

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS
ESPECIALIZAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Joffer Piton Gonçalves

CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES ELÉTRICAS DO
CÓRTEX CEREBRAL POR ESPECTROSCÓPIA DE IMPEDÂNCIA
ELETROQUÍMICA E SUAS IMPLICAÇÕES

Belo Horizonte

2022

Joffer Piton Gonçalves

**CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES ELÉTRICAS DO
CÓRTEX POR ESPECTROSCÓPIA DE IMPEDÂNCIA
ELETROQUÍMICA E SUAS IMPLICAÇÕES**

Trabalho de Conclusão de Curso da Pós
Graduação em Neurociências, como
requisito parcial para obtenção do grau de
especialista em neurociências e suas
fronteiras.

Orientador: Prof. Jerome Baron

Belo Horizonte
2022

043

Gonçalves, Joffer Piton.

Caracterização das propriedades elétricas do córtex por espectroscopia de impedância eletroquímica e suas implicações [manuscrito] / Joffer Piton Gonçalves. – 2022.

57 f.: il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Jerome Baron.

Trabalho de Conclusão de Curso da Pós Graduação em Neurociências, como requisito parcial para obtenção do grau de especialista em neurociências e suas fronteiras.

1. Neurociências. 2. Espectroscopia Dielétrica. 3. Impedância Elétrica. 4. Córtex Cerebral. 5. Condutividade Elétrica. I. Baron, Jerome Paul Armand Laurent. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612.8



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE NEUROCIÊNCIAS E SUAS FRONTEIRAS

**ATA DE DEFESA DE MONOGRAFIA DO ALUNO
JOFFER PITON GONÇALVES**

Realizou-se, no dia 31 de janeiro de 2022, às 10:00 horas, Sala Virtual, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de monografia, intitulada CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES ELÉTRICAS DO CÓRTEX POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA E SUAS IMPLICAÇÕES, apresentada por JOFFER PITON GONÇALVES, número de registro 2018688914, graduado no curso de QUÍMICA, como requisito parcial para a obtenção do certificado de Especialista em NEUROCIÊNCIAS E SUAS FRONTEIRAS, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Jerome Paul Armand Laurent Baron - Orientador (UFMG), Prof(a). Tulio Matencio (UFMG), Prof(a). Danilo Barbosa Melges (UFMG), Prof(a). Theo Rolla Paula Mota (UFMG).

Belo Horizonte, 31 de janeiro de 2022.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Theo Rolla Paula Mota, Professor do Magistério Superior**, em 31/01/2022, às 15:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jerome Paul Armand Laurent Baron, Professor do Magistério Superior**, em 14/02/2022, às 16:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tulio Matencio, Membro de comissão**, em 14/02/2022, às 17:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Danilo Barbosa Melges, Professor do Magistério Superior**, em 15/02/2022, às 18:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1223504** e o código CRC **3BB65F44**.

RESUMO

As funções cerebrais emergem de processos eletroquímicos complexos gerados, propagados e integrados por células nervosas em múltiplas escalas espaciais e temporais. Diversas técnicas foram desenvolvidas para medir e caracterizar as propriedades desses processos eletroquímicos. Uma delas, a espectroscopia de impedância (EI), consiste em medir a impedância do tecido cerebral em resposta a perturbações aplicadas de corrente (ou voltagem) senoidal de pequena amplitude em várias frequências. O espectro de impedância resultante de tais medições pode ser analisado no domínio da frequência e correlacionado com modelos de circuitos elétricos equivalentes, fornecendo assim uma base quantitativa para avaliar diferentes tipos de mecanismos de propagação de sinais no cérebro. Após uma descrição das bases teóricas da EI, o presente trabalho de revisão bibliográfica analisa a contribuição dessa técnica no âmbito da neurociência. Em especial, a questão, ainda aberta, acerca do caráter resistivo da propagação extracelular das correntes elétricas no cérebro é discutido. A resolução dessa questão é particularmente importante em vista de suas amplas implicações para a interpretação de resultados obtidos por técnicas de registro eletrofisiológico baseado em potenciais de massa como a eletroencefalografia.

Palavras-chave: espectroscopia de impedância, tecido cerebral, impedância, dependência da frequência, condutividade do meio extracelular.

ABSTRACT

Brain functions emerge from complex electrochemical processes generated, propagated, and integrated by nerve cells at multiple spatial and temporal scales. Several techniques have been developed to measure and characterize the properties of these electrochemical processes. One of them, impedance spectroscopy (IE), consists of evaluating the impedance of brain tissue in response to applied disturbances of small amplitude sinusoidal current (or voltage) at various frequencies. The resulting impedance spectrum of such can be analyzed in the frequency domain and correlated with models of equivalent electrical circuits, thereby providing a quantitative basis for evaluating different types of signal propagation mechanisms in the brain. After a general description of the theoretical bases of IE, the present review analyzes the contribution of this technique in the field of neuroscience. In particular, the still open question about the resistive character of the extracellular propagation of electrical currents in the brain is discussed. Resolving this issue is particularly important in view of its broad causes for the interpretation of results obtained by electrophysiological recording techniques based on mass potentials such as electroencephalography.

Keywords: impedance spectroscopy, cortical tissue, impedance, frequency dependency, extracellular medium conductivity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação de correntes elétricas em uma seção cilíndrica.....	13
Figura 2 – Representação dos elementos básicos de um circuito elétrico.....	15
Figura 3 – Deslocamento de fase entre a corrente e a tensão em circuitos elétricos.....	17
Figura 4 – Circuito equivalente para uma célula biológica.....	18
Figura 5 – Diagrama de Nyquist e diagrama de Bode.....	22
Figura 6 – Modelos de impedância complexa equivalente para tecido biológico.....	26
Figura 7 – Circuito equivalente proposto por Fricke e Morse.....	27

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. OBJETIVOS	9
3. ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA.....	9
3.1. Fundamentos Teóricos da EI.....	10
3.2. Sistemas de Medidas.....	21
3.3. Breve Histórico do uso da EI em Tecidos Biológicos.....	24
3.4 O problema da Interface eletrodo-eletrólito.....	30
4. CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES ELÉTRICAS DO TECIDO CEREBRAL POR EI.....	36
4.1. Origem do fenômeno elétrico no cérebro.....	36
4.2. Medidas da impedância em cérebros.....	37
4.3. Fatores envolvidos no modo de propagação do sinal neural.....	38
5. DISCUSSÃO E PERSPECTIVA.....	41
6. CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS	45

1. INTRODUÇÃO

A Espectroscopia de Impedância Eletroquímica ou simplesmente Espectroscopia de Impedância (EI) é uma excelente técnica amplamente utilizada para a caracterização de propriedades elétricas fundamentais dos mais variados sistemas e processos eletroquímicos. Esse termo encerra ao mesmo tempo dois significados: determinar o espectro de impedância e o estudo sobre determinado sistema eletroquímico por meio de ferramentas próprias de análise dessa técnica. Os gráficos de espectroscopia remetem ao entendimento de estudos de absorção da radiação eletromagnética com relação à frequência, do mesmo modo, é o caso da EI onde os gráficos são de impedância com relação à frequência do sinal aplicado ou medido (Szekeres & Láng, 2021).

Ao longo das últimas décadas, essa técnica tem sido empregada com muito sucesso nas mais diversas áreas do conhecimento como a ciência dos materiais, a biologia e a medicina. Basicamente, a técnica de EI consiste em medir a impedância de determinado meio frente a resposta a uma aplicação de corrente (ou potencial) senoidal sob várias frequências.

O espectro de impedância derivado dessas medidas é então analisado no domínio da frequência e correlacionado com modelos de circuitos equivalentes constituídos de resistores, capacitores e/ou indutores, podendo ainda apresentar elementos mais complexos como a constante de fase e elementos difusionais - Impedância de Warburg (Bockris & Gamboa-Aldeco, 2000). Dessa forma, os parâmetros obtidos que se assemelham melhor aos modelos propostos podem ser apresentados em formalismos matemáticos, fornecendo assim uma descrição quantitativa e qualitativa dos mecanismos do fluxo de corrente do sistema sob estudo.

A membrana celular é um dos elementos básicos de todas as células de animais e de plantas, a sua complexa estrutura e organização lipídica em sua maioria produz uma variedade enorme de tipos e funções, definindo a grande multiplicidade de funções biológicas em sentido amplo. Como será visto adiante, essas estruturas apresentam algumas propriedades elétricas e, em geral, são consideradas a terem comportamento próximos a componentes lineares elétricos. Especialmente por causa disso, a EI pode e deve ser empregada por ser apropriada em análises lineares, fornecendo muitas informações sobre as estruturas e funções das membranas celulares (Eisenberg & Mathias, 1980). Nesse contexto, a membrana neuronal tem seu destaque funcional por produzir a característica de ser excitável gerando sinais, podendo assim, ser estimulada

eletricamente para ser estudada. Além disso, ela possui as características elétricas usuais, como por exemplo, fenômenos de capacitância.

Por sua vez, as funções cerebrais, resultantes de inúmeras atividades elétricas neuronais, manifestam-se por meio de complexos processos eletroquímicos gerados, propagados e integrados por essas células nervosas em suas múltiplas escalas espaciais e temporais. Dessa forma, importantes informações acerca das propriedades elétricas do tecido cerebral são obtidas pelas medidas de impedância, com grande relevância para o entendimento da biologia da propagação dos sinais elétricos pelo cérebro.

Nas múltiplas estruturas anatômicas cerebrais, as medidas de impedância possuem ampla variedade tanto na fisiologia como em patologias e têm sido alvo de extensivos estudos, principalmente, porque acredita-se na importância da impedância do ponto de vista de suas bases fisiológicas para o entendimento dos fenômenos do cérebro (Shalit & Mahler, 1966).

Uma vez que o meio extracelular possui propriedades ainda não totalmente esclarecidas, a EI ganha a sua importância na avaliação das propriedades na escala mesoscópicas, tendo em vista que não está completamente evidente se o tecido cortical cerebral possui características totalmente ôhmicas, assim como o de um resistor, ou, se os sinais sofrem atenuações dependentes da frequência (Logothetis, 2007).

Embora o uso da EI em sistemas biológicos já tenha sido utilizado desde o final do século XIX (McAdams & Jossinet, 1995), ainda há, em pesquisas no tecido cerebral muita controvérsia e discussão tanto com relação à melhor técnica a ser utilizada, quanto à questão de qual seria o melhor aparato experimental para se realizar a medida de impedância. Uma das grandes discussões nesse sentido é sobre o comportamento elétrico equivalente do meio neuronal cerebral, ou seja, na hipótese do tecido cerebral apresentar um meio puramente resistivo, ele não apresentará as propriedades de filtragem de sinais sendo a condutância do meio independente da frequência. Já no caso do meio ser não-ôhmico, deverá o sistema exibir propriedades complexas podendo ser estas capacitivas e/ou indutivas e, conseqüentemente, apresentaria a filtragem de sinais, o que impacta na análise dessa propagação pelo tecido cerebral.

Há pouco mais de 10 anos, Logothetis e colaboradores (2007) relataram um comportamento relativamente linear e espacialmente isotrópico do espectro de impedância do córtex de primatas. Por conseguinte, confirmou-se a suposição atual de que a propagação dos sinais elétricos dentro de redes corticais pode ser modelada como

um processo resistivo. Gomes e colaboradores (2016) concluíram que o comportamento não-ôhmico está presente no tecido neural.

Posteriormente, Barbour (2017) questionou a interpretação dos modelos propostos por Gomes, por ter representado incorretamente a impedância das membranas de dendritos, as quais apresentam uma configuração extremamente complexa, dificultando, portanto, a medição do sinal de impedância extracelular.

Assim, a resolução dessa questão ainda está em aberto na literatura e possui grande importância tendo em vista suas implicações para a interpretação de quaisquer resultados obtidos por estimulação elétrica ou por registro no córtex.

2. OBJETIVOS

Este trabalho visa apresentar alguns conceitos básicos e fundamentais da técnica chamada de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica aplicada na determinação de propriedades elétricas do cérebro e, mais especificamente, na medição da impedância do córtex cerebral, bem como o intuito de se obter outros parâmetros importantes para a análise de propagação de sinais no cérebro. Também, destina-se este trabalho a mostrar os aparatos experimentais comumente utilizados por esse método em córtex de animais *in vivo* e *in vitro*, onde serão discutidos artigos relevantes nessa área, considerando abordagens experimentais utilizadas, as suas limitações técnicas e as demais problemáticas concernentes ao assunto.

Abordaremos primeiramente aspectos fundamentais teóricos e experimentais da EI, para formar um arcabouço mínimo para a compreensão da importância e utilidade do emprego dessa ferramenta de estudo, com o propósito de se compreender mais profundamente a questão da propagação dos sinais elétricos gerados pelo cérebro, bem como suas propriedades de filtragem de sinais.

3. ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA

A EI é uma técnica capaz de mostrar importantes informações sobre o fluxo de corrente iônica em tecidos biológicos, por meio de propriedades elétricas lineares em

função da frequência, e se constitui em um método eficaz na determinação dessa corrente (Macdonald & Johnson, 2018).

As medidas de impedância obtidas em sistemas biológicos, seja em tecidos ou em uma suspensão de células, quando são provenientes de correntes injetadas fora das células, serão relativas àquele espaço extracelular que se está estudando. O resultado é uma corrente iônica que também pode fluir através da membrana celular, tanto pela propriedade capacitiva desta, quanto devido aos seus canais iônicos inscrustados na bicamada lipídica (Eisenberg & Rae, 1977; Falk & Fatt, 1964).

Nos tópicos que se seguem, serão mostrados alguns dos aspectos históricos da determinação da impedância em sistemas biológicos e, seguindo mais adiante, será apresentada uma breve parte teórica básica para melhor compreensão do emprego da EI no contexto do córtex cerebral.

3.1 Fundamentos Teóricos da Espectroscopia de Impedância em Tecidos Biológicos

A técnica da EI é uma ferramenta muito utilizada para a caracterização de propriedades elétricas de materiais e suas interfaces com os eletrodos, empregada para o estudo da dinâmica de ligação ou de movimentação de cargas em um meio ou na região de interface de um sólido ou líquido (Macdonald & Barsoukov, 2005).

