

## CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DE MICROELETRODOS EM SONDAS NEURAIS BASEADAS NO POLÍMERO SU-8

J. A. B. Guevara\*, A. H. A. Malavazi\*, R. R. Panepucci\*\*, R. J. M. Covolan\*, F. Ely\*\*

\*Instituto de Física *Gleb Wataghin*, Campinas, Brazil

\*\* Centro de Tecnologia da Informação, Campinas, Brazil

e-mail: jesusarb@ifc.unicamp.com

**Resumo:** Sondas neurais são dispositivos capazes de realizar tanto registro quanto estímulo elétrico, *in vivo* ou *in vitro*. Na atualidade, existem vários tipos de materiais orientados para dar estrutura e funcionalidade a neurodispositivos. Foi utilizada a tecnologia de micro-fabricação para a produção de sondas baseadas no polímero SU-8. O objetivo deste trabalho é mostrar as propriedades eletroquímicas de macroeletrodos de Au/Cr, e microeletrodos de Au/Ti em sondas neurais, a partir do uso das técnicas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica. Tanto os macroeletrodos quanto os microeletrodos apresentaram processos quase-reversíveis, desta forma foi identificado um intervalo de segurança (-0,8 V até 0 V) em que os microeletrodos podem ser utilizados em registro (estímulo) eletrofisiológico. Além disso, verificou-se que o aumento da taxa de varredura acrescenta a quantidade de espécies eletroativas no metal. O valor médio da impedância obtido para os microeletrodos foi de  $26,6 \pm 5,5$  k $\Omega$  para 1kHz.

**Palavras-chave:** Sondas neurais, BioMEMS, eletroquímica, microeletrodos, macroeletrodos

**Abstract:** Neural probes are devices capable to perform recording as well as electrical stimulation, *in vivo* and *in vitro*. Currently, there are several types of materials oriented to give structure and functionality to neurodevices. We used microfabrication technology for production of a SU-8 polymer based probe. This work aims to show the electrochemical properties of Au/Cr macroelectrodes and neural probe's Au/Ti microelectrodes by using cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy measurements. Both macroelectrodes and microelectrodes showed quasi-reversible processes, thereafter we identified an interval (-0,8 V to 0 V) in which the microelectrodes could be used in electrophysiological recording (stimuli). Besides, it was found that increasing the scan rate adds the amount of electroactive species to the metal. The mean microelectrode's impedance was  $26,6 \pm 5,5$  k $\Omega$  at 1kHz.

**Keywords:** Neural probes, BioMEMS, electrochemical, microelectrodes, macroelectrodes.

### Introdução

O desenvolvimento de novas tecnologias aplicadas à pesquisa da atividade elétrica do cérebro é um dos tópicos de vanguarda em neurociências. Nas últimas década-

das, têm sido desenvolvidos dispositivos, chamados sondas neurais, que têm como base as técnicas atuais de produção e fabricação de BioMEMS (*biomedical microelectromechanical systems*) [1]. Estes dispositivos permitem registrar ou estimular eletricamente diferentes regiões do cérebro ou conjuntos isolados de células, tanto *in vivo* quanto *in vitro* [1,3]. A consolidação desta nova tecnologia fornece uma ferramenta de alta precisão para pesquisa em neurociência, além de permitir seu uso clínico em condições patológicas tais como lesão medular, acidente vascular cerebral e distúrbios neurológicos [1,3,4,5]. É de particular interesse o entendimento dos mecanismos subjacentes ao comportamento eletroquímico nos microeletrodos do dispositivo durante estímulo e registro da atividade neuronal. Além disso, é importante a investigação de materiais que forneçam, além de elevado grau de biocompatibilidade, condições adequadas de condução na interface eletrodo/neurônio para registro eletrofisiológico.

Em eletroquímica processos reativos que consistem em troca de elétrons em duas semireações são denominadas reações de oxidação-redução (REDOX). Uma célula eletroquímica é constituída de três eletrodos: um eletrodo de trabalho (WE), um de referência (RE) e um contra-eletrodo (CE), como representado na Figura 1.

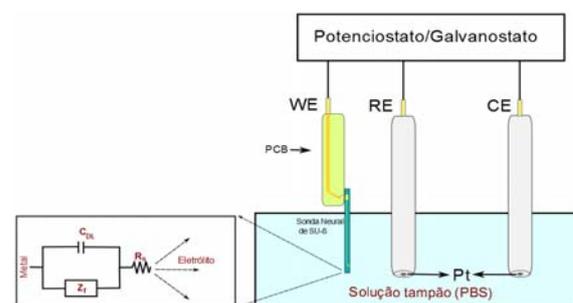


Figura 1: Esquema representativo da montagem de uma célula eletroquímica e seu circuito equivalente.  $C_{DL}$  é a dupla camada capacitiva,  $Z_f$  a impedância nos processos faradaicos no metal com a solução e  $R_s$  a resistência da solução tampão.

