Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Márcio Rafael Rodrigues Souto

OPTRODE EM SILÍCIO COM μ-LED INTEGRADO

Dissertação de Mestrado

Mestrado Integrado em Engenharia Eletrónica Industrial e Computadores

Trabalho efetuado sob a orientação do

Doutor João Ribeiro

Julho de 2018

DECLARAÇÃO

Nome: Márcio Rafael Rodrigues Souto

Endereço eletrónico: marcio_souto_94@hotmail.com

Telefone: 934477592

Cartão do Cidadão: 14620266

Título da dissertação: Optrode em silício com μ-LED integrado

Orientadores:

Doutor João Ribeiro

Ano de conclusão: 2018

Mestrado em Engenharia Eletrónica Industrial e Computadores

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Universidade do Minho, ____ /____ /_____

Assinatura:

Agradecimentos

Na realização desta dissertação, deixo o meu profundo e sincero agradecimento a múltiplas pessoas e instituições que tornaram o cumprir deste desafio possível, correndo o risco de, injustamente, não mencionar algum dos contributos.

Ao meu orientador, doutor João Ribeiro, pela orientação prestada, incentivo, disponibilidade, pelo apoio contínuo que sempre demonstrou ao longo do desenvolvimento desta dissertação e por indicar o melhor caminho desde o início até ao fim desta caminhada. Aqui deixo expressa a minha profunda gratidão.

À doutora Sara Pimenta pela co-orientação prestada, nomeadamente na área da ótica.

Ao projeto *"Brain-Lighting"* pelo despertar de novos interesses e conhecimento adquirido.

Aos meus colegas de laboratório pela ajuda e prontidão prestadas, pela manipulação de equipamentos necessários para os processos de fabrico, pela partilha de conhecimentos, pelo ótimo ambiente criado no trabalho ao longo deste ano, e, sobretudo, pela amizade.

A Deus, aos meus pais, Cidália e Manuel, e à minha irmã Sara, a todos, obrigado pela oportunidade que me deram de ingressar a vida académica, pelo esforço nestes anos para fosse possível abraçar este desafio, pelo enorme amor, pelo carinho, pela paciência e pelo apoio incansável ao longo desta etapa. A minha enorme gratidão.

À minha namorada, Mar, pelo apoio incondicional, amor, incentivo, por nunca deixar de acreditar em mim e, sobretudo, pela enorme paciência que teve comigo nos momentos mais complicados desta jornada. Um agradecimento profundo, por tudo.

Aos meus amigos, pelos excelentes momentos proporcionados ao longo destes anos académicos. Pela folia, pelos momentos de estudo até altas horas da madrugada, pela animação constante, pela ajuda, por tudo, a todos eles, um enorme obrigado.

Palavras são poucas, a todos um enorme obrigado!

Resumo

Nos dias que correm, as sondas neuronais são amplamente utilizadas na área da neurociência para estudar o comportamento e mapeamento cerebral bem como desmistificar a origem de doenças associadas ao foro neurológico. O aperfeiçoamento de novos métodos de fabrico das sondas neuronais e a investigação de novos materiais tem como objetivo procurar a melhor forma de inserir implantes neuronais provocando o mínimo impacto possível no cérebro e extraindo o máximo de informação.

A optogenética é uma técnica que combina a capacidade de leitura elétrica dos neurónios nas sondas neuronais com ótica e genética. A genética é usada para inserir proteínas nos neurónios (denominadas de *opsinas*) e torná-los sensíveis à luz num determinado comprimento de onda. As sondas neuronais para utilização em optogenética devem ser capazes de aplicar luz aos neurónios (estimulador/inibidor, dependendo da *opsina* e comprimento de onda da luz), ao mesmo tempo que fazem a leitura elétrica dos sinais neuronais. As sondas neuronais para utilização em optogenética são denominadas de optrodes.

O objetivo principal desta dissertação é o desenvolvimento de um optrode em substrato de silício para estimulação/leitura cerebral profunda. O optrode terá vários μ-elétrodos (pontos de leitura) e um μ-LED com o intuito de realizar a estimulação/inibição dos neurónios através da emissão de luz num determinado comprimento de onda. As técnicas de fabrico utilizadas para o fabrico do optrode foram a litografia (para padronização dos μ-elétrodos, pistas e contactos), a deposição de filmes-finos por deposição física de vapor (para formar os μ-elétrodos, pistas e contactos) e o corte com lâmina para definir a geometria do optrode.

O optrode foi caracterizado realizando testes a nível da mecânica, ótica, eletroquímica e resistência às condições da aplicação. A caraterização mecânica do optrode foi realizada medindo a força aquando da sua inserção/desinserção em gelatina agar-agar e cérebro de vitelo cadáver. A caracterização ótica foi realizada medindo a curva de emissão e a intensidade de luz do μ-LED acoplado no optrode. A caracterização eletroquímica foi conseguida através de espectroscopia de impedância dos μ-elétrodos, utilizando a sua impedância a 1 kHz (frequência à qual os neurónios interagem) como referência. A resistência às condições da aplicação foi testada submetendo o optrode a condições adversas e comparáveis com as do cérebro, realizando testes de espetroscopia de impedância aos μ-elétrodos ao longo do tempo.

Abstract

Nowadays, neural probes are widely used in the field of neuroscience to study brain behaviour and mapping as well as to demystify the origin of neurological diseases. The improvement of neural probes through new manufacture methods and the investigation of new materials aims to reduce the impact of probe's insertion in the brain and extracting the maximum of information.

Optogenetics is a technique that combines the neurons electrical recording in neural probes with optics and genetics. Genetics are used to insert proteins into neurons (called opsins) and make them sensitive to light at a given wavelength. Neural probes for use in optogenetics should be able to deliver light to neurons (stimulator/inhibitor, depending on opsin and light wavelength), while recording the neurons electrical signal. Neural probes for use in optogenetics are called optrodes.

The main objective of this dissertation is to develop an optrode in silicon substrate for deep brain stimulation/recording. The optrode will have several μ-electrodes (recording points) and a μ-LED in order to stimulate/inhibit the neurons through the emission of light at a given wavelength. The manufacturing techniques used for optrode fabrication were lithography (for patterning of μ-electrodes, connection lines and contacts), deposition of thin films by physical vapour deposition (to form μ-electrodes, connection lines and contacts) and dicing cut to define the optrode geometry.

The optrode was characterized by performing tests in mechanics, optics, electrochemistry and resistance to application conditions. The mechanical characterization of the optrode was performed by measuring the force upon insertion/removal into gelatine agar agar and calf brain cadaver. The optical characterization was performed by measuring the light intensity of the μ-LED coupled to the optrode. Electrochemical characterization was achieved by impedance spectroscopy of μ-electrodes, using their impedance at 1 kHz (frequency at which neurons interact) as a reference. Resistance to application conditions was tested by subjecting the optrode to adverse conditions comparable to those of the brain, performing impedance spectroscopy tests on μ-electrodes over time.

Índice

Agradecimentos iii

Resumo v

Abstract vii

Índice ix

Índice de figuras xiii

Índice de tabelas xviii

Índice de equações xviii

Nomenclatura xix

1. Introdução 1

1.1. Sondas neuronais 1

1.2. Optogenética 4

1.3. Apresentação e descrição do projeto 5

1.4. Objetivos e tarefas 6

1.5. Organização da dissertação 7

1.6. Lista de publicações 8

2. Estado de arte 9

2.1. Micro-fios 9

2.2. Sondas planares baseadas em silício (Si) 10

2.3. Sondas tridimensionais baseadas em Si 11

2.4. Sondas desenvolvidas no grupo 12

2.5. Sondas flexíveis 16

2.5.1. BCB (benzocyclobutene) 16

2.5.2. Polydimethylsiloxane (PDMS) 18

2.5.3. SU-8 19

2.5.4. Parylene 20
2.5.5. Poliimida (PI) 21
2.6. Outras sondas 26
2.7. Dispositivos optogenéticos 27
2.7.1. Fibra ótica 27
2.7.2. Guia de onda 29
2.7.3. μ-LED's 30
2.7.4. Laser 33
2.7.5. Lâmpadas incandescentes 34
3. Métodos e metodologias 35
3.1. Modelo do optrode 35
3.1.1. Requisitos do optrode 35
3.1.2. Protótipo 39
3.2. Materiais 40
3.2.1. Substrato 40
3.2.2. μ-elétrodos 43
3.2.3. Encapsulamento 43
3.3. Tecnologias 44
3.3.1. Fotolitografia 44
3.3.2. Corte com lâmina 47
3.3.3. Deposição física de vapor (PVD) 48
4. Fabrico do optrode 51
4.1. Preparação das amostras 51
4.2. Litografia para as pistas/contactos 52
4.2.1. Limpeza do substrato 52
4.2.2. Deposição do polímero fotossensível 53
4.2.3. Primeira cura 53
4.2.4. Reidratação 54
4.2.5. Exposição ótica 54
4.2.6. Cura pós exposição 55
4.2.7. Revelação do polímero fotossensível 55
4.3. Deposição de Ti/Al/Pt 56

4.4. Remoção do polímero fotossensível negativo 57
4.5. Litografia para o encapsulamento 58
4.5.1. Deposição por centrifugação 58
4.5.2. Evaporação de solventes e primeira cura 59
4.5.3. Reidratação 59
4.5.4. Exposição ótica 59
4.5.5. Corte da estrutura 60
4.5.6. Revelação do polímero fotossensível 61
4.6. Encapsulamento da parte de cima da agulha 62
4.7. Abertura dos μ-elétrodos 63
4.8. Acoplamento do μ-LED no optrode 64
4.9. Acoplamento do optrode na PCB 66
4.10. Encapsulamento da parte de baixo da agulha 66
4.11. Discussão e resultados 67
5. Caraterização do optrode 69
5.1. Caraterização mecânica 69
5.1.1. Gelatina agar-agar 70
5.1.2. Cérebro de vitelo cadáver 72
5.1.3. Teste de compressão longitudinal e axial 75
5.2. Caraterização ótica 76
5.2.1. Curva de emissão do μ-LED 77
5.2.2. Ângulo de emissão 79
5.2.3. Potência do μ-LED 80
5.3. Caraterização eletroquímica 83
5.4. Resistência do optrode às condições da aplicação 85
6. Conclusões e trabalho futuro 89
6.1. Conclusões 89
6.2. Trabalho futuro 92
Bibliografia 93

Anexo A..... 97

Anexo B..... 109

Índice de figuras

Figura 1: Variedade de aplicações das sondas neuronais: 1 - tratamento da doença de Parkinson; 2 - próteses neuronais; 3 - Pacemaker cerebral; 4 - investigação de doenças cerebrais e 5 - experiências cognitivas [4]. 2
Figura 2: Ilustração de células neuronais com: a) estimulação neuronal elétrica; b) estimulação neuronal ótica; c) inibição neuronal ótica [9]. 4
Figura 3: Exemplo de uma matriz de micro-fios produzida pela Plexon [5]. 9
Figura 4: Sonda planar baseada em Si desenvolvida na Universidade de Michigan [8]. 10
Figura 5: Matriz de Utah (à esquerda). Elétrodos revestidos pelo isolamento com exposição das pontas de Pt (à direita) [13]. 11
Figura 6: Matriz de Utah com diferentes comprimentos de agulhas [13]. 12
Figura 7: Estrutura final da matriz de μ-elétrodos [14]. 12
Figura 8: Parte de tás da matriz em Al [14]. 13
Figura 9: Vista detalhada das agulhas na matriz em Al [14]. 13
Figura 10: Matriz tridimensional de 6 x 6 em Si [15]. 14
Figura 11: Resultado após mergulhar a matriz na solução aquosa de KOH [16]. 15
Figura 12: Resultado final da matriz de elétrodos por termomigração [16]. 15
Figura 13: À esquerda vê-se a totalidade da sonda neuronal fabricada por Lee. À direita vê-se os μ-elétrodos (pontos de leitura) da mesma sonda neuronal [19]. 16
Figura 14: a) Implante neuronal baseado em BCB; b) Visão em corte do canal de microfluídica embebido no meio da estrutura de Si [19]. 17
Figura 15: Exemplo da interface neuronal muscular desenvolvida por Liang [20]. 18
Figura 16: Imagens gerais e detalhadas da sonda neuronal de SU-8 com estrutura em forma de "J" [21]. 19
Figura 17: Sonda neuronal baseada em parylene com integração de microfluídica [22]. 21
Figura 18: a) Matriz de μ-elétrodos ligada ao conetor ZIF; b) Corte transversal das camadas da matriz de μ-elétrodos [23]. 23
Figura 19: Processo de fabrico de sondas neuronais em PI desenvolvido por Jin-Hee Moon: a) deposição de PI na bolacha de Si; b) padronização da base; c) deposição de Au/Ti; d) padronização dos filmes de

Au/Ti; e) deposição de PI; f) remoção das sondas de PI; g) sondas de PI entre filmes de kapton® e pratos de vidro; h) remoção final das sondas de PI após cura total [24]. 24
Figura 20: a) Imagem da sonda em PI e dos locais de gravação; b) Sonda totalmente curado (esquerda) e sonda sem processo de cura total (direita) [24]. 24
Figura 21: Módulo de elasticidade do cérebro, nervos e de alguns dos materiais mais utilizados para a base das sondas neuronais [13]. 26
Figura 22: Cabo de fibra ótica para implante crónico desenvolvido na Universidade de Harvard [1]. 28
Figura 23: Esquema da interface ótica neuronal inserido no crânio de um rato [1]. 29
Figura 24: Optrode com guia de onda integrado [25]. 30
Figura 25: a) Imagem do optrode pronto a ser implantado no tecido neuronal; b) imagem da agulha do optrode com os μ-LED's acesos; c) ponta da agulha e dimensões [7]. 31
Figura 26: À esquerda é apresentada a distribuição da intensidade do μ-LED e à direita é apresentada a distribuição da potência ótica do μ-LED durante a estimulação ótica no cérebro [7]. 31
Figura 27: Processo de fabrico do optrode a) camadas p-GaN, n-GaN depositadas numa bolacha de Si (111); b) zona destinada ao μ-LED e abertura de contato de n-GaN; c) padronização de Ti/Al/Ti/Au para linhas de interconexão; d) deposição de SiO_2 no local do μ-LED; e) deposição de camada dupla de óxido e padronização de elétrodos de Ti/Ir; f) DRIE para definir as dimensões da haste do optrode; g) desbaste traseiro para libertar as sondas da bolacha de Si [7]. 32
Figura 28: Matriz 10 x 10 elétrodos para estimulação ótica [13]. 33
Figura 29: Sonda neuronal com díodo laser como fonte emissora de luz [28]. 34
Figura 30: Ilustração das leituras: a) do potencial local; b) do potencial de ação. 36
Figura 31: Representação esquemática do cérebro de um rato onde ficará implantado o optrode [14]. 37
Figura 32: μ-LED ELC-470-37: a) parte frontal e dimensões; b) base do μ-LED e dimensões dos contactos. 38
Figura 33: μ-LED C470DA232: a) parte frontal e dimensões: b) base do μ-LED e dimensões dos contactos. 38
Figura 34: Representação do modelo proposto para o optrode. 39
Figura 35: Objeto: a) antes de ser sujeito a uma força; b) resultado da deformação quando sujeito a forças distensíveis. 41
Figura 36: Curva típica tensão/deformação de um material [34]. 42
Figura 37: Orientação dos cristais das bolachas de Si do tipo n e tipo p segundo o respetivo índice de Miller (a vermelho). 42

Figura 38: Exposição do polímero fotossensível positivo à luz UV através de uma máscara de luz e respetivo resultado. 44
Figura 39: Exposição do polímero fotossensível negativo à luz UV através de uma mascara de luz e respetivo resultado. 45
Figura 40: Equipamento: a) de centrifugação POLOS utilizado para deposição do polímero fotossensível; b) placa de aquecimento Präitherm PZ23-2 da empresa Harry Gestigkeit GmbH. 46
Figura 41: Equipamento para exposição de luz UV (Karl SUSS MUB3). 46
Figura 42: a) Equipamento utilizado para o corte com lâmina da estrutura do optrode (DISCO DAD-2H/6T); b) Representação do corte com lâmina e respetivos parâmetros de entrada. 47
Figura 43: Deposição de um filme num substrato por feixe de eletrões. 49
Figura 44: Deposição de um filme num substrato por pulverização catódica. 50
Figura 45: Câmara de vácuo utilizada para a deposição através de feixe de eletrões e pulverização catódica. 50
Figura 46: a) Processo de corte da bolacha de silício; b) amostras após corte com lâmina. 52
Figura 47: Máscara utilizada no processo litográfico das pistas e contactos: a) completa; b) zona dos contactos e cruzes de alinhamento superiores; c) zona dos µ-elétrodos e cruzes de alinhamento inferiores. 54
Figura 48: Processo litográfico: a) deposição do polímero fotossensível negativo; b) exposição da amostra à luz UV através de uma máscara de luz; c) resultado final após revelação. 55
Figura 49: Disposição das amostras no suporte da câmara de deposição. 56
Figura 50: Deposição dos filmes metálicos: a) deposição de Ti por feixe de eletrões; b) deposição de Al por feixe de eletrões; c) deposição de Pt por pulverização catódica. 57
Figura 51: Configuração da placa de agitação/aquecimento com sensor de temperatura para remoção do polímero fotossensível. 58
Figura 52: Máscara utilizada no processo litográfico de encapsulamento: a) completa; b) zona dos contactos; c) zona dos µ-elétrodos. 60
Figura 53: Esquema de corte da estrutura do optrode. 61
Figura 54: Processo litográfico para encapsulamento: a) deposição do polímero fotossensível positivo; b) exposição da amostra à luz UV através de uma máscara de luz; c) resultado final. 62
Figura 55: Disposição das amostras no suporte da câmara de deposição. 62
Figura 56: Processo de remoção do polímero: a) amostra após sair do revelador; b) deposição de Si_3N_4; c) remoção do polímero com acetona e abertura da área dos µ-elétrodos. 63
Figura 57: Resultado do encapsulamento dos µ-elétrodos com Si_3N_4. 63

Figura 58: a) Resultado de uma amostra mal alinhada durante a exposição ótica do encapsulamento; b) imagem ampliada das zonas expostas e zonas encapsuladas dos µ-elétrodos. 64
Figura 59: Fixação do optrode durante a soldadura do µ-LED. 64
Figura 60: Contactos do µ-LED com a pasta de solda Kester EM907. 65
Figura 61: Resultado final do acoplamento do µ-LED no optrode; a) µ-LED ELC-470-37; b) µ-LED C470DA2432; c) adesivo instantâneo colocado por cima do µ-LED para proteção dos contactos. 65
Figura 62: PCB e conector A79014-001 da empresa Omnetics. 66
Figura 63: a) optrode acoplado à PCB; b) resina epóxi assinalada a vermelho para proteger os fios do wire-bonding. 66
Figura 64: Disposição do optrode no suporte antes de ser colocada no forno. 67
Figura 65: Resultado final do optrode com as dimensões obtidas. 68
Figura 66: Ponta da agulha do optrode e as suas dimensões. 68
Figura 67: Optrode desenvolvido com µ-LED ELC-470-37 aceso. 68
Figura 68: Configuração utilizada na implantação do optrode na gelatina agar-agar. 70
Figura 69: Relação força tempo para diferentes velocidades: a) 0.89 mm/s; b) 2 mm/s; c) 3 mm/s. 71
Figura 70: Configuração adotada para os testes de implantação em cérebro de vitelo cadáver. 72
Figura 71: Relação força tempo para velocidades de: a) 0.89 mm/s; b) 2 mm/s e c) 3 mm/s. 73
Figura 72: Tentativa de implantação sem remoção da dura. 74
Figura 73: Testes de compressão longitudinal: a) configuração adotada; b) resultado dos testes. 75
Figura 74: Testes de compressão axial: a) configuração adotada; b) gráfico resultante. 76
Figura 75: Configuração adotada no teste de medição da curva do µ-LED. 77
Figura 76: a) Circuito de alimentação dos µ-LED's; b) introdução de parâmetros para o varrimento do comprimento de onda de 350 nm a 550 nm. 78
Figura 77: Resultados da curva de emissão dos µ-LEDs. 78
Figura 78: Configuração adotada na medição do ângulo de emissão do µ-LED. 79
Figura 79: Curva do ângulo emissão do µ-LED: a) curva do ângulo de emissão ELC-470-37 representada a azul; b) curva do ângulo de emissão C470DA2432 representada a preto. 80
Figura 80: Teste de potência do µ-LED: a) configuração adotada no teste de potência do µ-LED; b) isolamento da luz ambiente durante a realização dos testes. 80
Figura 81: Potência emitida por cada um dos µ-LED's em função da corrente aplicada. 82
Figura 82: Sistema adotado para a caraterização eletroquímica dos µ-elétrodos do optrode. 83
Figura 83: Disposição dos µ-elétrodos no optrode. 84

Figura 84: Diagrama de bode dos resultados do teste EIS ao μ-elétrodo 1; a) impedância b) fase. 85
Figura 85: Configuração adotada no teste de resistência às condições da aplicação. 86
Figura 86: Gráfico da variação da impedância registada ao longo do tempo..... 87

Índice de tabelas

Tabela 1: Causas do dano causado por um implante baseado em Si e respetivo efeito colateral [4]. 3
Tabela 2: Propriedades físicas da PI, PDMS, Si, parylene-C, BCB e Su-8. Os valores foram retirados de estudos realizados por Stieglitz (2000), Mata (2005) e Armani (1999) [18]. 25
Tabela 3: Parâmetros a introduzir no dispositivo de corte e a respetiva função..... 48
Tabela 4: Parâmetros do equipamento de centrifugação para um filme de 7 µm de AZ® nLOF 2070. 53
Tabela 5: Parâmetros do aparelho de centrifugação para um filme de 20 µm de AZ® 4562. 59
Tabela 6: Força compressiva e distensível média para implantação em gelatina agar-agar a diferentes velocidades. 72
Tabela 7: Força compressiva e distensível média para implantação em cérebro de vitelo cadáver a diferentes velocidades. 74
Tabela 8: Potência obtida para cada um dos µ-LED's em função da corrente aplicada. 81
Tabela 9: Impedância obtida no teste EIS para cada um dos µ-elétrodos. 84
Tabela 10: Resultados do teste de aceleração do tempo de vida realizados ao optrode. 87

Índice de equações

Equação 1..... 37
Equação 2..... 40
Equação 3..... 41
Equação 4..... 81
Equação 5..... 85
Equação 6..... 86
Equação 7..... 86
Equação 8..... 87

Nomenclatura

Lista de acrónimos	Inglês	Português
BCB	Benzocyclobutene	-
ChR2	Channelrhodopsin-2	-
CMOS	Complementary metal-oxide-semiconductor	Semicondutor óxido de metal
CVD	Chemical vapour deposition	Deposição química de vapor
DNA	Deoxyribonucleic acid	Ácido desoxirribonucleico
DRIE	Deep reactive-ion etching	-
EIS	Electrochemical Impedance Spectroscopy	Espetroscopia de Impedância
LED	Light emitting diode	Díodo emissor de luz
IPA	Isopropyl alcohol	Isopropanol
MEMS	Microelectromechanical systems	Sistemas microeletromecânicos
NpHR	Halorhodopsin	-
PBS	Phosphate Buffered Saline	-
PCB	Printed circuit board	Placa de circuito impressa
PDMS	Polydimethysiloxane	-
PVD	Physical vapour deposition	Deposição física de vapor
RIE	Reactive-ion etching	Corrosão química por iões
SOI	Silicon on insulator	-
UV	Ultraviolet	Ultravioleta
ZIF	Zero insertion force	Força de inserção zero

Lista de símbolos		
Símbolo	Inglês	Português
Ag	Silver	Prata
AgCl	Silver chloride	Cloreto de prata
Al	Aluminium	Alumínio
A	Area	Área
Au	Gold	Ouro
$(C_2F_4)_n$	Polytetrafluoroethene	Teflon
Cr	Chromium	Crómio
CO_2	Carbon dioxide	Dióxido de carbono
E	Young's modulus	Módulo de elasticidade
F	Force	Força
h	Planck constant	Constante de Planck
Ir	Iridium	Irídio
K_a	Boltzman constant	Constante de Boltzman
KOH	Potassium hydroxide	Hidróxido de potássio
L	Lenght	Comprimento
Ni	Nickel	Níquel
PEDOT	Ethylenedioxythiophen	-
PI	Polyimide	Poliimida
Pt	Platinum	Platina
SiO_2	Silicon dioxide	Dióxido de silício
Si_3N_4	Silicon nitride	Nitreto de silício
Ti	Titanium	Titânio
W	Tungsten	Tungsténio
ε	Elastic deformation	Deformação elástica
σ	Strain	Tensão

1. Introdução

No presente capítulo será apresentado um conceito introdutório de sondas neuronais e optogenética, o propósito desta dissertação bem como as motivações adjacentes ao fabrico do optrode. Serão ainda mencionados os objetivos a atingir e a organização estrutural do documento.

1.1. Sondas neuronais

O cérebro é um órgão em constante investigação devido à falta de conhecimento e mistério envolvente em torno do seu funcionamento. As doenças neuronais emergem como sendo um dos pontos que despertam maior curiosidade em compreender a sua origem bem como a necessidade de encontrar soluções menos invasivas para a sua descoberta/tratamento.

No tratamento de doenças neuronais é importante identificar qual o aglomerado de células que contribui para um determinado comportamento/ação para que, numa instância seguinte, se possa inibir/excitar esse mesmo grupo de neurónios. Desta forma é possível, de uma forma mais precisa, efetuar o controlo de circunstâncias particulares das células do tecido vivo. A realização incorreta da estimulação neuronal pode causar ao cérebro efeitos colaterais irreversíveis. Por exemplo, a estimulação profunda do tálamo pode levar ao aparecimento de tonturas, cólicas musculares ou distúrbios de equilíbrio no movimento [1].

O primeiro caso conhecido de tratamento de doenças neuronais utilizando corrente elétrica remete ao ano de 1757 [2]. Foi conduzido por Benjamin Franklin para tratar pacientes com paralisia nos membros, recorrendo ao uso de choques elétricos. Mais tarde, em 1939, Hodgkin e Huxley documentaram a primeira gravação do potencial de ação no interior de um nervo [2]. O mesmo grupo, em 1952, descreveu detalhadamente o mecanismo de excitação dos nervos e subsequente geração de potenciais de ação [3].

O desenvolvimento de sondas neuronais é realizado há cerca de meio século e, sendo atualmente uma tecnologia mais madura em termos de processos de fabrico, serve como uma alternativa relativamente aos clássicos micro-fios [4]. A investigação constante de métodos de fabrico, novas estruturas ou materiais fez com que as sondas neuronais se tornassem mais densas, funcionais e confiáveis. Desta forma, as sondas neuronais não servem apenas para a gravação da atividade extracelular ou estimulação cerebral, dispondo de outras finalidades como mapeamento do cérebro,

restauro de funções neuronais e investigação de anomalias cerebrais [4]. Na figura 1 observa-se algumas aplicações das sondas neuronais [4].

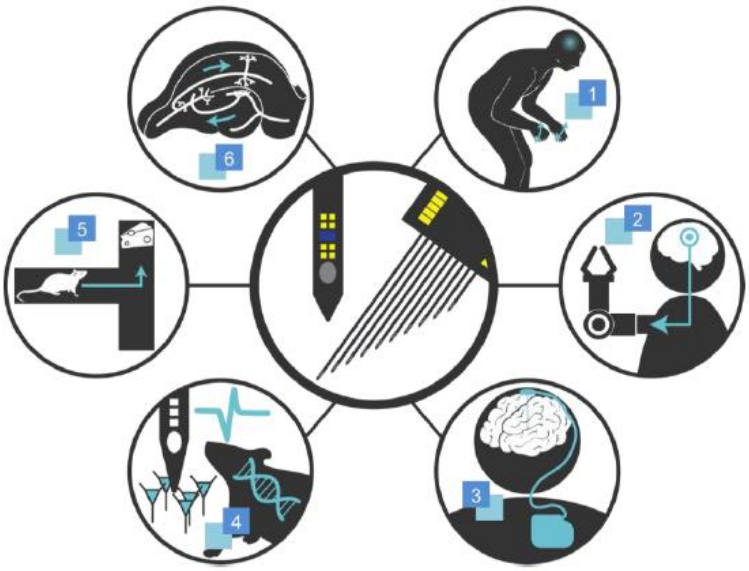
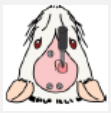
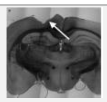
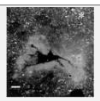
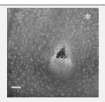
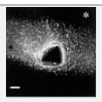


Figura 1: Variedade de aplicações das sondas neuronais: 1 - tratamento da doença de *Parkinson*; 2 - próteses neuronais; 3 - Pacemaker cerebral; 4 - investigação de doenças cerebrais e 5 - experiências cognitivas [4].

O maior entrave das sondas neuronais de hoje em dia é a sua fiabilidade a longo prazo [4]. A resposta do tecido cerebral à inserção do implante (corpo estranho) afeta substancialmente os resultados recolhidos. Na tabela 1 é possível encontrar uma relação causa-efeito dos danos causados por um implante baseado em silício (Si) antes, durante e após a sua inserção no cérebro de um rato.

Atualmente, o desafio passa não só pela correta gravação e estimulação dos neurónios, mas também pela procura de novas soluções que minimizem o impacto invasivo do implante [4].

Tabela 1: Causas do dano causado por um implante baseado em Si e respetivo efeito colateral [4].

Estágio	**Antes do Implante**	**Durante o implante**	**Depois do implante (< 1 semana)**	**Depois do implante (> 1 semana)**
Procedimento *in vivo*				
Esquemática				
Potenciais causas do dano	-Perfuração do crânio	-Impacto da inserção -Vibração mecânica durante o implante -Células mortas	-Micromovimentos	-Micromovimentos -Macromovimentos -Corrosão
Efeitos causados	-Excisão indesejada do tecido cerebral -Contaminação da superfície do elétrodo devido ao sangramento	-Células mortas -Hemorragia -Início de uma inflamação	-Resposta inflamatória aguda -Instabilidade da interface elétrodo-tecido	-Resposta crónica ao corpo estranho -Criação de uma zona morta em torno do implante
				

1.2. Optogenética

A estimulação elétrica é o método mais utilizado para interagir com o tecido neuronal, no entanto, a dificuldade em delimitar quantitativamente as células neuronais a serem controladas levou à procura de uma nova técnica que detivesse maior precisão espacial e temporal [5]. O aperfeiçoamento de novas técnicas de fabrico e descoberta de novas tecnologias levou à descoberta de um novo método de estimulação celular, utilizando a luz, ao invés da corrente elétrica. A este método inovador, que combina a ótica com a genética, atribui-se o nome de optogenética [5].

Na optogenética são utilizadas proteínas sensíveis à luz que são designadas como opsinas. As opsinas são inseridas no cérebro com o intuito de marcar o conjunto de neurónios a que se pretende realizar excitação/inibição. Uma das proteínas utilizadas na optogenética para ativação neuronal é a *channelrhodopsin-2* (ChR2) e requer que as fontes de luz emitam comprimentos de onda na gama dos 400 a 500 nm [6]–[8] A ChR2 pode marcar as células alvo por transformação (inserção de ácidos nucleicos dentro de células eucarióticas), transdução ou desenvolvendo ácido desoxirribonucleico (DNA) transgénico nos laboratórios [6], [8].

Na inibição da atividade celular utiliza-se normalmente a proteína *halorhodopsins* (NpHR) [6]–[8]. A ativação desta proteína requer emissão de luz com um espetro compreendido entre os 550 e 620 nm [6], [8] As proteínas de excitação/inibição celular encontram-se no espetro da luz visível, correspondendo ao azul e ao amarelo, respetivamente (figura 2) [6].