Originalmente, o termo impedância foi denominado para descrever a resistência a corrente alteranada (CA) ou potencial alternado em sistemas elétricos (Sluyters-Rehbach, 1994). Em sistemas eletroquímicos o termo impedância $Z(\omega)$ foi escolhido para representar os sinais de CA de ondas senoidais (Yuan & Zhang, 2009). Existem outros tipos de forma de sinais como quadráticas e triangular, usualmente não são muito utilizadas nos experimentos de EI em cérebros.

A designação espectroscopia de impedância em correntes alternadas é empregada para descrever a técnica de mensuração de impedância de CA em circuitos elétricos e, quando ela é aplicada em sistemas eletroquímicos, usa-se normalmente o termo espectroscopia de impedância eletroquímica (Yuan & Zhang, 2009). Porém, usualmente, muitos trabalhos denominam apenas como EI.

Com relação aos comportamentos elétricos, os sistemas biológicos podem ser vistos como sistemas eletroquímicos extremamente complexos, os quais podem ser

analisados e estudados sob o ponto de vista elétrico com base em modelos de representações de componentes básicos de circuitos elétricos. Assim, para entender o papel da impedância em sistemas eletroquímicos de uma forma geral, primeiramente deve-se buscar o entendimento do comportamento desses sistemas elétricos elementares que correspondem aos componentes elétricos lineares passivos, são eles: o resistor, o capacitor e o indutor (Yuan & Zhang, 2009).

Então, neste primeiro momento, deve-se conceber esses elementos sob a ação de uma corrente contínua (CC) e, em seguida, no sistema de corrente alternada (AC), cujo objeto de interesse é o exposto por este trabalho, já que esse é o tipo de corrente utilizada na EI. Os sistemas elétricos em CC são aqueles em que os valores da corrente e da diferença de potencial permanecem constantes com o passar do tempo (Callegaro, 2012), como exemplo, temos as pilhas e as baterias (Luiz, 2009).

A resistência, que pode ser entendida como a dificuldade com que as cargas elétricas possuem quando passam através de determinado meio, é quantificada pela representação R que, conceitualmente, é dada pela razão v/i ou conforme pode ser visto pela Eq. 1 (Adiutori, 2002), onde a diferença de potencial v (dada em volts, V) e a corrente i (dada em amperes, A) apresentam uma linearidade, em outras palavras, são proporcionais. O elemento físico elétrico que representa a resistência em circuitos ou quando algum sistema apresenta comportamento igual é o resistor (Yuan & Zhang, 2009). A unidade de medida da resistência utilizada pelo Sistema Internacional (SI) de medidas é o ohm (símbolo Ω).

$$R = \frac{v}{i} \quad (1)$$

Na prática, ao aplicar uma diferença de potencial entre dois pontos em um sistema condutor e realizar a medida da corrente resultante desse potencial, obtêm-se a resistência daquele meio.

Outro modo de expressar quantitativamente a oposição ao fluxo de cargas elétricas num meio é por meio da chamada condutância G (unidade em siemens, S), que é o inverso da resistência (Yuan & Zhang, 2009). Assim, quando maior a condutância menor será a resistência que o meio apresenta em oposição ao fluxo de corrente e vice-versa.

O resistor é um elemento dissipativo dito passivo, pois quando percorrido por um fluxo de cargas elétricas dissipam boa parte de sua energia na forma de calor (Orazem &

Tribollet, 2019). Na prática, todo fluxo de cargas dissipam energia de alguma de suas formas (calor, ondas eletromagnéticas, etc.) e em algum grau de intensidade.

Outro conceito derivado da resistência é a resistividade ρ . Conceitualmente, é importante diferenciar os termos resistência (R) de resistividade (ρ): o primeiro, relaciona-se com a propriedade de um objeto e, o segundo, refere-se à uma propriedade do meio ou do material pelo qual há a passagem de corrente de cargas por ele (Halliday & Walker, 2013). Assim, podemos dizer que os termos resistência e impedância possuem o mesmo significado físico, porém, este último além da componente resistência apresenta a o componente reatância que será vista adiante.

A resistividade ρ de um material é definida pela Eq. 2, na qual, matematicamente, não se relaciona com a resistência R do meio e nem com a corrente de cargas, mas, tão somente, com campo elétrico E e a densidade de corrente J em módulo. Possui a unidade de ôhm-metro ($\Omega.m$) no SI (Halliday & Walker, 2013).

$$\rho = \frac{E}{J} \quad (2)$$

O ôhmetro-metro ($\Omega.m$) é a unidade de medida da resistividade ρ no SI. Utiliza-se na prática também a condutividade σ de um meio que é definida pelo inverso da resistividade ($\sigma = 1 / \rho$) e possui unidades de Siemens por metro ($S.m$)⁻¹ no SI. Em sistemas eletroquímicos a resistência iônica é, por vezes, expressada como condutividade iônica, sendo que, normalmente, a resistência elétrica é usada mais para meios condutores como os metais (Yuan & Zhang, 2009). Alguns trabalhos de impedância utilizam o termo resistência elétrica para se referir a resistividade (Logothetis, 2007).

Por ultimo, a Eq. 3 relaciona a resistência com a condutividade e as características físicas dimensionais do meio, sendo elas o comprimento (L) e a área seccional (A) por onde a corrente elétrica (ou iônica) flui (Halliday & Walker, 2013; Yuan & Zhang, 2009).

$$R = \rho \frac{L}{A} \quad (3)$$

Conceitualmente, a Eq. 3 é válida somente para meios homogêneos isotrópicos, onde a seção transversal seja uniforme, conforme exemplificado pela Fig. 3. Por meio da Eq. 3 é possível calcular a resistividade de um material. Por exemplo, no trabalho de

Logothetis e colaboradores (2007), foi utilizada essa equação em seus cálculos para se obter a condutividade do meio extracelular em cérebros de macacos primatas.



Figura 1 – Exemplo de representação de correntes de cargas elétricas (linhas pretas) que atravessam uma seção cilíndrica sob a ação de uma aplicação de diferença de potencial. A resistência em (a) por ter conetores menores em relação ao (b), apresenta maior resistência. *Adaptado de Halliday & Walker, 2013.*

Em sistemas eletroquímicos, existe um tipo de resistência que foi denominada de resistência de transferência de cargas sendo aquela em que representa a dificuldade de trocas de cargas no processo interfacial, devido a transferência de elétrons na interface eletrodo-eletrólito, o que pode ser decorrente da dependência da reação, da superfície do eletrodo e do potencial de eletrodo (Yuan & Zhang, 2009).

Geralmente, o símbolo utilizado para se designar a impedância é o Z , diferenciando-se do R , sendo X o termo resistência da parte complexa da impedância.

Outro importante elemento elétrico cujo comportamento igual é encontrado nas membranas celulares é o capacitor que, basicamente, apresenta a propriedade de acúmulo de cargas elétricas (q) em seu interior, capaz de atuar como um armazenador de energia na forma elétrica. O seu comportamento segue a relação dada pela Eq. 4 (Yuan & Zhang, 2009). Estruturalmente, um capacitor consiste em duas placas condutoras de eletricidade que são separadas por um material dielétrico (não conduz corrente elétrica).

$$C = \frac{q}{v} \quad (4)$$

A unidade de capacitância é dada em Faraday (F) no SI, sendo v a diferença de potencial (Orazem & Tribollet, 2019).

O funcionamento básico de um capacitor é dado quando se aplica uma diferença de potencial entre suas placas, ocorrendo o acúmulo de cargas nessas placas formando assim um circuito aberto (não há passagem de corrente). Retirando-se o potencial, as

placas mantém as cargas devido ao campo elétrico resultante do acúmulo de cargas opostas e, ao se conectar novamente no sistema, pode haver o descarregamento elétrico dessas cargas no circuito gerando o fluxo de corrente de cargas (Halliday & Walker, 2013; Orazem & Tribollet, 2019; Yuan & Zhang, 2009).

Por outro lado, um indutor, assim como um capacitor, é também um elemento que armazena energia, porém, diferentemente do capacitor, ele o faz na forma de energia magnética. É constituído basicamente por uma espiral de metal que o fluxo de cargas elétricas percorre. O fluxo magnético em um indutor é dado por meio da Eq. 5 e a unidade da indutância L é o Henry (H) no SI (Orazem & Tribollet, 2019).

$$\Phi = Li \quad (5)$$

Os elementos elétricos básicos de circuitos elétricos apresentados acima são geralmente representados de acordo como mostrado na Fig. 4. Como será visto, esses mesmos elementos são utilizados para representar um circuito elétrico equivalente que representa o comportamento elétrico do tecido biológico que se estuda.

Um sistema elétrico por onde percorre a corrente alternada (CA) é aquele onde há o uso de corrente ou diferença de potencial alternado com valor variando de forma periódica com o passar do tempo (Yuan & Zhang, 2009). Um bom exemplo é a corrente senoidal que apresenta seu comportamento descrito por uma senóide.

Para que um sistema eletroquímico seja dito como linear no qual uma corrente ou potencial senoidal de baixa amplitude o perturba é dito linear se apenas os termos de primeira ordem da equação da expansão de Taylor são considerados, visto que essa expansão em outras ordens descreve correntes e potenciais não lineares, não sendo objeto de interesse deste estudo (Sluyters-Rehbach, 1994). Além disso, uma grande diversidade de processos eletroquímicos pode contribuir para a relação corrente-potencial e, dessa forma, para a impedância total do sistema (Sluyters-Rehbach, 1994).

Na experimentação da EI, a aplicação de CA é vista como um sinal de entrada, onde mede-se a resposta (saída) após a aplicação do sinal. Há diferentes tipos de sinais, porém, para as medidas em tecidos neurais usualmente é comum utilizar uma corrente do tipo senoidal $I(t) = I_m \cos(\omega t + \theta)$, no qual $I(t)$ é a corrente instantânea no tempo t , o I_m é a amplitude máxima do sinal, θ o ângulo de fase e o ω é a frequência angular (rad.s^{-1}) com valor igual a $2\pi f$ (Macdonald & Barsoukov, 2005; Yuan & Zhang, 2009). É importante ressaltar a diferença entre a frequência (f) e frequência angular (ω), sendo a

primeira dada em hertz (Hz) correspondendo ao número de ciclos de onda por segundo e a segunda, dada geralmente em radianos por segundo.



Figura 2 – Representação dos elementos básicos de um circuito elétrico. Na sequência da direita pra esquerda: um resistor (R), um capacitor (C) e um indutor (L).

Um aspecto importante nos cálculos que envolvem a corrente alternada na EI é a utilização de números complexos, devido à facilidade que estes apresentam na análise e manipulação numérica dos dados provenientes da EI.

Os resistores em CA se comportam segundo a Eq. 6, sendo V_r e I_r o potencial e a corrente, respectivamente, onde são variáveis segundo a função temporal senoidal; θ é o ângulo de fase. Destaca-se que ambas a diferença de potencial e a corrente possuem a mesma frequência e ângulo de fase (Yuan & Zhang, 2009).

$$I_R(t) = \frac{V_R}{R} = \frac{V_m}{R} \sin(2\pi ft + \theta) \quad (6)$$

Para um capacitor submetido a uma corrente senoidal ocorre um ângulo de fase de 90° entre a corrente I_c e o potencial V_c no capacitor, cuja relação pode ser escrita na forma da Eq. 7, onde C é a capacitância e a parte diferencial é a variação do potencial ao longo do tempo (Yuan & Zhang, 2009).

Uma das soluções da equação diferencial acima, conduz-nos a equação que calcula a impedância capacitiva num sistema de corrente alternada, Eq. 8.

$$I_c(t) = C \frac{dV_c(t)}{dt} \quad (7)$$

$$Z_c = \frac{1}{j\omega C} \quad (8)$$

Devido ao ângulo de fase no capacitor ser 90° entre a corrente e a diferença de potencial, diz-se que a corrente está adiantada do potencial em 90° , como mostrado pela Fig. 5b.

Já no indutor sob a aplicação de CA ocorre o comportamento de modo inverso, isto é, ele apresentará também um ângulo de fase de 90° , contudo, o potencial atrasa a corrente por 90° Fig. 5c (em inglês, “*the voltage lags the current*”). A relação que expressa o comportamento de um indutor em um circuito é dada pela Eq. (9), onde ω é a frequência angular e L é a indutância dada em Henry (H) no SI e, assim como na capacitância, uma das soluções da eq. 9 pode ser expressada por meio da Eq. 10 (Yuan & Zhang, 2009).

Essas duas relações tem grande importância na análise dos comportamentos elétricos dos sistemas biológicos, pois permite verificar qual a predominância de componentes se apresenta, que no caso pode ser capacitiva ou indutiva.

$$V_L(t) = L \frac{dI_L(t)}{dt} \quad (9)$$

$$Z_L = j\omega L \quad (10)$$

Como explicado acima, quando uma corrente ou potencial alternado é aplicado sobre um capacitor ou um indutor, diferentes comportamentos da onda senoidal ocorrem sendo esse fenômeno denominado de deslocamento ou mudança de fase. Como pode ser visto pela Fig. 5, em elementos resistivos (a) o potencial e a corrente estão em fase, enquanto que para os sistemas capacitivos e indutivos ocorre o deslocamento de fase. Nestes dois últimos dispositivos, naturalmente ocorre também a dificuldade à passagem de cargas elétricas, porém, diz-se que eles possuem impedância e não uma resistência. Assim, em um circuito elétrico ou em um modelo representado por ele, não se deve somar diretamente a resistência e a impedância (Dunn, 2013).

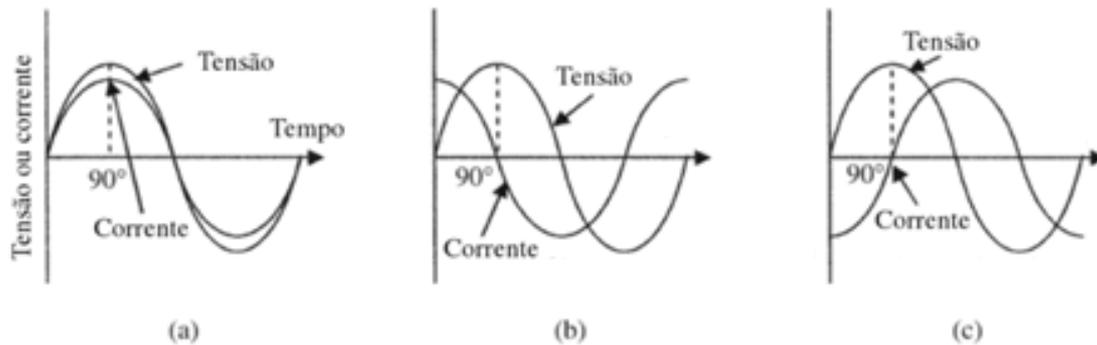


Figura 3 – Deslocamento de fase entre a corrente e a tensão em circuitos elétricos: (a) resistor, (b) capacitor e (c) indutor. *Adaptado de Dunn (2013).*

Nos estudos de propriedades elétricas de tecidos biológicos, em geral, o modelo de circuito elétrico equivalente é bem utilizado para as análises de dados de impedância. Esse modelo descreve um sistema eletroquímico no sentido de como se combinam os elementos básicos elétricos como o resistor, capacitor e/ou indutor, de maneira que esse circuito elétrico equivalente seja montado, sempre a partir dos dados. É possível, também, descrever, por meio de circuitos elétricos, outros fenômenos que não ocorrem num circuito usual elétrico como por exemplo, a difusão de Warburg. Esse modelo significa que, para determinado sistema eletroquímico, o circuito equivalente representa a mesma resposta ou, ao menos, bem aproximada quando tal sistema é submetido ao mesmo tipo de sinal elétrico (Yuan & Zhang, 2009).

