais ocorrências aumentam o grau de incerteza de causa-efeito entre a introdução do estímulo e a despolarização registada no sinal. Sugere-se que se introduza uma agulha nova, ou que a usada seja devidamente limpa de vestígios do composto químico ejetado, para que esta contaminação não cause uma resposta da antena noutra altura que não aquele em que o embolo da seringa é premido.

Outra das desvantagens é a falta de meios no sistema ao nível dos dispositivos físicos que filtrem e/ou isolem o circuito de ruído eletrónico. Isto leva a que surja algum ruído no sinal adquirido sendo preferível impedir a sua presença neste ainda no próprio sistema físico. Este ruído, mesmo sendo possível filtrá-lo na fase de tratamento de dados, corrompe o sinal adulterando-o. Outro ponto fraco é fato de a antena estar em contacto com o ar do meio ambiente do local da experiência o que possibilita que outros odores, que não os de teste, estimulem a antena corrompendo o sinal com picos EAG que são falsos positivos, tornando mais difícil assim identificar o pico EAG realmente causado pelo estímulo induzido. É sugerido que todo o sistema seja devidamente isolado do meio ambiente ao redor. Incluindo deve se certificar que a bomba de ar tenha filtragem adequada para evitar que esta bombeie o ar o meio ambiente da sala de experiência ou exterior a esta.

Para reduzir e evitar o ruído eletrônico é sugerida a introdução de blindagem no sistema: o circuito de amplificação, os elétrodos e até a própria estrutura de “interface” entre elétrodos, inseto e odor devem ser montados dentro de uma gaiola de Faraday, tendo de se ter o cuidado de a montar para que as peças A e B não sejam colocadas em contactouma com a outra. A própria fonte de alimentação é uma fonte inerente de ruído, uma vez que ligada à rede elétrica nacional introduz a frequência característica desta, de 50Hz como se pode ver através da análise de espectro de frequência (FFT) feita. Isto pode ser evitado usando, em substituição, uma pilha para alimentar o amplificador. Também se sugere o uso de filtros eletrônicos ao nível do circuito, em vez de ao nível do tratamento de dados, do mesmo tipo e parâmetros usados neste trabalho.

De forma a evitar o aparecimento de falsos positivos, para além da já referida Gaiola de Faraday que possibilita o isolamento da antena do ar no meio ambiente, sugere-se também o uso de uma bomba de ar que seja mais fácil regular para fluxos mais adequados, ou seja, de forma a não ativar os mecanoreceptores com um fluxo demasiado forte. Por mais que se tomem as medidas mencionadas, existe sempre potencial para falsos positivos: poder-se-á usar os filtros matemáticos já antes referidos neste trabalho, otimizando assim a deteção de sinais EAG, como o uso de várias antenas montadas em paralelo possibilitado pela peça de suporte.

# Referências bibliográficas

## 1) Autores:

- **Aston-Jones, G., Siggins G. R.** Electrophysiology. In: Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress. D. Kupfer and F. E. Bloom (ed.), Raven Press, pp. 41-64, 1995. (<http://www.acnp.org/g4/GN401000005/CH005.html>).
- **Graeme Jerald G., Tobey Gene E., Huelsman Lawrence P., 1983**, Operational Amplifiers: Design and Applications. McGraw-Hills. Auckland.
- **Kaissling, K. 1986.** Chemo-Electrical Transduction in Insect Olfactory Receptors. **Annual Review of Neuroscience. Vol. 9: 121-145. DOI: 10.1146/annurev.ne.09.030186.001005.**
- **Kaya L. M., Stopfer M. 2006.** Information processing in the olfactory systems of insects and vertebrates. Seminars in Cell & Developmental Biology 17. pp. 433-42.
- **Mansilla, P., Pérez, R..1996.** El defoliador del eucalito *Gonipterus scutellatus*. Phytoma España, 81. pp. 36-42.
- **Marvaldi Adriana E., Lanteri Analia A. 2005.** “Key to higher taxa of South American weevils based on adult characters (Coleoptera, Curculionioidea). Revista chilena de historia natural 78.PP.65-87.
- **Myrick Andrew J., Baker Thomas C., 2011**, Chopper-stabilized gas chromatography-electroantennography: Part I. Background, signal processing and example. Biosensors and Bioelectronics 31(1).Elsevier. pp. 197-204.
- **Park Kye Chung, Ochieng Samuel A., Zhu Jungwei, Baker Thomas C., 2002**, Odor Discrimination using Insect Electroantennogram Responses from an Insect Antennal Array. Chemical Senses 27(4). Oxford Journals. pp. 343-52. DOI: 10.1093/chemse/27.4.343.
- **Park Kye Chung, Baker, Thomas C., 2002**, Improvement of signal-to-noise ratio in electroantennogram responses using multiple insect antennae. Journal of Insect Physiology 48.Pergamon. pp. 1139-45.
- **Picket John A., Birkett Michael A., Dewhirst Sarah Y., Logan James G., Omolo Maurice O., Torto Baldwyn, Pelletier Julien, Syed Zainulabeuddin, Leal Walter S. 2010.**Chemical Ecology of Animal and Human Pathogen Vectors in a Changing Global Climate. Journal of Chemical Ecology 36. Springer pp.113-21. DOI: 10.1007/s10886-010-9739-9.