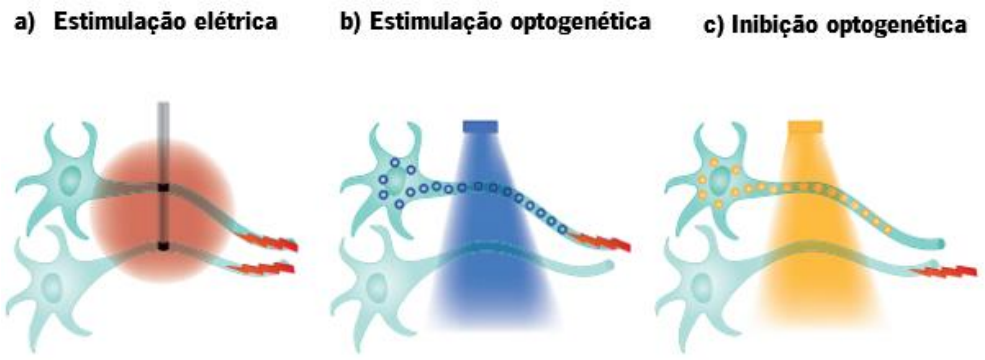


Figura 2: Ilustração de células neuronais com: a) estimulação neuronal elétrica; b) estimulação neuronal ótica; c) inibição neuronal ótica [9].

1.3. Apresentação e descrição do projeto

A tecnologia MEMS encontra-se empregue em diversas áreas. Nesta dissertação, a tecnologia MEMS é utilizada para o fabrico de sondas neuronais capazes de interagir com o sistema nervoso central ao nível celular. O desenvolvimento e aperfeiçoamento de novas técnicas no ramo da neurociência levou ao encontro de tecnologias que realizassem a estimulação dos neurónios. Um dos principais desafios dos investigadores é determinar qual a ligação entre toda a atividade neuronal e o seu comportamento [1].

Nos últimos anos o desafio passa pela produção de sondas neuronais, através da abordagem de novas técnicas e métodos de fabrico, que causem o menor dano possível no cérebro, extraiam o máximo de informação e que tenham um baixo custo de produção. Outro ponto crucial é o facto de os materiais escolhidos conferirem biocompatibilidade e longevidade à sonda neuronal de forma a não desencadear reações alérgicas no tecido biológico onde ficará implantada.

Ao longo dos últimos anos as sondas neuronais tornaram-se uma ferramenta chave na gravação dos potenciais de ação dos neurónios e estimulação de determinadas regiões do cérebro. A gravação e estimulação de neurónios utilizando sondas neuronais nas zonas cortical e sensorial do cérebro ajudou a melhorar a compreensão do comportamento do sistema nervoso bem como a sua organização somatossensorial [10].

A presente dissertação encontra-se enquadrada na área de investigação da engenharia neuronal com o intuito de estudar e enriquecer o conhecimento que possuímos acerca do cérebro. Esta dissertação está inserida no projeto de investigação “Brain Lighting”, que tem como objetivo principal desenvolver uma matriz de optrodes sem fios em substrato de Si para estimulação/leitura profunda do cérebro. O optrode em desenvolvimento vai estimular as células através de um μ-LED e realizar as leituras através de μ-elétrodos (pontos de leitura).

1.4. Objetivos e tarefas

O objetivo principal desta dissertação é o desenvolvimento de um optrode em substrato de Si para estimulação profunda, onde será acoplado um μ-LED. O optrode será concebido utilizando os recursos disponíveis no laboratório de microtecnologias do Departamento de Eletrónica Industrial da Universidade do Minho. De seguida encontram-se os pontos a serem explorados ao longo do projeto:

- Estudo do estado da arte e das tecnologias a serem utilizadas;
- Desenvolvimento de um processo de fabrico para um optrode com vários μ-elétrodos e um μ-LED para aplicação em optogenética;
- O optrode deverá ter como base o substrato de Si, μ-elétrodos em platina (Pt) e a agulha deverá ser encapsulada com um material biocompatível;
- Confeção de um método simples que permita o desenvolvimento de um optrode com comprimento superior a 6 mm e largura inferior a 1 mm;
- Caraterização mecânica, ótica, eletroquímica e resistência às condições de aplicação do optrode;
- Escrita da dissertação.

A forma geométrica do optrode será obtida recorrendo à técnica de corte com lâmina através da utilização do equipamento DISCO DAD-2H/6T, disponível no laboratório. Tanto os passos principais como os intermédios, desde a fotolitografia às deposições e ao acoplamento do μ-LED serão otimizados. A caraterização mecânica será realizada, submetendo o optrode a forças axiais e longitudinais de compressão e distensão. A caraterização ótica será realizada recorrendo aos equipamentos power meter 1918-R da empresa Newport, monocromador (74125 da empresa Newport), fotodíodo detetor (71675 da empresa Newport) fotodíodo (FDS100-CAL da empresa ThorLabs) acoplado a um orifício de 1 mm de diâmetro. Na caraterização ótica serão estudados parâmetros como o pico de emissão do comprimento de onda, potência ótica e ângulo de emissão dos μ-LED's C470DA2432 e ELC-470-37. A caraterização eletroquímica dos μ-elétrodos será concretizada recorrendo ao teste de espetroscopia de impedância. A resistência do optrode relativamente às condições de aplicação será realizada utilizando testes de aceleração do tempo de vida. Os testes de resistência às condições da aplicação consistem em expor o optrode a condições comparáveis às encontradas no cérebro e medir a impedância dos μ-elétrodos ao longo do tempo.

No desenvolvimento do optrode existem várias tarefas e processos. Nesta dissertação pretende-se que fique documentada toda a informação referente ao fabrico do optrode, apesar de algumas tarefas terem sido efetuadas por investigadores do projeto "Brain Lighting". Nomeadamente, o corte com lâmina,

a deposição de filmes-finos e o *wire-bonding* ficaram a cargo de outros investigadores presentes no laboratório. Os restantes processos, nomeadamente, os dois processos litográficos, o acoplamento do μ-LED ao optrode, o acoplamento do optrode à PCB, a caracterização mecânica, ótica e eletroquímica foram realizadas no âmbito desta dissertação. A caracterização da resistência do optrode às condições da aplicação foi realizada em conjunto com um investigador do projeto.

1.5. Organização da dissertação

A presente dissertação divide-se em 6 capítulos e dois anexos. No primeiro capítulo encontra-se a apresentação e descrição adjacentes à realização da tese bem como uma breve introdução aos conceitos de sondas neuronais e optogenética. Neste capítulo serão ainda apontados os objetivos a atingir com o projeto, referenciando, por fim, publicações em revista submetidas e um póster resultantes do trabalho desenvolvido na presente dissertação.

O segundo capítulo aborda o estado de arte das sondas neuronais existentes, desde a sua descoberta até à atualidade. Neste capítulo são descritos os processos de fabrico necessários para a conceção das sondas neuronais e a sua aplicabilidade na área da neurociência. Estão ainda presentes neste capítulo noções de optogenética, inclusive os dispositivos optogenéticos que têm vindo a ser utilizados na estimulação ótica neuronal.

O terceiro capítulo refere quais os métodos e metodologias adotados para a concretização do optrode. Durante o capítulo serão indicados os requisitos e modelo proposto para o optrode bem como os materiais e tecnologias utilizados nos processos de fabrico.

No quarto capítulo são apresentados os passos, de forma detalhada, dos processos de fabrico e os resultados obtidos.

O quinto capítulo mostra as diferentes caraterizações (mecânica, ótica, eletroquímica, resistência ao longo do tempo) à qual se submeteu o optrode bem como uma explanação dos resultados.

O sexto capítulo aborda as conclusões acerca do trabalho realizado durante o desenvolvimento da dissertação. Serão também apresentadas considerações que possam vir a ser tomadas num futuro com o intuito de melhorar o que já foi cumprido.

Por fim, os anexos A e B representam as receitas de fabrico do optrode em silício com μ-LED integrado e em substrato de poliimida, apontado como trabalho futuro.

1.6. Lista de publicações

M. R. Souto, H. C. Fernandes, N. M. Gomes, S. Pimenta, S. B. Goncalves, M. F. Silva, J. F. Ribeiro, J. H. Correia, "*Silicon-based neural probe with an integrated μ-LED*", Encontro Ciência 2018, Lisboa, Portugal, 2-4 julho 2018.

Publicações em revista:

S. Pimenta, H. C. Fernandes, S. B. Goncalves, M. R. Souto, A. M. Loureiro, J. M. Palha, Z. Yang, T. Dong, A. M. Goncalves, N. A. P de Vasconcelos, P. Monteiro, J. F. Ribeiro, J. H. Correia, "*In-vivo electrophysiology by a low-cost neural probe with scalable recording sites*", Sensors, MDPI, minor revisions.

S. B. Goncalves, J. M. Palha, H. C. Fernandes, M. R. Souto, S. Pimenta, J. F. Ribeiro, J. H. Correia, "*μLED optrode with integrated temperature sensing for optogenetics*", IEEE Sensors Journal, submetido.

H. C. Fernandes, S. B. Goncalves, S. Pimenta, J. M. Palha, M. R. Souto, J. F. Ribeiro, J. H. Correia, "*Silicon neural probe passivation materials for reliable chronic recording*", Materials Science & Engineering C, Elsevier, submetido.

2. Estado de arte

2.1. Micro-fios

Os primeiros elétrodos implantáveis, destinados à gravação da atividade neuronal, surgiram em 1950 e eram constituídos por micro-fios afiados de metal [5]. A sua estrutura fina permitiu que fossem colocados muito próximos dos neurónios *in vivo*, causando o mínimo dano possível no tecido cerebral. Os micro-fios são isolados, exceto nas pontas, para assim gravar o máximo possível do potencial extracelular dos neurónios junto à ponta ou ainda para injetar corrente de estimulação a fim de excitar os neurónios ao seu redor [11].

Os micro-fios eram fabricados utilizando diferentes metais como aço inoxidável, tungsténio (W), Pt, irídio (Ir) ou ouro (Au) [6]. O material utilizado para o isolamento dos micro-fios é geralmente poliimida (PI) ou teflon ($(C_2F_4)_n$). Numa experiência conduzida por Strumwasser utilizaram-se micro-fios de aço inoxidável com 80 μm de diâmetro para gravar descargas elétricas de neurónios individuais de animais não anestesiados, durante cerca de uma semana [12].

Nos dias de hoje ainda são utilizados micro-fios, mantendo-se praticamente inalterados os métodos de fabrico [6]. A utilização de matrizes de micro-fios permite a gravação de uma grande área de neurónios, sendo uma das suas vantagens o acesso às zonas profundas do cérebro tratando doenças como a epilepsia, *Parkinson* ou paralisia. Por outro lado, as desvantagens da utilização desta técnica é o facto dos micro-fios se dobrarem durante o implante levando a que a precisão da localização dos elétrodos uns relativamente aos outros não seja controlável [6].

Na figura 3 encontra-se exibida uma matriz de micro-fios produzida pela Plexon onde cada um dos seus fios apresenta um diâmetro de 50 μm [6].

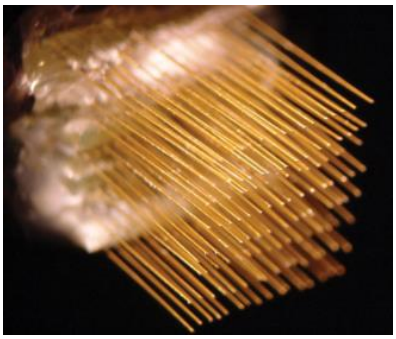


Figura 3: Exemplo de uma matriz de micro-fios produzida pela Plexon [5].

2.2. Sondas planares baseadas em silício (Si)

A invenção da litografia em 1959 levou ao aparecimento de novos processos de fabrico de sondas neuronais que permitiram efetuar simultaneamente a gravação e estimulação extracelular de um conjunto de neurónios [12]. A combinação da litografia com a tecnologia de microfabricação de Si permitiu a criação de sondas neuronais com alta densidade de gravação [12].

A tecnologia CMOS que utiliza técnicas de fotolitografia em bolachas de Si levou ao aparecimento de sondas neuronais baseadas em Si. O objetivo do desenvolvimento das sondas neuronais é a fixação da sonda durante o processo do implante no cérebro, algo que não acontecia com os micro-fios, levando à gravação de resultados muitas vezes pouco fiáveis [7].

A primeira sonda neuronal baseada em Si foi fabricada na Universidade de Michigan na década de 1970 e é apresentada na figura 4 [11]. O material do substrato e a forma da sonda neuronal permitiram a fácil incorporação em circuitos integrados, interfaces sem fios ou processamento de sinal. A sonda é feita em substrato de Si, escolhido por ter dureza suficiente para penetrar o cérebro e compatibilidade com os processos de fabrico. É composta por quatro µ-elétrodos responsáveis pela gravação e estimulação neuronal. O substrato de Si tem 15 µm de espessura, 3 mm de comprimento e 90 µm de largura. A área de gravação dos µ-elétrodos situa-se entre os 100 e 400 μm^2 [11].

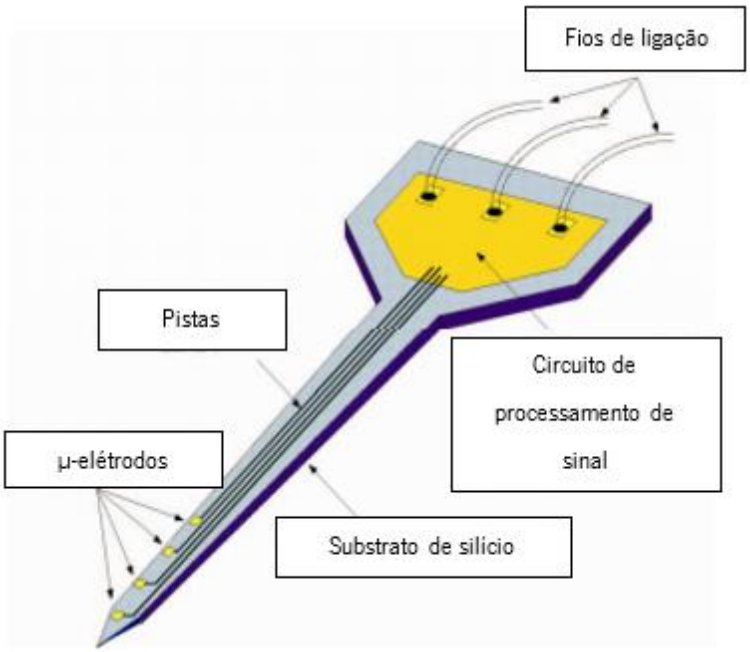


Figura 4: Sonda planar baseada em Si desenvolvida na Universidade de Michigan [8].

O material utilizado para os μ-elétrodos foi o Ir e o Au, revestidos com polímeros condutores como polypyrolle (PPy) ou ethylenedioxythiophene (PEDOT) para aumentar o desempenho da sonda neuronal a longo prazo bem como a sua durabilidade. Estes μ-elétrodos apresentam a vantagem de ter uma grande resolução espacial relativamente aos micro-fios na gravação dos impulsos neuronais, no entanto, a inserção da agulha no córtex cerebral poderá provocar danos no tecido neuronal [11].

2.3. Sondas tridimensionais baseadas em Si

A matriz de Utah é classificada como sendo uma sonda tridimensional constituída por 100 agulhas de Si orientadas verticalmente e é apresentada na figura 5 [13]. Foi concebida para gravar uma vasta quantidade de neurónios. Cada uma dessas agulhas é encapsulada com PI com o intuito de oferecer biocompatibilidade ao dispositivo sendo o material dos elétrodos composto por Pt.

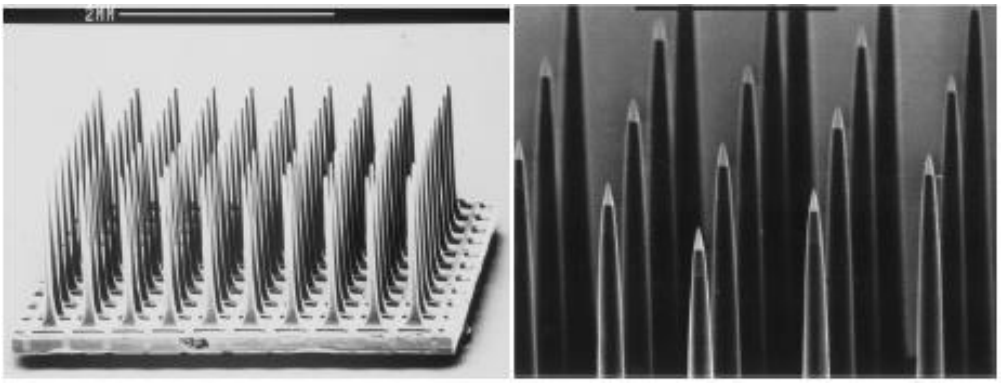


Figura 5: Matriz de Utah (à esquerda). Elétrodos revestidos pelo isolamento com exposição das pontas de Pt (à direita) [13].

A matriz de Utah é realizada sobre uma bolacha de Si do tipo n onde a criação de caminhos p+ surge por termo migração [13]. A bolacha é micromecanizada para expor os caminhos p+ como agulhas finas utilizando o corte por lâmina, realizando-se de seguida a corrosão química. O contacto elétrico é realizado na parte de trás da estrutura utilizando um fio de Au isolado. Esta sonda foi desenvolvida em 1991 por Campbell *et al* e a matriz (10 x 10) foi implementada no córtex auditivo e visual de gatos [13]. Cada agulha apresenta uma dimensão de 4.2 x 4.2 x 0.12 mm (largura x comprimento x altura, respetivamente).

Outra tipologia da matriz de Utah pode ser visualizada na figura 6 [7]. Apresenta agulhas de diferentes comprimentos (desde 0.5 a 1.5 mm) permitindo a excitação de neurónios a diferentes

profundidades. Foi utilizada numa experiência conduzida por Badi em 2003 sendo implementada no nervo coclear [13].

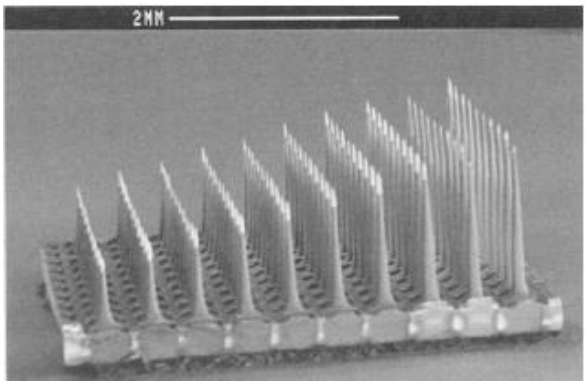


Figura 6: Matriz de Utah com diferentes comprimentos de agulhas [13].

2.4. Sondas desenvolvidas no grupo

Em 2015, Alexandre Peixoto do centro CMEMS da Universidade do Minho realizou a sua tese de doutoramento denominada "*High-aspect-ratio tridimensional electrode arrays for neural applications*" [14]. Neste projeto, Alexandre desenvolveu uma sonda tridimensional com o objetivo de chegar a zonas do cérebro com uma profundidade situada entre os 2 e os 4 mm [14]. A matriz neuronal concebida era composta por 100 agulhas com uma matriz de 10 x 10 (ver figura 7). A matriz apresentava 10 mm de largura, 5 mm de espessura e 3 mm de comprimento. O material utilizado no substrato da matriz de μ-elétrodos foi o alumínio (Al) com 99% de pureza. Cada agulha foi coberta por óxido de Ir na ponta para oferecer estabilidade na estimulação e gravação da atividade neuronal.

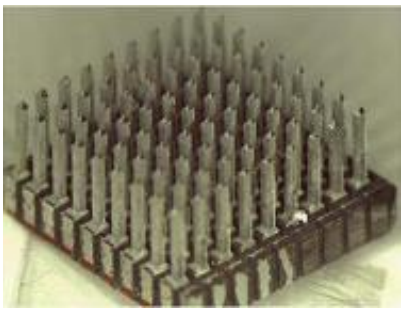


Figura 7: Estrutura final da matriz de μ-elétrodos [14].

No fabrico da estrutura da matriz aplicaram-se diversas técnicas como o corte com lâmina, deposição física de vapor, passivação eletrolítica, deposição de polímeros e corrosão em solução aquosa

[14]. O fabrico da matriz começou pela definição dos contactos (parte de trás) e forma da estrutura utilizando-se a técnica de corte com lâmina (ver figura 8). O espaço entre cada agulha era de 1 mm. No final desta etapa, as cavidades foram preenchidas com resina epóxi para isolamento elétrico, mantendo os elétrodos emparelhados numa única estrutura.

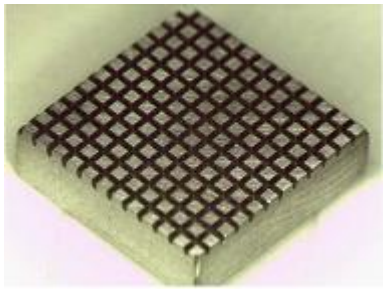


Figura 8: Parte de tás da matriz em Al [14].

Na parte da frente da matriz foi usado o conte com lâmina para formar as agulhas com 3 mm de altura e 350 µm de largura. A distância entre cada uma das agulhas era também de 1 mm para coincidir com a parte de trás da matriz. Após realizados os cortes, as agulhas apresentavam uma forma quadrada. De forma a facilitar a penetração no cérebro, efetuaram-se cortes para que a ponta da agulha ficasse em forma de "V". A forma final das agulhas pode ser verificada na figura 9.

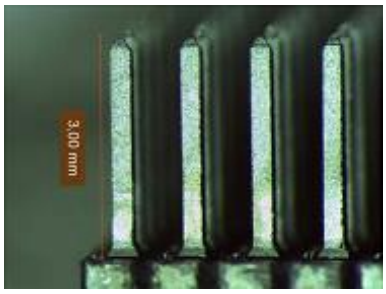


Figura 9: Vista detalhada das agulhas na matriz em Al [14].

Após os cortes com lâmina, uma vasta quantidade de resíduos de Al ficou depositada entre as agulhas [14]. Para limpar os resíduos, imergiu-se a matriz numa solução aquosa de corrosivo de Al tipo A durante 30 minutos a uma temperatura de 30 °C. No final deste processo verificou-se uma redução do tamanho das agulhas para 250 µm. De seguida depositou-se uma camada de 307 nm de Au na ponta das agulhas. Para garantir que somente a ponta se encontrava exposta para a deposição utilizou-se uma folha de Al como máscara de sombra.

Na última etapa do fabrico da matriz procedeu-se ao seu encapsulamento. Devido ao Al não ser um material biocompatível, através de um processo de passivação eletrolítica realizou-se a oxidação do Al. Desta forma, além da matriz se tornar biocompatível, ficou também mais robusta [14].

Matriz com diferentes tamanhos de agulha

Alexandre Peixoto desenvolveu também uma matriz de 6 x 6 elétrodos fabricada num substrato de Si do tipo p com 5 mm de espessura [15]. A estrutura apresenta três diferentes comprimentos de agulhas: 3 mm, 3.5 mm e 4 mm. É dividida em três regiões distintas, a base, o corpo da matriz e a de penetração que será utilizada para estimulação e gravação em diferentes profundidades do cérebro [15].

O processo de fabrico é semelhante ao usado na primeira matriz de Al, usando o corte com lâmina para definir os contactos na parte de trás da matriz e para definir as agulhas com estrutura em "V" na parte da frente da matriz. Através do corte com lâmina foram também conseguidas as três diferentes alturas das agulhas. Após terminada a etapa de corte cobriu-se a matriz com uma epóxi médica adesiva que conferiu biocompatibilidade ao dispositivo após o processo de cura.

O processo seguinte visou a conversão das agulhas de Si em elétrodos que realizassem a estimulação e gravação neuronal. Para isso depositaram-se duas camadas: uma de 50 nm de titânio (Ti) e a outra de 200 nm de Pt, criando uma camada de transdução. O filme-fino de Ti serve de camada de adesão e foi depositado por feixe de eletrões. O filme-fino de Pt serve de camada de transdução e foi depositado por pulverização catódica. A matriz final de elétrodos foi conseguida removendo o excesso de epóxi médico, resultando em dimensões de agulhas com 180 x 180 μm^2 e profundidades de 3 mm, 3.5 mm e 4 mm. O resultado final pode ser conferido na figura 10.



Figura 10: Matriz tridimensional de 6 x 6 em Si [15].

Matriz utilizando termomigração

A terceira matriz de μ-elétrodos fabricada por Alexandre Peixoto utilizou um processo de termomigração [16]. Iniciou-se o fabrico pelo corte com lâmina numa bolacha de Si do tipo n (100) com 4 mm de espessura. As agulhas tinham as dimensões de 0.2 x 0.2 x 0.3 mm (comprimento x largura x altura) [16]. Para a forma afiada das agulhas (figura 11) mergulhou-se o elétrodo durante 4 horas numa solução aquosa com 30% de concentração de hidróxido de potássio (KOH) a 90° C de temperatura.



Figura 11: Resultado após mergulhar a matriz na solução aquosa de KOH [16].

No processo seguinte recorreu-se à fotolitografia para a padronização de quadrados de Al e deposição de um filme fino na base inferior do substrato de Si. A combinação de uma fonte de calor por baixo do substrato e um sistema de convecção de arrefecimento por cima dele dá origem a um elevado gradiente térmico dando origem ao processo de termomigração [16].

Um segundo processo de corte em lâmina tem o objetivo de gerar os espaços entre cada agulha de Si. As pontas das agulhas da matriz foram revestidas com Au. A matriz de elétrodos foi concebida com potencial para aplicações na área da neuroprostética. O aspeto final da matriz encontra-se na figura 12.



Figura 12: Resultado final da matriz de elétrodos por termomigração [16].

2.5. Sondas flexíveis

Ao longo dos anos desenvolveram-se uma vasta quantidade de µ-elétrodos para gravar e observar as atividades neuronais. Umas das adversidades do implante de µ-elétrodos são os pontos de contacto do tecido-elétrodo [17]. A discrepância entre a rigidez do tecido neuronal e o material utilizado no substrato do µ-elétrodo dificulta os micromovimentos do cérebro levando a feridas crónicas e à formação de cicatrizes em torno do local do implante [17]. Por este motivo, ao longo dos últimos anos, tem aumentado o interesse no desenvolvimento de µ-elétrodos que utilizem polímeros como material para o substrato e encapsulamento. Entre esses polímeros é possível destacar a PI, benzocyclobutene (BCB), polydimethylsiloxane (PDMS), parylene, e SU-8 [18].

2.5.1. BCB (benzocyclobutene)

Este polímero apresenta diversas caraterísticas interessantes para aplicações crónicas como a flexibilidade, biocompatibilidade, boas propriedades dielétricas e químicas ou ainda boa impermeabilidade à humidade [19]. É também um material que pode ser facilmente trabalhado utilizando as tecnologias de microfabricação já existentes.

Em 2004 Lee desenvolveu e testou um implante neuronal revestido por BCB com canais de microfluídica integrados para o transporte de medicamentos [19]. A sonda neuronal fabricada apresenta uma agulha constituída por 3 µ-elétrodos de gravação com dimensões de 20 µm x 20 µm (comprimento x largura) [19]. O implante neuronal apresenta, na totalidade, um tamanho de 11 mm e uma espessura de aproximadamente 25 a 30 µm. Além disso, a sonda neuronal contém também dois depósitos (de entrada e saída) para a colocação do fluído a ser colocado no cérebro, como já foi referido anteriormente. A figura 13 apresenta a sonda fabricada por Lee [19].

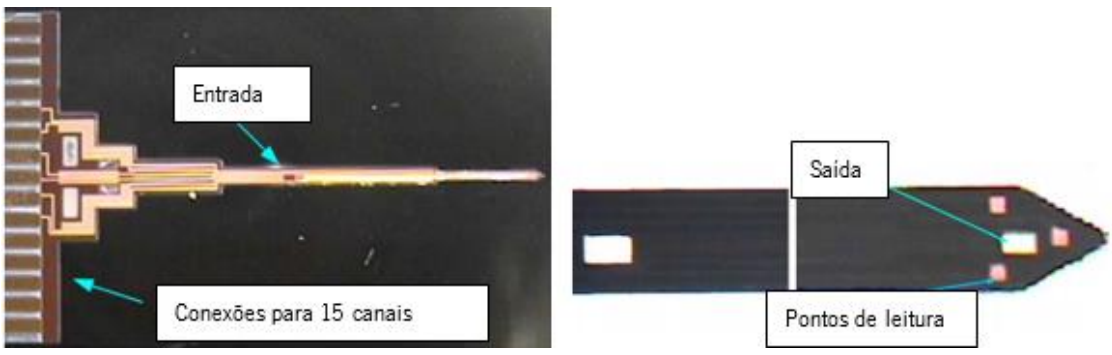


Figura 13: À esquerda vê-se a totalidade da sonda neuronal fabricada por Lee. À direita vê-se os µ-elétrodos (pontos de leitura) da mesma sonda neuronal [19].

Os elétrodos constituídos por BCB puro apresentam problemas aquando da sua inserção no cérebro devido à sua falta de rigidez. Para solucionar este problema foi fabricada uma estrutura de Si com a espessura entre 5 e 10 µm que foi anexada à região do elétrodo pretendida para aumentar a sua rigidez [19].

O fabrico da sonda apresentada na figura 14 começou pelo canal de transporte de fluídos [19]. Para isso utilizou-se inicialmente um substrato de silicon-on insulator (SOI) de 5 a 10 µm de espessura onde foi infundida uma camada de 1 µm de dióxido de silício (SiO_2). Primeiramente, a parte de cima da estrutura de Si, foi gravada em RIE utilizando uma máscara de polímero fotossensível. Após dissolução do polímero fotossensível, uma camada sacrificial de AZ® 4620 (polímero fotossensível) foi depositada através do aparelho de centrifugação, definindo o canal de microfluídica. De seguida depositou-se uma cama de 2 µm de parylene-C para prevenir que os solventes de BCB atacassem a camada sacrificial. A primeira camada de BCB fotossensível foi depositada por centrifugação, seguida de processos de exposição, cura e revelação. Utilizou-se Au para os locais de gravação pois possui uma ótima inércia superficial e não oxida [19].

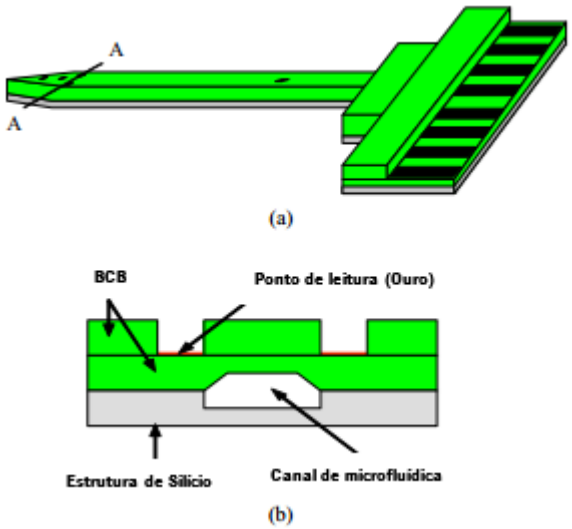


Figura 14: a) Implante neuronal baseado em BCB; b) Visão em corte do canal de microfluídica embebido no meio da estrutura de Si [19].

Os testes citológicos realizados às células declararam que o substrato não é tóxico para o seu crescimento. O elétrodo apresentou um valor médio de impedância de 1.2 MΩ à frequência de 1 kHz. Por fim os testes mecânicos foram efetuados com sucesso, onde a sonda neuronal penetrou o crânio sem causar qualquer dano cerebral no rato [19].

2.5.2. Polydimethylsiloxane (PDMS)

O PDMS é uma mistura de polímeros que é amplamente utilizado na indústria dos cosméticos [20]. Recentemente, este polímero, mostrou propriedades mecânicas interessantes para a área da neurociência [20].