Cada elemento do circuito equivalente possui determinado comportamento de impedância e o modelo resultante que pode ser parcialmente ou totalmente empírico, levando em consideração as interconexões entre eles, ou seja, sua combinação em série ou em paralelo (Yuan & Zhang, 2009). Além disso, essa representação tem o objetivo de atribuir um significado físico àquelas medidas de impedância.

De modo geral, o comportamento de grande parte dos sistemas biológicos possui predominância não-linear e não se pode utilizar todas as diversidades da técnica da EI, por esta ser essencialmente linear. No entanto, especial caso se faz com relação à bioeletricidade de células e tecidos, a membrana celular e sua intrínseca capacitância se apresentam ambas com características lineares. Então, nesse sentido, a EI ganha grande espaço na determinação de propriedades da capacitância de membrana para determinação das características elétrica da estruturas biológicas já mencionadas (Eisenberg & Mathias, 1980).

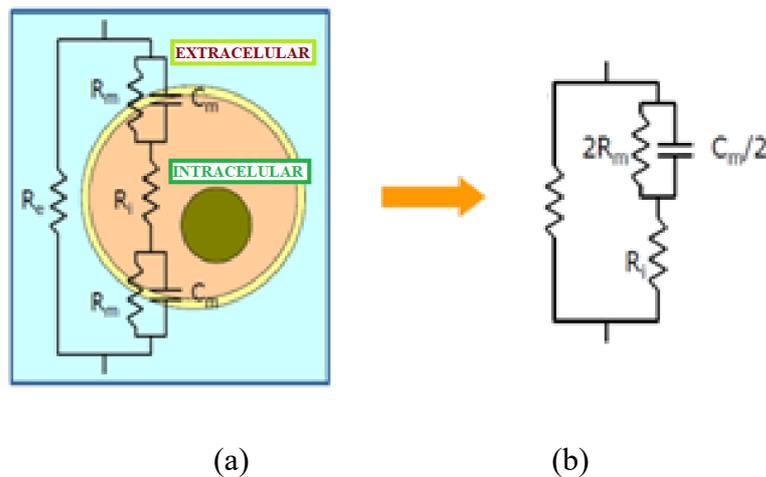


Figura 4 – Exemplo de circuito equivalente para uma célula biológica. Em (a) representação de todos os elementos elétricos e, em (b), o modelo equivalente elétrico simplificado. Ambos circuitos apresentados em (a) e (b) possuem comportamentos elétricos iguais. *Adaptado de (Batra & Kapoor, 2015).*

A partir disso, então, por meio de processos físicos e de engenhosos cálculos matemáticos ou, ainda, utilizando-se de *softwares*, o modelo de circuito elétrico equivalente é alcançado e poderá representar o comportamento elétrico de determinado tecido biológico nas circunstâncias experimentais estudadas (Batra & Kapoor, 2015).⁷

Como pode ser visto pela Fig. 6, o modelo de circuito elétrico equivalente pode representar o comportamento elétrico de uma célula do mesmo modo como é utilizado nos circuitos elétricos em engenharia elétrica. Baseado nisso, constroem-se circuitos elétricos para tecidos biológicos (constituídos de várias células) reduzindo-os a circuitos equivalentes que representem o comportamento elétrico total daquele sistema em particular. Nesse modelo da Fig. 6, podemos ver que se uma corrente for aplicada neste meio extracelular, as cargas poderão fluir por três caminhos: ao redor da célula ou através de canais iônicos (Batra & Kapoor, 2015).

Para representar um sistema eletroquímico ou um sistema biológico, o circuito equivalente deve ser o mais simples possível e demonstrar grande equivalência dos dados com o modelo de impedância (Yuan & Zhang, 2009).

O resistor representa a resistência do material analisado e, nesse caso, portanto, a resistência do meio biológico, o qual significa que é a parte condutiva de cargas que no

caso de tecidos neurais são íons. Em tais circuitos, os capacitores e indutores podem estar associados às regiões de polarização ou adsorção. Esses circuitos equivalentes são essenciais para a interpretação física da distribuição dos elementos e para o entendimento da maioria dos espectros de impedância (Macdonald & Barsoukov, 2005).

De modo geral, os sistemas eletroquímicos não exibem comportamentos simplesmente resistivos, eles possuem complexidades muito maiores como, por exemplo, a capacitância gerada devido à dupla camada ou mesmo os processos difusos, ambos fenômenos dependentes da frequência.

Uma das abordagens mais comuns do uso da EI, incluindo em sistemas biológicos, é a análise da amplitude e do ângulo de fase em função da frequência, o que resulta na medida da impedância propriamente dita. Por meio da EI, podemos estudar toda propriedade intrínseca do eletrodo/material que interfere na condutividade total do sistema. Tais propriedades podem ser divididas em duas partes: as que pertencem ao material em si, como a constante dielétrica, condutividade, mobilidade de cargas; e, aquelas devido à interface eletrodo-material como fenômeno de adsorção, capacitância da dupla-camada e coeficientes de difusão (Macdonald & Barsoukov, 2005).

Dentre a diversidade de técnicas eletroquímicas, a EI possui grande destaque, pois, enquanto os demais métodos apresentam as medidas de corrente ou cargas elétricas como função do tempo, a EI exhibe o sinal como função da frequência de a tensão (ou corrente) alternada e, por conseguinte, esses estudos são realizados no domínio da frequência (Srinivasan, 2006).

Na EI um sinal $v(t)$ na forma senoidal é aplicado no sistema em estudo, resultando na injeção de corrente estável $I(t) = I_m \cos(\omega t + \theta)$, que também é senoidal. Para sistemas puramente resistivos, o θ é igual a zero e, portanto, o potencial e a corrente estão em fase.

A impedância $Z(\omega)$ que varia com a frequência ω é uma variável complexa. Importante notar que o valor encontrado corresponde a impedância do circuito elétrico para cada frequência do sinal aplicado (Macdonald & Barsoukov, 2005). O chamado espectro de impedância, então, é o resultado final das medidas de impedância do sistema estudado em questão em função da frequência. Na literatura, existem diversos outros modos de se empregar as técnicas de impedância eletroquímica, alguns desses são: Voltametria de Corrente Alternada (usa-se o inverso da impedância chamado de admitância), Impedância Operacional e Polarografia de Corrente Alternada (Sluyters-Rehbach, 1994).

A definição formal de impedância envolve o conceito utilizado pela lei de Ohm, que é a relação do potencial pela corrente de um determinado sistema e também mostra o grau de dificuldade que o fluxo de cargas apresenta em resposta a determinado potencial (Yuan & Zhang, 2009). Porém, como já visto, nos cálculos de impedância são utilizados os números complexos na resolução de circuitos sob AC, pois basicamente é uma ferramenta facilitadora quando da manipulação dos dados para análises. A representação de um número complexo é geralmente descrita como na Eq. 11, em que Z é a impedância total do sistema, Z_r é a parte real representando o componente resistivo e Z_{im} é a parte imaginária, também chamada de reatância (Yuan & Zhang, 2009).

$$Z = Z_r + jZ_{im} \quad (11)$$

É comum o emprego das letras Z e Y nas literaturas de eletroquímica, referindo-se, respectivamente, a impedância e admitância do sistema analisado por unidade de área da interface, ou seja, as unidades de Z e Y , neste caso, são dadas respectivamente por $\Omega \cdot m^{-2}$ e $S \cdot m^{-2}$ (Sluyters-Rehbach, 1994).

O componente Z muitas vezes é expressado por $Z = |Z|(\cos \theta + j \sin \theta)$ que é a sua forma polar, onde $|Z|$ é a magnitude da impedância (Yuan & Zhang, 2009). O ângulo de Z é dado por $\arctg Z_{im}/Z_r = \theta$. Convém mencionar que a IUPAC convencionou que o símbolo “ i ” ($\sqrt{-1}$), que é utilizado nos cálculos de números complexos, deve ser substituído pelo símbolo “ j ”, uma vez que o “ i ” é usado para representar a densidade de corrente na engenharia elétrica.

Para os métodos de representação gráfica da impedância, dois modos foram desenvolvidos por A. E. Kennelly e, principalmente, por C. P. Steinmetz, que são os diagramas de vetores e a representação no plano complexo (Macdonald & Barsoukov, 2005).

Os modos como são apresentados os dados de impedância em seus diferentes formatos enfatizam determinado comportamento do sistema em estudo. Nesse sentido, por exemplo, a forma admitância descreve melhor o comportamento capacitivo para altas frequências em sistemas no estado sólido, já a capacitância complexa é usada para estudos de sistemas dielétricos. De forma semelhante, o tipo de representação de dados de impedância tem seu uso direcionado para determinados métodos gráficos, com a finalidade de melhor visualizar e interpretar os dados para certo sistema em estudo. Fundamentalmente, dois tipos de gráficos são os mais usados dentro dos estudos de

impedância em cérebro, são eles: o *diagrama de Nyquist* (ou plano de impedância complexa) e o *diagrama de Bode* (Orazem & Tribollet, 2019).

As representações gráficas por Nyquist e diagrama de Bode são normalmente as mais empregadas em sistemas eletroquímicos e ambos representam a impedância do sistema em função da frequência (Yuan & Zhang, 2009). Como essas duas formas de visualização dos dados são as mais utilizadas em análises das medidas de impedância no tecido neural, será dado enfoque apenas nesses dois tipos de gráficos.

3.2 Sistemas de medidas

Um gráfico no plano complexo em sua forma polar é um diagrama de Nyquist e representa a resposta de frequência de um sistema (Atkins & Escudier, 2013). O diagrama de Nyquist (Fig. 7a) é uma das formas mais comuns e utilizadas de representação gráfica de dados de impedância, que compreende traçar o Z_{im} contra Z_r na frequência angular utilizada (Sluyters-Rehbach, 1994). Foi introduzido em 1932 por Nyquist, o qual em sua abordagem clássica refere-se a aplicação em determinado sistema de um sinal de entrada senoidal sob diferentes frequências, mede-se então o sinal de saída (Bavafa-Toosi, 2017; Choudhury, 2005). No caso de sistemas eletroquímicos que podem apontar intrinsecamente comportamentos capacitivos, o Z_{im} possui sinal negativo e, para evitar confusões na análise dos dados, emprega-se o uso de $-Z_{im}$ (sinal negativo) no eixo das ordenadas (Sluyters-Rehbach, 1994).

No diagrama de Nyquist, cada ponto no gráfico representa as partes reais e imaginárias da impedância a diferentes frequências ω (Yuan & Zhang, 2009). Os gráficos de diagrama de Bode são apresentados de duas formas: $\log |Z|$ versus $\log \omega$ (ou $|Z|$ versus $\log \omega$) e θ contra o $\log \omega$ (Fig. 7b), ou seja, descreve a dependência do módulo e da fase em relação a frequência, respectivamente. Um diagrama de impedância no plano complexo pode revelar a natureza daqueles elementos elétricos envolvidos, isto é, se é análogo a um capacitor, um resistor, etc (Sluyters-Rehbach, 1994).

Pela forma como os pontos se apresentam no plano complexo se apresentam facilita-se o reconhecimento de mecanismos ou determinado fenômeno que governa o sistema investigado. Por exemplo, a Fig.7a mostra um semicírculo correspondendo ao comportamento do circuito mostrado (Orazem & Tribollet, 2019).

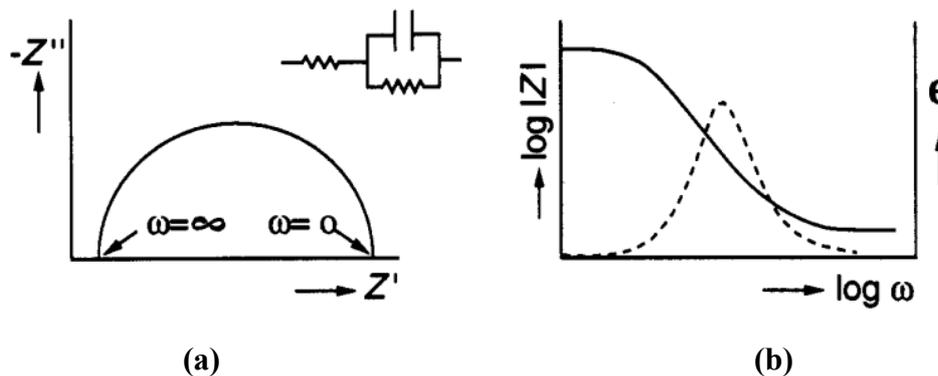


Figura 5 – Representação gráfica de dados de impedância: em (a) o diagrama do Nyquist e (b) o diagrama de Bode.

Neste tipo de visualização gráfica dos dados, cada ponto corresponde a uma medida diferente da impedância em uma determinada frequência, mas essa dependência não fica evidente neste tipo de gráfico, o que pode ser parcialmente resolvido classificando no próprio gráfico algumas frequências importantes para melhor compreensão do fenômeno. Outra particularidade negativa desse gráfico é a de ofuscar a dependência da frequência para valores baixos de impedância, ocasionando a ocultação de grandes diferenças na análise da frequência e a conseqüente concordância entre modelos e dados experimentais (Orazem & Tribollet, 2019).