Note que na Figura 1 os microeletrodos da sonda neural funcionam como WE, enquanto os CE e RE são os eletrodos de platina [2,4]. Quando um macroeletrodo ou um microeletrodo de metal é imerso num meio eletrolítico, se estabelece um equilíbrio eletroquímico, convergindo para um sistema que pode ser modelado

com elementos de um circuito elétrico [3]. Os processos básicos dos mecanismos de transferência de carga na interface eletrodo/eletrólito podem ser faradaicos e/ou não-faradaicos [2]. Processos faradaicos estão associados com reações químicas entre o eletrodo/eletrólito, o qual injeta produtos na solução como efeito da oxidação-redução. Um processo faradaico denomina-se reversível se os produtos injetados no meio eletrolítico (corrente anódica) são recuperados com uma corrente invertida (corrente catódica). Caso não se consiga recuperar estes produtos eletroativos, o processo denomina-se faradaico não-reversível. Já um processo não-faradaico é dado pelo efeito de dupla camada de Gouy-Chapman, o qual é associado com uma redistribuição de cargas na interface eletrodo/eletrólito, expressado pela relação (1) [6,8].

$$\frac{1}{C_{DL}} = \frac{1}{C_H} + \frac{1}{C_G} \quad (1)$$

Onde  $C_H$  é a capacitância de Helmholtz gerada pela primeira camada de íons aderida no eletrodo ( $\sim 5 \text{ \AA}$ ) e  $C_G$  a capacitância associada pela distribuição difusiva dos íons no meio eletrolítico [8]. No caso dos microeletrodos de sondas neurais, é de interesse entender os processos eletroquímicos que sejam preferencialmente do tipo não-faradaicos ou faradaicos reversíveis, garantindo assim uma menor probabilidade de material residual no córtex cerebral. Assim, é possível determinar um intervalo de potencial de segurança sobre o qual o bioeletrodo deve-se trabalhar.

Quando é fixo um potencial em um eletrodo metálico imerso num meio eletrolítico, gera-se uma nova distribuição dos íons na solução, induzindo transporte de massa por consumo de espécies iônicas na interface eletrodo/eletrólito. Este transporte é dada pela soma de três contribuições: convecção, difusão e migração. Em meios biológicos, uma vez que os materiais utilizados são neutros, só o transporte difusivo é levado em conta, que por sua vez está associado com os potenciais químicos das espécies reativas. O gradiente de concentração total destas espécies é expressado pela primeira e segunda equações de Fick [2,6,8]. As soluções destas equações dependem das condições de fronteira do sistema e da geometria do campo difusivo. Por exemplo, no caso de microeletrodos circulares e planares considera-se adequado o uso de coordenadas esféricas. Assim, aplicando-se a transformada de Laplace nas equações, obtém-se que a corrente de transporte difusivo é dada por (2) [8]:

$$I_{dif} = \frac{4nFDc^\infty}{\pi a} + \frac{nFD^{1/2}c^\infty}{\pi^{1/2}t^{1/2}} \quad (2)$$

onde  $a$  é o raio do disco,  $r$  a distância entre a origem e um ponto no meio eletrolítico,  $D$  a constante difusiva,  $F$  a constante de Faraday,  $t$  o tempo e  $c^\infty$  a concentração infinita para um  $r > a$ .

### Materiais e métodos

**Macroeletrodos:** Para estudo macroscópico dos processos REDOX no metal foram fabricados e caracteri-

zados macroeletrodos de Au sobre substratos de quartzo. Inicialmente, depositou-se uma camada de 2- 20 nm de Cr para atuar como promotor de aderência. Em seguida, depositou-se aproximadamente 200 nm de Au policristalino por meio de *sputtering*. Com ataque corrosivo, foi realizada a abertura de macroeletrodos circulares com diâmetros de 1 cm. O comportamento eletroquímico destes macroeletrodos foi estudado por voltametria cíclica (VC). As medições foram feitas em um intervalo de potencial de -1,4 V até 0,8 V para diferentes taxas de varredura: 5 mV.s<sup>-1</sup>, 10 mV.s<sup>-1</sup> e 20 mV.s<sup>-1</sup>. Foram utilizados uma solução tampão de 1mM de KOH, a temperatura ambiente (25°C), e eletrodos de Pt como CE e RE.