Em 2013, Liang Guo desenvolveu uma matriz de elétrodos para efetuar a comunicação entre o cérebro e os músculos [20]. O objetivo de Liang passou pela conceção de um dispositivo que ficasse fixado na superfície do tecido neuronal (ver figura 15). O propósito final passa pela utilização da matriz de μ-elétrodos na área da neuroprostética. Assim, o material utilizado teria de ser flexível o suficiente para se adaptar aos micromovimentos do cérebro de forma a não o danificar [20]. O PDMS destaca-se assim do Si, BCB e parylene pela sua elevada flexibilidade.

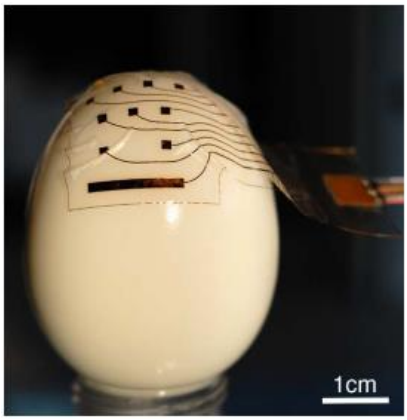


Figura 15: Exemplo da interface neuronal muscular desenvolvida por Liang [20].

No processo de fabrico da interface destes μ-elétrodos neuronais utilizaram-se duas camadas de PDMS intercaladas com filmes finos com aberturas para a criação de contactos e pistas de Pt e Au. A utilização de duas camadas (uma base e outra de isolamento) permite uma fácil personalização da camada intercalar, sendo adaptável a várias geometrias. Um dos problemas da utilização do PDMS como substrato é a conceção de circuitos elétricos integrados no próprio material bem como a criação de ligações de alta densidade.

Em 2010, Liang Guo, já havia desenvolvido um novo método para a criação de ligações de alta densidade no PDMS [20]. Por conseguinte, aproveitou o método desenvolvido anteriormente para a conceção da interface neuronal [20]. No processo de fabrico utilizou-se, inicialmente, a técnica de feixe de eletrões para deposição de uma camada antiaderente por cima de um substrato de vidro cujas dimensões escolhidas foram de 75 x 50 x 1 mm (comprimento x largura x espessura). As camadas de PDMS foram depositadas através da técnica de centrifugação durante 30 segundos com uma velocidade

de 450 rpm. De seguida realizou-se o processo de cura, deixando a amostra numa placa de aquecimento durante uma hora com a temperatura de 60 °C e outra a 80 °C. De forma a curar totalmente, a amostra permaneceu um total de 12 horas à temperatura ambiente [20].

O circuito de processamento dos sinais adquiridos pelos elétrodos foi assimilado numa placa de circuito impresso (PCB) que foi integrada no próprio substrato de PDMS. Na comunicação para o exterior foram colocados fios soldados à placa PCB e esta foi isolada com uma camada de PDMS em ambos os lados. A espessura final da interface neuronal muscular fixou-se nos 60 µm [20]. As conclusões retiradas da realização deste sistema apontam a sua aplicabilidade em próteses retinianas e ECoG onde é requerida elevada resolução e densidade de µ-elétrodos [20].

2.5.3. SU-8

O SU-8 é, a par de outros polímeros, um dos materiais explorados na última década para o fabrico de µ-elétrodos neuronais flexíveis. Em 2008, Sung-Hoon Cho em conjunto com outros investigadores, desenvolveu uma sonda neuronal para gravar sinais de axónios dentro dos nervos periféricos (ver figura 16) [21]. O implante destes µ-elétrodos é aplicado sobretudo à área da neuroprostética [21]. Esta sonda neuronal foi desenhada com o intuito de limitar o número de fibras expostas à superfície do elétrodo de forma a selecionar de forma mais específica quais as fibras a serem estimuladas. As dimensões da sonda apresentavam um comprimento de 5 mm e 240 µm de largura. Cada elétrodo tinha 500 µm de comprimento, 12 µm de largura e 10 µm de profundidade [21].

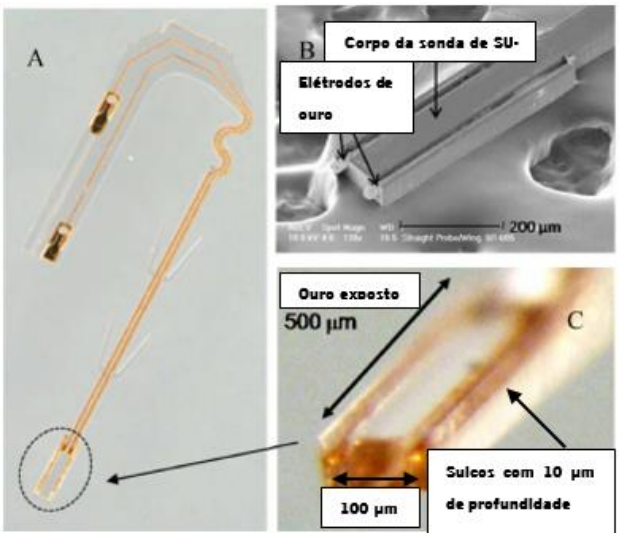


Figura 16: Imagens gerais e detalhadas da sonda neuronal de SU-8 com estrutura em forma de "J" [21].

No processo de fabrico da sonda apresentada na figura 16 utilizou-se uma bolacha de Si com 250 µm de espessura que foi inicialmente oxidada para obter uma camada sacrificial de 5 µm de espessura [21]. No processo seguinte depositou-se crómio e aço por evaporação térmica para formar uma camada protetora de eletrodeposição. Seguidamente depositou-se, por cima da camada protetora, 20 µm do polímero fotossensível positivo SPR-220. A amostra foi exposta à luz ultravioleta e revelada para formar um molde estrutural para a eletrodeposição [21]. As superfícies com mais rugosidade permitem aos axónios aderirem mais facilmente à sonda neuronal. O molde criado para eletrodeposição e a camada protetora de aço foram removidos para criar a camada inferior do corpo da sonda. O material utilizado nas pistas, nos contactos e nos µ-elétrodos foi o Au [21]. Removeu-se o Au por corrosão química, depositou-se e padronizou-se 50 µm de SU-8 para envolver as pistas de Au e formar o corpo da sonda neuronal. O passo final foi libertar a sonda do substrato de SiO_2 através do processo de corrosão.

O dispositivo fabricado por Sung-Hoon Cho foi sujeito a testes de biocompatibilidade revelando que não existiram quaisquer implicações no contacto direto com fibras nervosas [21]. A sonda neuronal foi testada durante 51 semanas no cérebro de um rato, não revelando problemas de biocompatibilidade. Foi possível concluir que este tipo de implantes é viável para gravações a longo prazo. Esta sonda pode ser aplicada numa interface neuroprostética ligando os nervos responsáveis pelos movimentos e sensações corporais a uma prótese artificial [21].

2.5.4. Parylene

O parylene é um polímero biocompatível utilizado há diversos anos como isolamento em µ-elétrodos neuronais. Em 2004, Shoji Takeuchi desenvolveu uma sonda neuronal integrada com canais de microfluídica (ver figura 17) [22]. Utilizou-se etilenoglicol, um material biocompatível, para enrijecer a sonda e assim facilitar a inserção do implante no tecido neuronal. No processo de fabrico colocou-se uma camada de 10 µm de polímero fotossensível entre duas camadas de parylene com 5 µm de espessura [22]. Para abrir o canal de microfluídica utilizou-se acetona e etanol que dissolveram a camada de polímero fotossensível. Por cima da camada superior de parylene depositou-se, através de evaporação, uma camada de Au [22].

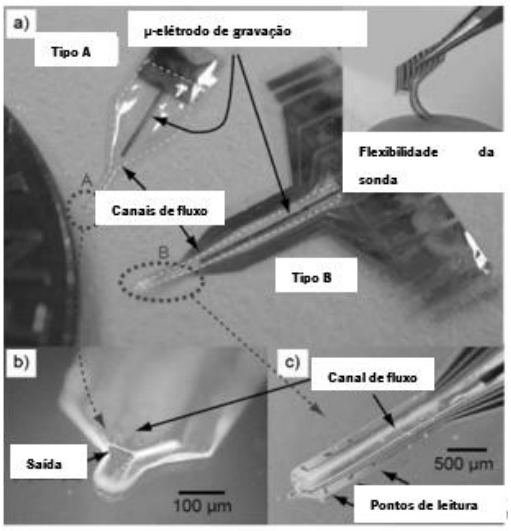


Figura 17: Sonda neuronal baseada em parylene com integração de microfluídica [22].

A sonda neuronal apresentada na figura 17 é composta por sete μ-elétrodos [22]. Seis desses μ-elétrodos encontram-se em contacto direto com o tecido cerebral, realizando a gravação extracelular da atividade neuronal. O sétimo μ-elétrodo situa-se dentro do canal de microfluídica. A gravação deste μ-elétrodo é realizada de maneira diferente, ou seja, através da medição da salinidade da solução dentro do canal de microfluídica. É requerido que seja uma solução eletrolítica para que haja uma condução do sinal recebido das células para o contacto em Au do μ-elétrodo [22]. Os resultados obtidos na medição da atividade neuronal foram igualmente semelhantes aos dos μ-elétrodos convencionais baseados em Si. O teste de espetroscopia de impedância apresentou 100 kΩ a uma frequência de 1 kHz [22].

2.5.5. Poliimida (PI)

A PI é um polímero referenciado cada vez mais no campo das microtecnologias devido às suas propriedades [23]. Este material é utilizado como substrato e elemento isolador, apresentando outros atributos relevantes tais como: excelente resistência aos solventes, forte adesão ao metal e óxido de metal, detendo ainda boas caraterísticas dielétricas. Estudos anteriores realizados *in vitro* e *in vivo*, por Stieglitz em 2000 e Richardson em 1993, comprovaram que a biocompatibilidade da PI em conjunto com as suas propriedades mecânicas conferem pontos positivos para a utilização deste polímero em implantes neuronais [23].

Um estudo desenvolvido por Sami, Katja e Reijo da Universidade de Kuopio, levou em conta o uso da PI em sondas neuronais flexíveis para tratamento de doenças associadas ao foro psicológico [23]. O objetivo incidiu na criação de um implante que não provocasse danos aquando da sua inserção no tecido neuronal ou desencadeasse reações alérgicas em torno do elétrodo. Desta forma, seria possível

aumentar a longevidade do implante, mantendo a fiabilidade das informações obtidas pelos elétrodos [23]. No processo de fabrico da sonda neuronal utilizou-se a pulverização catódica para a deposição das camadas de metal e a fotolitografia para padronização de contactos e pistas.

Numa instância inicial do procedimento desenvolvido na Universidade de Kuopio colocou-se como base um prato de vidro para oferecer rigidez à amostra durante o fabrico [23]. De seguida, depositou-se um filme de PI, com 25 μm de espessura, seguido de outro de polímero fotossensível negativo, ambos através da técnica de centrifugação. A camada do polímero fotossensível foi padronizada, expondo a amostra à luz ultravioleta [23]. Na etapa a seguir depositou-se por pulverização catódica um filme de Ti (20 μm) e outro de Pt (200 nm). A camada de Ti serviu para aumentar a adesão entre a PI e a camada de Pt. O polímero fotossensível negativo que não interessava foi removido utilizando um revelador [23]. No final depositou-se um filme de PI fotossensível, com 3 μm de espessura, por centrifugação e posteriormente exposto à luz ultravioleta a fim de ficar padronizado. Este filme atuou como elemento isolador, exceto nas áreas dos elétrodos e dos contactos de ligação. Por fim a amostra foi retirada dos pratos de vidro.

A sonda neuronal desenvolvida por Sami, Katja e Reijo era composta por 16 μ-elétrodos de Pt, ligando cada um deles a uma entrada de um conetor de força de inserção zero (ZIF) [23]. O conetor ZIF foi soldado a uma placa PCB que continha 16 entradas para receber os sinais elétricos de cada um dos μ-elétrodos. A placa PCB serviu para efetuar o tratamento do sinal (amplificação) e instrumentação necessários à correta gravação dos impulsos elétricos adquiridos [23]. Os resultados obtidos pelos investigadores apontaram para uma excelente flexibilidade e força mecânica apropriada durante a inserção do implante no tecido neuronal, não desencadeando quaisquer ferimentos no tecido neuronal. Os dados adquiridos pelos μ-elétrodos foram apresentados num computador durante a experiência, mostrando leituras estáveis mesmo quando existia maior instabilidade de gravação devido a problemas externos (atrasos de sinal, diminuição de tensão dos componentes) [23].

O implante crónico permaneceu durante 16 dias no crânio do rato sem que se verificassem lesões nos tecidos. Ao fim desse período denotou-se uma diminuição da amplitude do sinal adquirido, acompanhado do aumento da impedância do μ-elétrodo para o dobro. Segundo os autores, o aumento desta impedância é comum em implantes crónicos devido ao aumento da espessura da dura (camada do cérebro) e das fibras não condutoras à volta do elétrodo. Os testes de citologia ao μ-elétrodo não revelaram qualquer componente tóxico. O resultado final do produto desenvolvido pode ser visto na figura 18 [23].

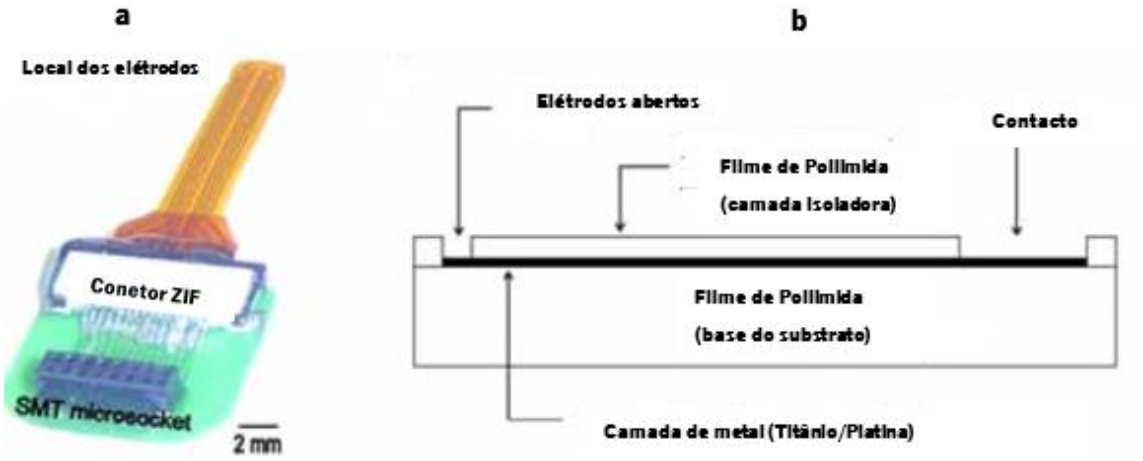


Figura 18: a) Matriz de μ-elétrodos ligada ao conetor ZIF; b) Corte transversal das camadas da matriz de μ-elétrodos [23].

Em 2010 Jin-Hee Moon, em conjunto com outros investigadores, produziu sondas neuronais de PI utilizando filmes de kapton® para medição de sinais EEG do crânio do rato [24]. O ponto-chave deste processo inovador consiste em separar os elétrodos de PI da bolacha de Si antes do processo de cura total. A cura total acontece ao colocá-los entre dois filmes de kapton® [24]. Os métodos de fabrico utilizados na conceção destes elétrodos foram a fotolitografia para a padronização da base e a deposição de camadas de metal por feixe de eletrões [24].

No processo de fabrico depositou-se uma camada com 6-7 μm de PI negativamente fotossensível, através de centrifugação por cima de uma bolacha de Si [24]. Seguidamente colocou-se a amostra numa placa de aquecimento durante 4 minutos a temperatura de 100 °C. Depois, realizou-se a exposição da amostra à luz ultravioleta através da máscara de luz, deixando novamente a curar numa placa de aquecimento durante 4 minutos a 100 °C. A parte de PI não exposta à luz ultravioleta foi removida com a ajuda do revelador [24]. De seguida depositou-se, utilizando o canhão de eletrões, uma camada de Au e outra de Ti. Na padronização dos contactos recorreu-se ao método de corrosão, depositando posteriormente um filme de PI, por centrifugação, como camada isoladora. Continuadamente retiraram-se as sondas de PI da bolacha de Si e colocaram-se entre filmes de kapton® e pratos de vidro. Por fim separou-se totalmente as sondas do kapton® e do vidro. O processo descrito anteriormente pode ser visto na figura 19 [24].

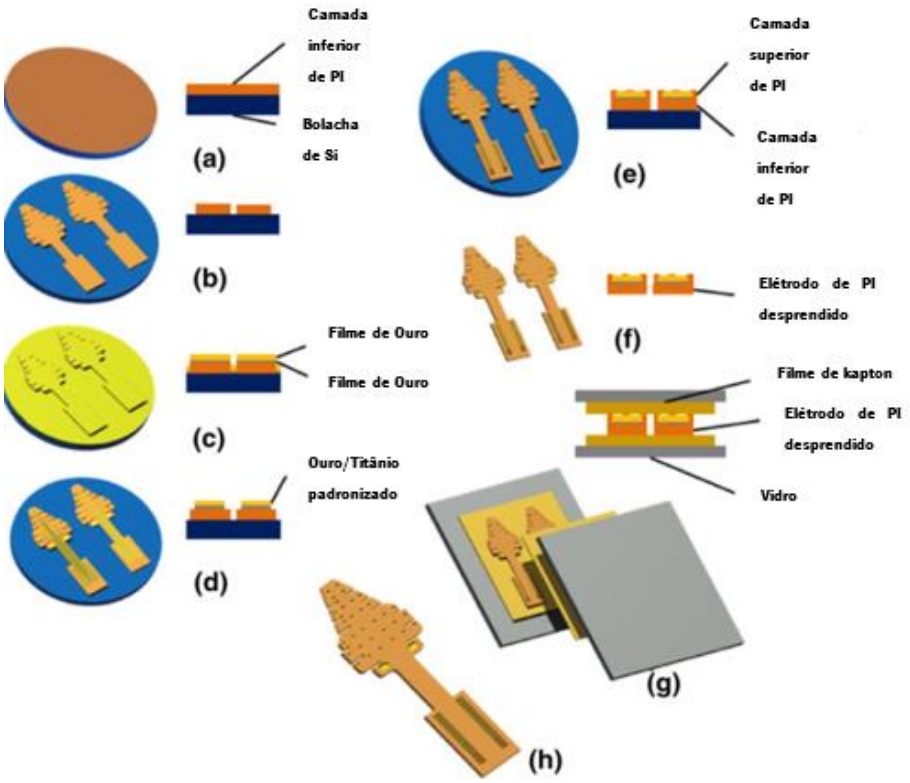


Figura 19: Processo de fabrico de sondas neuronais em PI desenvolvido por Jin-Hee Moon: a) deposição de PI na bolacha de Si; b) padronização da base; c) deposição de Au/Ti; d) padronização dos filmes de Au/Ti; e) deposição de PI; f) remoção das sondas de PI; g) sondas de PI entre filmes de kapton® e pratos de vidro; h) remoção final das sondas de PI após cura total [24].

Os resultados obtidos por Jin-Hee Moon demonstraram que os elétrodos que não foram curados totalmente sofrem uma deformação da sua forma decorridos 3 dias após serem removidos da bolacha de Si [24]. A deformação tornou-se na principal causa do contacto não uniforme com a superfície do tecido neuronal (ver figura 20) [24].

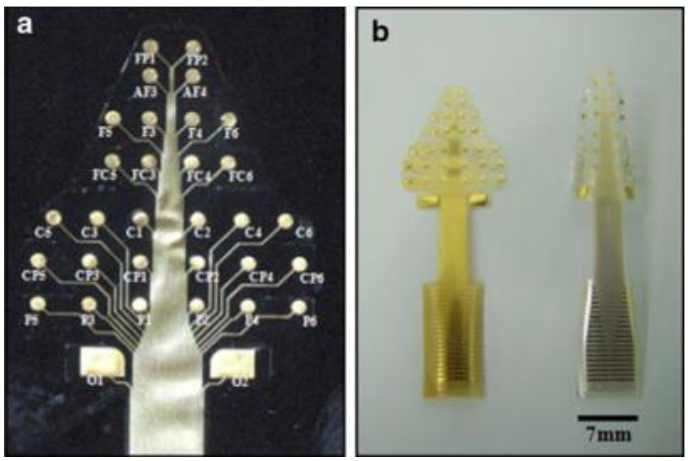


Figura 20: a) Imagem da sonda em PI e dos locais de gravação; b) Sonda totalmente curado (esquerda) e sonda sem processo de cura total (direita) [24].

O método apresentado, em comparação com o de corrosão química para remoção da camada de sacrifício, permitiu reduzir bastante o tempo do processo de fabrico [24]. Na utilização do método de corrosão, o tempo de deposição da camada de sacrifício é de aproximadamente 4 horas e a remoção total da camada demora 21 horas. Este tempo elevado deve-se à dificuldade em retirar totalmente os resíduos da camada de sacrifício nas zonas mais profundas entre a camada de PI e a bolacha de Si. Em oposição, o método desenvolvido por Jin-Hee Moon não utiliza qualquer camada de sacrifício ou processos de corrosão, conseguindo fabricar os elétrodos em alguns minutos [24].

Os resultados apresentados mostram que o processo total de cura aumenta a robustez necessária para aguentar as forças de tensão elétrodo-tecido neuronal, diminuindo a rigidez da sonda de PI. A diminuição da rigidez da sonda de PI facilita o contacto com as superfícies curvas do cérebro [24]. Concluiu-se ainda que a força necessária para partir a sonda totalmente curada aumentou 27% relativamente ao não curado. A espessura do elétrodo curado (8.4 μm) também diminuiu relativamente ao não curado (13 μm) [24]. O processo de cura melhorou a condutividade elétrica do Au e do Ti e diminuiu a impedância de 300 kΩ para 100 kΩ [24].

Os testes citológicos de toxicidade mostram que não existe nenhum efeito prejudicial ao tecido neuronal [24]. Estimularam-se caudas de ratos pressionando os seus bigodes e a resposta recolhida pelos elétrodos mostra uma correta receção dos sinais sem ruído [24]. Na tabela 2 encontra-se uma comparação entre o Si e os materiais utilizados no fabrico de sondas flexíveis. As caraterísticas mais relevantes são o alongamento, módulo de elasticidade resistência volúmica e resistência à força. O Si apresenta um módulo de elasticidade superior ao do cérebro (figura 21) pelo que consegue penetrar o tecido neuronal sem nenhum problema.

Tabela 2: Propriedades físicas da PI, PDMS, Si, parylene-C, BCB e Su-8. Os valores foram retirados de estudos realizados por Stieglitz (2000), Mata (2005) e Armani (1999) [18].

Propriedades físicas	**PDMS**	**PI**	**Si**	**Parylene-C**	**BCB**	**SU-8**
Resistência à força (MPa)	0.4-1.1	215	1225	68.9	87	34
Alongamento (%)	140	85	-	200	8	6.5
Densidade (g/cm^3)	1.11	1.45	2.1	1.289	0.957	1.2
Módulo de elasticidade (GPa)	0.04-0.09	2.5	$20x10^3$	2.8	2.9	4.02
Resistência volúmica (Ω.cm)	$2.9^{\circ}10^{14}$	10^{16}	-	$8.8x10^{16}$	10^{19}	$2.8x10^{16}$

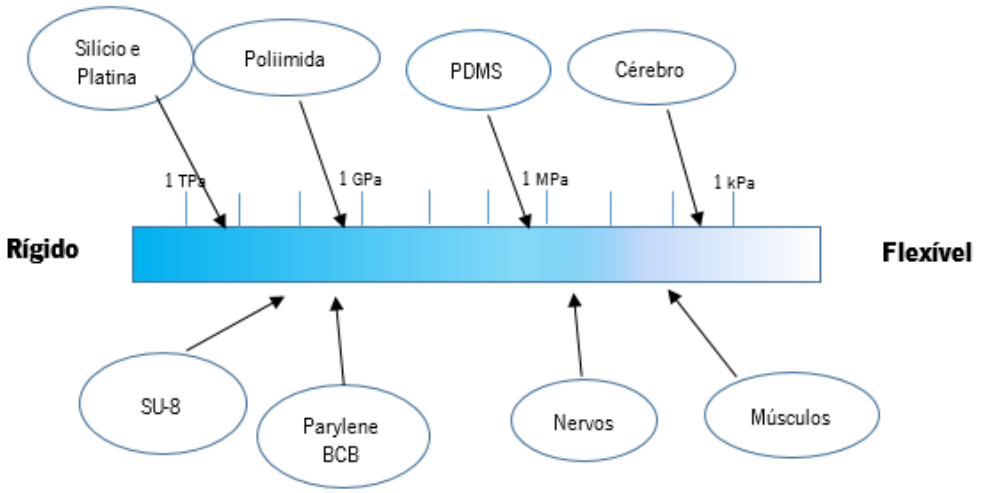


Figura 21: Módulo de elasticidade do cérebro, nervos e de alguns dos materiais mais utilizados para a base das sondas neuronais [13].

2.6. Outras sondas

Uma investigação conduzida por Jason Burmeister em 2000 levou à descoberta de uma alternativa ao Si para o fabrico de sondas neuronais, utilizando substrato de cerâmica [4]. A cerâmica apresenta vantagens relativamente ao Si. O facto de ser um material não condutor diminui o "*cross talk*" entre o substrato e os locais de gravação, havendo um melhor isolamento. Além disso, é mais duro que o Si, sendo mais resistente a processos de corte e é um material mais barato, diminuindo os custos de produção relativamente às sondas baseadas em Si [4].

A sonda desenvolvida por Jason tinha um substrato de cerâmica com uma espessura entre 25 e 50 µm [4]. O substrato foi inicialmente limpo utilizando uma solução composta por ácido sulfúrico e trióxido de crómio e seguidamente enxaguado com água desionizada [4]. Na etapa seguinte colocou-se o substrato a secar a 120 °C, aplicando depois uma camada de polímero fotossensível através de centrifugação. A bolacha de cerâmica foi padronizada usando a técnica de fotolitografia para os contactos, pistas e µ-elétrodos. A sonda tinha 120 µm de largura, 125 µm de espessura e 1 cm de comprimento. Os quatro µ-elétrodos de gravação detinham dimensões de 50 x 50 µm, espaçados 200 µm entre eles [4].

Depositou-se uma camada de Ti seguida de uma camada de Pt por intermédio de pulverização catódica [4]. Após isso removeu-se o polímero fotossensível utilizando acetona deixando os contactos, pistas e µ-elétrodos expostos. Recorreu-se à PI para encapsular a sonda e torná-la biocompatível [4]. Jason chegou à conclusão, realizando experiências *in vivo* que os µ-elétrodos são compatíveis com o ambiente salino do tecido cerebral [4].

2.7. Dispositivos optogenéticos

As opsinas são inseridas no tecido celular do cérebro do rato e, uma vez que marquem o grupo de neurónios alvo, são necessários dispositivos optogenéticos que realizem a estimulação/inibição profunda do cérebro através da luz. A esses dispositivos dá-se o nome de optrodes e têm como função ativar molecularmente as opsinas. Existem diferentes técnicas de emissão de luz para aplicações em específico que necessitem de determinado comprimento de onda e realizem o controlo espacial, temporal e espetral. Entre as fontes de luz encontram-se o laser, μ-LED e fontes incandescentes que chegam aos neurónios através de guias de onda ou fibra ótica [9].

Os dispositivos de estimulação ótica podem estar integrados na sonda neuronal ou inseridos separadamente. Um dos maiores problemas dos dispositivos óticos que são inseridos separadamente é o facto de terem de ser colocados, manualmente, o mais próximo possível das sondas de gravação da atividade neuronal. A inserção manual torna difícil controlar com precisão a localização dos dispositivos para uma correta gravação da atividade neuronal por parte dos optrodes [9]. A estimulação cerebral recorrendo à optogenética pode ser realizada em experiências *in vivo* e *in vitro* [9].

2.7.1. Fibra ótica

A fibra ótica é um dos métodos utilizados para conduzir a luz proveniente das fontes até áreas profundas do cérebro sem causar danos a nível celular ou que perturbem o normal comportamento do animal em estudo [1]. A fibra ótica são cabos flexíveis feitos de um material transparente que atua como condutor de onda da luz. As propriedades do material escolhido para o cabo de fibra influenciam diretamente todo o sistema em que a fibra ótica se encontra integrado. Caraterísticas como as dimensões ou propriedades óticas do cabo irão influenciar a geometria e intensidade da luz emitida no cérebro [1].

Os cabos de fibra ótica podem ser introduzidos diretamente na região do cérebro após uma operação ou através da inserção de uma cânula (tubo de plástico, metal ou borracha) precedente também de uma pequena intervenção cirúrgica. Nas experiências de longa duração ou em implantes crónicos são inseridos no cérebro um cabo curto de fibra ótica acoplado a um metal na sua ponta (ver figura 22). O comprimento do cabo da fibra ótica pode ser escolhido de acordo com o pretendido [1].

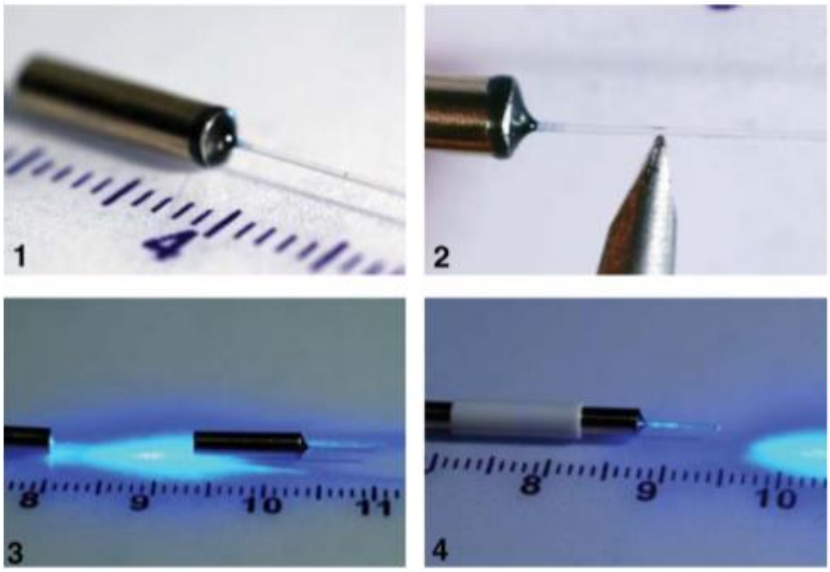


Figura 22: Cabo de fibra ótica para implante crónico desenvolvido na Universidade de Harvard [1].

Em 2007 Alexander e outros investigadores foram pioneiros na utilização da fibra ótica para a estimulação das células do tecido neuronal [1]. Desenvolveram uma interface ótica neuronal e colocaram-na no crânio de um rato. Optaram por um díodo emissor de luz azul acoplado a um cabo de fibra ótica com 200 µm de diâmetro, potência de 20 mW e com um comprimento de onda na ordem dos 473 nm. A intensidade luminosa proporcionada pela fibra ótica era de, aproximadamente, 380 mW/mm^2, sendo suficientemente elevada para excitar os neurónios marcados com ChR2+ sem colocar em risco o tecido cerebral [1].

A guia de fibra (representada na figura 23) tem duas finalidades: numa primeira instância injetou-se o ChR2+ na região requerida do tecido neuronal através da guia de fibra [1]. O outro propósito passou pela inserção do cabo de fibra ótica dentro da guia de fibra para posterior iluminação das células marcadas com a proteína de ChR2+ [1]. Os testes realizados tinham o intuito de testar se a estimulação ótica influenciava a parte motora do animal. Assim, o objetivo passou por estudar a deflexão dos bigodes do rato em resposta à estimulação ótica. Após a ativação da opsina (ChR2+) através da luz azul verificou-se um desvio de 10° comparativamente à posição inicial dos bigodes. O esquema da interface de estimulação ótica encontra-se representado na figura 23 [1]. Os resultados revelaram que a estimulação ótica influencia a parte motora do animal, permitindo ainda uma maior seletividade do grupo de neurónios a ser controlado comparativamente à estimulação elétrica [1].