Um gráfico de Bode (do inglês “Bode Plot”) é um método de análise de resposta em frequência muito bem empregado para grandes faixas de frequências (Fig. 7b) que corresponde basicamente a dois tipos de gráficos: o gráfico de magnitude $|H(\omega)|$ versus a frequência angular ω , o qual é denominado de *diagrama de magnitude* ou *módulo* (no inglês, “*magnitude plot*”); e, o gráfico de *ângulo de fase* θ versus ω , denominado de *diagrama de ângulo de fase* (no inglês, “*phase angle plot*”). Encontra-se também as nomenclaturas *diagrama de ganho* (no inglês, “*gain plot*”) e o *diagrama de fase* (no inglês, “*phase plot*”). Nesses gráficos a frequência pode variar de um valor acima de zero até o infinito. Para poder dispor valores elevados de frequência e magnitude, a $|H(\omega)|$ é expressada pelo valor em decibel (db) como $20 \cdot \log |H(\omega)|$ dB e a frequência como $\log \omega$, pois devido às grandes variações na magnitude e frequência a disposição dos dados ficaria prejudicada em uma escala linear.

Alguns autores utilizam, no mesmo gráfico, ambos os eixos de magnitude e ângulo de fase, podendo ambos os termos estarem no eixo-y das ordenadas ou, frequentemente encontrado, em um outro eixo paralelo a este, porém, do lado direito do gráfico, assim

como o apresentado pela Fig. 7b. No eixo-x das abscissas, a frequência deve estar em escala logarítmica ($\log \omega$), enquanto o eixo-y em escala linear (Godse & Bakshi, 2009).

O diagrama de Bode foi delineado pelo cientista H.W. Bode e consiste um dos fundamentos de qualquer análise de resposta em frequência de um sistema (Godse & Bakshi, 2009). Duas vantagens desse tipo de gráficos são substituição da multiplicação e divisão por adição e subtração quando se usa logaritmo, respectivamente, e, a capacidade de mostrar as características do sistema tanto para baixas como para altas frequências em um mesmo diagrama (Bakshi, U. A., & Bakshi, A. V. (2008). *Electrical Networks*. Technical Publications).

Uma das vantagens de se utilizar o diagrama de Bode é o fato dele poder indicar a quantidade de elementos elétricos separadamente na aplicação de um circuito equivalente, formando a impedância total (Sluyters-Rehbach, 1994). No diagrama de Bode, como são usadas as escalas logarítmicas, estas viabilizam uma facilidade na visualização da dependência da frequência de outras informações advindas de medidas de impedância, como por exemplo, diferentemente do plano complexo, comportamentos importantes podem ser vistos à baixa frequência.

Em alguns trabalhos, encontra-se o termo *medida da impedância específica* diferenciando-se *da medida de impedância*, pois aquela é considerada como absolutamente calibrada onde os dados são relacionados com a natureza do tecido, são considerados, por exemplo, aspectos como a configuração e a polarização dos eletrodos, as formas de onda aplicadas e a instrumentação (Robillard & Poussart, 1977). Na prática, isso significa que o sistema de medidas, isto é, todo o conjunto experimental como eletrodos, cabos, solução, aparelhos de medidas, etc., devem ser muito bem controlados e mensurados antes de se realizar as medidas nos sistemas biológicos.

Com relação à frequência aplicada, cada sistema biológico pode requerer uma técnica específica e ajustes de parâmetros experimentais mais adequados para aplicação no meio biológico, a frequência é um dos principais parâmetros que devem ser considerado (Schwan, 2013). Assim, por exemplo, dependendo da frequência de injeção da corrente o fluxo de cargas pode direcionar-se ou mesmo atravessar diferentes partes do tecido biológico (Gersing, 1998).

Em se tratando de estudos da determinação das características elétricas do meio biológico, é importante também destacar dois fenômenos bem relevantes: a dispersão e o efeito de relaxamento. Ambos são aspectos dependentes da frequência de injeção de corrente. Quando a frequência varia, existem regiões de frequência em que o valor da

constante dielétrica e da condutividade do meio apresenta linearidade, a isso denomina-se de dispersão.

Segundo McIntyre e Grill (2001), as correntes geradas pelos eletrodos seguem a lei de Ohm e, dessa forma, pode-se negligenciar os fenômenos indutivos, magnéticos e os efeitos resultantes da propagação dos sinais bioelétricos no meio extracelular, para uma faixa de frequências entre 0 até cerca de 5 kHz (Robinson, 1968). Isso resulta em uma simplificação dos cálculos de densidade de corrente e potenciais gerados pelos eletrodos.

3.3 Breve Histórico da Impedância em Tecidos Biológicos

Nesta seção, serão expostas algumas noções históricas do uso da EI em sistemas biológicos, principalmente em tecidos, com a finalidade de evidenciar de forma sucinta a construção desse conhecimento ao longo dos anos desde o seu surgimento. Contudo, esta abordagem não intenciona apresentar de forma estritamente rigorosa a cronologia da totalidade dos fatos. Ressalta-se que o enfoque nos estudos em tecidos biológicos se devem porque o tema EI é muito vasto e abrange muitas áreas do conhecimento. Ademais, os conceitos ora apresentados tais como a dupla camada e o efeito de capacitância decorrente desta serão explicitados posteriormente com maior clareza.

Embora sejam consideradas medidas relativas, as primeiras mensurações de impedância não complexa podem ser atribuídas a Georg Simon Ohm (1788-1854), as quais foram realizadas em sistemas de corrente contínua (CC). Nessa época, nem sequer havia ainda a definição de unidade de resistência (ou impedância) em Ohms (Hall, 1992). As medidas de propriedades elétricas de eletrólitos começaram sem sucesso, no período logo após a Lei de Ohm (1827), porque a questão da polarização do eletrodo foi um relevante obstáculo para o desenvolvimento da técnica de mensuração de correntes iônicas.

O primeiro cientista a propor a existência e um modelo de uma dupla camada de cargas (iônicas) existente na interface eletrodo-eletrólito foi realizado por Helmholtz em 1879. Posteriormente, com o uso de correntes alternadas por Kohlrausch em 1869, uma parte dos problemas de polarização foram superadas, permitindo assim medidas de condutância eletrolítica muito mais precisas (Hall, 1992).

A chamada Espectroscopia de Impedância Eletroquímica teve seu verdadeiro início por meio dos extraordinários trabalhos do engenheiro elétrico Oliver Heaviside, por volta dos anos 1880, cujos estudos iniciais foram sobre a Teoria de Sistemas Lineares.

Ele foi considerado por alguns como o mais brilhante matemático de seu tempo. Foi esse brilhante engenheiro o responsável também por introduzir os termos “impedância”, “capacitância” e “indutância”, além da notação da impedância complexa (Hall, 1992).

Outro aspecto importante com relação à polarização dos eletrodos foi mostrado por Wien em 1896, o qual representou o sistema eletrodo-eletrólito como uma combinação de resistência e capacitância (Z), mostrando que ambos possuem a dependência da frequência com seus valores diminuídos quando aumenta-se a frequência do sinal (McAdams & Jossinet, 1995).

Em 1899, o físico alemão Emil Warburg publicou trabalhos de extenso valor relacionando o conceito de impedância de sistemas eletroquímicos, descrevendo então a impedância difusional. Nessa época, a técnicas de impedância era muito pouco utilizadas e foi somente no século 20 que elas se popularizou nos mais variados sistemas. O motivo principal para isso foi devido à invenção do potenciostato eletrônico, por volta de 1940.

Warburg, pautado nos efeitos da difusão na interface eletrólito-eletródo, encontrou a relação C_{pol} proporcional a $f^{-0,5}$ (frequência do sinal aplicado), onde C_{pol} é a capacitância devido à polarização no eletrodo. Contudo, essa teoria funcionava apenas para eletrodos de platina, um metal inerte. A confirmação da teoria de Warburg foi dada por Wolf (1926), onde a capacitância de polarização para frequências maiores que 20 kHz foi proporcional a $f^{-0,5}$. Não obstante, ele encontrou também a proporcionalidade de $f^{-0,3}$ na faixa de 10 kHz a 200 kHz, sugerindo a equação $C_{pol} = C_0 f^{-m}$ (C_0 e m são constantes) para a capacitância de polarização.

Na área da bioimpedância, Hoerber foi o primeiro cientista a empregar a técnica de EI comparando a condutividade elétrica de eritrócitos em baixas e altas frequências (Schwan, 1999). Todavia, o início de trabalhos de impedância especificamente sobre células em suspensão e em tecidos biológicos deu um salto somente após a invenção da Ponte de Wheatstone (Hall, 1992).

Outro importante cientista foi Fricke (1932), que discutiu a similaridade desta polarização em tecidos de seres vivos quando uma corrente elétrica passa através de substratos biológicos, estabelecendo uma dependência da frequência muito semelhante aos examinados nos eletrodos de metal.

Onaral e Schwan (1982) observaram que a impedância em uma solução de NaCl (0,9%) em eletrodos de platina, formava um arco semicircular para frequências abaixo de 10 mHz, quando a representação gráfica do comportamento do sistema. Além disto, eles

preconizaram a representação da impedância pelo circuito Z_{CPA} (CPA - ângulo de fase constante) em paralelo com a resistência (Figura 1).

Em 1940, Cole propôs um modelo matemático empírico capaz de descrever a impedância complexa em alguns tecidos biológicos, utilizando para isso os modelos de circuitos elétricos equivalentes. Esse feito foi de enorme contribuição para se realizar uma descrição analítica quantitativa de impedância em meios biológicos.

Mais recentemente, McAdams (1987) estabeleceu que a impedância no Z_{CPA} (Fig. 1) seria decorrente da rugosidade dos eletrodos e a existência de efeitos específicos de adsorção. Esse cientista estabeleceu que o fenômeno da resistência em paralelo devia-se ao processo de transferência de carga Faradaica (fluxo de corrente resultante de reações químicas na superfície do eletrodo, onde há transferência de cargas).

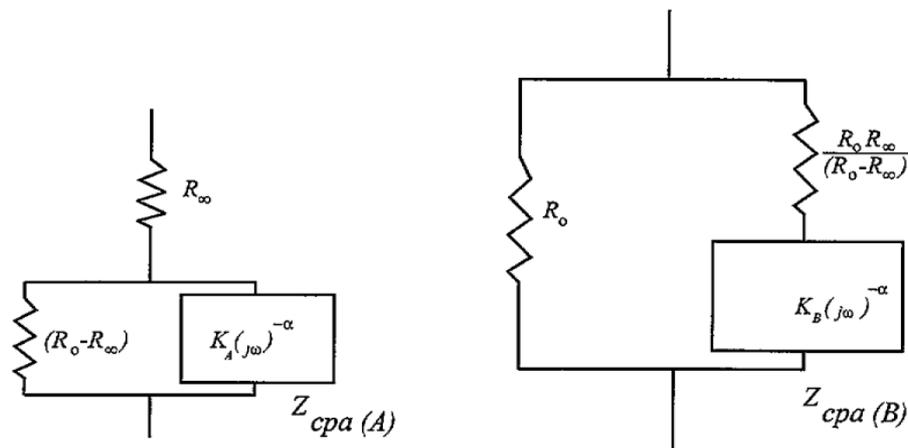


Figura 6 - Dois modelos de impedância complexa equivalentes em correntes alternadas descrevendo determinado tecido biológico. *Adaptado de McAdams & Jossinet (1995).*

O médico alemão Rudolf Höber (1910, 1912, 1913) realizou uma série de medidas de impedância sob um amplo espectro de frequências em células vermelhas do sangue (hemácias), encontrando valores acima de $1000 \Omega\text{cm}$ para baixas frequências (em torno de 10 Hz) e $200 \Omega\text{cm}$ para altas (1 kHz). Esses resultados são semelhantes ao medido em uma solução de NaCl a 0,4%

Höber, então, hemolisou essas células e realizou novamente as medidas de impedância. Contudo, os valores da resistividade não eram mais dependentes da frequência, pois apresentavam o mesmo valor baixo daqueles medidos em altas frequências. Assim, concluiu que a resistividade medida em altas frequências era uma

medida no interior da célula, enquanto que a baixas frequências, em células intactas, a alta resistência era devido à presença da membrana celular.

Fricke e Morse (1925) realizaram medidas em ampla faixa de frequência de suspensão de células vermelhas do sangue e encontraram dados que poderiam sugerir circuitos semelhantes ao da Fig. 2. Concluíram que a transição entre baixas e altas frequências era resultado do comportamento capacitivo das membranas. Em medidas de baixas frequências, as correntes passariam por entre os corpúsculos, cujas membranas celulares apresentam alta reatância, mas a impedância total apresenta-se relativamente alta. Já em altas frequências a reatância seria baixa, como resultado correntes fluiriam através da membrana e a resistência limite seria devido aos fluidos intracelulares.

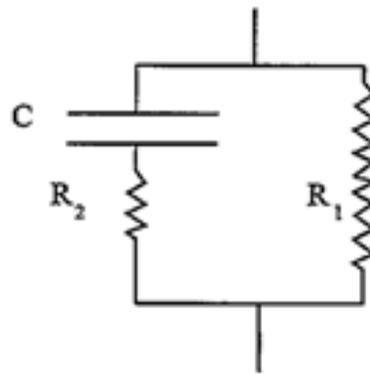


Figura 7 - Circuito equivalente proposto por Fricke e Morse em 1925, para representar o comportamento elétrico sob várias frequências de corrente em células vermelhas do sangue. *Adaptado de McAdams & Jossinet (1995).*

Embora o resultado encontrado por Fricke, bem como seu modelo de frequência puramente capacitivo em células vermelhas do sangue tenha sido de grande relevância, ainda não explicava o comportamento de outros tecidos.

Cole (1928) prosseguiu com o trabalho de Fricke sobre as células em suspensão abrangendo os sistemas onde a impedância da membrana variasse com a frequência. Desse modo, Fricke foi capaz de estabelecer uma relação entre o ângulo de fase e o quanto a frequência é dependente da impedância da membrana e, assim, foi a primeira vez que as propriedades elétricas de tecidos biológicos eram apresentados em um plano complexo.

Fricke (1931) percebendo o fenômeno da dependência da frequência em tecidos biológicos, estudou esse comportamento em músculos de coelhos o qual encontrou um valor constante do produto I/RC independente da frequência, cujo modelo da impedância

da membrana poderia ser representado pelo modelo de capacitor e resistor dependente da frequência. Nessa ocasião, teria percebido que a polarização da interface eletrodo-eletrólito variava exponencialmente segundo a relação C_{pol} proporcional a ω^{-1} , lei esta encontrada na polarização de superfície das células.