- **Reis AR, Ferreira L, Tomé M, Araujo C, Branco M. 2012.** Efficiency of biological control of *Gonipterus platensis*(Coleoptera: Curculionida) by *Anaphesnitens* Hymenoptera: Mymaridae) in cold areas of the Iberian Peninsula: Implications for defoliation and wood production in *Eucalyptus globulus*. *Forest Ecology and Management* 270: 216–22;
- **Roelofs Wendell L., 1984,** Eletroantennogram Assays: Rapid and Convenient Screening Procedures. In: *Techniques in Pheromone Research*. Springer. pp. 131-59.
- **Slone D.H., Sullivan B.T.. 2007.** An automated Approach to detecting Signals in Eletroantennogram Data. *Journal of Chemical Ecology* 33(9).Springer. pp. 1748-62. DOI: 10.1007/s10886-007-9338-6.
- **Weissbecker Bernhard, HolighausGerrit, Schütz Stefan. 2004.** Gas chromatography with mass spectrometric and eletroantennographic detection: analysis of wood odorants by direct coupling of insect olfaction and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. Elsevier. pp.209-16.

## 2) Catálogos, Sites na Internet e Artigos de revista sem Autores explícitos:

- **Catálogo online da empresa**

**VWR:** ([https://us.vwr.com/store/catalog/product.jsp?product\\_id=4789442](https://us.vwr.com/store/catalog/product.jsp?product_id=4789442))

- **CORDIS RTD-NEWS European. 2006.** Communities, Gas Chromatography-eletroantennography finds key malarial medicine by examining body odours:

(<http://www.timeshighereducation.co.uk/news/gas-chromatography-electroantennography-finds-key-anti-malarial-medicine-by-examining-body-odours/204113.article>)

- **Datasheet INA 114- ampop** (<http://www.ti.com/lit/ds/symlink/ina114.pdf>)

- **Eletroantennography: a practical introduction (“Syntech” Manual):**

(<http://www.syntech.nl/manuals/EAGpract.pdf>)

- **LabVIEW SignalExpress Manual:** (<http://www.ni.com/pdf/manuals/373873a.pdf>)

- **La Voz de Galicia, Julho 2003.** Perspectivas de ataque del *Gonipterus* en las masas de Eucalito

- **Leak Free Microminiature Reference**

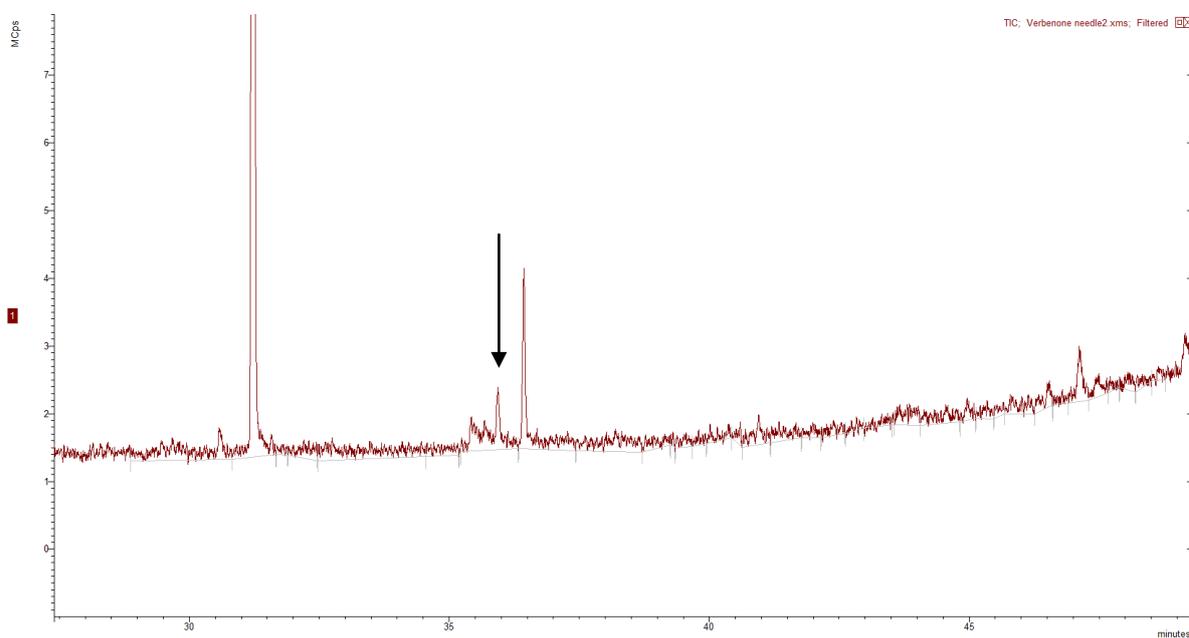
**Electrodes:** ([http://www.harvardapparatus.com/webapp/wcs/stores/servlet/haisku4\\_10001\\_11555\\_36810\\_-1\\_HAI\\_ProductDetail\\_N\\_37376\\_37392\\_37393\\_37394](http://www.harvardapparatus.com/webapp/wcs/stores/servlet/haisku4_10001_11555_36810_-1_HAI_ProductDetail_N_37376_37392_37393_37394))

- **Manual de Matlab** ([http://www.mathworks.com/help/pdf\\_doc/matlab/getstart.pdf](http://www.mathworks.com/help/pdf_doc/matlab/getstart.pdf))

- **(NI-Datasheet-ds-9)** (<http://sine.ni.com/ds/app/doc/p/id/ds-9/lang/pt>)

- **TracoPower\_TML15212** (<http://www.farnell.com/datasheets/1812089.pdf>)

## Anexos



**Anexo 1** - Representação do resultado do teste CG efetuado ao resultado da microextração de fase sólida da ponta da agulha da seringa para introdução do estímulo químico. A seta na figura indica o pico da verbonona detetado, revelando assim a presença de vestígios deste composto na agulha, provando assim a sua contaminação.