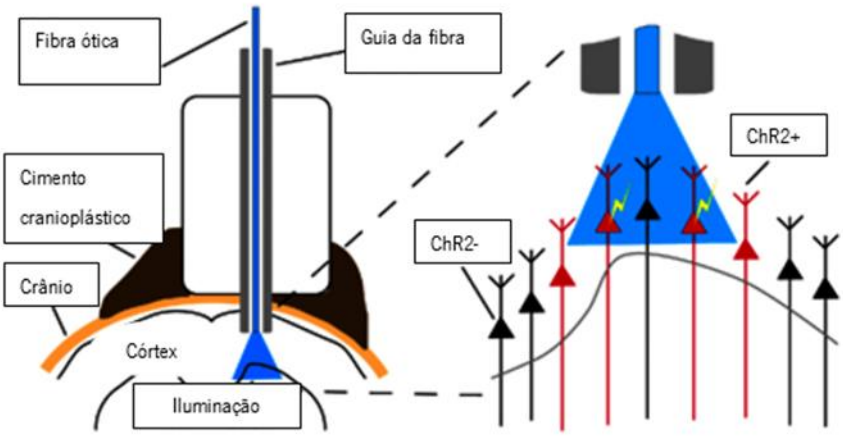


Figura 23: Esquema da interface ótica neuronal inserido no crânio de um rato [1].

2.7.2. Guia de onda

As guias de onda são, a par da fibra ótica, uma das formas mais utilizadas para a entrega de luz às zonas pretendidas do cérebro [25]. Os dispositivos com guias de onda são escolhidos em detrimento da fibra ótica devido às vantagens que apresentam. A utilização da fibra ótica impõe o uso de um dispositivo para gravação (sonda neuronal) e outro ótico (fibra ótica). Esta exigência faz com que a interface de estimulação ótica tenha uma dimensão maior, seja mais rígida e danifique os neurónios aquando da sua inserção no crânio. A utilização da guia de onda integrada na sonda neuronal procura responder a este problema [25].

Em 2010, Joo Cho em conjunto com Baac e Yoon, desenvolveram um optrode com guia de onda integrada para estimulação ótica [25]. Este optrode permitia a monotorização e gravação da atividade extracelular [25]. O material utilizado no optrode foi o SU-8 com revestimento em óxido [25]. O optrode era constituído pela guia de onda integrada desde o topo da agulha e conectada a um cabo de fibra ótica localizado na parte externa do crânio. O cabo de fibra ótica serviu para conduzir a luz desde uma fonte de luz até à guia de onda [25].

O modelo do optrode (ver figura 24) baseou-se nas sondas de Michigan, diferindo apenas na incorporação de uma camada de revestimento de SiO_2 para minimizar as perdas de propagação da luz nas guias de onda por refração [25]. O optrode apresenta 14 elétrodos de Ir com o objetivo de gravar e monitorizar externamente a atividade neuronal. As pistas do optrode eram feitas de polisilício, realizando a comunicação entre os elétrodos e os contactos. A base do substrato do optrode era constituída por Si dopado de boro com uma camada de 12 µm e uma guia de onda com 5 µm de espessura. A espessura final da sonda fixou-se abaixo 20 µm, sendo possível a sua inserção no tecido neuronal sem causar danos adversos às células [25]. A luz foi emitida com um comprimento de onda de 475 nm e uma

potência de 0.31 mW à saída da guia de onda. A impedância medida após mergulhar a sonda numa solução salina foi de, aproximadamente, 1.49 MΩ à frequência de 1 kHz. O protótipo final pode ser visto na figura 24 [25].

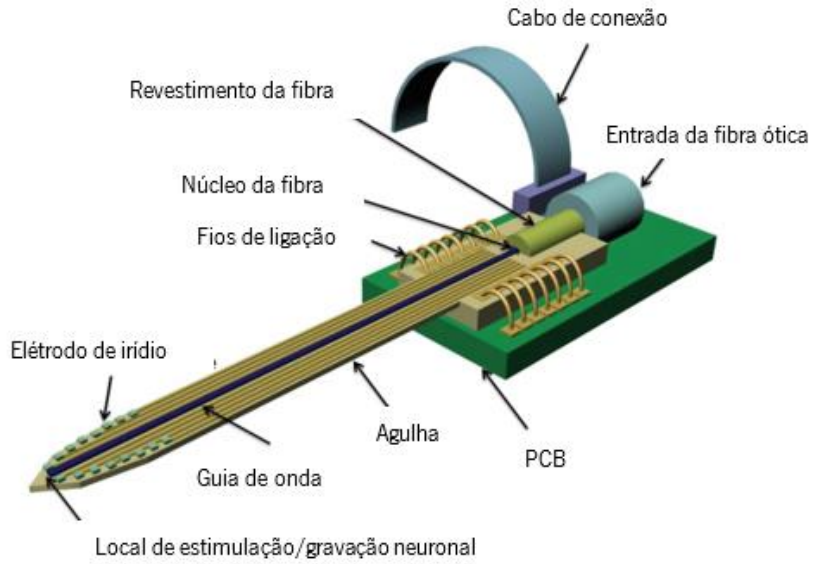


Figura 24: Optrode com guia de onda integrado [25].

2.7.3. µ-LED's

Os µ-LED's são outra alternativa utilizada na optogenética como fonte de luz. Este dispositivo apresenta vantagens como a fácil modulação do sinal para a frequência pretendida, simplicidade e baixo custo [7]. Ademais, os circuitos de eletrónica auxiliares ao correto funcionamento dos µ-LED's são simples. Apesar disto, são necessários cuidados quando o dispositivo é utilizado próximo dos tecidos *in vivo* devido ao calor dissipado pelo sobreaquecimento do µ-LED [7].

Os µ-LED's destacam-se das outras fontes de luz pela resolução espacial e temporal com que conseguem excitar os neurónios [7]. A sua integração em dispositivos optogenéticos permite atingir e estimular zonas profundas do cérebro [7]. Dependendo da potência de saída do µ-LED e da potência requerida para a ativação das opsinas, a resolução de estimulação pode limitar-se às dezenas de micrómetros [7]. A integração do µ-LED no optrode permite o desenvolvimento de dispositivos sem-fios, o que irá melhorar a mobilidade dos animais durante as experiências *in vivo*, realizando a estimulação e gravação da atividade neuronal com sucesso [7].

O optrode desenvolvido por Fan Wu *et al* é constituído por 4 agulhas com 3 µ-LED's integrados e 8 pontos de leitura em cada uma delas (figura 25) [7]. Os 3 µ-LED's apresentam dimensões de 10 µm x 15 µm (comprimento x largura) e emitem luz azul com um comprimento de onda de 460 nm sendo

responsáveis pela ativação da opsina ChR2 [7]. Os pontos de gravação são de Ti e Ir com dimensões de 11 µm x 13 µm (comprimento x largura).

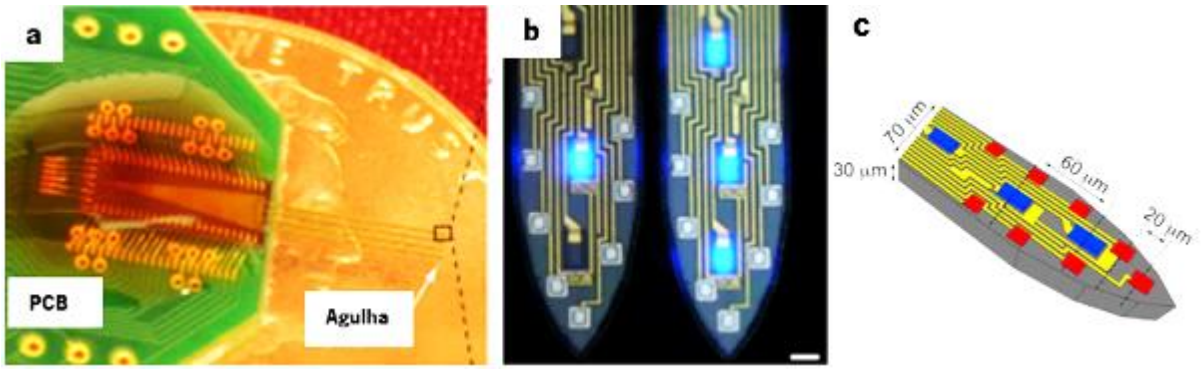


Figura 25: a) Imagem do optrode pronto a ser implantado no tecido neuronal; b) imagem da agulha do optrode com os µ-LED's acesos; c) ponta da agulha e dimensões [7].

Comparando com o macro LED, o tamanho reduzido do µ-LED pode ajudar na distribuição da corrente através da camada de níquel (Ni) e Ti, levando a emissão de luz uniforme (figura 26) [7]. Como referência, uma potência ótica de saída de 0.15 mW corresponde a 1 mW/mm^2 na superfície do µ-LED (150 µm^2) [7]. Esta intensidade é suficiente para a ativação da opsina ChR2 e foi conseguida aplicando uma corrente de 8 µA [26].

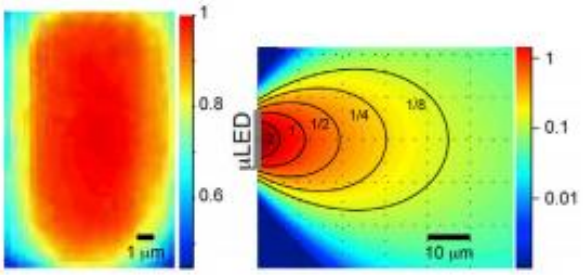


Figura 26: À esquerda é apresentada a distribuição da intensidade do µ-LED e à direita é apresentada a distribuição da potência ótica do µ-LED durante a estimulação ótica no cérebro [7].

A arquitetura de sonda planar é uma plataforma ideal para a integração de ótica, devido à versatilidade dos processos de microfabricação existentes, possibilitando a formação de múltiplas camadas de componentes ativos. A figura 27 mostra o processo de fabrico do optrode desenvolvido por Fan Wu *et al* em substrato de Si [7]. Ao contrário das sondas flexíveis a rigidez das agulhas e seus componentes integrados permanecem intactos após o implante, fornecendo maior precisão durante a

estimulação e gravação. O μ-LED tem menos de 0.5 μm de espessura, sendo de uma ordem de grandeza menor do que as fibras óticas ou guias de onda para danos de inserção reduzidos.

Semelhante à tecnologia laser, nos μ-LED's apenas é escolhida uma determinada gama de cores que emitam a potência adequada para a excitação do tecido neuronal [27]. Nas experiências optogenéticas *in vitro* os μ-LED's são usados para estimular células de forma individual. No caso dos ensaios *in vivo* são utilizados no interior do cabo de fibra ótica que se encontra colocado no cérebro do animal [27].

As possíveis aplicações dos μ-LED's incluem o seu implante ou colocação em cima do tecido neuronal (com o cuidado necessário para não ocorrer dissipação de calor) ou ainda a sua montagem de forma permanente num cabo de fibra ótica [13]. Na figura 28 encontra-se uma matriz 10 x 10 de μ-elétrodos com a incorporação de um μ-LED para estimulação ótica por cima da superfície do tecido neuronal [13].

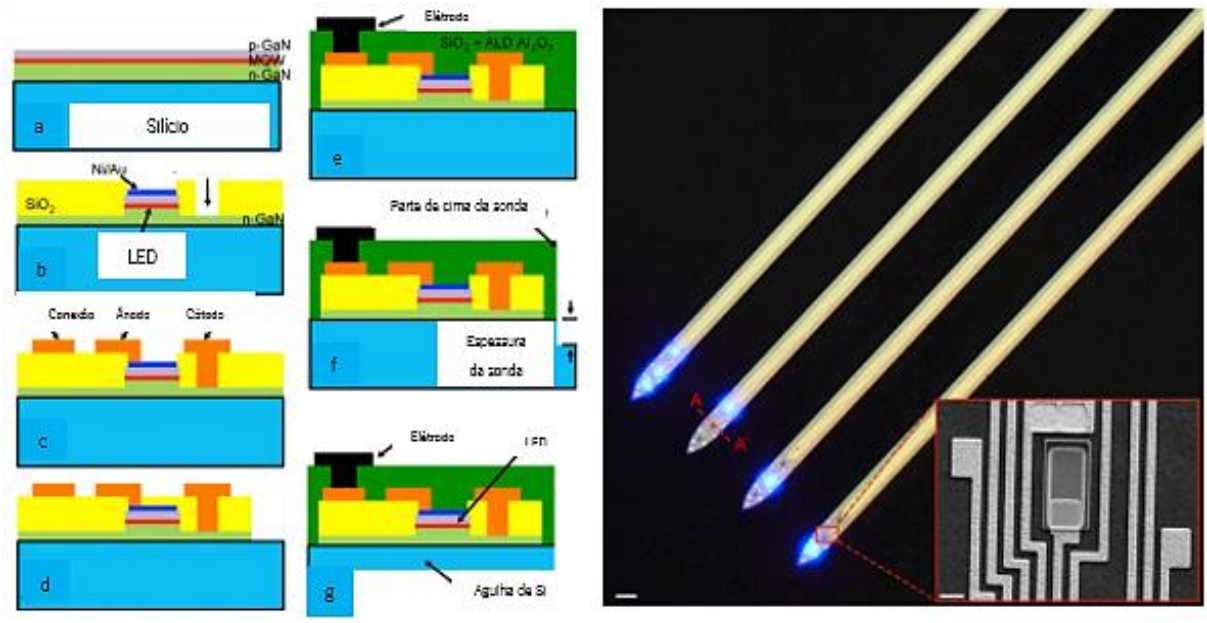


Figura 27: Processo de fabrico do optrode a) camadas p-GaN, n-GaN depositadas numa bolacha de Si (111); b) zona destinada ao μ-LED e abertura de contato de n-GaN; c) padronização de Ti/Al/Ti/Au para linhas de interconexão; d) deposição de SiO_2 no local do μ-LED; e) deposição de camada dupla de óxido e padronização de elétrodos de Ti/Ir; f) DRIE para definir as dimensões da haste do optrode; g) desbaste traseiro para libertar as sondas da bolacha de Si [7].

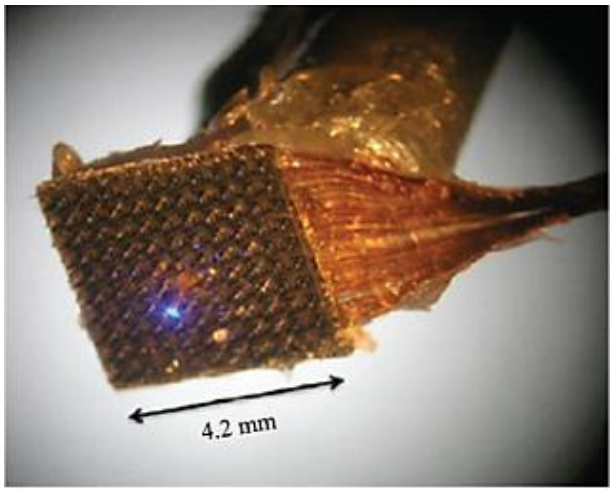


Figura 28: Matriz 10 x 10 elétrodos para estimulação ótica [13].

2.7.4. Laser

No decorrer da última década o uso da tecnologia ótica aplicada à medicina tem sido uma realidade. O laser foi utilizado com o intuito de causar alterações fotoquímicas, fototérmicas ou fotomecânicas nos tecidos biológicos [28]. Estas mudanças eram conseguidas através da alteração de certas propriedades como a intensidade, tempo de aplicação ou do comprimento de onda do laser. Em 2004 Niemz conduziu diversos estudos no ramo das aplicações médicas utilizando este método [28]. Entre as áreas destacam-se a dermatologia, urologia ou ortopedia.

A tecnologia laser é uma alternativa aliciante para diversas aplicações do ramo da optogenética devido à sua resolução espetral (menor do que 1 nm), permitindo chegar muito próximo do pico de ativação das opsinas [28]. De entre os diversos dispositivos que usam a tecnologia laser, os mais utilizados são os díodos devido à fácil modulação na gama dos quilohertz. A potência adotada para esta tecnologia é de cerca de 100 mW, permitindo a modulação analógica da potência de saída sem grandes perdas de transmissão [28].

Em 2012, Fan Wu em conjunto com outros investigadores, desenvolveu uma sonda neuronal com elétrodos de gravação recorrendo a díodos laser como fontes de luz para estimulação ótica [28]. A base do optrode era Si com oito elétrodos de gravação e uma guia de onda integrada composta pelo polímero SU-8. A técnica de fotolitrografia foi empregue para o fabrico do optrode, providenciando as dimensões mínimas para que fossem colocados todos os componentes necessários. Além da sonda neuronal e da guia de onda integrada, encontrava-se acoplado a este sistema um cabo de fibra ótica, realizando a transmissão da luz entre a fonte emissora de luz (díodo laser) e a guia de onda. A espessura final da sonda neuronal rondou os 15 μm. Os comprimentos de onda emitidos pelo díodo laser foram de 473 nm e de 593 nm para excitação e inibição celular, respetivamente. Nesta experiência os

investigadores tiveram em conta o alinhamento entre a fibra ótica e a guia de onda de forma a minimizar as perdas de transmissão de luz entre os dois cabos. A morfologia da sonda neuronal pode ser vista na figura 29 [28].

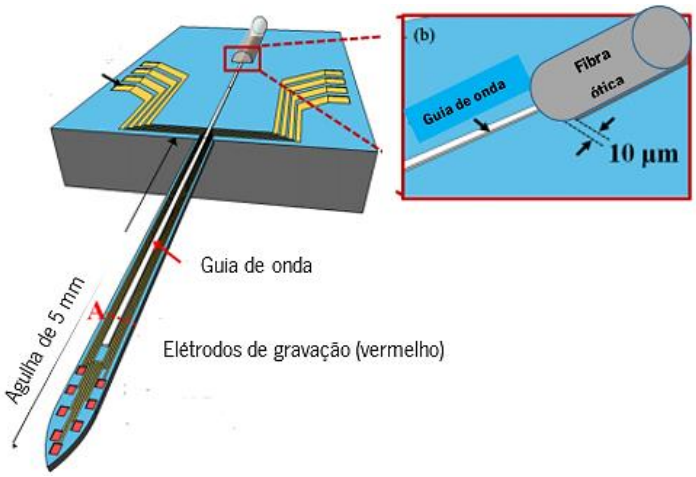


Figura 29: Sonda neuronal com díodo laser como fonte emissora de luz [28].

2.7.5. Lâmpadas incandescentes

As lâmpadas de incandescência tradicionais de dimensões microscópicas podem ser utilizadas como fontes de estimulação ótica [9]. Este tipo de fonte de luz providencia pulsos com duração de 1 ms, estando apenas limitado à ação de ligar/desligar, não permitindo controlo de luminosidade como acontece em alguns lasers ou LED's [9].

As lâmpadas incandescentes são utilizadas em experiências optogenéticas, tendo a vantagem de se poder aplicar um filtro passa banda consoante o comprimento de onda pretendido [9].

3. Métodos e metodologias

No presente capítulo abordam-se os métodos e metodologias utilizados no desenvolvimento do optrode com μ-LED integrado. Os métodos e técnicas empregues têm como base os estudos apresentados no capítulo anterior e os recursos disponíveis no laboratório. Ao longo deste capítulo são apresentados o modelo e requisitos propostos. Seguem-se os materiais e técnicas adotados no fabrico do optrode.

3.1. Modelo do optrode

Na etapa precedente aos processos de fabrico do optrode existe uma série de aspetos que devem ser considerados de acordo com a finalidade requerida para o dispositivo optogenético. O desenho geométrico da sonda é dependente de uma série de critérios entre os quais a profundidade a atingir durante a implantação neuronal, a disposição espacial e a densidade de μ-elétrodos de forma a potenciar ao máximo a gravação de informação neuronal.

Os materiais utilizados no processo de fabrico devem ser ponderados de acordo com as suas propriedades mecânicas, químicas e elétricas. A união entre a seleção de materiais e o desenho da estrutura têm influencia direta nas tecnologias e técnicas de microfabricação a serem empregues, pelo que devem ser ponderados. Os processos intrínsecos ao fabrico do optrode devem ser considerados de acordo com a reprodutibilidade, custo e disponibilidade de recursos.

3.1.1. Requisitos do optrode

Os requisitos do optrode são definidos de acordo com a finalidade do dispositivo. A sonda será utilizada para estimulação profunda e gravação da atividade cerebral. A estrutura do optrode deve apresentar uma geometria que facilite a inserção do dispositivo no cérebro e acomodação ao tecido neuronal [13]. Em neurociência é importante que os implantes neuronais detenham a menor área de contacto possível com o tecido neuronal de forma a minimizar os danos causados pela implantação [13]. Por outro lado, a área de contacto tem de ser grande o suficiente para sustentar o maior número de μ-elétrodos possíveis a fim de abranger o máximo de locais de gravação e redundância [13].

O optrode a ser desenvolvido terá como propósito o estudo de doenças do foro mental, pelo que será implantado cronicamente no rato durante um período de tempo que pode ser superior a um mês

[4]. O animal utilizado com maior frequência nas experiências laboratoriais no campo da neurociência é o rato. A sua ampla utilização deve-se ao facto de os ratos apresentarem uma organização do DNA semelhante aos seres humanos e padecerem de doenças tais como o *Parkinson, Alzheimer* ou ansiedade [29]. Outras caraterísticas como serem pequenos, de fácil reprodução e elevada resistência a doenças fazem dos ratos excelentes candidatos para serem utilizados em investigação [29]. Durante o tempo em que se encontra implantado, o optrode pode efetuar dois tipos de leitura: potencial de ação e potencial local. O potencial de ação diz respeito à gravação de impulsos que são emitidos por apenas uma célula. O potencial local é a leitura da atividade extracelular de um conjunto de neurónios [30]. Na leitura do potencial de ação é requerido que os μ-elétrodos estejam situados a uma distância menor do que 20 μm do neurónio pretendido (figura 30 b)). Este requisito indica que a espessura do encapsulamento do optrode não deverá ser superior a 20 μm. No potencial local a leitura da atividade extracelular é feita num raio máximo de 500 μm (figura 30a)) [30].

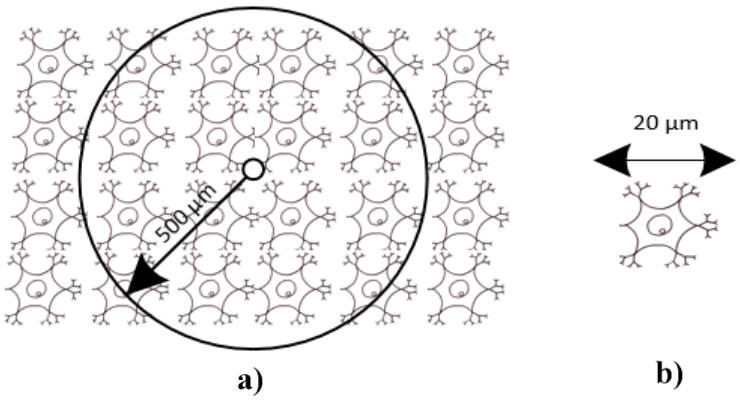


Figura 30: Ilustração das leituras: a) do potencial local; b) do potencial de ação.

Para estimulação/gravação profunda do cérebro, o optrode deverá atingir uma profundidade de, pelo menos, 2 mm de forma a atingir a zona do hipocampo do rato (ver figura 31). O hipocampo está relacionado com a aprendizagem de conteúdos e criação de novas memórias, situando-se no cérebro entre os 2 e os 4.6 mm de profundidade [31].

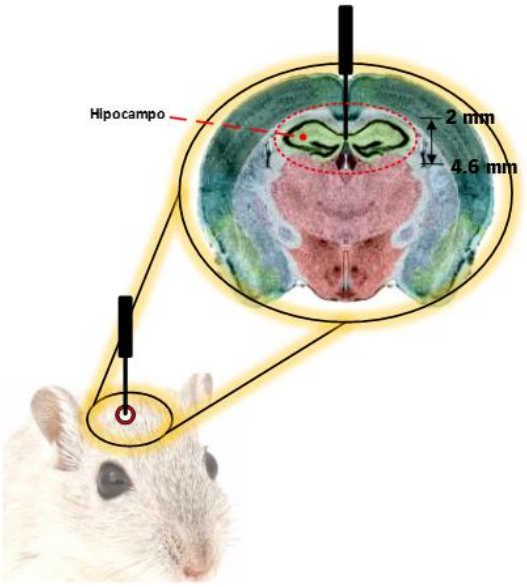


Figura 31: Representação esquemática do cérebro de um rato onde ficará implantado o optrode [14].

O optrode com o μ-LED integrado utilizará a luz emitida para estimular as células neuronais através da ativação de opsinas. A opsina alvo designa-se por *channelrhodopsin-2* (ChR2) e depende de dois parâmetros para ser ativada: comprimento de onda e potência ótica. O comprimento de onda da luz deve compreender valores entre 400 e 500 nm [27]. A potência mínima para ocorrer estimulação nos tecidos neuronais é de 1 mW/mm^2 [32]. O fotodíodo FDS100-CAL da Thorlabs em conjunto com o medidor de potência (Power Meter 1918-R) será utilizado na medição da potência ótica do μ-LED. A fórmula para o cálculo da potência ótica é dada pela equação 1 onde I é a corrente produzida pelo fotodíodo e R_λ é a responsividade do fotodíodo num determinado comprimento de onda (λ).

$$P = \frac{I}{R_\lambda} \qquad \text{Equação 1}$$

P = potência ótica (W);

I = corrente do fotodíodo;

R_λ = responsividade (A/W).

O μ-LED escolhido deverá cumprir as caraterísticas de comprimento de onda e potência ótica previamente designadas. Como tal selecionaram-se dois μ-LED's para testes: ELC-470-37 da empresa Roithner Lasertechnik GmbH e C470DA2432 da empresa Cree Inc. O propósito passa por descobrir qual dos dois apresenta melhores atributos (comprimento de onda, potência emitida, ângulo de emissão) para

realizar a ativação da opsina ChR2. Os µ-LED's e as suas dimensões encontram-se representados na figura 32 e figura 33. O µ-LED C470DA2432 (figura 33) apresenta dimensões ligeiramente menores do que o µ-LED ELC-470-37 (figura 32), um fator importante no espaço ocupado pelo µ-LED no optrode.

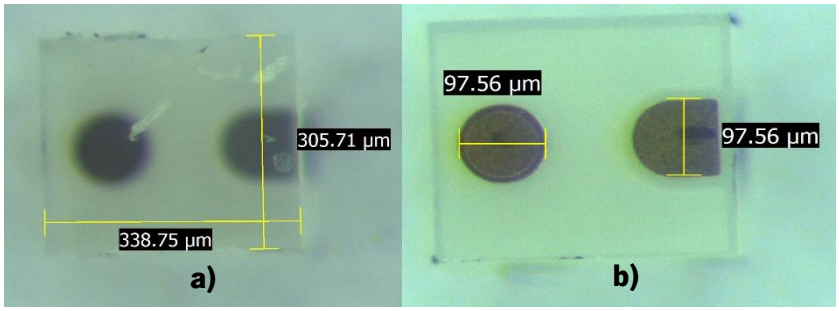


Figura 32: µ-LED ELC-470-37: a) parte frontal e dimensões; b) base do µ-LED e dimensões dos contactos.

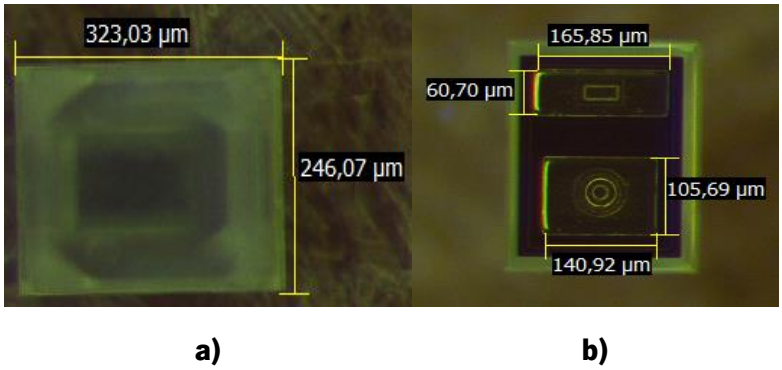


Figura 33: µ-LED C470DA232: a) parte frontal e dimensões: b) base do µ-LED e dimensões dos contactos.

O optrode deverá reunir um conjunto de requisitos de forma a manter viáveis as funções de estimulação e gravação durante o maior tempo possível. Os requisitos foram definidos com base numa reflexão dos pontos anteriores:

I. O material do substrato do optrode deverá ser suficientemente robusto para ser inserido no cérebro sem partir;
II. O optrode deverá apresentar uma geometria que facilite a inserção e acomodação aos µ-movimentos do tecido neuronal;
III. O material da agulha do optrode terá de ser biocompatível e resistente às condições ao qual estará sujeito durante o tempo de implantação;

IV. As tecnologias a serem empregues no fabrico do dispositivo optogenético deverão ter em conta o custo, a simplicidade e a reprodutibilidade, sabendo que o dispositivo é frágil e pode ser danificado facilmente;

V. O μ-LED deverá emitir luz com um comprimento de onda entre os 400 e 500 nm e potência superior a 1 mW/mm^2 para ocorrer estimulação ótica dos tecidos neuronais.

3.1.2. Protótipo

O modelo adotado para o optrode encontra-se representado na figura 34. O modelo foi desenhado consoante os requisitos impostos no subcapítulo anterior. O optrode é constituído por duas partes, a base e a agulha. A agulha é a parte do optrode que ficará inserido no cérebro do rato, em contacto com o tecido neuronal. A agulha detém 10 μ-elétrodos que apresentam dimensões de 50 μm x 50 μm (comprimento x largura) cada um. Os contactos para integração do μ-LED apresentam dimensões de 100 μm x 100 μm (comprimento x largura) cada um. As dimensões e distribuição dos μ-elétrodos na agulha tem como objetivo ter à disposição o maior número possível de pontos de leitura dos potenciais neuronais no mínimo espaço possível, tendo em conta as restrições de fabrico. Após excitação celular, a informação gravada pelos μ-elétrodos será transmitida através de pistas até aos contactos localizados na base. Os contactos estarão ligados a um circuito eletrónico exterior onde as informações recolhidas da atividade neuronal serão analisadas.

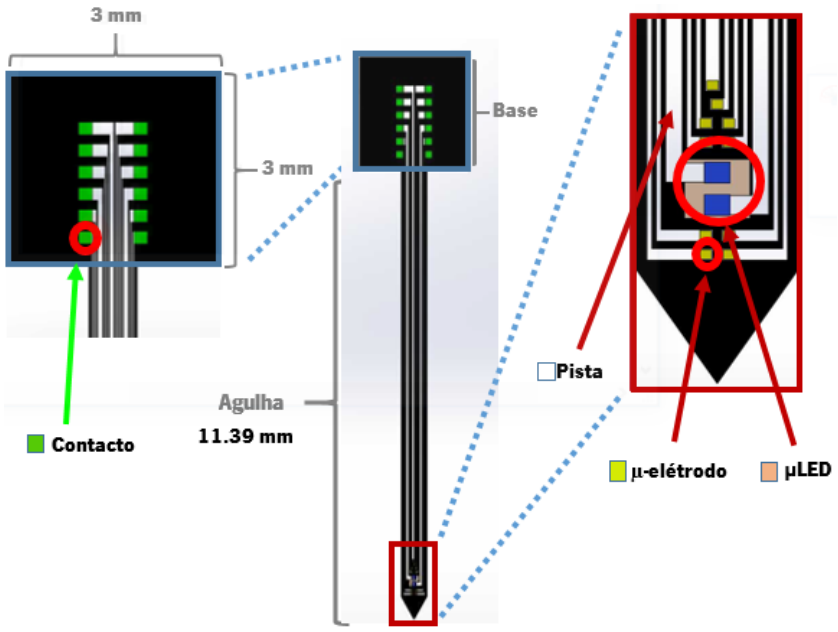


Figura 34: Representação do modelo proposto para o optrode.