No ano seguinte, Fricke (1932), baseando-se nas integrais de Fourier publicou sua teoria da polarização relacionando o α (onde $\alpha = I - m$) e a polarização do ângulo de fase da impedância. Embora talvez esse não tenha sido exatamente o primeiro trabalho que relacionou o comportamento constante do ângulo de fase da impedância da membrana com a polarização, ele foi importante para divulgar o conceito em si.

Em 1940, Cole introduziu os conceitos de distribuição dos tempos de relaxamento no qual aplicou os conceitos de propriedades dielétricas as membranas biológicas. Se for considerado que a impedância 'dielétrica' está em paralelo com a resistência à permeabilidade, isso resultará em um arco semicírculo no gráfico da impedância complexa resultado da impedância total da membrana.

No ano de 1963, tendo em vista os problemas decorrentes das polarizações dos eletrodos, Schwan desenvolveu a técnica do sistema de 4-eletrodos em corrente alternada, o qual basicamente separa os eletrodos de injeção de corrente com os eletrodos de registro (Schwan, 1999). Desde então, essa técnica vem sendo utilizada por muitos autores para diversos tipos de medidas nos mais variados tipos de tecidos biológicos.

Convém também relatar um breve histórico na área de eletrodos para biopotenciais, uma vez que a técnica de mensuração da impedância está totalmente relacionada com os tipos de eletrodos utilizados nos experimentos, principalmente por causa da questão da polarização dos eletrodos.

O primeiro trabalho que se refere à polarização dos eletrodos foi proposto por Gaston Planté em 1826, que abordou o assunto de forma não muito clara. Gaston, trabalhou com o comportamento de correntes alternadas de máquinas magnetoelétricas para investigar esse assunto (Feder, 1968).

Henrici Schönbein em 1839, investigou os efeitos da polarização empregando um galvanômetro para mediar a corrente transiente em um eletrólito. Todavia, Schönbein não acreditava em uma polarização elétrica conferindo o fenômeno a ações puramente químicas (Ostwald, 1980).

No começo do século XX, outros cientistas renomeados discutiram o assunto tais como Ohm, Faraday, Arrhenius, Maxwell, Helmholtz, Nerst e Kohlrausch. Mas, foi somente em 1869 que os problemas de efeitos de polarização dos eletrodos causados pela

corrente contínua foram superados e isso se deu com o advento da tecnologia de corrente alteranada, desenvolvida por Kohlrausch (Stock, 1989).

Na eletrofisiologia de células nervosas, o conceito de polarização de eletrodos foi introduzido por Cremer em 1901 e por Hermann em 1905 (Cole, 1972). O grande salto para superar os problemas de polarização foi apresentado por Edgar Newberry em 1918, em seu artigo intitulado *A new method for determination of conductivity* (do inglês “um novo método de determinação de condutividade”). Ele utilizou uma corrente alternada usando o aparato de 4-eletrodos que reduz os efeitos de polarização. Desde então, essa técnica tem sido aplicada em medidas eletrofisiológicas (Schmukler, 1992).

Após a invenção da ponte de Wheatstone, os estudiosos da área começaram a realizar as medidas de impedância com corrente alternada (CA) no sangue e outros sistemas biológicos. A primeira relação entre a frequência e a polarização veio pelo trabalho de Wolff em 1926 (Schwan, 1966). Fricke em 1932, publicou sua teoria da polarização eletrolítica e, em 1940, um aperfeiçoamento da técnica dos 4-eletrodos foi introduzida por Gordon (Stock, 1989).

As medidas de impedância elétrica em tecidos e células biológicas foram aperfeiçoadas por Schwan (1963), como resultado foi possível adaptar a técnica dos 4-eletrodos nas mensurações fisiológicas, cuja estrutura experimental resolvia o problema da polarização capacitiva nos eletrodos. Historicamente, Theremin (1926) foi um dos primeiros cientistas a propor o uso da espectroscopia de impedância em aplicações biológicas.

3.4. O problema da Interface eletrodo-eletrólito

Em qualquer sistema eletroquímico existe uma interface presente que é a interação eletrodo-eletrólito, cuja descrição elétrica pode ser dada por meio das representações de circuitos elétricos como já mencionado anteriormente (Yuan & Zhang, 2009). Para o propósito desta parte, considera-se o meio celular e suas estruturas como um sistema ou célula eletroquímica onde se estuda, por meio das técnicas de EI, as suas propriedades elétricas resultantes da aplicação de corrente ou potencial.

Para um sistema eletroquímico onde uma reação química ocorra, observa-se que a corrente elétrica é uma função não-linear do potencial do eletrodo. A resistência ôhmica da célula como um todo e o potencial para reações de transferência de carga são dois

fatores influenciadores do fluxo de corrente na célula eletroquímica. Se não há a passagem de corrente elétrica nesse sistema, então não ocorrerá reações eletroquímicas, considerando certa faixa de potencial (Orazem & Tribollet, 2019). Isso significa que na análises dos dados de impedância deve-se considerar qual amplitude potencial será utilizado, pois não é desejável que ocorram reações químicas entre o meio celular e o eletrodo, o que comprometeria ou impediria a análise das propriedades do sistema que se quer estudar.

Nesse caso, a única reação que ocorre é a do potencial padrão (potencial padrão de célula ou potencial de eletrodo), cujo fenômeno ocorre por causa da doação/recepção de elétrons da solução eletrolítica, seja elétrons do soluto e/ou do eletrólito dissolvido, para o eletrodo que geralmente é constituído de um metal inerte (Orazem & Tribollet, 2019). No equilíbrio dinâmico, haverá uma diferença de potencial em consequência a separação de cargas entre o metal e a solução, ficando estabelecido o potencial de eletrodo. Tal fenômeno ocorre mesmo se for colocado somente um eletrodo (metal) na solução sem aplicação de qualquer potencial ou corrente e isso constitui o potencial aberto de uma célula eletroquímica (Compton & Sanders, 1996).

A distribuição de corrente e potencial pelo eletrodo interfere na resposta da impedância. Por isso, assume-se que a concentração dos íons do eletrólito são uniformes, cuja distribuição primária de corrente do sistema é dominada apenas pelo comportamento resistivo (puramente ôhmico). Nessas condições, a resistência associada a cinética de reações pode ser desconsiderada (a distribuição secundária de corrente considera os efeitos cinéticos). Assim, o eletrodo compreende uma superfície equipotencial, ou seja, aquela em que todo pontos possuem o mesmo potencial escalar constante. Distribuição secundária de corrente é aquela onde há a passagem de corrente elétrica pelo material analisado (Orazem & Tribollet, 2019).

Um relevante tópico a ser discutido a respeito da interface eletrodo-eletrólito e que pode afetar muito as medidas de impedância é a questão da rugosidade da superfície de eletrodo. Um eletrodo traz em sua área de superfície uma geometria rugosa ou uma superfície lisa, mas, mesmo nesse último caso, as propriedades como a dupla camada de capacitância, não estarão uniformemente distribuídas. Assim, por maior que seja o tratamento de purificação e polimento dado a um metal de um eletrodo, ele sempre terá a sua superfície irregular sob o ponto de vista microscópico ou em escala atômica. A consequência dessa rugosidade é a distribuição não uniforme da corrente na superfície do eletrodo e, como resultado, a queda de potencial adjacente à solução eletrolítica desigual.

Portanto, considera-se muitas vezes sua descrição a partir de um ponto onde a distribuição de corrente seja homogênea (Sluyters-Rehbach, 1994).

Estudos mostram que a dependência da impedância do eletrodo muda em relação à frequência muda sistematicamente pelo fato do eletrodo ser rugoso e não homogêneo (Sluyters-Rehbach, 1994). Algumas investigações científicas sobre isso têm sido conduzidas com base na teoria dos fractais, onde assume-se generalizações das irregularidades do eletrodo (Mandelbrot, 1983). Weinman & Mahler (1964), analisando as propriedades de eletrodos de metais, concluíram que a influência da superfície eletródica sobre a polarização é função da densidade de corrente.

Helmholtz (1853) demonstrou que a interface eletrodo-eletrólito, quando não apresenta reações químicas, possui comportamentos capacitivos o qual denominou de dupla camada elétrica. Nessa situação, as cargas das espécies iônicas são atraídas pelas cargas de sinais opostos na interface eletrodo/eletrólito, essa conformação resulta num comportamento capacitivo, resultado de cargas que não participaram de algum tipo de reação ou difusão. De maneira geral, tão logo um eletrodo é submergido em uma solução eletrolítica a dupla camada se forma (Lvovich, 2012).

Posteriormente, os cientistas Louis G. Gouy (1910) e David L. Chapman (1913) desenvolveram outro modelo para descrever os fenômenos na interface eletrodo-eletrólito, o qual ficou conhecido como a camada de Gouy-Chapman (Stupin & Dubina, 2020). Em 1924, Otto Stern construiu um modelo no qual os íons se comportariam de acordo com ambos modelos de Helmholtz e de Gouy-Chapman, descrevendo a camada difusiva.

O modelo teórico de Gouy-Chapman-Stern da camada elétrica dupla pode ser descrito a partir das camadas de Helmholtz e Gouy-Chapman por um circuito equivalente em série. Apesar desse modelo teórico apresentar consistência, ele não é muito observado devido ao fenômeno de *dispersão capacitiva* o qual também é chamado de *elemento de fase constante* (CPE – *constant Phase element*, sigla no inglês). A origem exata desse fenômeno ainda não está totalmente elucidada (Stupin & Dubina, 2020).

Entretanto, dois modelos descrevem satisfatoriamente o fenômeno da dispersão capacitiva. O primeiro é o modelo da impedância de Warburg (1899), o qual considera que a concentração de íons do não-equilíbrio na superfície eletródica seria proveniente de reações eletroquímicas entre os íons da solução eletrolítica com os átomos do eletrodo, ocorrendo então um fluxo difusivo de íons. O segundo modelo foi proposto por R. Levie

(1965), o qual tratou sobre a porosidade dos eletrodos de metais, assumindo que estes são cilíndricos e que a solução nos poros é homogênea.

Se os íons da solução eletrolítica não tem tempo o suficiente para se acumularem próximos ao eletrodo durante meio ciclo da onda, ou seja, da injeção de corrente senoidal, a polarização não será considerável e passa a não ter mais efeitos (Shalit & Mahler, 1966) e os efeitos de polarização são limitados a camadas adjacentes aos eletrodos (Chang e Jaffe, 1952).

Kohlrausch e Nippoldt (1869) demonstraram que com o aumento da superfície do eletrodo, poderia ocorrer uma diminuição dos efeitos de polarização, mostrando a possibilidade da influência da área eletródica na obtenção dos dados. Contudo, mostraram também que há um aumento dos efeitos de polarização quando a superfície do eletrodo é menos exposta na solução eletrolítica. Um pequeno aumento na exposição eletródica causa significativas mudanças na resistência e na capacitância da polarização, o que complica na padronização da fabricação dos eletrodos e, como consequência disso, diferenças na comparação de resultados, utilizando-se diferentes pares de eletrodos. Na prática, geralmente, considera-se o eletrodo como perfeitamente liso (Macdonald & Barsoukov, 2005).

Observando-se alguns trabalhos sobre efeitos de polarização nos eletrodos, nota-se que há certa discrepância de resultados encontrados por diferentes autores. Assim, por exemplo, Kohlrausch (1893), Schwan e Kay (1957), que encontraram o valor de 1 kHz para o qual o fenômeno da polarização desaparecia. Jaffé e Rider (1952) encontraram a valores entre 100 Hz e 1 kHz, e, a partir de 10 kHz (Aladjalova, 1964). A resposta para essa diversidade de valores, pode ser devido ao tipo de material utilizado por cada um dos autores, incluindo a diferença da superfície eletródica. A frequência a partir d

o qual o efeito desaparece será cada vez maior quanto menor for a área do eletrodo, e essa frequência deveria ser determinada individualmente para cada par de eletrodos, devido às dificuldades de se produzir eletrodos idênticos (Shalit & Mahler, 1966).

A questão do quanto essa capacitância é relevante, deve-se primordialmente ser analisada considerando as dimensões moleculares e atômicas do sistema. Apesar disso, essa polarização não se comporta de forma constante como em um capacitor simples (Logothetis, 2007), pois R e C variam ambos inversamente com o quadrado da frequência da corrente que se utiliza (Warburg, 1899; Geddes et al., 1971; Geddes, 1997)

Desde os primeiros experimentos de impedância percebeu-se que o efeito da dupla camada de íons era dependente da frequência e esse fenômeno ficou conhecido como

Elemento de Fase Constante ou, simplesmente, ângulo de fase, referindo-se ao fato do plano complexo Z_c ser uma linha reta formando um ângulo com o eixo Z' (Sluyters-Rehbach, 1994).

Nas proximidades da interface eletrodo-eletrólito, pode ocorrer também o fenômeno de queda de potencial ôhmica, também conhecida como *IR Drop*, que é a tensão resultante do fluxo de corrente elétrica em eletrólitos e, a princípio, não é considerada ou não visualizada em medidas de impedância no córtex cerebral. O *Ohmic Overpotential* ocorre predominantemente durante a passagem de uma corrente elétrica e é devido à resistência elétrica do transporte de íons de um eletrodo para outro em um sistema eletroquímico (Srinivasan, 2006).

A impedância faradaica Z_f ocorre nas proximidades da interface eletrodo-eletrólito e está associada as taxas de reações de transferência de cargas nesse local. Por não ser puramente resistivo, a Z_f é distinta dos elementos elétricos, pois atua em paralelo com a capacitância da dupla-camada em combinação em série com a resistência eletrolítica e, por ter um elemento capacitivo, varia com a frequência do sinal aplicado no sistema (Yuan & Zhang, 2009).

Os efeitos de capacitância podem ocorrer em um sistema eletroquímico em razão dos efeitos dielétricos do meio ou da redistribuição de cargas nas interfaces do eletrodo-eletrólito (Orazem & Tribollet, 2019). A dupla camada elétrica é resultado deste último fenômeno bastante comum nos experimentos de medida de impedância em tecidos biológicos. Outro desafio experimental em algumas medidas de impedância provém resistência da solução (R_s), que é proporcional ao valor da resistividade ρ e, para cada geometria do eletrodo e da célula eletroquímica, existe uma relação diferente para R_s :

$$R_s = \rho a$$

(a)

$$R_s = \rho \frac{ar_0}{a+r_0}$$

(b)

$$R_s = \rho r_0 \ln \frac{a+r_0}{r_0}$$

(c)

Sendo (a) planar, (b) esférico e (c) cilíndrico; a é a distância entre a superfície do eletrodo e queda do potencial ôhmico e r_0 é o raio de curvatura do eletrodo. A unidade de R_s é dada em $\Omega \cdot \text{m}^2$ (Sluyters-Rehbach, 1994).