**Microelectrodos:** As sondas neurais foram construídas a partir dos processos usuais de microfabricação e tecnologia MEMS [3]. Inicialmente foram projetadas e produzidas três máscaras litográficas de Cr. Utilizou-se como substrato base vidro ou Si sobre os quais depositou-se  $\approx 200$  nm de Al como metal sacrificial. O dispositivo foi construído baseando-se no uso do polímero SU-8 devido sua excelente biocompatibilidade [7]. A microfabricação do dispositivo foi realizada em três etapas principais: uma camada de SU-8 2 de aproximadamente 350 nm; uma etapa de metalização de  $\approx 400$  nm de Ti/Au, para gerar as interconexões elétricas e microeletrodos; finalmente uma camada de SU-8 50 de  $\approx 50$   $\mu\text{m}$  para isolar as regiões metalizadas do microdispositivo. Para a liberação das sondas do substrato utilizou-se KOH diluído e mantido a uma temperatura fixa de 70°C. A Figura 2 mostra uma sonda após o processo de liberação. Estes dispositivos contêm 8 microeletrodos de 28  $\mu\text{m}$  de diâmetro. As conexões elétricas entre a sonda de SU-8 e um circuito impresso foram realizadas por meio de microsolda. Um estudo mais detalhado dos processos de microfabricação das sondas está elucidado em outro trabalho submetido pelos mesmos autores neste mesmo congresso (843).

Para testar o funcionamento do dispositivo foram realizadas medições de VC e de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), em PBS (*phosphate-buffered saline*), para cada um dos oito microeletrodos (WE). Além disso, foram utilizados eletrodos de Pt como CE e RE. As medidas de VC foram realizadas para diferentes taxas de variação de voltagem e janelas de potencial enquanto que as medidas de EIE foram efetuadas no intervalo de 100 Hz até 100 kHz.

### Resultados

Nas medidas em KOH pretendia-se estudar o comportamento dos macroeletrodos de Au policristalino em diferentes taxas de varredura, como exposto na Figura 3.

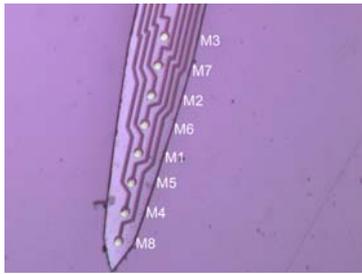


Figura 2: Microscopia ótica da sonda neural de SU-8. Cada microeletrodo foi enumerado conforme a imagem.

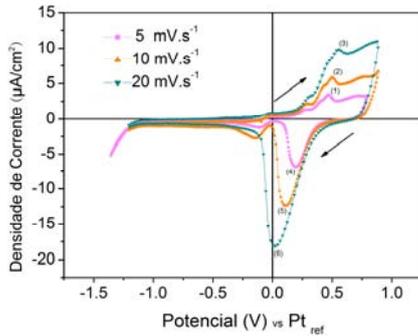


Figura 3: Medidas de VC de macroeletrodo de Au/Cr em KOH para várias taxas de varredura.

Na Figura 4 é possível observar as medidas de VC em PBS realizadas para cada um dos microeletrodos da sonda neural, com taxa de varredura de 100 mV.s<sup>-1</sup>, numa janela de potencial de -1,4 V até 0,8V.

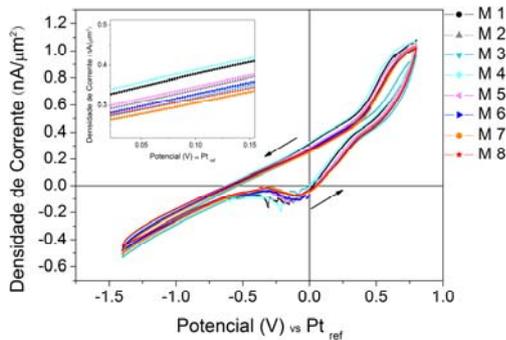


Figura 4: Medidas de VC em PBS para os 8 microeletrodos classificados entre M1-M8.

As Figuras 5, 6 e 7 mostram medições de VC em um microeletrodo (M1) a temperatura ambiente (25 °C) em PBS. Nas Figuras 5 e 6 foi utilizado uma taxa de varredura de 100 mV.s<sup>-1</sup>, em um intervalo de potencial de -1,5 V até 1 V e de -0,8 V até 0 V respectivamente. Já na Figura 7 foram utilizadas diferentes taxas de varredura: 5 mV.s<sup>-1</sup>, 20 mV.s<sup>-1</sup>, 50 mV.s<sup>-1</sup>, 70 mV.s<sup>-1</sup>, 80 mV.s<sup>-1</sup> e 100 mV.s<sup>-1</sup>. Foram feitas medidas de EIE sobre cada um dos microeletrodos entre 100 Hz até 100 kHz. A Figura 8 apresenta o valor médio do módulo da impedância ( $Z'$ ) dos microeletrodos.