3.2. Materiais

A conceção do optrode envolve a seleção de diferentes materiais de acordo com as suas propriedades físicas e função para a qual são designados. Nas propriedades físicas do material consideram-se as caraterísticas a nível mecânico, elétrico, químico e ótico. O presente optrode é fragmentado em três partes: o substrato, os μ-elétrodos e o encapsulamento. A escolha do substrato é de extrema relevância pois será o suporte do optrode. O material constituinte do substrato deverá deter rigidez suficiente para perfurar o cérebro e aguentar a tensão exercida sobre toda a sonda sem que esta quebre. Os μ-elétrodos são constituídos por um transdutor iónico biocompatível capaz de aguentar o contacto com o tecido neuronal sem se degradar. O encapsulamento tem de ser composto por um material isolante elétrico e biocompatível afim de não fazer curto-circuitos e não desencadear reações alérgicas aquando do contacto com o tecido neuronal.

3.2.1. Substrato

O material selecionado como substrato do optrode foi o Si porque confere integridade ao optrode e é compatível com os processos de microfabricação a ser utilizados. No substrato de Si serão padronizados os μ-elétrodos, contactos e pistas. Os μ-elétrodos estão situados na ponta da agulha do optrode e vão receber as informações da atividade neuronal sobre a forma de impulsos elétricos. Essa informação é conduzida desde os μ-elétrodos até aos contactos, localizados na base do optrode, através das pistas. O Si apresenta, além de vantagens económicas e excelentes caraterísticas semicondutoras, boas propriedades mecânicas. O Si apresenta elevada resistência mecânica (relativamente a materiais como o aço ou alumínio, por exemplo) quando aplicadas tensões [33]. A resistência mecânica de um material corresponde à tensão máxima aplicada ao material antes da sua rutura. O cálculo da resistência mecânica é dado pela divisão da força máxima suportada pelo material pela área de secção na qual a força está a ser aplicada equação 2.

$$Tensão\ (MPa) = \frac{Força\ (N)}{Área\ (m2)} \qquad \text{Equação 2}$$

O optrode terá de ser resistente o suficiente aquando da sua implantação no tecido neuronal, sem partir. O módulo de elasticidade ou módulo de Young (E) é o coeficiente entre a tensão aplicada e a deformação elástica daí resultante (figura 35). O módulo de elasticidade está também relacionado com

a rigidez do material: quanto maior o módulo de elasticidade, maior a sua rigidez. A equação 3 traduz o módulo de elasticidade.

$$E = \frac{\frac{F}{A}}{\frac{\Delta L}{L}} \qquad \text{Equação 3}$$

E = módulo de elasticidade (Pa);

F= força exercida (N);

A = área (m^2);

ΔL = diferença entre o comprimento original e o comprimento após deformação (m);

L = comprimento original do objeto (m).

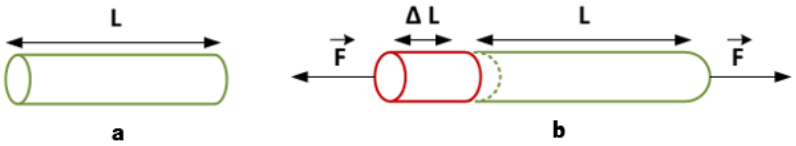


Figura 35: Objeto: a) antes de ser sujeito a uma força; b) resultado da deformação quando sujeito a forças distensíveis.

Na presente dissertação é requerido que o módulo de elasticidade do material da sonda neuronal seja superior ao do cérebro. O Si apresenta um módulo de elasticidade (165 GPa) [33], bastante superior ao do cérebro (15 kPa) [33], pelo que o optrode tem condições de penetrar o cérebro sem quebrar.

A resistência mecânica encontra-se relacionada com a deformação que o material pode conceber sem partir. A deformação elástica (ε) é proporcional à tensão (σ) dentro de certos limites (tensão limite de proporcionalidade na figura 36). Na zona elástica quando o corpo deixa de estar sujeito a forças retorna ao estado normal. Neste caso, o Si é um material que se deforma pouco e, quando está sujeito a tensões superiores àquelas que consegue suportar (tensão máxima sem partir na figura 36), quebra.

$$\sigma = E * \varepsilon \qquad (4)$$

σ = tensão (N/mm^2);

E = módulo de elasticidade (Pa);

ε = deformação elástica.

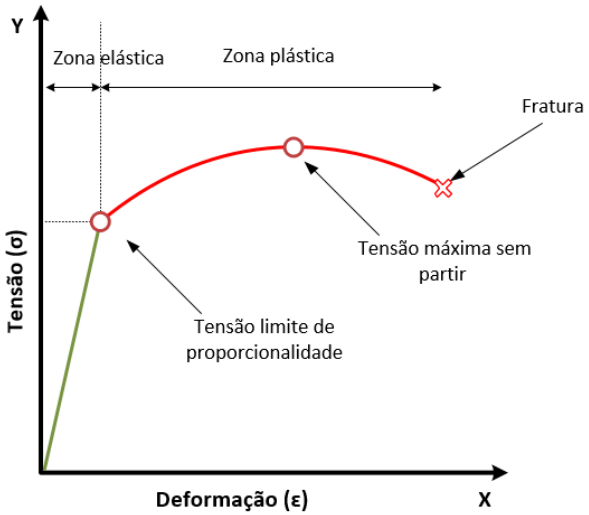


Figura 36: Curva típica tensão/deformação de um material [34].

Para garantir o isolamento elétrico entre o Si e os metais padronizados por cima, será utilizada uma camada de SiO_2 [35]. A escolha da bolacha de Si decai sobre três vertentes: a espessura, o tipo de dopagem e a orientação dos cristais de Si. A espessura da bolacha de Si tem de ser suficientemente elevada para suportar todos os processos de fabrico do optrode sem partir. A bolacha de Si tem espessura de 525 ± 25 µm, é polida de um dos lados, e tem depositado sobre ele um filme de SiO_2 com 1 µm de espessura. A escolha da bolacha de Si do tipo n (100) baseou-se nas experiências de corte realizadas anteriormente. As bolachas de Si do tipo n (100) apresentam uma resistência superior à quebra durante o corte, relativamente às restantes, devido ao índice de Miller (figura 37).

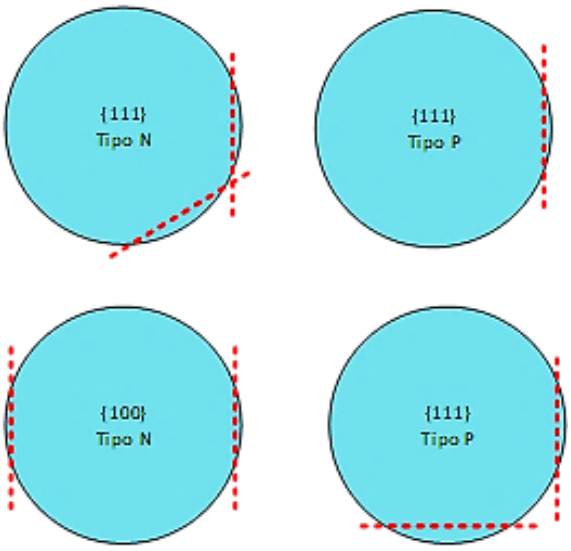


Figura 37: Orientação dos cristais das bolachas de Si do tipo n e tipo p segundo o respetivo índice de Miller (a vermelho).

3.2.2. μ-elétrodos

Os μ-elétrodos serão constituídos por um material biocompatível e com baixa impedância (< 1 MΩ a 1 kHz) para que seja possível realizar a transição de iões entre o μ-elétrodo e o tecido neuronal. Um μ-elétrodo de Pt, nas gravações *in vivo*, deverá apresentar uma elevada injeção de cargas e ser biocompatível. Além destas propriedades, a Pt detém boa condutividade elétrica, resistência ao eletrólito e é tolerante a ataques químicos [36].

A Pt deverá ser utilizada como transdutor iónico de cargas, no entanto, foram acrescentados um filme-fino de Ti e outro de Al no fabrico dos μ-elétrodos. Para simplificar o processo de fabrico, os μ-elétrodos e os contactos para o μ-LED deverão ser depositados ao mesmo tempo. O Al é utilizado para reduzir a resistência dos filmes-finos, o que permite reduzir o tamanho das pistas do μ-LED. O Ti é utilizado como camada de adesão entre o Al e o SiO_2. O último filme a ser depositado é a Pt, por cima do Al, tendo em conta que é o material que efetuará a transdução iónica.

3.2.3. Encapsulamento

O material utilizado para encapsular a sonda neuronal terá como objetivo conceder ao dispositivo biocompatibilidade e isolamento elétrico. O intuito será encapsular as zonas que estão em contacto com o tecido neuronal, deixando os locais dos μ-elétrodos expostos, de forma a não desencadear reações adversas aquando da implantação da sonda. As reações alérgicas desencadeadas por um material não biocompatível induzem leituras erradas, por parte dos μ-elétrodos, dos sinais provenientes da atividade neuronal. Outro aspeto a ter em atenção é o facto de o material de encapsulamento atuar como proteção contra a corrosão da estrutura durante o tempo em que a sonda neuronal se encontra implantada. Utilizaram-se dois materiais para o encapsulamento da agulha da sonda neuronal: o nitreto de silício (Si_3N_4) e o PDMS. O material utilizado para o encapsulamento da parte de cima da agulha do optrode (onde estão os μ-elétrodos) foi o Si_3N_4. O Si_3N_4 apresenta resistência mecânica e dureza elevadas bem como boa estabilidade química, sendo inerte à maioria das soluções corrosivas [37]. A parte de baixo da agulha será encapsulada com PDMS. O PDMS é um polímero viscoso e um material usado atualmente nas indústrias da biomédica e microeletrónica devido à sua biocompatibilidade, baixo custo e cura à temperatura ambiente.

3.3. Tecnologias

No fabrico do optrode recorreu-se a um conjunto de tecnologias ou técnicas de microfabricação, balanceando entre o custo, disponibilidade no laboratório e capacidade de reprodução. Utilizaram-se diversas tecnologias, no entanto, são destacadas três: fotolitografia, deposição física de vapor (PVD) e corte com lâmina. As restantes serão mencionadas aquando da descrição mais detalhada do fabrico do optrode.

3.3.1. Fotolitografia

A fotolitografia é uma técnica que utiliza a luz e uma máscara ótica para a padronização de figuras geométricas numa superfície. No processo de fabrico do optrode, a fotolitografia será utilizada para padronização de pistas, contactos e encapsulamento no substrato de Si/SiO_2. O processo de padronização envolve a utilização de um polímero fotossensível negativo ou positivo. A deposição do polímero é seguida de exposição ultravioleta e processo de revelação. No caso do polímero fotossensível positivo as zonas expostas à luz ultravioleta tornam-se solúveis quando mergulhadas na solução de revelação, ficando no final as zonas que não foram expostas à luz (ver figura 38).

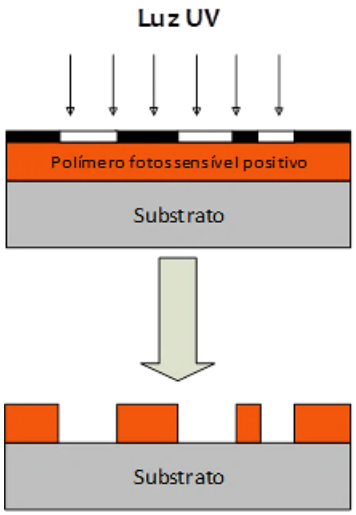


Figura 38: Exposição do polímero fotossensível positivo à luz UV através de uma máscara de luz e respetivo resultado.

No polímero fotossensível negativo as regiões expostas à luz padecem do fenómeno de ligação cruzada. As áreas expostas permanecem rígidas, não ficando diluídas no revelador. No final do processo de revelação ficam as regiões que foram expostas à luz ultravioleta (ver figura 39).

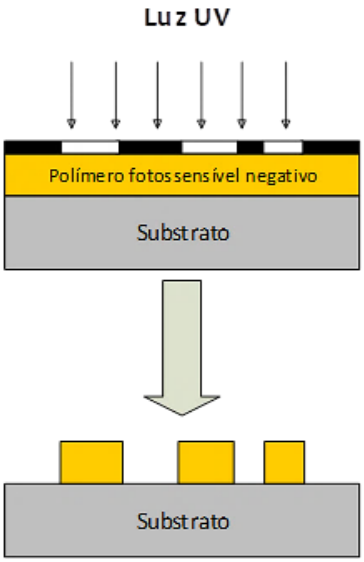


Figura 39: Exposição do polímero fotossensível negativo à luz UV através de uma mascara de luz e respetivo resultado.

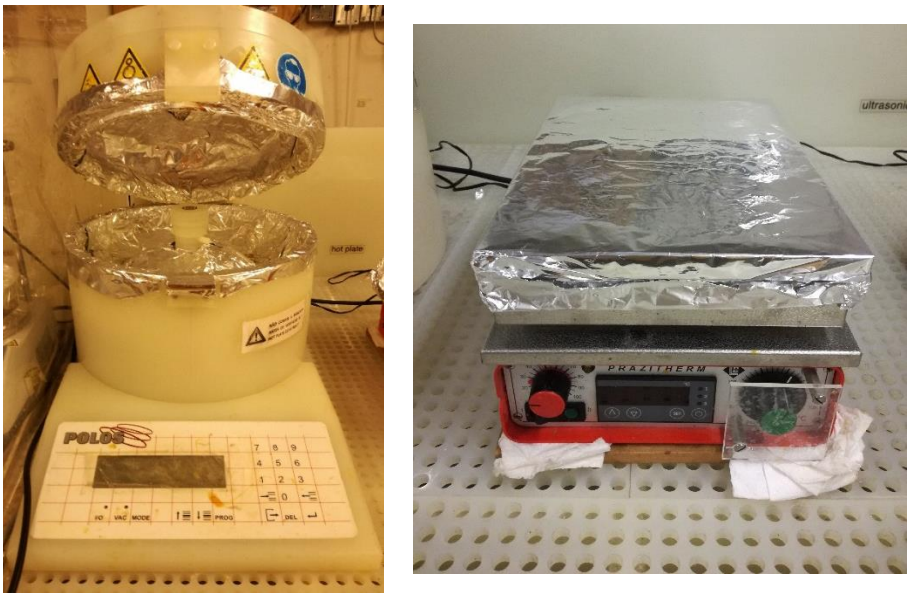
No processo de fotolitografia existem três diferentes técnicas que podem ser empregues:

i. Técnica subtrativa – o polímero fotossensível é colocado sobre um filme-fino e de seguida realiza-se o processo por corrosão. No final o polímero fotossensível é removido, permanecendo os locais de interesse com o filme desejado [38];
ii. Técnica aditiva – o polímero fotossensível é depositado sobre o substrato de Si. De seguida é depositado sobre o polímero o filme do material desejado. Por fim é realizado o processo de *lift-off* [38];
iii. Técnica de modificação – o polímero fotossensível expõe ou protege a área que é modificada através de dopagem, cura ou recozimento [38].

A técnica a ser utilizada será a aditiva, visto que não subsistem no laboratório recursos disponíveis para a realização da corrosão de Pt.

A deposição do polímero fotossensível será realizada através do aparelho de centrifugação POLOS que se encontra disponível no laboratório (figura 40 a)). A utilização deste aparelho permite uma rápida deposição de polímeros fotossensíveis no substrato. A espessura do polímero a ser depositado pode ser controlada através da introdução de parâmetros como a velocidade de rotação, aceleração e tempo.

Nos processos de cura do polímero fotossensível utilizou-se uma placa de aquecimento de precisão Präitherm PZ23-2 da empresa Harry Gestigkeit GmbH. A imagem da placa de aquecimento encontra-se representada na figura 40 b).



a) **b)**

Figura 40: Equipamento: a) de centrifugação POLOS utilizado para deposição do polímero fotossensível; b) placa de aquecimento Präitherm PZ23-2 da empresa Harry Gestigkeit GmbH.

A exposição da amostra à luz UV para a padronização dos μ-elétrodos, pistas e contactos foi realizada através do equipamento Karl SUSS MUB3 (figura 41). O equipamento de exposição emite comprimentos de onda de 365 nm ou 405 nm e permite alinhar as amostras com a respetiva máscara.



Figura 41: Equipamento para exposição de luz UV (Karl SUSS MUB3).

3.3.2. Corte com lâmina

Na área de microeletrónica existem diversas técnicas que são empregues no corte de estruturas em bolachas de Si. As técnicas utilizadas podem ser mecânicas ou químicas. No corte do optrode optou-se por uma técnica mecânica de forma a não modificar as propriedades do substrato de Si. Entre as técnicas de corte mecânicas destacam-se o corte a laser, riscar e partir a bolacha de Si e, por fim, o corte com lâmina [39]. O processo escolhido para definir a estrutura do optrode foi o corte com lâmina. Esta tecnologia comporta uma série de caraterísticas interessantes como a precisão no corte, o baixo custo, simplicidade e repetibilidade no processo [39].

O dispositivo utilizado para cortar as bolachas de Si foi o DAD-2H/6T da DISCO Corporation, (figura 42) equipado com a lâmina Z09-SD2000-Y1-90 revestida de diamante que pode atingir velocidades de rotação entre os 3000 rpm e 5000 rpm. A representação figurativa do processo de corte pode ser vista na figura 42.

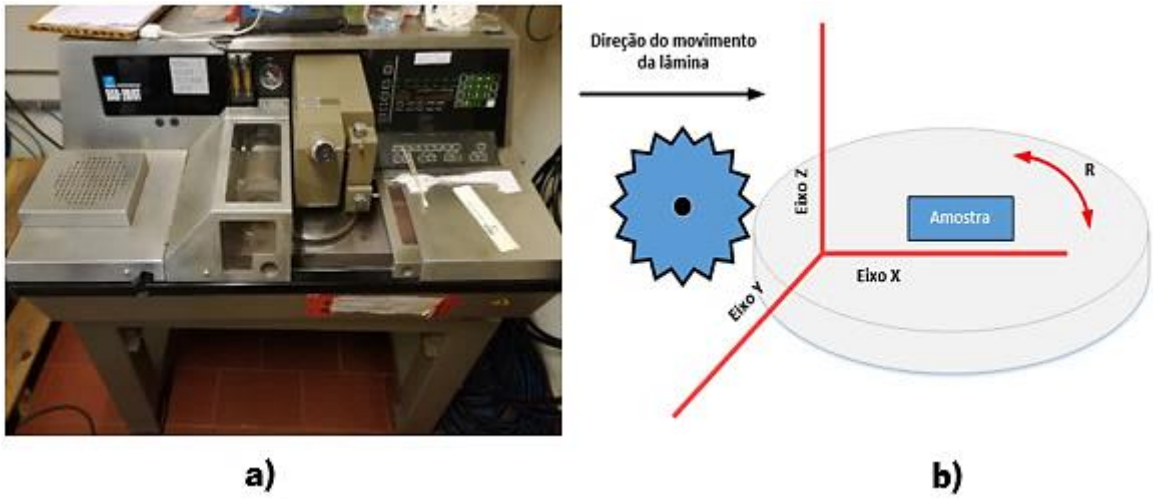


Figura 42: a) Equipamento utilizado para o corte com lâmina da estrutura do optrode (DISCO DAD-2H/6T); b) Representação do corte com lâmina e respetivos parâmetros de entrada.

Durante o processo de corte, a lâmina é constantemente arrefecida através de água desionizada. A qualidade de corte da bolacha de Si é influenciada pela velocidade de rotação da lâmina, pelo fluxo de água que é despendido sob a bolacha de Si e pela velocidade que a amostra passa através da lâmina durante o corte. No decorrer do corte é importante que a amostra de Si se encontre fixa para que o golpe seja feito sem problemas. Para fixar a bolacha de Si utiliza-se uma fita adesiva em contacto com a mesa, realizando de seguida vácuo. O alinhamento da amostra pode ser feito com recurso a um microscópico

a uma luz infravermelha de referência. Os parâmetros a programar durante o processo de corte podem ser vistos na tabela 3.

Tabela 3: Parâmetros a introduzir no dispositivo de corte e a respetiva função.

Eixo das coordenadas	Função
X	Define o comprimento do corte
Y	Define a distância entre os dois cortes realizados numa mesma sessão
Z	Define a profundidade do corte
R	Define a rotação da mesa (utilizada no corte do bico da agulha)

3.3.3. Deposição física de vapor (PVD)

A deposição física de vapor é um método de deposição onde átomos ou moléculas são evaporados de um material líquido ou sólido. O material será transportado sobre o estado físico de vapor dentro de uma câmara em vácuo ou com baixa pressão, acabando depositado num substrato [40].

A deposição através do método PVD pode ser somente de um ou de diversos materiais. A deposição física de vapor apresenta também a caraterística de permitir a deposição de filmes-finos a temperaturas elevadas. O método PVD apresenta vantagens relativamente à evaporação térmica, possibilitando altas taxas de deposição e evaporação a temperaturas baixas [41].

Feixe de eletrões

A deposição através de feixes de eletrões é uma das técnicas de deposição física de vapor desenvolvida com o intuito de depositar uma ou mais substâncias num substrato. O método de deposição por feixe de eletrões é utilizado para a produção de revestimentos de motores de avião, componentes eletrónicos ou material detetor de infravermelhos para a temperatura ambiente devido à sua resistência a elevadas temperaturas e resistência ao desgaste [42]. A técnica de deposição por feixe de eletrões permite a deposição de filmes finos de grande densidade e boa adesão ao substrato [42].

O método de deposição por feixe de eletrões apresenta vantagens relativamente aos outros processos de deposição física de vapor pelo facto de ser mais eficiente e apresentar custos mais reduzidos [42]. Esta técnica utiliza um feixe de eletrões que embate a altas velocidades contra o material alvo acabando por aquecê-lo e sublimá-lo. As baixas pressões à qual a câmara se encontra faz com que o material, em forma de vapor, suba e acabe depositado sobre o substrato (figura 43).

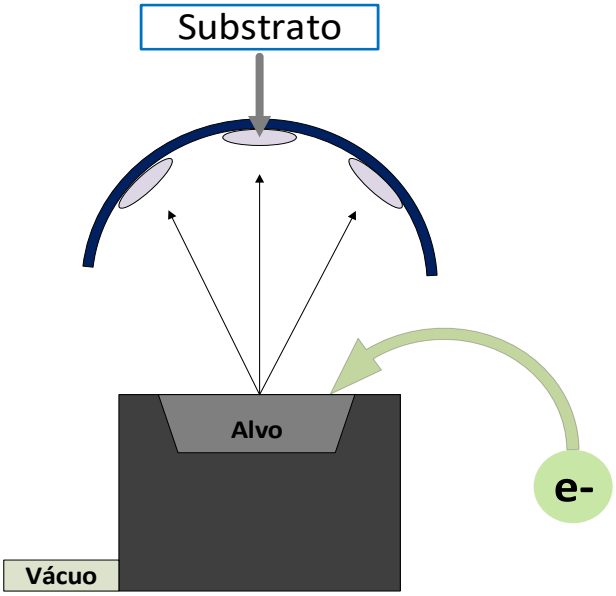


Figura 43: Deposição de um filme num substrato por feixe de eletrões.

A técnica de deposição por feixe de eletrões será empregue na deposição de Ti e Al. A utilização do feixe de eletrões deve-se à capacidade de aquecimento, a altas temperaturas, de materiais com um ponto de fusão elevado, permitindo elevadas taxas de deposição, contribuindo para um filme de alta densidade com elevada adesão ao substrato.

Pulverização catódica

A deposição de filmes-finos por pulverização catódica é, a par do feixe de eletrões, um dos métodos de deposição física de vapor mais utilizados. A pulverização catódica é empregue não só na deposição de filmes finos mas também na indústria de produção de semicondutores e também na deposição de Au para acabamentos decorativos, relógios ou joias [43].

Na pulverização catódica o processo de deposição é realizado numa câmara de vácuo na qual é inicialmente introduzido, de forma controlada, um gás (figura 44). Os iões do gás introduzido são energizados através da conciliação entre campos magnéticos e elétricos, formando um plasma. Os iões do plasma são bombardeados contra o material alvo, libertando átomos do alvo que serão depositados no substrato.

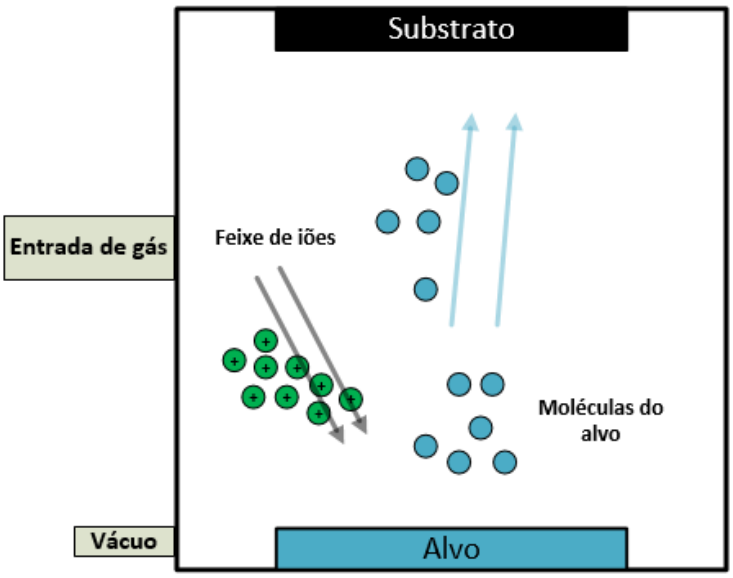


Figura 44: Deposição de um filme num substrato por pulverização catódica.

A técnica de deposição através de pulverização catódica será utilizada para a deposição de filmes de Pt e Si_3N_4. A técnica de deposição catódica consegue preencher facilmente espaços devido à grande área de incidência do feixe de iões no alvo, produzindo filmes com uniformidade em espessura [40]. A câmara de vácuo disponível no laboratório para deposição de filmes através das técnicas de feixe de eletrões e de pulverização catódica pode ser vista na figura 45.

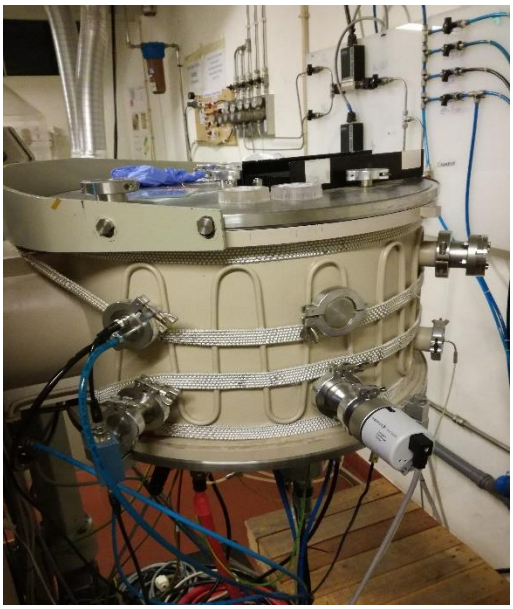


Figura 45: Câmara de vácuo utilizada para a deposição através de feixe de eletrões e pulverização catódica.

4. Fabrico do optrode

O fabrico do optrode em substrato de Si compreende uma série de passos principais e intermédios desde a microfabricação à caracterização do dispositivo. Durante o processo de fabrico existem fatores como a limpeza das amostras ou a temperatura ambiente que podem influenciar o sucesso do resultado final. Com o objetivo de responder a eventuais falhas causadas por estes fatores, em cada processo de fabrico, são produzidos quatro optrodes com o intuito de aumentar a produção, comprovando também o conceito de reprodutibilidade.

O presente capítulo aborda, de forma detalhada, as diferentes etapas necessárias para o fabrico do optrode em substrato de Si com μ-LED integrado. O primeiro passo será a padronização das pistas e contactos numa amostra retangular de Si, previamente cortada, com as dimensões de 75 mm x 30 mm (comprimento x largura). Após o primeiro processo litográfico, segue-se a deposição dos filmes-finos e posterior encapsulamento com o intuito de proteger as pistas e contactos durante o procedimento de corte da estrutura. Concluídos os processos litográficos e de corte que definem a estrutura do optrode, segue-se a etapa de acoplamento do μ-LED no dispositivo. O resultado final consiste num optrode para aplicação optogenética. O optrode é constituído por uma base com dimensões de 3 mm x 3 mm (comprimento x largura) e uma agulha em forma de bico com 8 mm de comprimento e 700 μm de largura. Na agulha encontram-se os μ-elétrodos com dimensões de 50 μm x 50 μm (comprimento x largura) e dois contactos para acoplar o μ-LED. Os μ-elétrodos encontram-se conectados a pistas com espaçamento e largura de 20 μm. Ao longo dos subcapítulos serão apresentados os métodos de fabrico e os resultados obtidos em cada um. No final é apresentado um subcapítulo com depreciações gerais dos resultados obtidos no processo de fabrico do optrode.

4.1. Preparação das amostras

As bolachas de Si do tipo n são adquiridas com o formato da figura 46 a), apresentando espessura de 525 ± 25 μm e diâmetro de 4 polegadas. De forma a rentabilizar o material disponível, o primeiro passo consiste na divisão da bolacha de Si em duas amostras retangulares utilizando a técnica de corte com lâmina. As amostras apresentam dimensões de 30 mm de largura e 75 mm de comprimento. O esquema de corte das bolachas de Si é apresentado na figura 46 a) e o resultado final na figura 46 b).

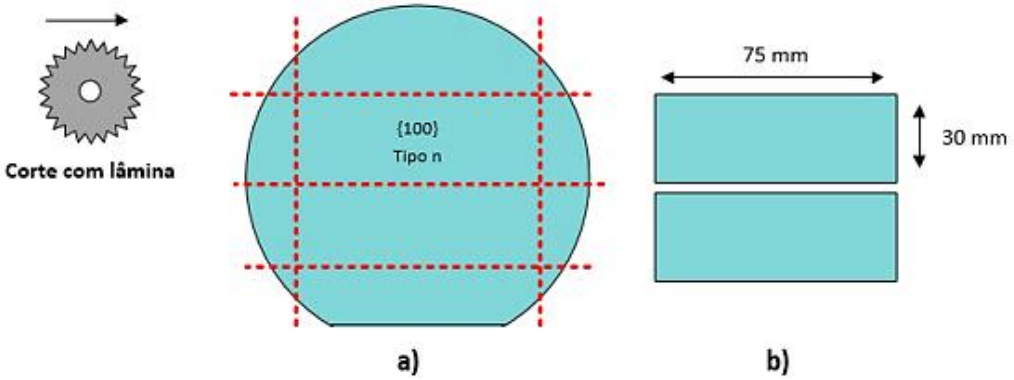


Figura 46: a) Processo de corte da bolacha de silício; b) amostras após corte com lâmina.

4.2. Litografia para as pistas/contactos

Na litografia para padronização de pistas e contactos utilizou-se o polímero fotossensível negativo AZ® nLOF 2070 da empresa MicroChemicals. Os parâmetros de centrifugação foram otimizados para obter espessura de 7 µm. O processo litográfico para a deposição de pistas e contactos seguiu uma sequência de etapas, otimizadas, com o intuito de conseguir um filme com as condições adequadas para a deposição de Ti, Al e Pt. A receita foi conseguida, e adaptada às condições oferecidas pelo laboratório, através da leitura e análise da ficha de produto do polímero fotossensível negativo AZ® nLOF 2070. De seguida é apresentado o procedimento otimizado para a litografia das pistas/contactos.