A resistência do metal R_m corresponde a corrente que percorre o metal até os fios de conexão e deve ser adicionada a R_s (resistência da solução), levando ao conceito de

resistência ôhmica R_{Ω} . Esta, deve aparecer nos modelos de circuitos equivalentes eletroquímicos em série com a impedância do eletrodo Z_e como parte de representação de determinado sistema onde a R_s pode estar presente (Sluyters-Rehbach, 1994).

Para entender a dimensão da complexidade das medidas de impedância em tecidos cerebrais e sua influência do eletrodo-eletrólito, os seguintes fatores devem ser muito bem conhecidos e controlados para se ter êxito experimental: material do eletrodo, superfície do eletrodo, frequência da corrente e a concentração do eletrólito na solução (Shalit & Mahler, 1966). A medida de impedância no córtex, além da solução eletrolítica, possui a membrana e suas demais propriedades, levando então a uma alta complexidade de funções e propriedades elétricas derivadas de suas estruturas intrínsecas.

A configuração usual para medidas de EI em cérebros era a de 2-eletrodos. Neste tipo de configuração experimental um mesmo eletrodo é utilizado para injetar corrente e realizar a medida do potencial ao mesmo tempo. Deve-se assumir que o potencial entre os eletrodos é próximo do potencial do meio que se mede (Logothetis, 2007), e para frequências muito baixas essa aproximação não pode ser considerada (Schaw, 1966, 1968).

O principal problema que essa configuração eletródica apresenta é a questão eletroquímica da interface eletrodo-eletrólito, onde se desenvolve os problemas de polarização, formando um capacitor (Geddes, 1997), como já foi discutido anteriormente. A princípio, separando os eletrodos, o que mede o potencial e o que injeta a corrente pode se ter uma solução (Logothetis, 2007).

Desde há muito tempo o sistema de 2-eletrodos foi reconhecido por apresentar essa barreira experimental da polarização dos eletrodos, embora tenha sido utilizado na literatura mais antiga em muitas medidas *in vivo*. Esse fenômeno foi muito bem investigado por vários autores ao longo dos anos e a maioria desses estudos foram realizados por eletrodos de metais em soluções eletrolíticas (Shalit & Mahler, 1966).

Numa configuração mais avançada para medição da impedância, o sistema denominado de 4-eletrodos ou sistema de eletrodo tetrapolares pode ser utilizado no lugar do sistema de 2-eletrodos, muito utilizado dentro das pesquisas em bioimpedância porque sua configuração experimental é capaz de tornar negligível os efeitos de polarização nos eletrodos (Schwan & Ferris, 1968).

Devido aos efeitos de polarização nos eletrodos bipolares tornou-se insatisfatório realizar as medidas de propriedades capacitivas no tecido neural, pois afeta muito os resultados experimentais. Então, para superar esse obstáculo experimental Schwan

propôs a técnica de medidas de impedância utilizando quatro eletrodos, conhecido como o método de eletrodo tetrapolar ou, simplesmente, 4-eletrodo. Desde seu surgimento, o eletrodo tetrapolar foi mais empregado nas medidas de impedância no córtex cerebral (Shalit & Mahler, 1966)

Nesse tipo de sistema, quatro eletrodos alinhados são utilizados, sendo que os dois eletrodos internos são dedicados a medir o potencial e os outros dois externos para injetar a corrente no meio. A depender do tipo do tecido, os eletrodos de corrente induzem uma queda de potencial. Esse método ainda apresenta a vantagem de se utilizar diversas configurações geométricas de condução geradas pelo eletrodo de injeção de corrente dentro do espaço extracelular tridimensional (Logothetis, 2007).

Por esse sistema, a princípio, consegue-se medidas sem o problema da polarização dos eletrodos (Schwan, 1963; 1966). Neste tipo de aparato, dois eletrodos de injeção de corrente ficam igualmente espaçados ao longo de uma linha, onde os outros dois eletrodos que medem o potencial, ficam internos (Robillard & Poussart, 1977).

A técnica dos 4-eletrodos parece ter sido bem sucedida nas medidas de resistência cortical (Freygang & Landau, 1955). Utilizando esse método, Ranck (1963, 1963, 1964) realizou medidas no cérebro de coelhos sob várias frequências. Analisando o córtex cerebral sob condições fisiológicas, Aladjalova (1964) determinou ambos componentes resistivos e capacitivos daquele sistema; em cérebros de macacos, Robinson, Rosvold e Bryan (1965) mediram os mesmos parâmetros; Shalit e Shebshinsky (1965) realizaram medidas em condições patológicas do cérebro de humanos e gatos; Porter, Adey e Kado (1964), e Adey, Kado e Walter (1965), usando eletrodos implantados em cérebro de humanos, mediram ambos os parâmetros em várias estruturas e condições fisiológicas.

Uma excelente referência sobre o método com 4-eletrodos foi realizado por Robillard & Poussart (1977), principalmente, quanto ao cuidado da verificação das condições e propriedades dos eletrodos. Estes autores relatam a importância dos 4 eletrodos serem desenvolvidos com as mesmas dimensões (comprimento, ponta do eletrodo, estarem em paralelos e muito bem presos), a fim de se medir a impedância específica, isso significa, em outros termos, que o aparato dos eletrodos deve-se estar muito bem calibrado. Esses autores empregaram uma densidade de corrente com base no comportamento linear do tecido investigado, testando o comportamento dos eletrodos em uma solução salina de impedância conhecida. Além disso, realizaram uma curva de calibração calculando o fator da geometria dos seus eletrodos, utilizando uma regressão linear de medidas de nove soluções de resistividade conhecidas. Para finalizar, os autores

testaram se a inserção do eletrodo no tecido cerebral poderia causar danos (microscópicos) em seus eletrodos, realizando para isso medidas em gel com consistência aproximada do tecido (solução salina, 1% agar).

4. CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES ELÉTRICAS DO TECIDO CEREBRAL POR EI

4.1 Origem dos fenômenos elétricos no cérebro

Em um determinado ponto do meio extracelular, um potencial elétrico é resultado de diversos potenciais gerados por correntes iônicas de processos celulares do cérebro. Assim, o meio extracelular apresenta várias fontes de sinais elétricos os quais foram bem descritos no trabalho de Buzsáki & Koch (2012) e serão brevemente descritos abaixo:

- *Atividade sináptica*: geralmente a mais importante fonte de correntes extracelulares;
- *Potenciais de ação rápidos*: gerado pelo movimentos de Na^+ através da membrana, sendo o sinal mais forte associado a esse evento, cujo registro se dá por “spikes”;
- *Picos de cálcio*: normalmente gerados por Ca^{2+} spikes. Pouco ainda se sabe sobre esses registros *in vivo*;
- *Correntes e ressonâncias intrínsecas*: são dependente de tensão;
- *Pico após hiperpolarizações e estados de baixa*: influxo de íons ativados por canais controlados por ligantes devido ao aumento da concentração intracelular de determinados íons;
- *Junções comunicantes e interações neurônio-glia*: interações neurônio e glia (sincício glial) podem gerar potenciais de amplitudes baixas e infra baixas;
- *Efeitos efáticos*: causado pela sincronização de disparos de potenciais de ação de neurônios.

4.2 Fatores envolvidos no modo de propagação do sinal neural

O sistema nervoso central tem sido estudado sob o ponto de vista de sua atividade elétrica desde um neurônio até potenciais agregados, também chamados potenciais de

massa. Para o estudo das medidas de impedância do tecido com relação à propagação dos sinais elétricos, o nível estudado é o mesoscópio, ou seja, as correntes extracelulares. Posto isso, deduz-se que a distribuição das correntes e potenciais ao longo da arquitetura do tecido deve ser levada em consideração, principalmente no quesito quantitativo (Robillard & Poussart, 1977).

O meio extracelular é considerado como um volume condutor onde os neurônios estão imersos. Em diferentes regiões de uma membrana de um mesmo neurônio, ocorre o fluxo de corrente extracelular em regiões ativas exercendo o papel sorvedouro de outras regiões inativas, chamadas de fonte de corrente, ambas derivadas da diferença de potencial que separam essas duas partes. Esses potenciais extracelulares sobrepõem-se por meio do volume condutor (Logothetis, 2007).

As células neurais não são simplesmente esféricas ou cilíndricas, elas possuem uma diversidade de formatos e estruturas complexas formadas por proteínas especializadas, chamadas de canais iônicos são localizadas nessa membrana por onde flui corrente iônica.

Na biologia, todas as membranas apresentam propriedades resistivas lineares (Hodgkin, 1992; Huxley, 2002), mas essa linearidade é dependente do formato das membranas e como as resistências estão distribuídas ao longo delas (Eisenberg & Mathias, 1980). Por isso, conhecer quantitativamente a morfologia das células pode ser interessante, pois negligenciar essa característica tem sido feito em muitas medidas de impedância em sistemas biológicos. Deveria se ter uma teoria associando as medidas dessa estrutura as medidas elétricas realizada pela EI (Macdonald & Johnson, 2018).

4.3 Medidas de impedância em cérebros

O tecido cerebral pode ser considerado sob a ótica elétrica como um circuito de resistores e capacitores arquitetados de forma complexa e topologia (Shalit & Mahler, 1966). Uma vez que sob determinadas circunstâncias o tecido cerebral muda sua resistividade, devido a alterações anatômicas e características elétricas das células neurais e glias, bem como o espaço intersticial, as medidas de impedância são significativas nesse contexto (Ranck, 1963b).

A análise do espectro de impedância do córtex cerebral tem seu papel fundamental na interpretação de sinais do meio, cujos resultados são de extrema relevância para a

neurofisiologia como na investigação dos potenciais de campo local. Como exemplo, recursos de estímulo de orientação de uma grade ou a direção de movimentos planejados tem correlação com a amplitude de bandas de frequências específicas naqueles potenciais locais (Logothetis, 2007).

Em cérebros humanos, a determinação da natureza e da condução volumétrica da atividade neural depende dos parâmetros de impedância, onde duas abordagens principais são realizadas nessa mensuração: a medida de impedância cerebral *ex vivo* utilizando correntes realizada em amostras de tecido durante cirurgias e a medida utilizando a tomografia de impedância elétrica no crânio *in vivo* ou injeção de corrente elétrica intracerebral, embora a primeira opção seja a mais utilizada (Koessler & Maillard, 2017).

O espaço extracelular de um tecido forma um complexo mosaico tridimensional ocupado pelo fluido extracelular, o qual corresponde ao espaço entre as células e por onde as correntes se espalham sem atravessar as membranas dos neurônios (Robinson, 1968). Sendo assim, a resistência que o meio apresenta provém da conformação dos neurônios e da glia, por onde, teoricamente, os sinais elétricos podem se propagar a grandes distâncias. Devido a essa complexidade é que ainda é obscuro se as propriedades do meio extracelular do tecido cortical se comportam como um resistor ou apresentam reatância também (Logothetis, 2007).

Em medidas de registros de atividades neurais, os eletrodos devem ter uma alta impedância ($> 100 \text{ k}\Omega$ a 1 kHz), obtida por uma pequena exposição da ponta do eletrodo, e capacidade de medir em amplas faixas de frequência em relação a impedância do tecido (Logothetis, 2007).

Sendo a impedância a medida da habilidade de um circuito de resistir à passagem de corrente elétrica ou iônica, tanto contínua quanto alternada, a análise de um espectro de impedância é a melhor maneira de se avaliar as propriedades de filtragem de sinais no tecido cerebral. Dentro desse contexto, a medida a ser realizada em um cérebro deve responder a duas questões primordiais: o tecido apresenta propriedades resistivas (ou não) e se há isotropismo na propagação do sinal.

Essa dependência da orientação da impedância para a substância branca já foi relatada em cérebros de gatos (Li, et.al., 1968, Nicholson, 1965). A dependência da frequência da substância branca deve ser devido a direção das fibras, sendo a menor resistência na direção das fibras e a mais alta ortogonal às fibras (Logothetis, 2007).

Assim, por exemplo, as atividades de ondas de baixa amplitude no EEG são independentes dos potenciais de ação dos neurônios respostas neuronais spiking. Mesmo

assim, os potenciais de baixa amplitude podem ser vistos pela superfície do couro cabeludo, enquanto os potenciais de atividade spiking não podem ser visualizados (Creutzfeldt et al., 1966; Morocutti et al., 1966; Watanabe et al., 1966). Conclui-se a partir disso que o tecido cortical possui propriedades de filtragem de sinais e essa dependência da frequência foi sugerida também por meio da realização de registros extracelulares como, por exemplo, por meio do trabalho de Gold et al. (2006) onde verificou-se a sensibilidade com relação à posição do eletrodo na amplitude dos spikes extracelulares registrados.

Um espectro de impedância dependente da frequência poderia atenuar os sinais elétricos de uma frequência mais do que outras. Foi observado que potenciais de ação não são visíveis pela superfície do crânio, o que foi relacionado às propriedades de filtragem do tecido cortical (Bedard & Destexhe, 2006).

Com relação à trabalhos no córtex, recentemente, Logothetis (2007), empregou a técnica dos 4-eletrodos realizando experimentos em cérebros de macacos, discutindo a sua relevância com relação às propriedades elétricas do tecido neural. Concluiu que, para os tecidos analisados *in vivo* e *in vitro*, o meio apresentaria um comportamento puramente resistivo e o meio exibiria propriedades isotrópicas com relação à propagação de sinais elétricos. Bédard e Dextexhe (2009) tentaram demonstrar que o uso de correntes na amplitude utilizada por Logothetis poderia dissimular a dependência da frequência na condutividade no meio extracelular.

Gomes e colaboradores (2016) abordaram o problema utilizando a *técnica whole patch-clamp*, em suas medidas de cérebros de ratos, mostrando que essa técnica deixaria a interface do meio extracelular e intracelular intacta. Esses autores encontraram que o tecido neural apresentava comportamento não-ôhmico com propriedades de dependência da frequência, de forma que tal achado impactaria no estudo da gênese dos potenciais de campo locais (sigla em inglês, LFPs), segundo seus modelos.