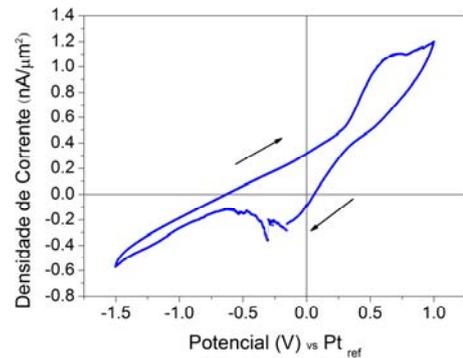


Figura 5: Medidas de VC do microeletrodo M1 no intervalo de -1,5 V até 1,0 V.

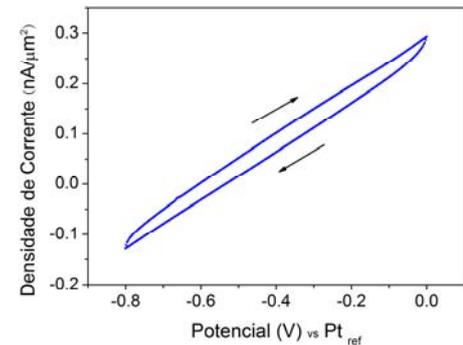


Figura 6: Medidas de VC do microeletrodo M1 com 100 mV.s<sup>-1</sup>, entre -0,8 V até 0 V.

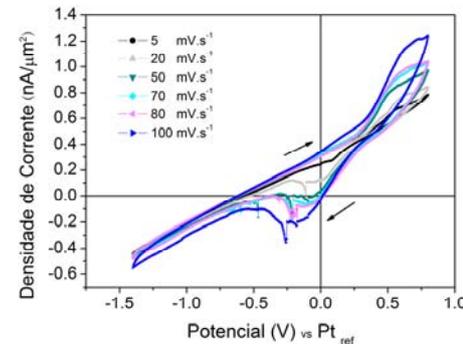


Figura 7: Medidas de VC do microeletrodo M1 para diferentes taxas de varredura.

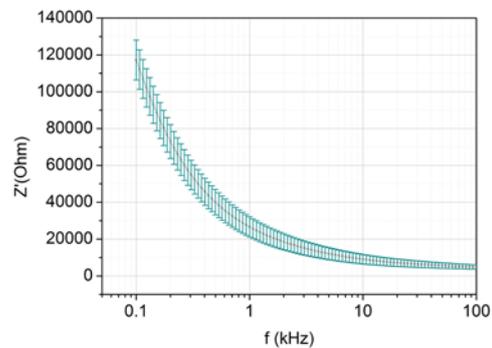


Figura 8: Média do módulo da impedância dos microeletrodos vs Frequência.

## Discussão

Observa-se que em medições de VC tanto para macroeletrodos (Figura 3) quanto para microeletrodos (Figuras 4 e 5) existe um efeito predominante de correntes difusivas. Na Figura 3 é possível observar que para cada taxa de varredura aparecem diferentes picos associados com a densidade de corrente anódica ( $i_a$ ) e densidade de corrente catódica ( $i_c$ ) dos processos REDOX. Estes picos foram enumerados de (1) a (6). Os valores de  $i_a$  obtidos (1-3) estão em torno de 3,42, 5,82 e 9,81  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ; para valores de  $i_c$  (4-6) estão em torno de 6,81, 12,36 e 18,14  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ .

Além disso, observa-se que o aumento da taxa de varredura gera um deslocamento positivo nos picos associados a  $i_a$  e deslocamento negativo para os picos associados a  $i_c$ . No intervalo aproximado de -1,2 V até 0,5 V é observado o comportamento típico de dupla camada capacitiva [6,8]. Na Figura 4 observa-se que as densidades de correntes de  $i_a$  e  $i_c$  mudam, o qual pode-se associar com possíveis alterações nas áreas de contato do metal durante a fabricação do dispositivo, possíveis defeitos na integridade física e a possível presença de Ti residual. Pode-se confirmar que os processos no metal são quase-reversíveis para todos os microeletrodos [3,8,9]. As medidas apresentadas na Figura 5 foram feitas entre -1,5 V e 1 V, com o fim de determinar os processos REDOX no metal. Observa-se que aparecem  $i_a$  e  $i_c$  próximos de 0,7 V e -0,2 V respectivamente. Além disso, nota-se a aparição de novos picos na densidade de corrente catódica, o qual pode-se assumir estar associado a resíduos de Ti. Na Figura 6 é apresentado uma janela de segurança no intervalo de -0,8 V até 0 V sobre o qual o microeletrodo garante unicamente processos não-faradaicos. Como mostrado na Figura 7, foram feitas medidas a várias taxas de varredura num microeletrodo na sonda (M1), verifica-se, de maneira qualitativa, a diminuição de densidades de correntes catódicas e anódicas além da diminuição da taxa de varredura, comportamento também observado por outros autores [9]. Para as medidas de EIE foram investigadas frequências baixas, onde tipicamente encontra-se o potencial de ação ( $f < 1$  kHz) [5]. Na Figura 8, obteve-se o valor médio do módulo da impedância dos microeletrodos na ordem de  $26,6 \pm 5,5$  k $\Omega$  para 1 kHz.

A partir dos dados anteriores é possível determinar tanto a viabilidade das sondas neurais para inserção no córtex quanto sua capacidade de registro (estímulo) em aplicações específicas. Os valores da impedância, por exemplo, determinam se os microeletrodos são capazes de registrar neurônios isolados (*single-unit*) ou conjuntos neuronais (*local field potential, multi-unit*), além de influenciar na relação sinal ruído.

Em suma, foi verificado que tanto para o macro quanto microeletrodos os processos REDOX são quase-reversíveis. Além disso, foi identificado um intervalo de segurança (-0,8 V até 0 V) em que os microeletrodos podem ser utilizados em experimentos eletrofisiológicos, já que apresenta predominantemente processos do tipo não-faradaicos (Figura 6). Verifica-se, também, que

o aumento da taxa de varredura acrescenta a quantidade de espécies eletroativas no metal. Entretanto, nota-se que os dados eletroquímicos podem ser sensíveis aos processos de microfabricação, já que alterações na área efetiva dos microeletrodos e resíduos de Ti na superfície do mesmo afetam a reprodutibilidade dos resultados (Figura 4). Por fim, a média do módulo da impedância obtida para a sonda neural de SU-8 a 1 kHz foi na ordem de  $26,6 \pm 5,5$  k $\Omega$ , tal valor está abaixo daqueles encontrados em sondas comerciais e apresentados em outros trabalhos [9]. Desta forma, o dispositivo poderia ser utilizado para registro de células individuais.

## Agradecimentos

JABG e AHAM agradecem o CNPq pela bolsa de estudos de mestrado; FAPESP pelo apoio financeiro (Grant 2013/07559-3); ao CTI, CCS, Lamult-IFGW e LNI-IFGW pela infraestrutura; Carlos Bortolo, Marinalva Rocha, Graça Almeida, Elaine Von Zuben, Marcia Finardi e Michele Odnicki pelo suporte técnico.

## Referências

- [1] H.P. Neves, G.A. Orban, M. Koudelka-Hep, and P. Ruther, "Development of multifunctional probe arrays for cerebral Applications," Proc. 3rd Int. IEEE EMBS Conf. on Neural Engineering 2007, pp 104–109, 2007.
- [2] Bard, A.J. & Faulkner, L.R., 2006. Electrochemical methods: fundamentals and applications, ISBN 8126508078 Albazaar
- [3] Stuart F. Cogan, "Neural Stimulation and Recording Electrodes", Annu. Rev. Biomed. Eng. 2008. 10:275–309.
- [4] Saba Mohtashami, "Electrochemical properties of flexible electrodes for implanted neuromuscular excitation applications", thesis Master, McMaster University, N° xv 93 August 2011.
- [5] Myer Kutz, "Standard Handbook of Biomedical Engineering & Design" McGRAW-HILL, 2003 The McGraw-Hill Companies, Inc, chapter 17.
- [6] S. Moulton, J. N. Barisci, A. Bath, R. Stella, and G. G. Wallace, "Studies of double layer capacitance and electron transfer at a gold electrode exposed to protein solutions," Electrochimica Acta, vol. 49, no. 24, pp. 4223–4230, 2004.
- [7] Krishnamurthy V. Nemani, et al., "In vitro and in vivo evaluation of SU-8 biocompatibility," Materials Science and Engineering, C 33 (2013) 4453–4459.
- [8] Irene, et al. "Microelectrodes: Theory and Applications", 1991, XIII, 497 p.
- [9] Ane Altuna, et al. "SU-8 based microprobes for simultaneous neural depth recording and drug delivery in the brain", Lab Chip, 2013, 13, 1422, January 2013.