4.2.1. Limpeza do substrato

Durante o corte com lâmina é acumulado Si em pó na superfície da amostra bem como outras impurezas presentes no ambiente onde se estão a realizar os processos de fabrico. Como tal é necessário garantir que a superfície da amostra se encontra limpa antes da deposição do polímero fotossensível negativo no substrato. O primeiro passo de limpeza é utilizar um pedaço de papel embebido em acetona e limpar suavemente a superfície das amostras para remover as sujidades maiores. De seguida emergiram-se as amostras num banho de acetona com agitação ultrassónica a 40 ºC durante 20 minutos. O banho ultrassónico em acetona garante a limpeza de qualquer resíduo orgânico nas amostras. Depois do banho ultrassónico as amostras foram limpas com água destilada, isopropanol (IPA) e novamente com água destilada. Por fim as quatro amostras foram secas com uma pistola de azoto. Durante todo o processo de fabrico utilizaram-se recursos como luvas, máscara e bata para prevenir contaminações da amostra por contacto ou respiração. Após a limpeza, a amostra é colocada na placa

de aquecimento durante 20 minutos a 110 °C para desidratarem e promover a adesão do polímero fotossensível ao substrato.

4.2.2. Deposição do polímero fotossensível

No processo de *lift-off* definiu-se que a espessura do polímero fotossensível negativo (AZ® nLOF 2070) seria de 7 µm (espessura suficiente para garantir a remoção do polímero após as deposições). O polímero fotossensível deverá ser deitado cuidadosamente e uniformemente na amostra para que não ocorra a formação de bolhas. A espessura do filme pode ser obtida através da inserção dos seguintes parâmetros no aparelho de centrifugação (tabela 4):

Tabela 4: Parâmetros do equipamento de centrifugação para um filme de 7 µm de AZ® nLOF 2070.

Parâmetros	**1º Passo**	**2º Passo**
Velocidade de rotação (rpm)	1500	2500
Tempo de rotação (s)	5	15
Aceleração (rotações/s^2)	200	200

4.2.3. Primeira cura

No fim do processo de deposição do polímero fotossensível negativo no substrato, encontra-se presente no filme uma elevada concentração de solventes. A concentração de solventes varia consoante a espessura e tipo de polímero depositado. É realizada uma primeira cura com o intuito de tornar o polímero sensível à luz e evaporar os solventes.

A amostra é colocada na placa de aquecimento durante 10 minutos a 110 °C. A concentração de solventes varia consoante a zona do polímero fotossensível. Nas zonas mais profundas a quantidade de solventes presente é maior do que a zona que está mais próxima da superfície. Por isso a utilização de uma placa de aquecimento ao invés de um forno permite que a cura comece pela parte que se encontra em contacto com a placa (zona mais funda). Assim permite que a superfície do material não evapore primeiro nem que as moléculas de solventes fiquem retidas dentro do filme. Após o passo da primeira cura as amostras foram protegidas da luz ambiente até ao processo de exposição.

4.2.4. Reidratação

No processo de exposição é necessário garantir a existência de uma quantidade mínima de água no filme. Isso não acontece logo após o passo da primeira cura, pelo que é necessário deixar a amostra em repouso dentro de uma caixa metálica antes de ir para a exposição. Se o tempo de espera entre o processo de primeira cura e exposição for demasiado curto, o processo de revelação irá ser bastante elevado. A fonte de água para a reidratação é a atmosfera do meio ambiente. A amostra é colocada assim durante 20 minutos dentro de uma caixa metálica para ganhar uma percentagem entre 40% a 50% de água (% de água ideal para a revelação).

4.2.5. Exposição ótica

O processo de exposição do polímero fotossensível representa o processo chave na padronização de estruturas. A exposição ótica é feita submetendo o polímero fotossensível à luz UV através de uma máscara. Tendo em conta que o polímero fotossensível é negativo, a máscara não deixará passar luz nas zonas que se pretende que fiquem padronizadas no substrato. As zonas que estão expostas à luz UV sairão durante o processo de revelação. A máscara utilizada para a padronização de pistas e contactos encontra-se representada na figura 47. As cruzes presentes na máscara de luz servem para realizar o alinhamento entre a primeira e a segunda exposição. Tanto a máscara utilizada na padronização das pistas/contactos como para o encapsulamento foram fabricadas pela empresa Micro Lithography Services Ltd. O tempo de exposição foi otimizado para 5.4 segundos. A exposição foi realizada em duas instâncias de 2.7 segundos cada pois o equipamento de exposição não tem a capacidade de realizar a exposição durante o tempo pretendido de uma só vez. O valor do tempo de exposição ótica foi definido consoante o conhecimento prévio de experiências realizadas anteriormente no laboratório.

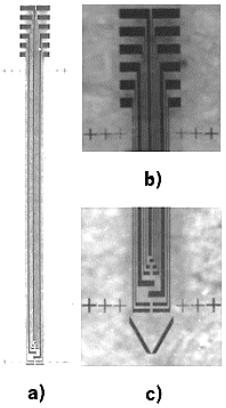


Figura 47: Máscara utilizada no processo litográfico das pistas e contactos: a) completa; b) zona dos contactos e cruzes de alinhamento superiores; c) zona dos μ-elétrodos e cruzes de alinhamento inferiores.

4.2.6. Cura pós exposição

Após a exposição ótica, as zonas expostas à luz UV são enrijecidas durante o processo de cura devido às suas características fotossensíveis. Nos polímeros fotossensíveis negativos ocorre o fenómeno de ligação cruzada entre os polímeros nas zonas não expostas à luz UV. A cura pós exposição é imprescindível para fortalecer essas ligações para que durante o processo de revelação as zonas não expostas à luz se tornem insolúveis. Definiu-se um tempo de cura de 10 minutos, colocando a amostra a 110 °C na placa de aquecimento.

4.2.7. Revelação do polímero fotossensível

O último passo da litografia das pistas e contactos consiste na revelação do polímero fotossensível. O revelador é composto por uma solução aquosa de iões livres de metal e servirá para diluir as zonas solúveis que foram expostas à luz UV. O revelador escolhido foi o AZ® 726 MIF da empresa Microchemicals. A temperatura é um fator importante na taxa de revelação: quanto maior for a temperatura, mais rápido é o processo de revelação. No verão, com temperatura ambiente superior a 25 °C, o tempo de revelação foi definido para 3 minutos, enquanto no inverno o tempo de revelação chegou aos 6 minutos. Outro aspeto a ter em conta é não deixar a tampa do frasco do revelador aberta pois a maioria das soluções reveladoras utilizam químicos para neutralizar o dióxido de carbono (CO_2). A exposição do revelador a ambientes com CO_2 faz com que a taxa de revelação seja mais demorada. Um esquema do processo de padronização dos contactos/pistas pode ser visto na figura 48.

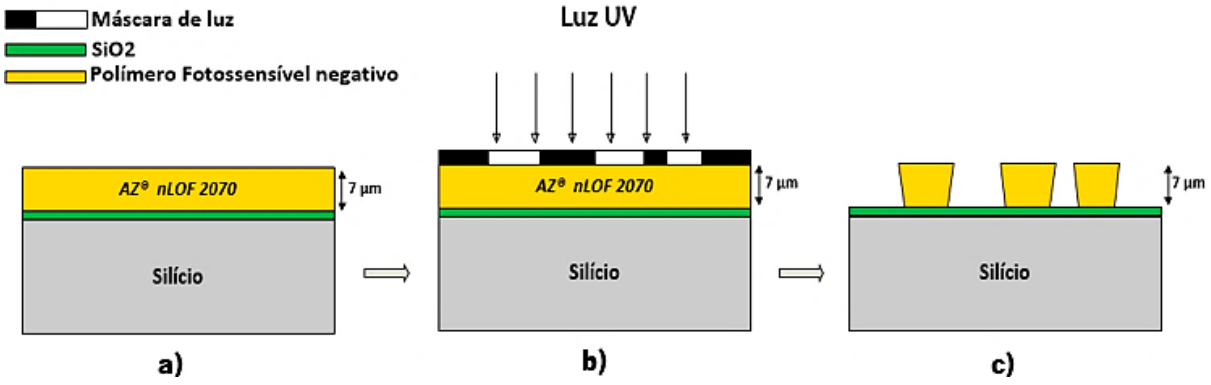


Figura 48: Processo litográfico: a) deposição do polímero fotossensível negativo; b) exposição da amostra à luz UV através de uma máscara de luz; c) resultado final após revelação.

Um contratempo no resultado final do processo é a existência de sujidades presentes no substrato que podem originar cortes ou curto-circuito de pistas, inutilizando por completo o µ-elétrodo ao qual se encontram ligados. O motivo de se utilizar a fotolitografia para padronização de estruturas é a

simplicidade do processo, sendo somente necessários uma máscara e uma fonte de luz UV. Após a revelação do polímero fotossensível com sucesso, as pistas e contactos estão padronizados no substrato de Si, resultando num filme ótimo para a deposição de metais.

4.3. Deposição de Ti/Al/Pt

O processo seguinte à litografia de pistas e contactos é a deposição dos filmes metálicos. Neste processo fixaram-se as amostras num suporte com auxílio de fita-cola de kapton® devido à sua resistência às temperaturas que são aplicadas durante o processo de deposição. A utilização de uma máscara de sombra permite delimitar o local do material depositado, restringindo à área padronizada, e facilitando posteriormente o processo de remoção do polímero fotossensível. A disposição de amostras no suporte da câmara de deposição pode ser vista na figura 49.

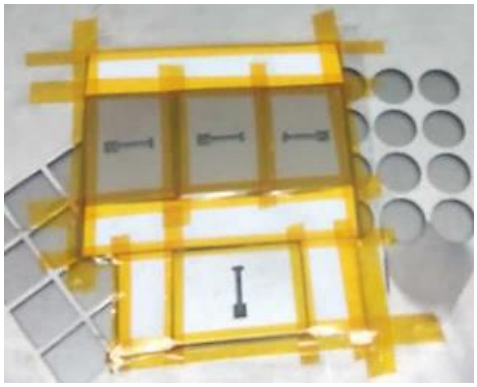


Figura 49: Disposição das amostras no suporte da câmara de deposição.

Em primeiro lugar depositou-se um filme de Ti, atuando como camada de adesão entre o SiO_2 e o Al. O Ti foi depositado através de feixe de eletrões com 15 nm de espessura. A pressão inicial da câmara encontrava-se a 5.7 $x10^{-6}$ mbar e a temperatura final foi de 75 °C. Forneceu-se um potencial elétrico de 7 kV e corrente de 50 mA. A taxa de deposição foi de 1.6 Å/s e demorou 1 minuto e 30 segundos.

A corrente necessária para o funcionamento do μ-LED levou a que fosse depositado Al para aumentar a condutividade elétrica das pistas. O Al foi depositado através de feixe de eletrões com 200 nm de espessura. A pressão inicial da câmara foi de 5.6 x 10^{-6} mbar e a temperatura registada após a deposição foi de 53 °C. O potencial elétrico fornecido foi de 7 kV e a corrente de 70 mA. A taxa de deposição do filme de Al foi de 22 Å/s e demorou 1 minuto e 30 segundos. Por fim, utilizou-se um alvo de Pt para depositar a camada de transdução de Pt. O filme de Pt tem uma espessura de 100 nm e foi depositado através de pulverização catódica por corrente contínua. A pressão da câmara no momento da deposição

era de 6 x 10^{-3} mbar e forneceu-se uma corrente de 0.30 mA, 20 sccm de árgon, potência de 110 W e um potencial elétrico de 353 V. A temperatura final registada na câmara foi de 53 °C. A taxa de deposição do filme de Pt foi de 3.2 Å/s e demorou 3 minutos. O processo de deposição dos filmes metálicos encontra-se representados na figura 50.

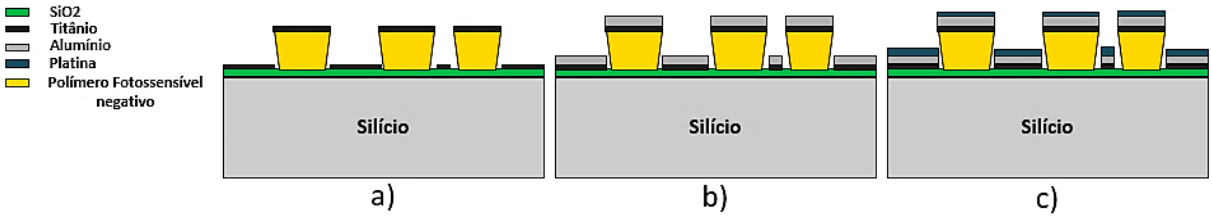


Figura 50: Deposição dos filmes metálicos: a) deposição de Ti por feixe de eletrões; b) deposição de Al por feixe de eletrões; c) deposição de Pt por pulverização catódica.

4.4. Remoção do polímero fotossensível negativo

A etapa sequente à deposição dos filmes metálicos é o *lift-off* onde se pretende remover o polímero fotossensível da amostra de forma a ficarem somente os metais padronizados. O *stripper* utilizado foi o TechnniStrip NI555 da empresa MicroChemicals devido ao seu elevado poder de dissolução de polímeros fotossensíveis negativos e compatibilidade com os metais depositados.

No primeiro passo do processo de remoção do polímero fotossensível colocaram-se as quatro amostras juntamente com o stripper numa caixa de vidro, entretanto colocados num recipiente de aço inoxidável. Utilizou-se o banho-maria para o processo de remoção do polímero fotossensível negativo. O dispositivo utilizado foi o Agimixt da empresa JP Selecta (figura 51) e funciona como placa de aquecimento/agitação. O equipamento possui também um sensor de temperatura que fez o controlo da temperatura, mantendo a água do banho-maria a 75 °C. O tempo de remoção depende da adesão do polímero fotossensível negativo ao substrato variando o processo entre 20 a 30 minutos. O esquema de montagem utilizado é apresentado na figura 51.

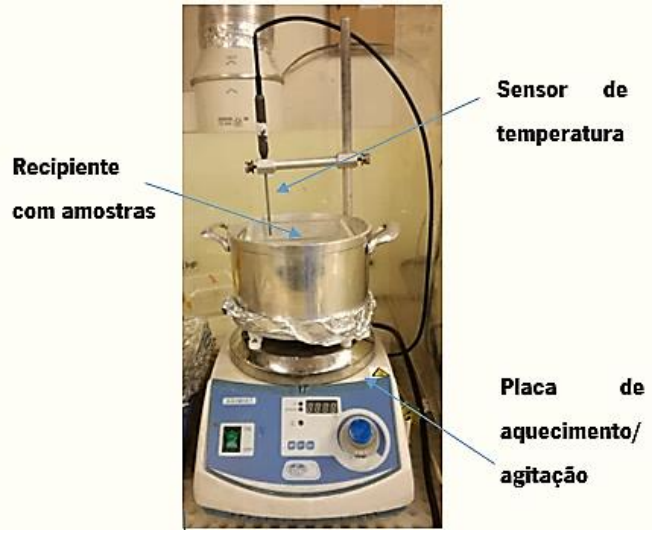


Figura 51: Configuração da placa de agitação/aquecimento com sensor de temperatura para remoção do polímero fotossensível.

4.5. Litografia para o encapsulamento

O segundo processo litográfico tem como objetivo proteger as amostras da sujidade deixada pelo Si durante o processo de corte com lâmina e também a padronização das aberturas para os µ-elétrodos/contactos.

Na litografia para o encapsulamento utilizou-se o polímero fotossensível positivo AZ® 4562 por permitir a deposição de filmes com espessuras superiores a 10 µm. No caso dos polímeros fotossensíveis positivos a parte que for exposta à luz UV através da máscara de luz durante o processo de exposição será a que vai sair no revelador.

4.5.1. Deposição por centrifugação

A espessura escolhida para o polímero fotossensível positivo foi de 20 µm. Optou-se por esta espessura para facilitar o processo de remoção após a deposição do encapsulamento. O primeiro passo nesta etapa foi definir os parâmetros de velocidade e aceleração do aparelho de centrifugação para obter um filme de 20 µm. Os parâmetros colocados para um filme ótimo de 20 µm resultam de experiências anteriormente realizadas pelo grupo e encontram-se representados na tabela 5.

Tabela 5: Parâmetros do aparelho de centrifugação para um filme de 20 µm de AZ® 4562.

Parâmetros	1º Passo	2º Passo
Velocidade de rotação (rpm)	1500	2000
Tempo de rotação (s)	6	3
Aceleração (rotações/s^2)	300	300

4.5.2. Evaporação de solventes e primeira cura

Após a deposição do polímero fotossensível por centrifugação é necessário aplicar um tempo de espera antes da primeira cura. Este tempo de espera é necessário para que os solventes do polímero fotossensível consigam evaporar e, desta forma, não fiquem retidos no interior do filme, promovendo a adesão do polímero ao substrato. A adição deste passo relativamente ao primeiro processo litográfico deve-se à elevada viscosidade e concentração de solventes presentes nos polímeros fotossensíveis positivos. As amostras foram colocadas durante 45 minutos numa caixa metálica com uma tampa furada, dentro de um local de atmosfera limpa. De seguida procedeu-se à primeira cura que tem com como objetivo dar continuidade à evaporação dos solventes e tornar o polímero sensível à luz UV. As amostras foram colocadas durante 10 minutos na placa de aquecimento a uma temperatura de 110 °C.

4.5.3. Reidratação

A etapa de reidratação, tal como no primeiro processo litográfico, é essencial para garantir a presença de uma quantidade mínima de água no filme fotossensível para o processo de exposição ótica à luz UV. Neste caso, tendo em conta que o polímero fotossensível positivo é mais espesso e viscoso, requer também um tempo maior de reidratação do que o polímero fotossensível negativo. Para isso, as amostras foram colocadas durante 30 minutos numa caixa metálica protegida com uma tampa.

4.5.4. Exposição ótica

Na exposição ótica utilizou-se a máscara de luz da figura 52. As zonas da máscara que são atravessadas pela luz UV durante o processo de exposição serão as que vão sair no revelador. O tempo de exposição à luz UV foi otimizado de acordo com a relação exposição e tempo de revelação. Os locais a serem padronizados devem estar definidos corretamente na estrutura e o tempo de revelação não deve de ser muito elevado (inferior a 10 minutos). Os testes realizados anteriormente no laboratório definiram

que o tempo ótimo para a exposição é de 75 segundos. Durante o processo de deposição das pistas e contactos foram criadas cruzes à beira dos contactos e dos μ-elétrodos que servem para realizar o alinhamento com os quadrados da máscara de encapsulamento (ver figura 52). Um mau alinhamento durante a exposição ótica pode causar a abertura de contactos em locais que deveriam encontrar-se encapsulados ou encapsular os μ-elétrodos que deveriam estar abertos.

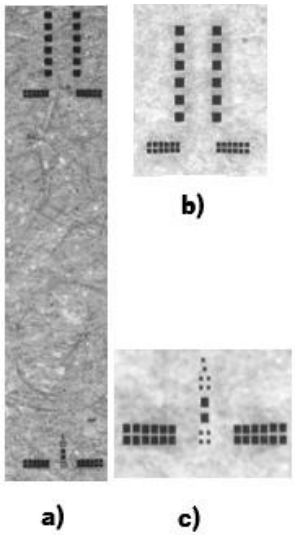


Figura 52: Máscara utilizada no processo litográfico de encapsulamento: a) completa; b) zona dos contactos; c) zona dos μ-elétrodos.

4.5.5. Corte da estrutura

A seguir à exposição ótica, as amostras encontram-se protegidas pelo polímero fotossensível positivo para proceder ao corte da estrutura do optrode. Durante todo o processo de corte, a iluminação da sala reduziu-se a uma lâmpada de luz amarela. O corte do optrode foi realizado utilizando a lâmina Z09-SD20000-Y1-90. Os alinhamentos dos cortes são realizados com a ajuda de um microscópio incorporado no equipamento de corte com lâmina.

Os cortes realizados para se obter o optrode com uma agulha em forma de bico, bem como a ordem na qual foram feitos, podem ser vistos na figura 53. O terceiro e quarto cortes foram realizados para tornar a ponta da agulha afiada e em forma de bico, formando um ângulo de abertura de 60°.

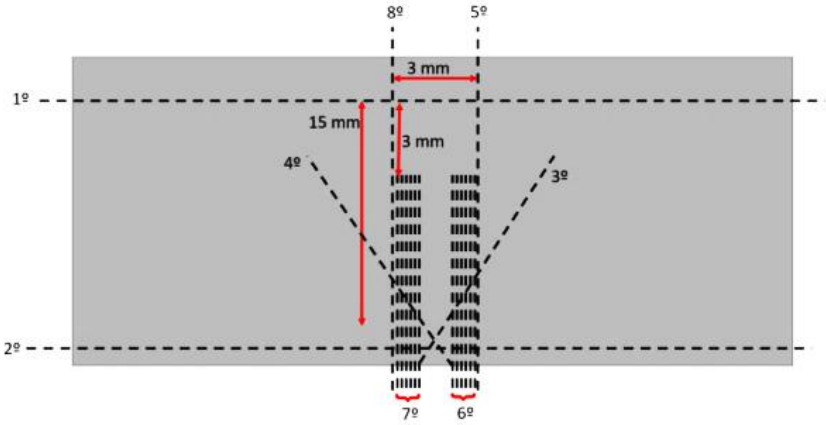


Figura 53: Esquema de corte da estrutura do optrode.

4.5.6. Revelação do polímero fotossensível

O processo de revelação do polímero fotossensível positivo tem como objetivo remover as zonas expostas à luz UV durante a exposição. O revelador utilizado foi o AZ® 351 B da empresa MicroChemicals por ser indicado para a remoção do polímero fotossensível AZ® 4562, definindo perfis com ótima qualidade e resolução. O revelador é concentrado pelo que é necessário, segundo a ficha do produto [44] diluir a solução em água destilada num rácio de 1:4 (AZ® 351B: água destilada).

Antes do processo de revelação, limparam-se as amostras cuidadosamente com um cotonete, embebido em água destilada, para limpar as sujidades (Si em pó) deixadas pelo corte da estrutura. Este passo é bastante importante pois existe uma relação entre a limpeza do substrato e o tempo de revelação: quanto mais sujas se encontrarem as amostras, maior será o tempo de revelação. Noutros casos existe mesmo a possibilidade de o polímero fotossensível não ser totalmente removido. Para ter a certeza que a amostra se encontrava devidamente limpa, verificou-se através do microscópio ótico a existência de sujidades antes do processo de revelação.

As amostras foram mergulhadas, em primeiro lugar, em água destilada e depois na solução reveladora. Realizaram-se ciclos de 30 segundos de submersão em água destilada, alternados com 60 segundos de submersão em solução reveladora. O número de ciclos necessários para a revelação não apresenta um valor certo pois é dependente da quantidade de sujidade presente na superfície da amostra resultante do processo de corte com lâmina. Desta forma, o estado de revelação foi controlado através da visualização da amostra ao microscópio. No final do processo de revelação o polímero fotossensível ficou apenas nos μ-elétrodos e nos contactos. O esquema do processo litográfico para encapsulamento encontra-se representado na figura 54.

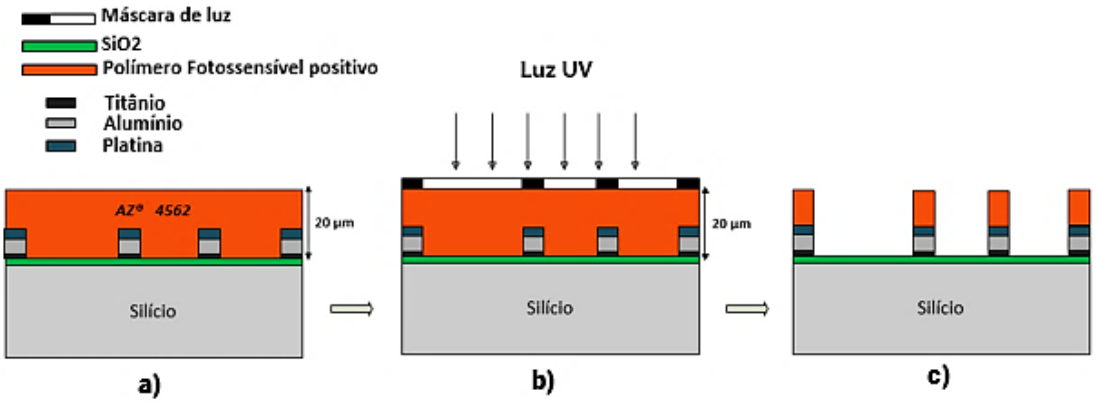


Figura 54: Processo litográfico para encapsulamento: a) deposição do polímero fotossensível positivo; b) exposição da amostra à luz UV através de uma máscara de luz; c) resultado final.

4.6. Encapsulamento da parte de cima da agulha

O material utilizado para o encapsulamento da parte de cima da agulha do optrode foi o Si_3N_4. O Si_3N_4 foi escolhido pela capacidade de isolar eletricamente diferentes estruturas em equipamentos eletrónicos e por atuar como barreira contra moléculas de água e iões de sódio, duas fontes de corrosão e instabilidade na microeletrónica [45]. O Si_3N_4 é também um material biocompatível pelo que não desencadeará efeitos adversos no tecido neuronal [45]. O alvo de Si foi utilizado na deposição de Si_3N_4. Depositaram-se 400 nm de Si_3N_4 por pulverização catódica de corrente alternada reativa. A pressão da câmara no momento da deposição era de 6 x 10^{-3} mbar e forneceu-se uma potência de 150 W, 7 sccm de árgon e 13 sccm de azoto. A temperatura final registada na câmara foi de 53 °C. A taxa de deposição do filme de Si_3N_4 foi de 0.3 Å/s e demorou 4 horas. Utilizou-se uma máscara em papel no suporte da câmara para que o filme de Si_3N_4 fosse apenas depositado na agulha (ver figura 55).

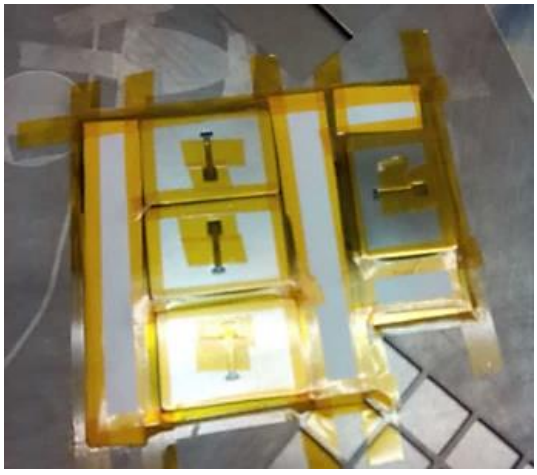


Figura 55: Disposição das amostras no suporte da câmara de deposição.

4.7. Abertura dos µ-elétrodos

O processo de remoção do polímero fotossensível teve como objetivo a abertura da área dos µ-elétrodos. O stripper utilizado foi a acetona, lançada em jato em cima do optrode, variando o tempo do processo de remoção do polímero fotossensível entre 1 a 2 minutos. O processo de remoção do polímero fotossensível encontra-se representado na figura 56 e o seu resultado final na figura 57.

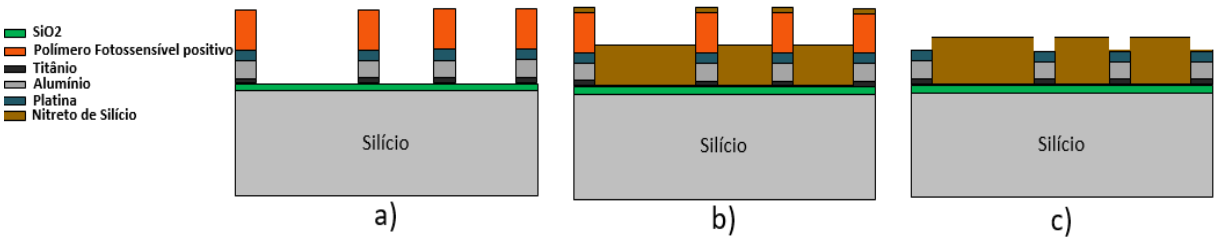


Figura 56: Processo de remoção do polímero: a) amostra após sair do revelador; b) deposição de Si_3N_4; c) remoção do polímero com acetona e abertura da área dos µ-elétrodos.

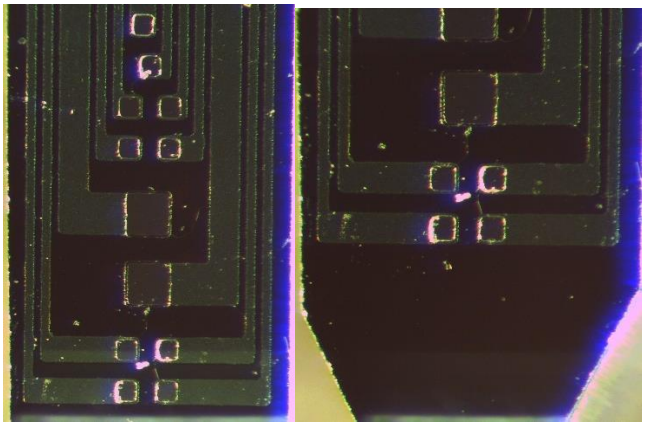


Figura 57: Resultado do encapsulamento dos µ-elétrodos com Si_3N_4.

Os resultados da figura 58 revelaram que o encapsulamento da agulha e a abertura dos µ-elétrodos foram realizados com sucesso. Por outro lado, se o alinhamento durante a exposição ótica da litografia para o encapsulamento for mal efetuado, as áreas que deveriam ficar encapsuladas serão removidas pela acetona (figura 58 b)).

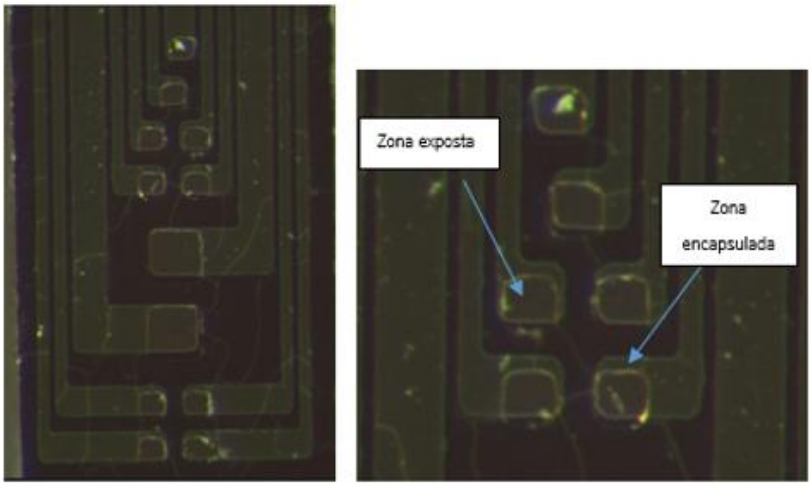


Figura 58: a) Resultado de uma amostra mal alinhada durante a exposição ótica do encapsulamento; b) imagem ampliada das zonas expostas e zonas encapsuladas dos μ-elétrodos.

4.8. Acoplamento do μ-LED no optrode

O primeiro passo para realizar o acoplamento do μ-LED ao optrode com sucesso é garantir que o optrode não se mexe durante o processo de soldadura do μ-LED. Para isso fixou-se uma peça metálica com papel (para não danificar os metais) e fita-cola de kapton® numa superfície, servindo de suporte ao optrode (figura 59).

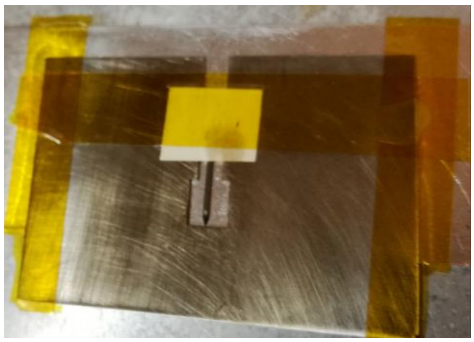


Figura 59: Fixação do optrode durante a soldadura do μ-LED.