Por último, Miceli e colaboradores (2017) realizaram um estudo utilizando pequenas amplitudes de correntes via *patch-pipettes* em cérebros de ratos, o qual demonstrou ter efeitos de dependência da frequência muito sutis pelo menos para as frequências de LFPs, sendo que para a maioria dos estudos, modelos matemáticos mostraram que essa dependência não seria relevante para as análises dos sinais extracelulares de cérebros de LFPs.

O ponto central do trabalho de Miceli et al (2017) foi verificar o quanto as frequências dos sinais eletrofisiológicos neurais extracelulares podem afetar a

condutividade no tecido cerebral, sugerindo que o tecido cortical apresenta meio ôhmico. Compararam a dependência da frequência realizando medidas no cortex e em uma solução que imita o fluido cerebro espinhal; e também, compararam se haviam diferença no ângulo de fase entre o tecido e uma solução salina, não encontrando diferenças estatísticas significativas. Estudaram a condutividade elétrica do tecido neural de córtex de barril de rato juvenil, utilizando correntes de frequências entre 5 e 500 Hz, onde concluíram que o meio neural analisado comportou-se como um condutor linear para correntes sub-nanoampères e a dependência da frequência é no máximo moderada. Além disso, observaram que, no meio extracelular a injeção de corrente pode ser muito bem modelada como uma fonte pontual.

Muitos autores concluíram que o córtex cerebral possui pouca dependência da frequência para as faixa de frequência analisada. Todavia, Gabriel et al. (1996) encontraram forte dependência da frequência em valores menores que 100 Hz. Embora Wagner et al. (2014) tenham utilizado um aparato experimental parecido, Gabriel et al. mencionaram que a baixas frequências seus valores poderiam estar incorretos pela falta da correção da polarização eletródica em seu equipamento experimental ou pode ser resultado de uma má preservação celular, talvez inchaço ou degradação, o que por si só alteraria a composição do fluido extracelular.

Logothetis et al. (2007) realizando medidas em cérebros de macacos *in vivo* na faixa de 10 a 5000 Hz, encontraram cerca de 25% de dependência na condutividade. Elbohouty (2013), trabalhando com fatias de córtex cerebral de ratos na faixa de 20 Hz a 2 MHz, e Wagner et al. (2014), medindo em gatos no intervalo entre 10-1000 Hz, depararam com valores próximos de dependência. Realizaram medidas variando as distâncias entre os 4 eletrodos e a profundidade no córtex, variando esta entre 250 a 325 μm . Importante ressaltar que, durante a realização de suas medidas, Logothetis et al. (2007) encontraram uma grande variação na impedância quando os eletrodos atingiram a substância branca que possui grande dependência da frequência na direção em que se realiza a medida no tecido.

Os trabalhos de Ranck (1963b), Havstad (1976), Mitzdorf (1985) e Logothetis (2007), os quais analisaram a resistividade do tecido cortical em diferentes animais, corroboram que o espaço extracelular apresentou comportamento ôhmico de cerca de quatro vezes os valores de resistividade encontrada na solução salina fisiológica de 0,664 Ωm (Logothetis, 2007). Pfurscheller e Cooper (1975) utilizaram correntes de dipolos no córtex e no crânio sendo ambos independentes da frequência.

O trabalho mais recente sobre espectroscopia de impedância em cérebros é o de Bedard & Destexhe (2021), cujos experimentos foram realizados em ratos e utilizaram método de 3 eletrodos (intracelular, extracelular e terra) por Patch-clamp. Mostraram que seus resultados foram dependentes da técnica utilizada para a medição da impedância, ou seja, quando os eletrodos são posicionados unicamente no meio extracelular, tem-se uma medida puramente resistiva, já uma medida com posicionamento de eletrodo intracelular existe a ocorrência de um comportamento próprio de impedância. Essa diferença foi explicada devido à presença de corrente transmembrana que ocorre no cérebro, pois a difusão iônica parece ser predominante enquanto a membrana está presente.

Da análise dos artigos presentes, pode-se verificar que uma das razões para as quais concorrem para a diversidade dos resultados encontrados para as medidas de impedância é a falta de procedimentos experimentais padronizados e bem estabelecidos.

5. DISCUSSÃO E PERSPECTIVA

Longe do intuito de esgotar o assunto com relação a experimentação da espectroscopia de impedância em tecidos corticais, citamos alguns questionamentos e propostas de estudos experimentais que julgamos importantes:

- Poderia o somatório dos potenciais elétricos gerados por certos neurônios ou conjuntos deles num determinado ponto ou região do tecido cerebral (por exemplo, a região entre os dois eletrodos de medição), apresentar um comportamento não estacionário e, portanto, não linear? A verificação da não estacionaridade para análise da dependência do tempo por meio das relações de Kramers-Kronig (Szekeres & Láng; 2021), pode ser fundamental para a aplicação da espectroscopia de impedância, tendo em vista que cada cérebro possui suas particularidades e, provavelmente, suas propriedades elétricas específicas para cada ser biológico;

- Considerando essa diversidade e os inúmeros potenciais que por ali passam através de várias direções, intensidades e frequência, poderia o tecido nervoso apresentar um sistema variável com relação à sua dependência de frequência? Assim, por exemplo, um mesmo ponto dentro do meio extracelular neural se apresentaria frente a algumas situações como puramente resistivo e, em outras circunstâncias, se comportaria com propriedades de filtragem de sinais. O método dos 8 eletrodos, denominado como Medição de Impedância Focada, do inglês “Focused Impedance Measurement”(Rabbani

& Akter, 1999; Rabbani & Karal, 2008; Rabbani & Kadir, 2011), método parecido com o tetrapolar estudado, porém, são utilizados mais quatro eletrodos perpendiculares aos outros restantes já vistos, sendo esses igualmente posicionados em sua configuração, ou seja, dois eletrodos externos de injeção de corrente e dois internos para medição. A vantagem aqui seria se estudar a interação entre os sinais elétricos num certo ponto ou região do tecido neural. Há ainda a possibilidade de se pensar num sistema 3D para tecidos *in vitro*;

- A aplicação de circuitos equivalentes parece ser válida para muitos casos, porém, esse modelo de comparação é baseado em metais e não para meios biológicos com sua diversidade totalmente diferente. Seriam os modelos de circuitos equivalentes elétricos a melhor aplicação de modelos quando estamos trabalhando com sistemas biológicos? Se sim, qual o sentido ou explicação de um tecido nervoso apresentar comportamento semelhante a um indutor? O que isso realmente significaria em termos moleculares ou biológicos? Embora essa seja uma discussão quase que filosófica e de difícil imaginação, nem tampouco por isso deve ser desconsiderada. A suposição da existência de um elemento elétrico ‘fictício’, até então, ou seja, existente somente para meios biológicos (e talvez somente para cérebros) deve ser explorada, geralmente é assim que surgem novas teorias ou modelos que explicam comportamentos ainda não muito bem detalhados.

Como seria esse componente elétrico biológico hipotético e como ele se comportaria, ainda permanece latente e o intuito aqui é apenas despertar a atenção para essa possibilidade. Vejamos, por exemplo, o modelo do soliton de Andersen & Heimburg (2009) para explicar como os potenciais de ação são iniciados. Esse modelo se baseia na teoria termodinâmica da propagação do pulso nervoso, cuja proposição é a transmissão do sinal pela membrana da célula por meio de sólitons de ondas mecânicas (ondas de somente um pulso). Os sólitons durante o pulso nervoso têm sido estudado por Engelbrecht & Vendelin (2018), embora esses autores não atribuam os potenciais de ação iniciados pelos sólitons. Outros trabalhos também consideram em seus modelos, além da parte termodinâmica do potencial de ação, aspectos magnéticos (Wang, T. 2017).

A perspectiva desse trabalho é a realização da espectroscopia de impedância utilizando-se a configuração de eletrodos tetrapolar no cérebro de corujas buraqueiras. O hiperpálio (*wulst*) é uma região cerebral do telencéfalo de aves relacionada especialmente com a visão, a qual possui origem embrionária igual a porção medial e temporal do néocórtex dos mamíferos e, por isso, considera-se o *wulst* homólogo ao córtex visual

primário de mamíferos apesar daquele apresentar organização nuclear e em pseudocamadas (Karten et al., 1973; Pettigrew & Konishi, 1976; Pettigrew, 1979).

Dentre os diferentes graus de laminação entre as espécies, o wulst da coruja buraqueira se destaca por apresentar maior estruturação que não ocorre em por outra ave (Bravo e Pettigrew, 1981).

Bechers et. al. (2014) mostraram que há a propagação tridimensional de ondas lentas através da estrutura nuclear e pseudolaminar do hiperpálio apical (wulst visual) de mandarins (*Zebra Finch*), diferindo-se da propagação de ondas lentas em mamíferos, onde transcorre bidimensionalmente e paralelamente às camadas do córtex (Chauvette et al. 2010).

Assim, propriedades anisotrópicas ou isotrópicas com filtragem de sinais (ou não) podem estar presentes no cérebro de corujas buraqueiras e o estudo da impedância nesses animais poderá contribuir para o entendimento de como diferentes estruturas cerebrais (laminar, pseudolaminar, nuclear), apresentam comportamentos distintos com relação ao comportamento elétrico em mamíferos, por exemplo. Além disso, ainda não há na literatura estudos de EI em aves se constituindo um campo a ser explorado.

6. CONCLUSÃO

Verifica-se que vários são os métodos para a medição da impedância em cérebros. Contudo, há a falta de consenso na literatura sobre a metodologia experimental mais adequada a ser utilizada em termos de resultados mais fidedignos e que se aproximariam, em tese, dos valores de impedância que o cérebro apresenta. Algumas controvérsias têm origens em aspectos como: a medição da impedância em cérebro de animais da mesma espécie, a falta de um aparato experimental que seria o mais adequado para a análise e medição da impedância nos tecidos cerebrais, tudo isso contribui para que a questão ainda permaneça relativamente aberta.

REFERÊNCIAS

Adiutori, E. F. (2002). *The new engineering*. Ventuno Press, pp. 41.

Adey, W. R., Kado, R. T., & Walter, D. O. (1965). Impedance characteristics of cortical and subcortical structures: evaluation of regional specificity in hypercapnea and hypothermia. *Experimental neurology*, 11(2), 190-216.

Aladjalova, N. A. (1964). Ionic processes in the cerebral cortex investigated by the method of conductivity. *Prog Brain Res*, 7, 156-206.

Andersen, S. S., Jackson, A. D., & Heimburg, T. (2009). Towards a thermodynamic theory of nerve pulse propagation. *Progress in neurobiology*, 88(2), 104-113.

Anderson, J. E. (1994). The Debye-Falkenhagen effect: experimental fact or friction? *Journal of Non-Crystalline Solids*, 172, 1190-1194.

Atkins, A. G., Atkins, T., & Escudier, M. (2013). *A dictionary of mechanical engineering*. Oxford University Press, pg 237.

Bakshi, U. A., & Bakshi, A. V. (2008). *Electrical Networks*. Technical Publications. Cap 6, item 2.

Barbour, B. (2017). Analysis of claims that the brain extracellular impedance is high and non-resistive.

Batra, P., & Kapoor, R. (2015). *Electrical Bioimpedance: Methods and Applications*. *International Journal*, 3(4), 702-707.

Bavafa-Toosi, Y. (2017). *Introduction to Linear Control Systems*. Academic Press. pg 447.

Beckers, G. J., van der Meij, J., Lesku, J. A., & Rattenborg, N. C. (2014). Plumes of neuronal activity propagate in three dimensions through the nuclear avian brain. *BMC biology*, 12(1), 1.

Bédard, C., & Destexhe, A. (2009). Macroscopic models of local field potentials and the apparent 1/f noise in brain activity. *Biophysical journal*, 96(7), 2589-2603.

Bédard, C., Kröger, H., & Destexhe, A. (2004). Modeling extracellular field potentials and the frequency-filtering properties of extracellular space. *Biophysical journal*, 86(3), 1829-1842.

Bedard, C., Piette, C., Venance, L., & Destexhe, A. (2021). Extracellular and intracellular components of the impedance of neural tissue. *bioRxiv*.

Bernstein, J. U. L. I. U. S. (1868). Ueber den zeitlichen Verlauf der negativen Schwankung des Nervenstroms. *Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*, 1(1), 173-207.

Bernstein, J. (1902). Untersuchungen zur Thermodynamik der bioelektrischen Ströme. *Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*, 92(10-12), 521-562.

Bockris, J. O. M., Reddy, A. K., & Gamboa-Aldeco, M. (2000). *Electrodics. Modern Electrochemistry 2A: Fundamentals of Electrodics*, 1035-1400, Pg 1133.

Bravo, H., & Pettigrew, J. D. (1981). The distribution of neurons projecting from the retina and visual cortex to the thalamus and tectum opticum of the barn owl, *Tyto alba*, and the burrowing owl, *Speotyto cunicularia*. *Journal of Comparative Neurology*, 199(3), 419-441.

Bullock, T. H. (1997). Signals and signs in the nervous system: the dynamic anatomy of electrical activity is probably information-rich. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(1), 1-6.

Buzsáki, G., Anastassiou, C. A., & Koch, C. (2012). The origin of extracellular fields and currents—EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nature reviews neuroscience*, 13(6), 407-420.

Callegaro, L. (2012). *Electrical impedance: principles, measurement, and applications*. CRC Pres, pp. 36;

Casas Piedrafita, O. (1998). Contribución a la obtención de imágenes paramétricas en tomografía de impedancia eléctrica para la caracterización de tejidos biológicos. Universitat Politècnica de Catalunya.

Chang, H. C., & Jaffé, G. (1952). Polarization in electrolytic solutions. Part I. Theory. *The Journal of Chemical Physics*, 20(7), 1071-1077.

Chauvette, S., Volgushev, M., & Timofeev, I. (2010). Origin of active states in local neocortical networks during slow sleep oscillation. *Cerebral cortex*, 20(11), 2660-2674.

Choudhury, D. R. (2005). *Modern control engineering*. PHI Learning Pvt. Ltd, pg 353, 424.

Cole, K. S. (1928). Electric impedance of suspensions of spheres. *The Journal of general physiology*, 12(1), 29.

Cole, K. S. (1940, January). Permeability and impermeability of cell membranes for ions. In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* (Vol. 8, pp. 110-122). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Cole, K. S. (1972). *Membranes, ions and impulses: a chapter of classical biophysics* (Vol. 1). Univ of California Press.