Após fixado o optrode colocou-se a pasta de solda Kester EM907 nos contactos do μ-LED com o auxílio de uma agulha. No processo de soldadura, o ponto crítico é garantir que a solda fique apenas depositada sobre os contactos do μ-LED (figura 60). Caso algum vestígio de solda fique depositado sobre os μ-elétrodos fará com que a corrente do μ-LED seja conduzida até aos μ-elétrodos. Isto levará à inutilização dos μ-elétrodos e também à destruição dos neurónios aquando da estimulação ótica. No processo de solda surgiram mais dificuldades em acoplar o μ-LED C470DA2432 devido à sua geometria.

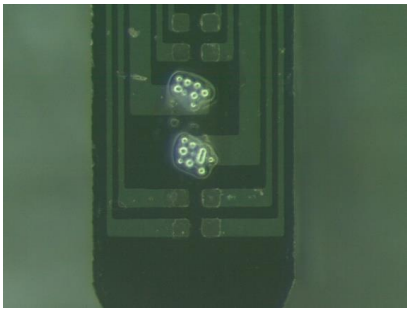
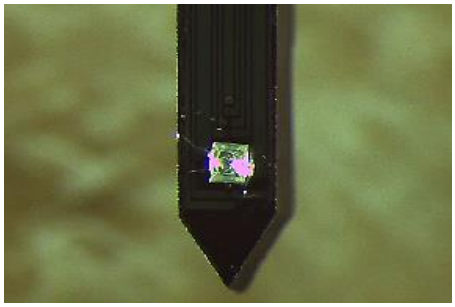


Figura 60: Contactos do μ-LED com a pasta de solda Kester EM907.

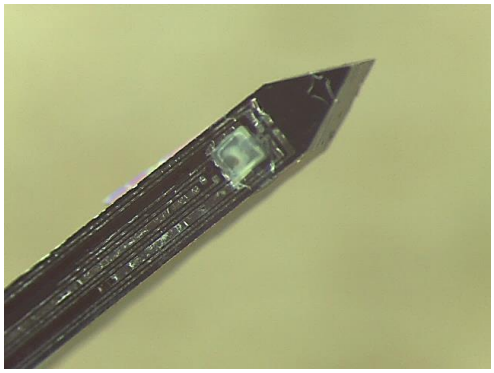
Depois de colocado o μ-LED com os seus contactos devidamente alinhados com os do optrode, colocou-se o dispositivo numa placa de aquecimento durante 5 minutos a uma temperatura de 230 °C para fundir a pasta de solda. Por fim colocou-se adesivo instantâneo biocompatível (PERMABOND 102) por cima do μ-LED de forma a proteger os seus contactos e a fixá-lo ao optrode. O resultado final do acoplamento dos dois μ-LED's é apresentado na figura 61.



a)



b)



c)

Figura 61: Resultado final do acoplamento do μ-LED no optrode; a) μ-LED ELC-470-37; b) μ-LED C470DA2432; c) adesivo instantâneo colocado por cima do μ-LED para proteção dos contactos.

4.9.Acoplamento do optrode na PCB

O optrode foi acoplado a uma PCB para possibilitar a ligação dos contactos. Soldou-se à PCB os fios de ligação do μ-LED e um conetor A79014-001 da empresa *Omnetics* (figura 62).



Figura 62: PCB e conector A79014-001 da empresa Omnetics.

A sonda foi acoplada com supercola à PCB e realizou-se o *wire-bonding* para ligar os contactos. Para proteger os fios do *wire-bonding* utilizou-se a resina epóxi LOCTITE® M-31CL™ HYSOL (figura 63).

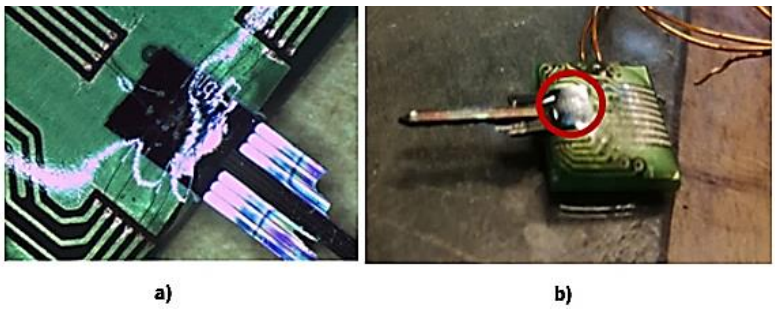


Figura 63: a) optrode acoplado à PCB; b) resina epóxi assinalada a vermelho para proteger os fios do *wire-bonding*.

4.10. Encapsulamento da parte de baixo da agulha

No encapsulamento da parte de baixo da agulha utilizou-se PDMS por ser um material biocompatível e não desencadear reações alérgicas no tecido neuronal. O PDMS foi diluído com tolueno (1:1) com o objetivo de diminuir a viscosidade. Visto que o tolueno é uma substância volátil, ou seja, evapora com bastante facilidade, não trará qualquer efeito nocivo que coloque em causa a biocompatibilidade da sonda. A parte de baixo da amostra foi cuidadosamente mergulhada na solução e fixada num suporte com fita-cola de kapton® como se pode ver na figura 64.

No passo final do encapsulamento da parte de baixo da agulha procedeu-se à cura do PDMS e evaporação do tolueno. Para isso colocou-se a amostra no forno durante 30 minutos a uma temperatura de 100 °C.

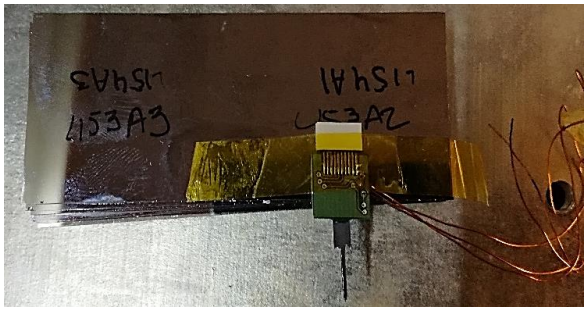


Figura 64: Disposição do optrode no suporte antes de ser colocada no forno.

4.11. Discussão e resultados

A metodologia de fabrico baseada em processo de fotolitografia, deposição de filmes finos e cortes com lâmina resultou num optrode com 10 µ-elétrodos para gravação da atividade neuronal e a integração de um µ-LED comercial para estimulação ótica. A microfabricação originou um optrode com 8 mm de comprimento de agulha, 717 µm de largura e 525 µm de espessura (ver figura 65). Obter o maior comprimento da agulha é importante para que o dispositivo seja capaz de atingir zonas profundas do cérebro.

O ângulo de abertura formado pela ponta da agulha (60°) surge do compromisso entre o ângulo α (ver figura 66) e a distância d (ver figura 66). Quanto menor for o ângulo α, mais facilmente a agulha consegue penetrar o tecido neuronal, no entanto, maior será o valor da distância representado pela letra d. Com o aumento da distância d, aumenta também a profundidade de penetração do optrode sem existirem µ-elétrodos, levando a que o optrode exerça força no tecido neuronal sem que seja necessário. Fixou-se 30° como valor ideal do ângulo α formando um ângulo de abertura da ponta da agulha de 60°. A espessura do optrode ficou desde logo limitada pela espessura das bolachas de silício. A utilização de bolachas de silício com uma espessura menor permitiria diminuir a espessura do optrode, diminuindo por sua vez os danos provocados nos tecidos neuronais.

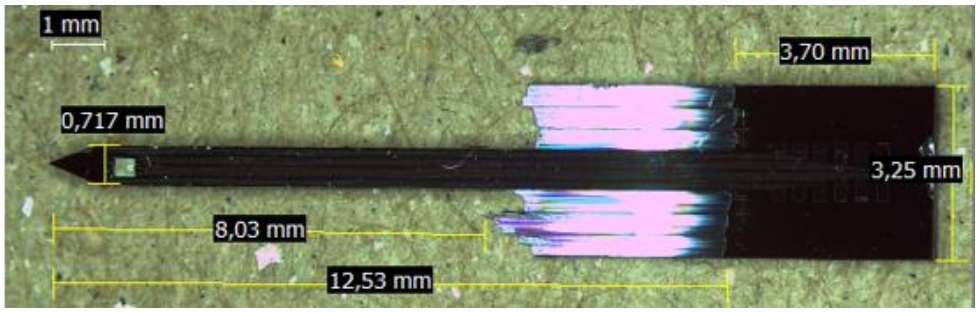


Figura 65: Resultado final do optrode com as dimensões obtidas.

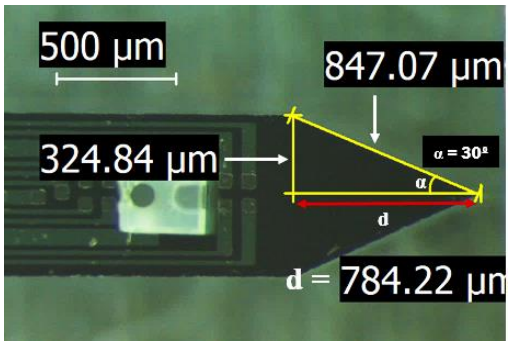


Figura 66: Ponta da agulha do optrode e as suas dimensões.

As dimensões do optrode e a densidade dos µ-elétrodos foram limitadas pelas dimensões do µ-LED comercial. Para diminuir a largura do optrode e aumentar a densidade de µ-elétrodos, futuramente poderá ser incluída também a microfabricação de µ-LED's. Outro fator que pode contribuir para o aumento da densidade dos µ-elétrodos é a diminuição da largura das pistas. A temperatura inconstante e as impurezas presentes no ambiente durante a microfabricação do dispositivo foram dificuldades constantes. O ideal seria realizar a produção de optrodes numa atmosfera limpa com temperatura constante. Os dois µ-LED's foram ligados com sucesso na ponta do optrode (figura 67), encontrando-se pronto para a caraterização ótica, descrita no capítulo 5.

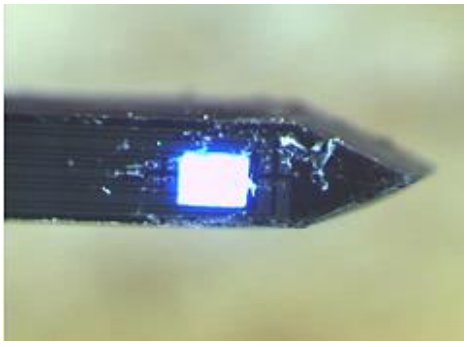


Figura 67: Optrode desenvolvido com µ-LED ELC-470-37 aceso.

5. Caraterização do optrode

Após concluída a etapa de fabrico do optrode prosseguiu-se para a sua caraterização mecânica, ótica, eletroquímica e resistência às condições da aplicação. O objetivo da caraterização do optrode passa por verificar a fiabilidade e viabilidade do dispositivo através dos seguintes aspetos: resistência do optrode às forças exercidas durante o processo de implantação no cérebro, potência ótica suficiente para estimulação das células neuronais marcadas com a opsina sensível à luz azul, impedância dos μ-elétrodos adequada à gravação da atividade neuronal e resistência do dispositivo a condições equivalentes às do cérebro.

Na caraterização mecânica realizaram-se dois tipos de testes recorrendo à utilização de um dinamómetro: implantação em gelatina agar-agar e cérebro de vitelo cadáver a fim de analisar as forças compressivas e distensíveis e testes de força axial e longitudinal para testar a força máxima admitida pelo optrode antes de quebrar. Na caraterização ótica procedeu-se à validação da fotoestimulação medindo a potência ótica, curva de emissão e o ângulo de visão do μ-LED. A caraterização dos μ-elétrodos realizou-se por espetroscopia de impedância eletroquímica (EIS) da camada de transdução iónica (filme de platina). Por fim no teste de resistência às condições de aplicação sujeitou-se o optrode a condições comparáveis ao cérebro e realizou-se a leitura de impedâncias dos μ-elétrodos ao longo do tempo com o intuito de verificar a longevidade do dispositivo em condições *in vitro*.

5.1. Caraterização mecânica

A caraterização mecânica foi realizada em duas fases distintas: testes de compressão e distensão através da implantação do optrode fabricado em gelatina agar e cérebro de vitelo cadáver; e submetendo a agulha do optrode a testes de força axial e longitudinal. Os testes da caraterização mecânica foram realizados recorrendo a um dinamómetro Shimadzu AG-IS provido de uma célula de carga de 10 N. Os testes em gelatina agar-agar e cérebro de vitelo cadáver foram realizados à temperatura ambiente.

5.1.1. Gelatina agar-agar

O primeiro conjunto de testes de implantação e extração foram realizados em gelatina agar-agar com uma concentração de 0.5%. A utilização de gelatina agar-agar é uma alternativa ao tecido neuronal para realizada testes *in vitro* [46]. A força imposta pelo dinamómetro foi realizada na vertical, de cima para baixo, com três velocidades diferentes: 0.83 mm/s, 2 mm/s e 3 mm/s. A utilização de diferentes velocidades tem como objetivo analisar qual delas exerce menor força na gelatina agar-agar. Desta forma é possível concluir qual a velocidade de implantação adequada para a realização de testes *in vivo* com o objetivo de diminuir o dano provocado no tecido neuronal. A configuração utilizada na implantação da agulha de 8 mm na gelatina agar-agar pode ser vista na figura 68.

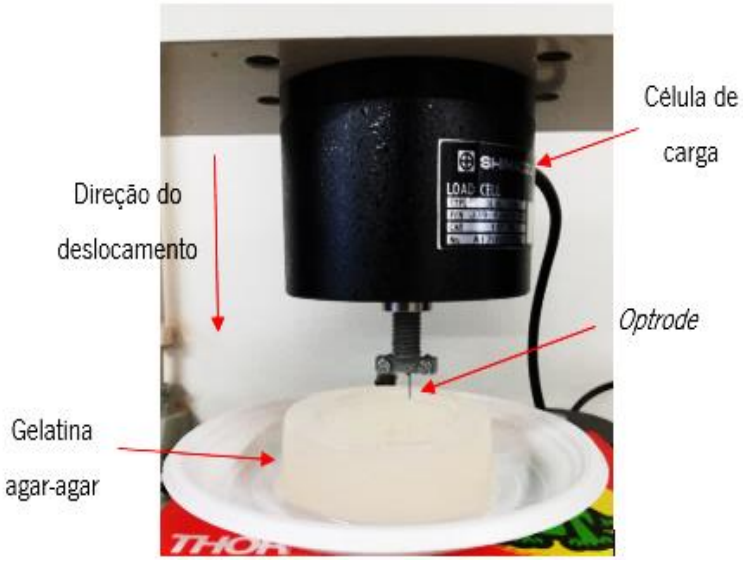


Figura 68: Configuração utilizada na implantação do optrode na gelatina agar-agar.

Os resultados da implantação do optrode para diferentes velocidades encontram-se na figura 69. A análise dos resultados é feita em quatro momentos representados pelas letras A, B, C e D nos gráficos da figura 69. O momento A revela o instante em que a agulha entrou em contacto com a gelatina agar-agar e o momento B representa o instante em que foi exercida a força máxima e onde a agulha penetrou a gelatina. No intervalo entre o momento B e momento C a agulha move-se dentro da gelatina e no momento C começa a extração da agulha da gelatina. O instante D representa a força máxima necessária para extrair a agulha da gelatina agar-agar.

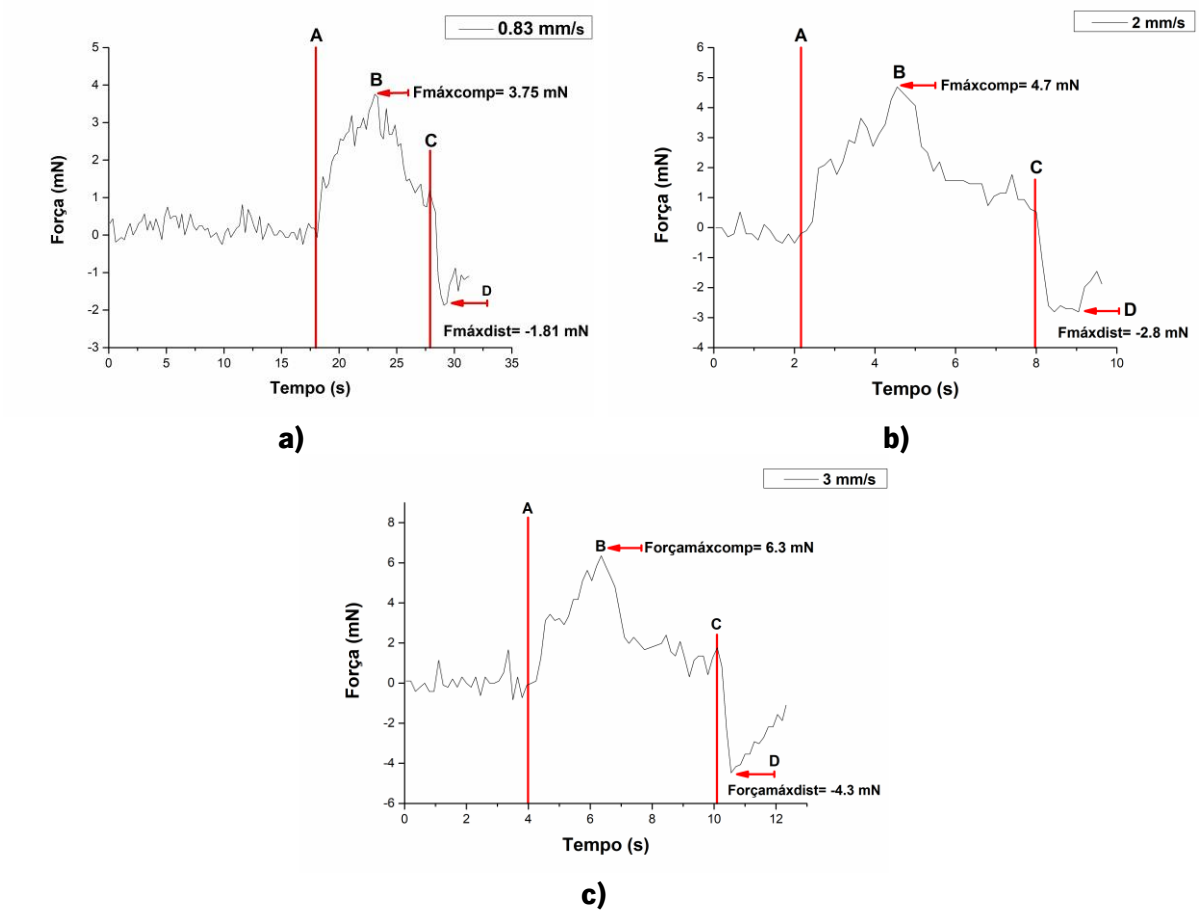


Figura 69: Relação força tempo para diferentes velocidades: a) 0.89 mm/s; b) 2 mm/s; c) 3 mm/s.

Realizou-se um conjunto de 5 testes para cada uma das velocidades e calculou-se a média de implantação para forças compressivas e distensíveis (tabela 6). Na tabela 6 é possível observar que, com o aumento de velocidade de implantação, maior serão as forças compressivas (Fmáxcomp em cada um dos gráficos da figura 69) e distensíveis (Fmáxdist em cada um dos gráficos da figura 69) exercidas na gelatina agar-agar. A diferença entre a força provocada pela implantação de uma agulha a uma velocidade de 0.83 mm/s para uma velocidade de 3 mm/s é menor do que 3 mN. Apesar de a diferença ser pouca, concluiu-se que, durante uma implantação *in vivo*, seria indicado a utilização de uma velocidade menor para que a força de implantação seja também a menor possível e, por sua vez, provocar o mínimo de lesões no tecido neuronal.

Tabela 6: Força compressiva e distensível média para implantação em gelatina agar-agar a diferentes velocidades.

Velocidade de implantação (mm/s)	Força compressiva média (mN)	Força distensível média (mN)
0.83	3.75	-1.81
2	4.7	-2.8
3	6.3	-4.3

5.1.2. Cérebro de vitelo cadáver

Os testes em cérebro de vitelo cadáver foram realizados com o intuito de obter resultados o mais aproximado possível a uma experiência realizada em contexto real. O aproveitamento de um cérebro de um animal cadáver vindo da indústria alimentar evita o sacrifício propositado de outro animal para fins experimentais. O cérebro de vitelo é também menor do que o cérebro de outros animais, como o porco, facilitando o seu transporte para o local a serem realizadas as experiências. No cérebro de vitelo efetuou-se um conjunto de 5 testes para três diferentes velocidades (0.83 mm/s, 2 mm/s e 3 mm/s). Para a realização dos testes de implantação, removeu-se a dura com uma pinça. A dura é uma camada (meninge) resistente e inflexível que envolve a parte externa do cérebro e é responsável pela manutenção do líquido cefalorraquidiano. Esta camada é também retirada durante as implantações *in vivo* utilizando sondas neuronais [4]. Na figura 70 encontra-se a configuração adotada durante a realização dos testes.

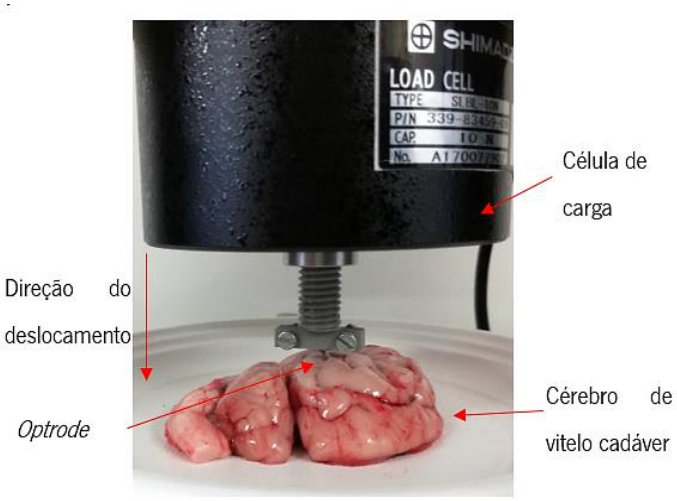


Figura 70: Configuração adotada para os testes de implantação em cérebro de vitelo cadáver.

O resultado obtido dos testes de implantação para diferentes velocidades pode ser visto nos gráficos da figura 70. Tal como nos testes de implantação em gelatina agar-agar, os resultados foram divididos nos mesmos 4 momentos (A, B, C e D).

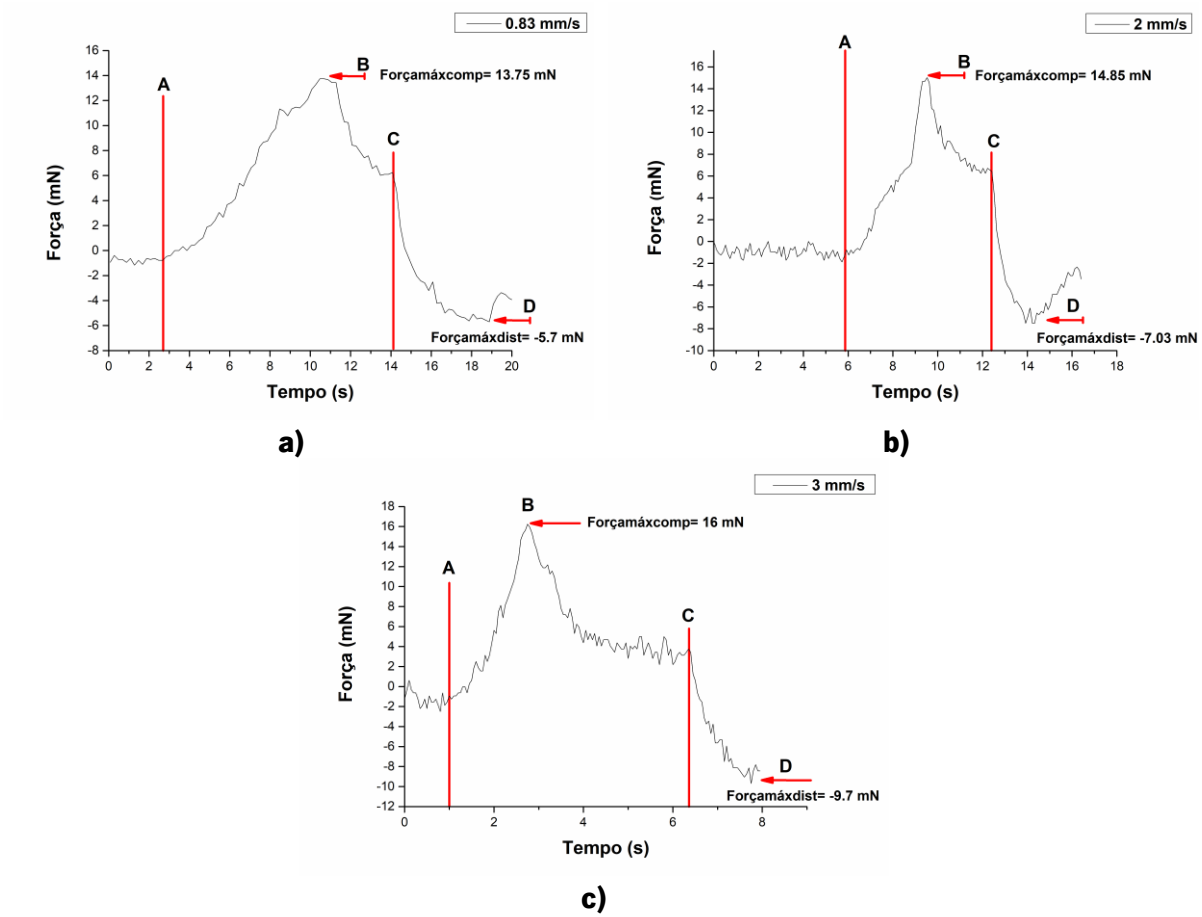


Figura 71: Relação força tempo para velocidades de: a) 0.89 mm/s; b) 2 mm/s e c) 3 mm/s.

Na tabela 7 estão apresentadas as médias de forças compressivas e distensíveis obtidas durante a implantação. A robustez do cérebro, derivado da existência de meninges que se encontram no tecido neuronal, requer que a força exercida durante o momento de implantação no cérebro de vitelo cadáver seja superior à força exercida em gelatina agar-agar. Tal como acontece na implantação em gelatina agar-agar, a força compressiva e distensível é proporcional ao aumento da velocidade do deslocamento da agulha.

Tabela 7: Força compressiva e distensível média para implantação em cérebro de vitelo cadáver a diferentes velocidades.

Velocidade de implantação (mm/s)	**Força compressiva média (mN)**	**Força distensível média (mN)**
0.83	13.75	-5.7
2	14.85	-7.03
3	16	-9.7

A implantação foi realizada com sucesso tanto na gelatina agar-agar como no cérebro de vitelo cadáver, aguentando as forças exercidas por ambos sem partir. A força compressiva exercida no cérebro de vitelo cadáver foi, em média, 3 vezes superior à força exercida na gelatina agar-agar. Tal como a força compressiva, a força média necessária para extrair a agulha do cérebro foi 2.6 vezes superior à força exercida na gelatina. Desta forma é possível concluir que o silício é um material suficientemente robusto para aguentar as forças compressivas e distensíveis exercidas pela gelatina agar-agar e pelo cérebro de vitelo cadáver.

No último teste procedeu-se à tentativa de implantação do optrode num local onde não se havia removido a dura de forma a comprovar a dificuldade de implantação. A força exercida na agulha atingiu um máximo de 85 mN, a uma velocidade de 0.83 mm/s, sem quebrar nem perfurar o cérebro de vitelo cadáver. O resultado do teste pode ser visto no gráfico da figura 72. Conclui-se, tal como previsto, que a remoção da dura é essencial para implantar o optrode no cérebro. Mesmo aplicando uma força seis vezes superior à aplicada sem a dura, a agulha não foi capaz de perfurar o cérebro com a dura.

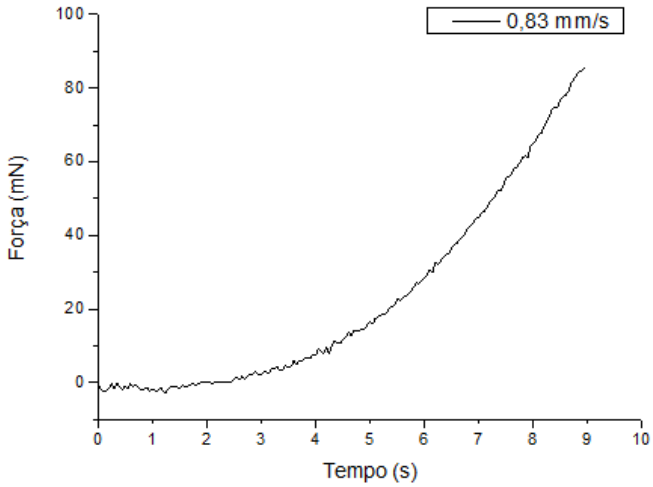


Figura 72: Tentativa de implantação sem remoção da dura.

5.1.3. Teste de compressão longitudinal e axial

Na última etapa da caraterização mecânica procedeu-se aos testes de compressão longitudinal e axial com o intuito de comprovar que o silício é um material rígido e não dúctil.

Teste de compressão longitudinal

O teste de compressão longitudinal foi realizado em condições semelhantes aos testes em gelatina agar-agar e em cérebro de vitelo cadáver. Utilizou-se um dinamómetro com uma célula de carga de 500 N, embatendo a agulha do optrode contra uma superfície de alumínio a uma velocidade de 0.83 mm/s. A configuração adotada nos testes de compressão longitudinal bem como o resultado obtido podem ser vistos na figura 73.

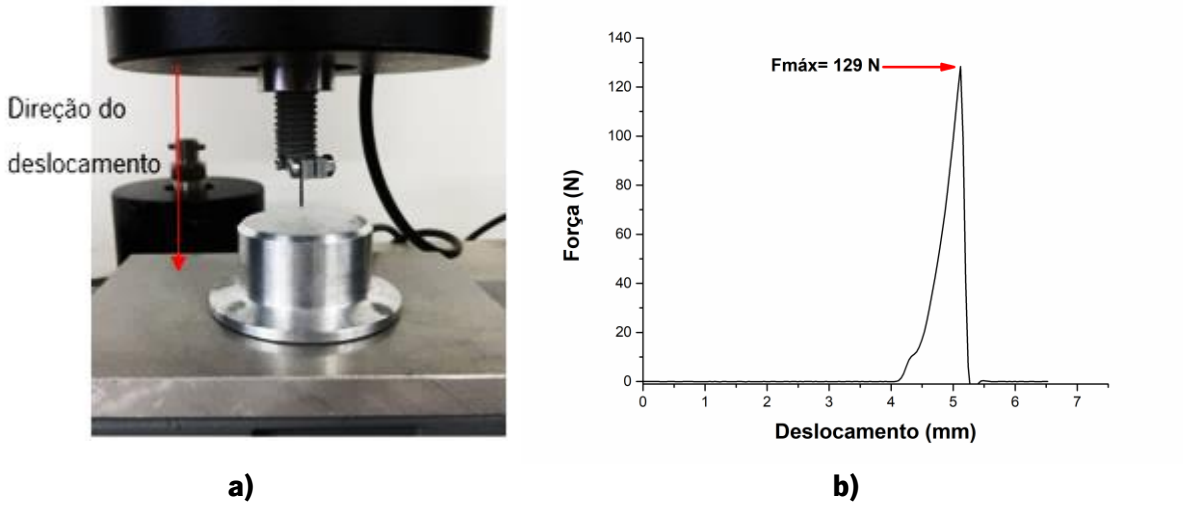


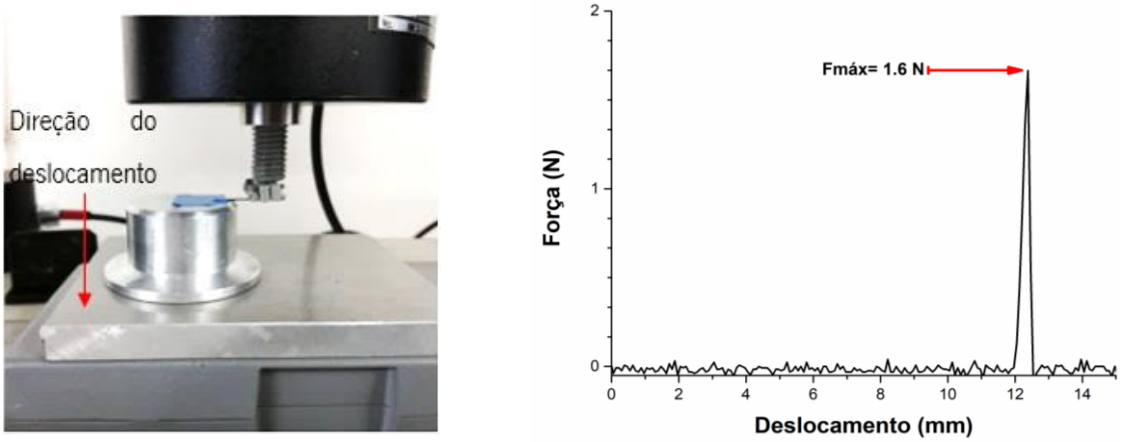
Figura 73: Testes de compressão longitudinal: a) configuração adotada; b) resultado dos testes.