Compton, R. G., & Sanders, G. H. (1996). *Electrode potentials*. Oxford: Oxford University Press.

Creutzfeldt, O. D., Watanabe, S., & Lux, H. D. (1966). Relations between EEG phenomena and potentials of single cortical cells. I. Evoked responses after thalamic and epicortical stimulation. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, 20(1), 1-18.

Debye, P., & Falkenhagen, H. (1928). Dispersion of the conductivity and dielectric constants of strong electrolytes. *Phys. Z*, 29, 121.

Destexhe, A. (2016). Intracellular impedance measurements reveal non-ohmic properties of the extracellular medium around neurons. *Biophysical journal*, 110(1), 234-246.

Dunn, W. C. (2013). Fundamentos de instrumentação industrial e controle de processos, pp. 36-37.

Eisenberg, R. S., Mathias, R. T., & Rae, J. S. (1977). Measurement, modeling, and analysis of the linear electrical properties of cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 303, 342.

Eisenberg, R. S., & Mathias, R. T. (1980). Structural analysis of electrical properties of cells and tissues. *CRC Crit Rev Bioeng*, 4(3), 203-32.

Engelbrecht, J., Peets, T., Tamm, K., Laasmaa, M., & Vendelin, M. (2018). On the complexity of signal propagation in nerve fibers. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences*, 67(1).

Falk, G., & Fatt, P. (1964). Linear electrical properties of striated muscle fibres observed with intracellular electrodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 160(978), 69-123.

Feder, W. (1968). Introduction to bioelectrodes. *NYASA*, 148(1), 3-4.

Freygang Jr, W. H., & Landau, W. M. (1955). Some relations between resistivity and electrical activity in the cerebral cortex of the cat. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 45(3), 377-392.

Fricke, H. (1932). XXXIII. The theory of electrolytic polarization. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 14(90), 310-318.

Fricke, H., & Morse, S. (1925). The electric resistance and capacity of blood for frequencies between 800 and 4½ million cycles. *The Journal of general physiology*, 9(2), 153.

Fricke, H. (1931). The electric conductivity and capacity of disperse systems. *Physics*, 1(2), 106-115.

Fricke, H. (1932). XXXIII. The theory of electrolytic polarization. The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science, 14(90), 310-318.

Geddes, L. A., & Baker, L. E. (1967). The specific resistance of biological material—a compendium of data for the biomedical engineer and physiologist. Medical and biological engineering, 5(3), 271-293.

Geddes, L. A. (1997). Historical evolution of circuit models for the electrode-electrolyte interface. Annals of biomedical engineering, 25(1), 1.

Geddes, L. A., Da Costa, C. P., & Wise, G. (1971). The impedance of stainless-steel electrodes. Medical and biological engineering, 9(5), 511-521.

Gersing, E. (1998). Impedance spectroscopy on living tissue for determination of the state of organs. Bioelectrochemistry and bioenergetics, 45(2), 145-149.

Godse, A. P., & Bakshi, U. A. (2009). Solid State Devices and Circuits. Technical Publications.

Gomes, J. M., Bédard, C., Valtcheva, S., Nelson, M., Khokhlova, V., Pouget, P., ... & Destexhe, A. (2016). Intracellular impedance measurements reveal non-ohmic properties of the extracellular medium around neurons. Biophysical journal, 110(1), 234-246.

Grimnes, S., & Martinsen, Ø. G. (2006). Sources of error in tetrapolar impedance measurements on biomaterials and other ionic conductors. Journal of Physics D: Applied Physics, 40(1), 9.

Hall, H. P. (1992). A history of impedance measurements. historical archives of the General Radio Company.

Halliday, D., Resnick, R., & Walker, J. (2013). Fundamentals of physics. John Wiley & Sons, pp. 753-755, 757, 717-719.

Havstad, J. W. (1976). Electrical impedance of cerebral cortex: an experimental and theoretical investigation (Doctoral dissertation, Stanford University).

Helmholtz, H. V. (1879). Studien über electriche Grenzschichten. *Annalen der Physik*, 243(7), 337-382.

Hodgkin, A. L. (1992). *Chance & Design: The Pursuit of Science in the Mid-20th Century*.

Höber, R. (1910). Eine Methode, die elektrische Leitfähigkeit im Innern von Zellen zu messen. *Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*, 133(4-6), 237-253.

Höber, R. (1912). Ein zweites Verfahren, die Leitfähigkeit im Innern von Zellen zu messen. *Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*, 148(4-5), 189-221.

Höber, R. (1913). Messungen der inneren Leitfähigkeit von Zellen. *Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*, 150(1-2), 15-45.

Huxley, A. (2002). From overshoot to voltage clamp. *Trends in neurosciences*, 25(11), 553-558.

Jaffe, G., & Rider, J. A. (1952). Polarization in electrolytic solutions. Part II. Measurements. *The Journal of Chemical Physics*, 20(7), 1077-1087.

Karten, H. J., Hodos, W., Nauta, W. J., & Revzin, A. M. (1973). Neural connections of the "visual wulst" of the avian telencephalon. Experimental studies in the pigeon (*Columba livia*) and owl (*Speotyto cunicularia*). *Journal of Comparative Neurology*, 150(3), 253-277.

Kohlrausch, F., & Nippoldt, W. A. (1869). Ueber die Gültigkeit der Ohm'schen Gesetze für Elektrolyte und eine numerische Bestimmung des Leitungswiderstandes der verdünnten Schwefelsäure durch alternirende Ströme. *Annalen der Physik*, 214(11), 370-390.

Kohlrausch, F., & Rose, F. (1893). Die Löslichkeit einiger schwer löslicher Körper im Wasser, beurteilt aus der elektrischen Leitungsfähigkeit der Lösungen. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, 12(1), 234-243.

Lasia, A. (2002). Electrochemical impedance spectroscopy and its applications. In *Modern aspects of electrochemistry* (pp. 143-248). Springer, Boston, MA.

Logothetis, N. K., Kayser, C., & Oeltermann, A. (2007). In vivo measurement of cortical impedance spectrum in monkeys: implications for signal propagation. *Neuron*, 55(5), 809-823.

Luiz, A. M. (2009). *Coleção Física 3 Eletromagnetismo, Teoria e problemas resolvidos*. Editora Livraria da Física, pp. 137.

Lvovich, V. F. (2012). *Impedance spectroscopy: applications to electrochemical and dielectric phenomena*. John Wiley & Sons, pg 15 – 16.

Mandelbrot, B. B. (1983). *The fractal geometry of nature/Revised and enlarged edition*. whf.

McAdams, E. T. (1987). *A study of electrode-tissue impedances encountered in cardiac pacing* (Doctoral dissertation, University of Leeds).

McAdams, E. T., & Jossinet, J. (1995). Tissue impedance: a historical overview. *Physiological measurement*, 16(3A), A1.

Macdonald, J. R., & Johnson, W. B. (2018). Fundamentals of impedance spectroscopy. *Impedance spectroscopy: theory, experiment, and applications*, 1-20; 2-5; 472.

McIntyre, C. C., & Grill, W. M. (2001). Finite element analysis of the current-density and electric field generated by metal microelectrodes. *Annals of biomedical engineering*, 29(3), 227-235.

Miceli, S., Ness, T. V., Einevoll, G. T., & Schubert, D. (2017). Impedance spectrum in cortical tissue: Implications for propagation of LFP signals on the microscopic level. *Eneuro*, 4(1).

Mitzdorf, U. (1985). Current source-density method and application in cat cerebral cortex: investigation of evoked potentials and EEG phenomena. *Physiological reviews*, 65(1), 37-100.

Morocutti, C., Sommer-Smith, J. A., & Creutzfeldt, O. (1966). The visual reaction potential in normal experimental people and characteristic changes in epileptics. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten*, 208(3), 234-254.

Newbery, E. (1918). LXI.—A new method for the determination of conductivity. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 113, 701-707.

Nyquist, H. (1932). Regeneration theory. *Bell system technical journal*, 11(1), 126-147.

O'M, B. J., Reddy, A. K. N., Gamboa-Aldeco, M., O'M, B. J., Reddy, A. K. N., & Gamboa-Aldeco, M. (2000). *Modern electrochemistry: fundamentals of electrodictics* (pp.1113).

Onaral, B., & Schwan, H. P. (1982). Linear and nonlinear properties of platinum electrode polarisation. Part 1: frequency dependence at very low frequencies. *Medical and biological engineering and computing*, 20(3), 299-306.

Orazem, M. E., & Tribollet, B. (2019). Electrochemical impedance spectroscopy. *Electrochemical Society Interface*, 18, 3, pp. 61-62.

Ostwald, W. (1980). *Electrochemistry: history and theory*, translation by Date NP from German original (*Elektrochemie: ihre Geschichte und Lehre*, published 1896).

Pettigrew JD, Konishi M (1976) Neurons selective for orientation and binocular disparity in the visual Wulst of the barn owl (*Tyto alba*). *Science* 193: 675–678.

Pettigrew, J. D. (1979). Binocular visual processing in the owl's telencephalon. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 204(1157), 435-454.

Porter, R., Adey, W. R., & Kado, R. T. (1964). Measurement of electrical impedance in the human brain: some preliminary observations. *Neurology*, 14(11), 1002-1012.

Rabbani, K. S., Sarker, M., Akond, M. H. R., & Akter, T. (1999). Focused impedance measurement (FIM): a new technique with improved zone localization. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 873(1), 408-420.

Rabbani, K. S., & Karal, M. A. S. (2008). A new four-electrode Focused Impedance Measurement (FIM) system for physiological study. *Annals of biomedical engineering*, 36(6), 1072-1077.

Rabbani, K. S. E., & Kadir, M. A. (2011). Possible Applications of Focussed Impedance Method (FIM) in biomedical and other areas of study. *Bangladesh Journal of Medical Physics*, 4(1), 67-74.

Ranck Jr, J. B. (1963). Specific impedance of rabbit cerebral cortex. *Experimental neurology*, 7(2), 144-152.

Ranck Jr, J. B. (1963). Analysis of specific impedance of rabbit cerebral cortex. *Experimental neurology*, 7(2), 153-174.

Ranck Jr, J. B. (1964). Specific impedance of cerebral cortex during spreading depression, and an analysis of neuronal, neuroglial, and interstitial contributions. *Experimental Neurology*, 9(1), 1-16.

Robillard, P. N., & Poussart, Y. (1977). Specific-impedance measurements of brain tissues. *Medical and Biological Engineering and Computing*, 15(4), 438-445.

Robinson, D. A. (1968). The electrical properties of metal microelectrodes. *Proceedings of the IEEE*, 56(6), 1065-1071.

Robinson, B. W., Bryan, J. S., & Rosvold, H. E. (1965). Locating Brain Structures: Extensions to the Impedance Method. *Archives of Neurology*, 13(5), 477-486.

Rzevkin, S. N. (1948). Progress in soviet acoustics. *Uspekhi fizicheskikh nauk*, 34(1), 1-12.

Schwan, H. P., & Kay, C. F. (1957). Capacitive properties of body tissues. *Circulation Research*, 5(4), 439-443.

Schwan, H. P. (1968). Electrode polarization impedance and measurements in biological materials. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 148(1), 191-209.

Schwan, H. P., & Ferris, C. D. (1968). Four-electrode null techniques for impedance measurement with high resolution. *Review of scientific instruments*, 39(4), 481-485.

Schwan, H. P. (1963). Physical techniques in biological research. *Electrophysiological Methods*, 6(pt B).

Schwan, H. P. (1966). Alternating current electrode polarization. *Biophysik*, 3(2), 181-201.

Schwan, H. P. (1999). The practical success of impedance techniques from an historical perspective. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 873(1), 1-12.

Schwan, H. P. (2013). Determination of biological impedances. *Physical techniques in biological research*, 6(Part B), 323-407.

Shalit, M., & Shebshin, d. (1965, january). Evaluation (in vivo) of some regional pathological conditions in brain tissue by characteristics of electrical impedance. in *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* (vol. 18, no. 3, p. 304). customer relations manager, bay 15, Shannon Industrial Estate CO, Clare, Ireland: Elsevier SCI Ireland Ltd.

Shalit, M. N., & Mahler, Y. (1966). Brain impedance measurements by the use of small bipolar needle electrodes. *Journal of Applied Physiology*, 21(4), 1237-1242.

Schmukler, R. (1992). A brief history of bioelectrodes. *Annals of biomedical engineering*, 20(3), 265-268.

Sluyters-Rehbach, M. (1994). Impedances of electrochemical systems: Terminology, nomenclature and representation-Part I: Cells with metal electrodes and liquid solutions (IUPAC Recommendations 1994). *Pure and applied chemistry*, 66(9), 1831-1891.

Srinivasan, S. (2006). *Fuel cells: from fundamentals to applications*. Springer Science & Business media.

Stock, J. T., Orna, M. V., Electrochemistry, P., & Present, A. C. S. (1989). *Symposium Series*.

Stock, J. T. (1989). *Electrochemistry in Retrospect: An Overview*.

Szekeres, K. J., Vesztergom, S., Ujvári, M., & Láng, G. G. (2021). Methods for the Determination of Valid Impedance Spectra in Non-stationary Electrochemical Systems: Concepts and Techniques of Practical Importance. *ChemElectroChem*, 8(7), 1233-1250.

Theremin, L. S., & Petrishev, O. (1996). The design of a musical instrument based on cathode relays. *Leonardo Music Journal*, 6(1), 49-50.

Wang, T. (2017). *Studies on the action potential from a thermodynamic perspective (Doctoral dissertation, University of Copenhagen, Faculty of Science, Niels Bohr Institute)*.

Warburg, E. (1899). Ueber das Verhalten sogenannter unpolarisierbarer Elektroden gegen Wechselstrom. *Annalen der Physik*, 303(3), 493-499.

Weinman, J., & Mahler, J. (1964). An analysis of electrical properties of metal electrodes. *Medical electronics and biological engineering*, 2(3), 299-310.

Wien, M. (1896). Ueber die Polarisation bei Wechselstrom. *Annalen der Physik*, 294(5), 37-72.

Wolff, I. (1926). A study of polarization capacity over a wide frequency band. *Physical Review*, 27(6), 755.

Yuan, X. Z. R., Song, C., Wang, H., & Zhang, J. (2009). *Electrochemical impedance spectroscopy in PEM fuel cells: fundamentals and applications*. Springer Science & Business Media, pg 38; 40-41; 45; 49; 50-56; 81-85; 98; 139-140.