O gráfico da figura 73 mostra uma quebra abrupta para 0 N após ser exercida uma força de 129 N. Esta é a força máxima que o optrode em substrato de silício consegue aguentar sem quebrar. A partir do gráfico é possível constatar que o optrode começa a dobrar próximo dos 4 mm de deslocamento, acabando por partir aos 5 mm.

Teste de compressão axial

Os últimos testes requeridos para a caraterização mecânica do optrode foram os testes de compressão axial. O objetivo destes testes passou por analisar qual a força máxima que o optrode consegue aguentar quando lhe é aplicada uma força lateral apenas na ponta da agulha. O teste de compressão axial foi realizado com velocidade de 0.83 mm/s, fixando o optrode com fita-cola de dupla

face numa superfície de alumínio para que o dispositivo não se mova durante o teste (figura 74 a)). A força axial necessária para quebrar a agulha foi de 1.6 N (Fmáx), bastante superior à força máxima registada durante a implantação no cérebro de vitelo de cadáver (16 mN). Conclui-se que o optrode será robusto o suficiente para aguentar as forças de tensão impostas pelo tecido neuronal de um rato durante a sua implantação. O resultado do teste de compressão axial encontra-se apresentado no gráfico da figura 74 b).



a) **b)**

Figura 74: Testes de compressão axial: a) configuração adotada; b) gráfico resultante.

5.2. Caraterização ótica

A caraterização ótica dividiu-se num conjunto de testes para descobrir qual dos dois µ-LED's comerciais selecionados (ELC-470-37 ou C470DA2432) reúne as melhores caraterísticas para realizar a fotoestimulação das células neuronais. A proteína alvo utilizada na optogenética para ativação neuronal é a ChR2 (Channelrhodopsin) e requer que o µ-LED emita luz num comprimento de onda na gama dos 400 a 500 nm [6]. Para isso será medida a curva de emissão do µ-LED utilizando um monocromador (74125 Newport) e um medidor de potência (1918-R Newport) acoplado a um fotodíodo detetor (71675 newport). A medição da potência ótica do µ-LED será feita usando um fotodíodo (FDS100-CAL da empresa ThorLabs) acoplado a um orifício de 1 mm de diâmetro. Por fim mediu-se o ângulo de emissão do µ-LED recorrendo a um transferidor e ao medidor de potência.

5.2.1. Curva de emissão do μ-LED

Os testes da curva de emissão foram realizados para validar se os μ-LED's conseguiam emitir luz num comprimento de onda que fosse capaz de ativar a opsina que é excitada pela cor azul. No teste utilizou-se um monocromador, um fotodíodo detetor e um medidor de potência. O primeiro passo durante o teste é colocar o optrode com o μ-LED à entrada do monocromador. No monocromador é realizado o varrimento de comprimentos de onda compreendidos entre os 350 nm e 550 nm. Este valor foi inserido pelo utilizador num programa, dado que a gama de interesse da ativação da opsina se situa entre os 400 nm e os 500 nm, deu-se uma margem de 50 nm. Durante o varrimento no monocromador é medido, para cada comprimento de onda, a corrente no fotodíodo utilizando o medidor de potência programado no modo medidor de corrente. No decorrer do varrimento, o pico de maior intensidade de corrente registado por parte do fotodíodo para um determinado comprimento de onda, corresponderá ao comprimento de onda emitido pela luz de cada um dos μ-LED's. A configuração adotada para os testes de curva de emissão dos dois μ-LED's pode ser vista na figura 75.

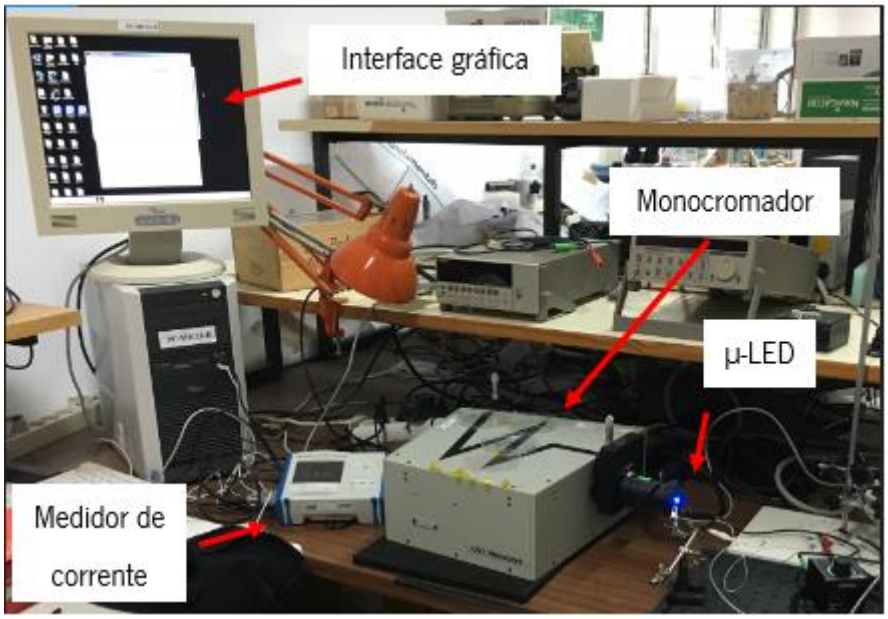


Figura 75: Configuração adotada no teste de medição da curva do μ-LED.

Na interface gráfica definiu-se que o varrimento de onda estaria compreendido entre os 350 nm e 550 nm (figura 76 b)). Durante o teste, isolou-se o sistema da luz ambiente para que não existisse qualquer influência no resultado. Alimentaram-se os dois μ-LED's com 20 mA, correspondente ao valor aconselhado pelos fabricantes [47]. Os μ-LED's foram alimentados com uma fonte de corrente, e o circuito utilizado encontra-se representado na figura 76 a).

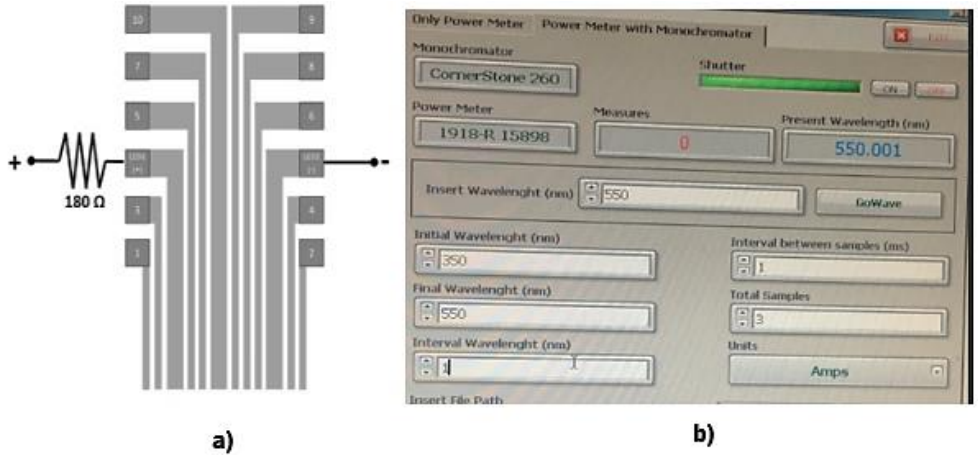


Figura 76: a) Circuito de alimentação dos μ-LED's; b) introdução de parâmetros para o varrimento do comprimento de onda de 350 nm a 550 nm.

No decurso do varrimento espectral do monocromador, o maior valor de corrente registado no fotodíodo corresponde ao comprimento de onda da luz emitida pelos μ-LED's. No caso do μ-LED ELC-470-37 detetou-se um pico de intensidade máxima de corrente para um comprimento de onda correspondente a 467 nm (figura 77). A intensidade de corrente detetada para 467 nm foi de 27.8 μA. Relativamente ao μ-LED C470DA2432 detetou-se um pico de intensidade máxima de corrente de 68.7 μA para um comprimento de onda correspondente a 466 nm. Os resultados obtidos mostram que os comprimentos de onda emitidos pela luz dos dois μ-LED's (466 nm e 467 nm) diferem apenas em 1 nm, situando-se na gama de comprimentos de onda (400 nm a 500 nm) apropriados para efetuar a ativação da opsina excitada pela cor azul.

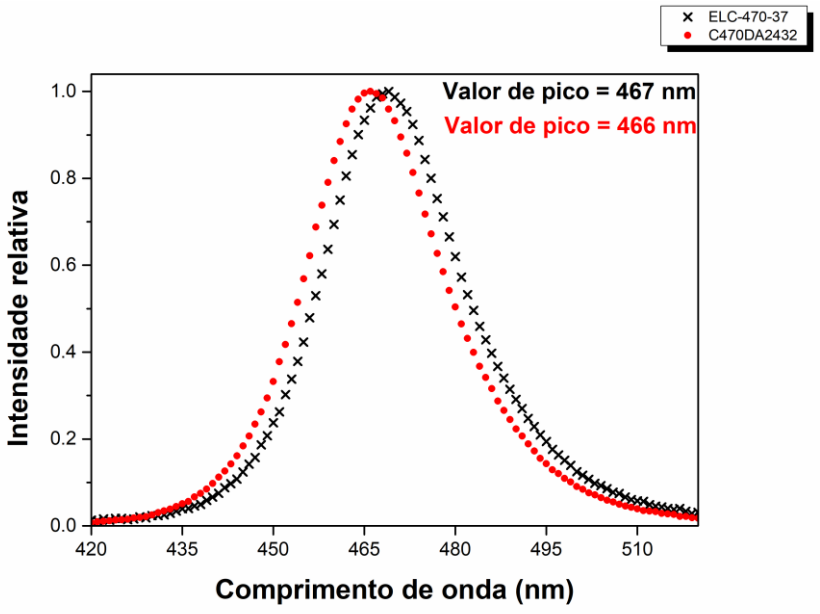


Figura 77: Resultados da curva de emissão dos μ-LEDs.

5.2.2. Ângulo de emissão

Pretende-se saber qual o ângulo de emissão de cada um dos μ-LED's pois esta caraterística não se encontra disponível na ficha de produto dos componentes. Através da medição do ângulo de emissão saberemos qual a área do tecido neuronal abrangida pela luz emitida. No teste utilizou-se o fotodiodo detetor (71675 *newport*) ligado ao Power Meter 1918-R e um transferidor (figura 78).

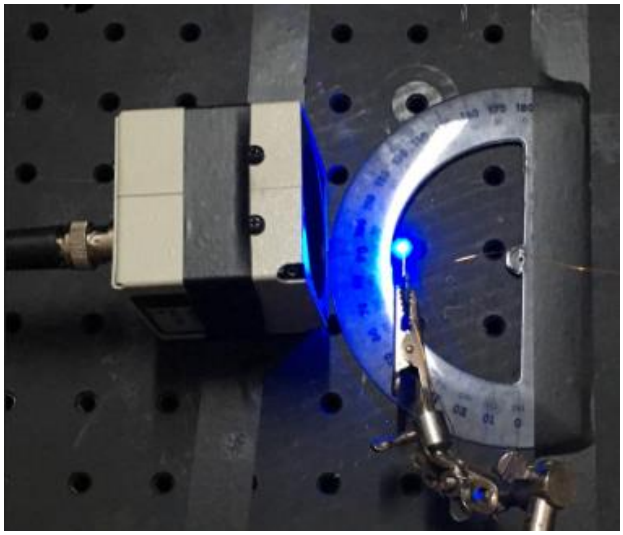


Figura 78: Configuração adotada na medição do ângulo de emissão do μ-LED.

Nos testes colocou-se, em primeiro lugar, o μ-LED alinhado com o centro do fotodíodo, sendo essa posição definida como a marca de referência dos 0°. A marca dos 0° é indicada como sendo o valor de maior potência que o fotodíodo pode registar. O valor do ângulo de emissão é medido quando a potência diminui até metade da potência máxima. Utilizou-se um transferidor para que fosse possível mover o fotodíodo detetor de acordo com o ângulo pretendido, variando a sua posição em intervalos de 20° e medindo a potência correspondente a cada uma das posições.

No gráfico da figura 79 o valor do ângulo de emissão de cada um dos μ-LED's é dado por metade da intensidade relativa. O resultado dos testes indica que o ângulo de emissão do μ-LED ELC-470-37 é de, aproximadamente, 32° enquanto o da C470DA2432 é de, aproximadamente, 35° (figura 79). A diferença entre os ângulos de emissão obtidos para cada um dos μ-LED's é de apenas 5°, pelo que não é uma caraterística preponderante na escolha do μ-LED adequado.

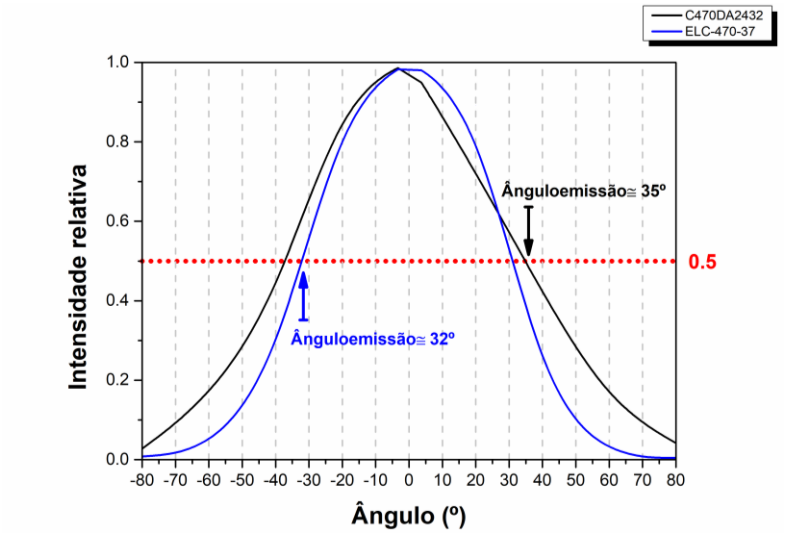


Figura 79: Curva do ângulo emissão do µ-LED: a) curva do ângulo de emissão ELC-470-37 representada a azul; b) curva do ângulo de emissão C470DA2432 representada a preto.

5.2.3. Potência do µ-LED

A fotoestimulação é validada pela medição da intensidade de energia do µ-LED. A intensidade de luz mínima relatada para promover um efeito biológico em células do tecido neuronal é de 1 mW/mm^2 [32]. A potência ótica dos µ-LED's foi medida usando um sensor fotodíodo comercial (FDS100-CAL da empresa Thorlabs), acoplado a um orifício de 1 mm de diâmetro. A utilização do orifício aumenta a precisão dos resultados obtidos e permite obter os valores numa área aproximada de 1 mm^2, área de interesse para o estudo da potência ótica. A configuração adotada para o teste de medição do de potência dos µ-LED's pode ser vista na figura 80 a).

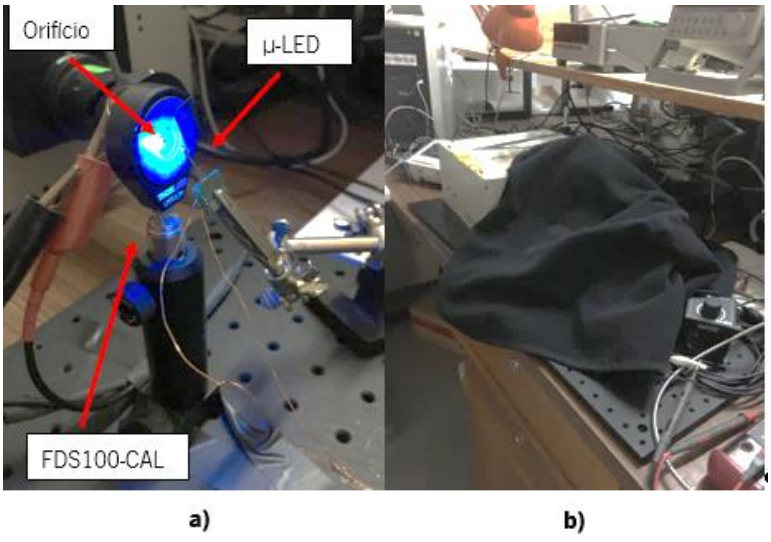


Figura 80: Teste de potência do µ-LED: a) configuração adotada no teste de potência do µ-LED; b) isolamento da luz ambiente durante a realização dos testes.

No teste de medição de potência dos μ-LED's ELC-470-37 e C470DA2432 fixou-se o Power Meter 1918- R nos 467 nm e 466 nm, respetivamente, para garantir que o valor de potência ótica recebido pelo fotodíodo é do comprimento de onda pretendido. Utilizando o picoamperímetro 487 da empresa Keithley, registou-se a corrente que passa pelo fotodíodo. Variou-se o valor da corrente fornecida ao μ-LED, utilizando uma fonte de corrente, em intervalos de 5 mA até um máximo de 20 mA, sendo este o limiar de condução de corrente dos μ-LED's [47], [48]. A potência é calculada através da equação 4 e a responsividade é extraída da ficha de dados do fotodíodo comercial [49]. O resultado da corrente medida no sensor fotodíodo e potência ótica obtida em função da corrente fornecida para cada um dos μ-LED's pode ser visto na tabela 8 e no gráfico da figura 81.

$$P = \frac{I}{R_\lambda} \qquad \text{Equação 4}$$

P = Potência ótica (W/mm^2);

I = Corrente do sensor fotodíodo;

R_λ = Responsividade = 0.1416179 (A/W).

Tabela 8: Potência obtida para cada um dos μ-LED's em função da corrente aplicada.

Corrente aplicada (mA)	**Corrente medida (μA)**		**Potência (W/mm^2)**		**Potência (mW/mm^2)**	
	ELC-470-37	C470DA2432	ELC-470-37	C470DA2432	ELC-470-37	C470DA2432
5	124	40.3	0.00041	0.00028	0.41	0.28
10	139.1	70.9	0.00065	0.0005	0.65	0.5
15	153.8	91	0.00098	0.00065	0.98	0.65
20	168.5	129	0.0012	0.00092	1.2	0.92

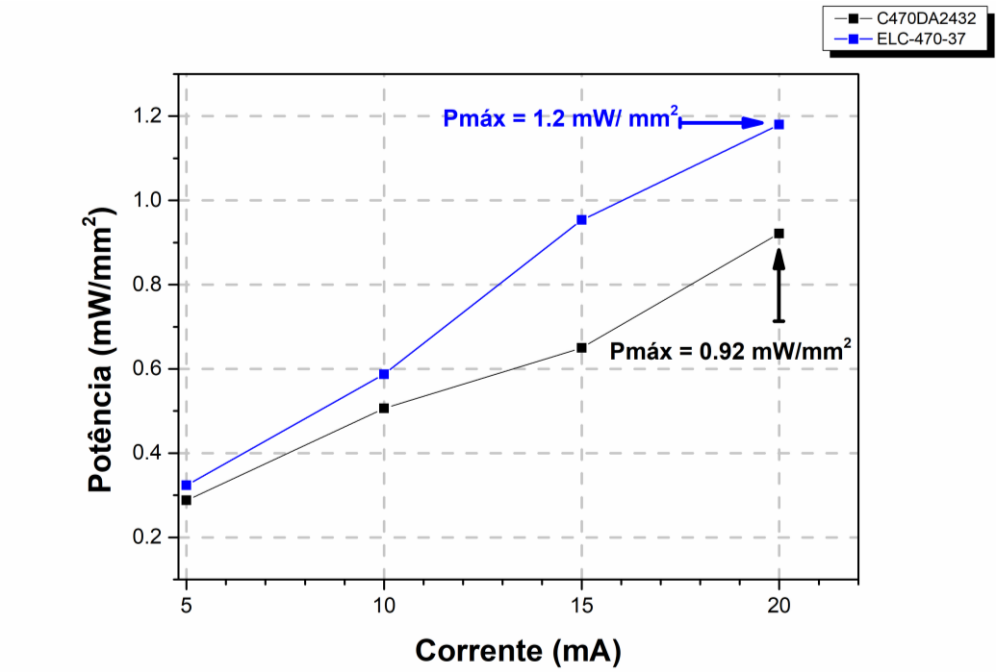


Figura 81: Potência emitida por cada um dos µ-LED's em função da corrente aplicada.

Através da análise da tabela 8 é possível concluir que se consegue atingir uma potência ótica superior a 1 mW/mm² quando é fornecida uma corrente de 20 mA ao µ-LED comercial ELC-470-37. Outra medida que se encontra bastante próxima de 1 mW/mm² é no momento em que são fornecidos 15 mA ao µ-LED (P = 0.98 mW/mm²). Como tal realizaram-se medidas intermédias de corrente entre os 15 mA e 20 mA. Concluiu-se que a corrente mínima necessária para obter uma potência ótica superior a 1 mW/mm² é de 16 mA.

O µ-LED C470DA2432 não consegue atingir em momento algum a potência mínima requerida para a fotoestimulação (1 mW/mm²). O valor máximo que é possível alcançar para 20 mA é de 0.92 mW/mm² (< 1 mW/mm²). O µ-LED ELC-470-37 consegue atingir mais 0.2 mW/mm² de potência ótica (P = 1.2 mW/mm²) relativamente ao µ-LED C470DA2432 (P = 0.92 mW/mm²) para uma corrente fornecida de 20 mA.

Durante as medições de potência de emissão, o µ-LED C470DA2432 demonstrou-se instável apagando-se momentaneamente devido ao sobreaquecimento após uns minutos ligado continuamente. A instabilidade demonstrada pelo µ-LED C470DA2432 em conjunto com a incapacidade de fotoestimulação (P < 1mW/mm²) das células do tecido neuronal levou a que fosse descartado. O µ-LED ELC-470-37 é o único que consegue validar o conceito de fotoestimulação das células do tecido neuronal, quando lhe é fornecido uma corrente superior a 16 mA, obtendo uma potência ótica maior do que 1 mW/mm².

5.3. Caraterização eletroquímica

A espetroscopia de impedância eletroquímica (EIS) foi a técnica utilizada para a caraterização eletroquímica dos µ-elétrodos. A medição da impedância dos µ-elétrodos foi realizada com o equipamento Gamry 600 da empresa Gamry Instruments. Utilizou-se uma configuração a três elétrodos, uma folha de platina com as dimensões de 40 x 40 x 0.25 mm^3 como contra elétrodo, um elétrodo de referência de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) e os µ-elétrodos do optrode como elétrodo de trabalho. O contra elétrodo, o elétrodo de referência e o optrode foram emersos numa solução de 0.9% de cloreto de sódio (NaCl). A impedância foi medida para frequências compreendidas entre 100 Hz e 1 MHz, fornecendo uma tensão AC constante de 10 mV rms. O objetivo da caraterização eletroquímica é analisar se os µ-elétrodos apresentam impedâncias apropriadas para a correta gravação da atividade neuronal. A impedância à frequência de 1 kHz é a que comporta maior interesse neurobiológico pois o potencial de ação das células neuronais têm uma duração próxima de 1 ms [15]. A configuração adotada na caraterização eletroquímica é apresentada na figura 82.

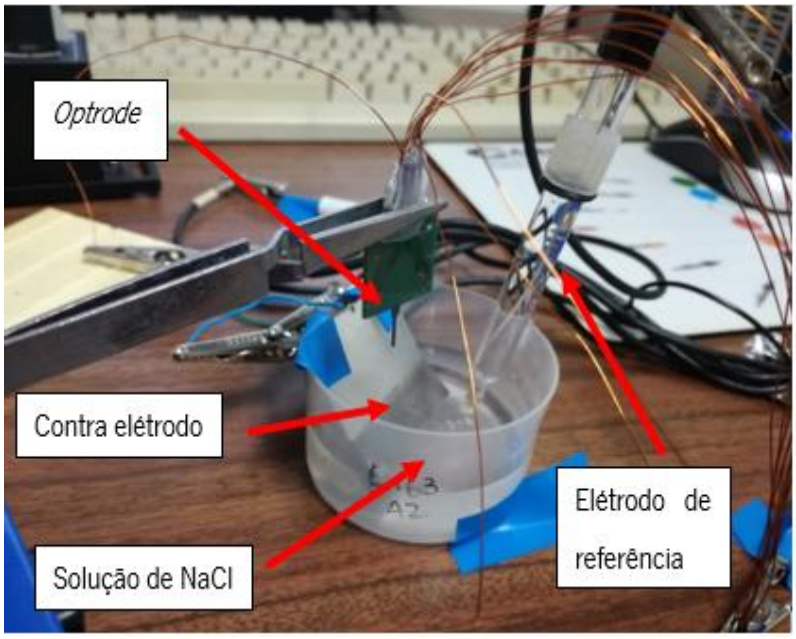


Figura 82: Sistema adotado para a caraterização eletroquímica dos µ-elétrodos do optrode.

Na figura 83 encontra-se representada a disposição dos µ-elétrodos no optrode. Os µ-elétrodos numerados de 1 até 10 foram submetidos ao teste de espetroscopia de impedância eletroquímica, exceto os contactos LED 1 e LED 2 que são destinados para o µ-LED.

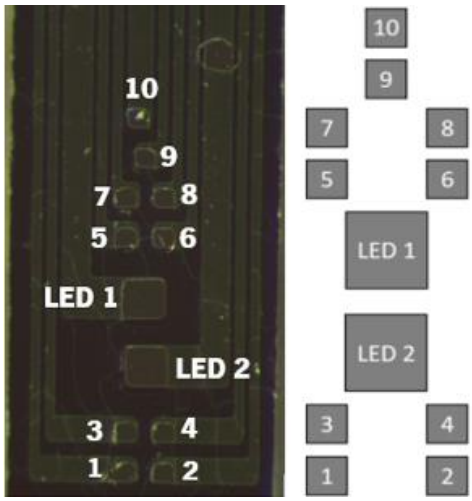


Figura 83: Disposição dos μ-elétrodos no optrode.

O resultado do teste de espetroscopia de impedância eletroquímica encontra-se presente na tabela 9. Os resultados obtidos mostram que 9 dos 10 μ-elétrodos apresentam impedâncias apropriadas para a gravação da atividade neuronal, compreendidas entre os 365.8 kΩ e 421.5 kΩ (< 1 MΩ) registando uma média de impedâncias de 400 kΩ. O μ-elétrodo número 10 mostrou uma impedância de 35,51 MΩ, resultante da remoção incompleta da camada de encapsulamento (Si_3N_4). A figura 84 mostra o diagrama de bode obtido por EIS realizado ao μ-elétrodo 1, registando à frequência de 1 kHz uma impedância de 380,9 kΩ e uma fase de -69°. É possível concluir através do gráfico da figura 84 que a impedância tende a baixar quanto maior for a frequência.

Tabela 9: Impedância obtida no teste EIS para cada um dos μ-elétrodos.

μ-elétrodo	**Impedância a 1 kHz (kΩ)**
1	380,9
2	387,6
3	397,7
4	426,1
5	421,5
6	365,8
7	414,1
8	397,1
9	416,3
10	32.51×10^3

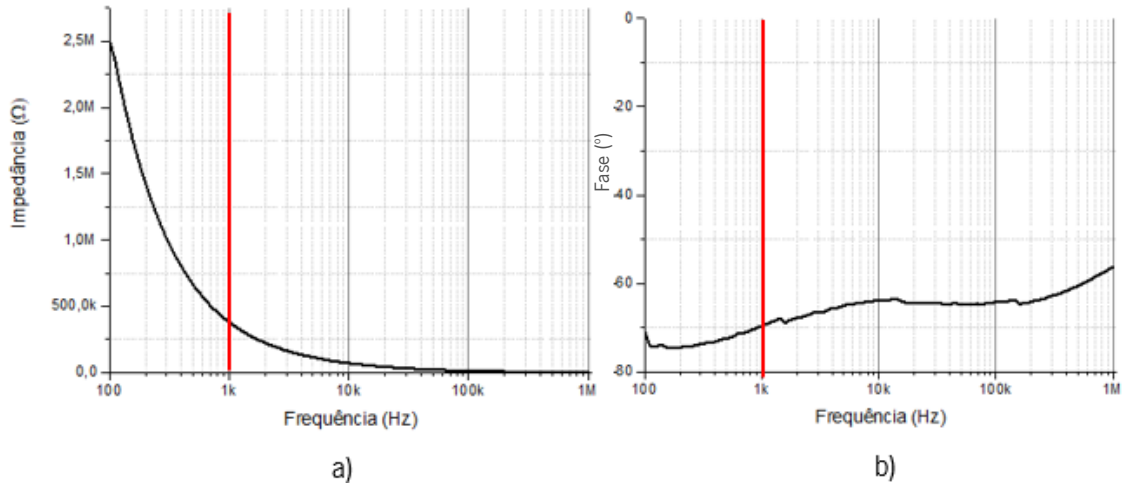


Figura 84: Diagrama de bode dos resultados do teste EIS ao μ-elétrodo 1; a) impedância b) fase.

5.4. Resistência do optrode às condições da aplicação

O último teste de caraterização do optrode tem como objetivo verificar a resistência do optrode às condições da aplicação A caraterização será realizada *in vitro*, expondo o optrode a condições semelhantes às encontradas no cérebro com o intuito de analisar a longevidade do dispositivo. É sabido que as implantações em cérebros de ratos para gravação da atividade neuronal podem durar semanas, tendo o dispositivo que, pelo menos, igualar esse tempo [4]. Para acelerar as reações desencadeadas no optrode num curto espaço de tempo, um dos métodos passa por sujeitar o optrode a temperaturas elevadas durante a leitura da impedância dos μ-elétrodos em intervalos de tempo (aceleração do tempo de vida) [50]. O efeito da temperatura é explicado em termos de taxa de reação e descrito através da equação de Eyring (equação 5).

$$K = k\frac{k_B T}{h} e^{\frac{-\Delta A‡}{RT}} \qquad \text{Equação 5}$$

K = taxa de reação da temperatura;

k = coeficiente de transmissão (assumindo k = 1);

K_B = constante de Boltzman ($1.38064852^{E\text{-}26}$ kJ/mol);

h = constante de Planck ($6.62607004 \times 10^{-37}$ kJ.s);

R = constante de gás ideal (8.31×10^{-3} kJ/mol.K);

T = temperatura absoluta em kelvin (353.15 K);

A‡ = energia de ativação.

A energia de ativação é a quantidade de energia necessária, sob a forma de calor, para desencadear as reações químicas de forma a criar condições para ocorrer o fenómeno de aceleração de tempo de vida. No cálculo da energia de ativação, utiliza-se a equação de tempo médio de vida que está relacionada com a taxa de reação equação 6:

$$tempo\ médio\ de\ vida = \frac{1}{K} \qquad \text{Equação 6}$$

O tempo médio de vida diz respeito ao tempo de falha do optrode (MTTF), definido através de resultados experimentais. Utilizando as duas equações é possível deduzir a equação de energia de ativação [50] (equação 7).

$$\Delta A \ddagger = -RTln\left(\frac{h}{k_b T * MTFFT(T)}\right) \qquad \text{Equação 7}$$

Desta forma mergulhou-se o optrode numa solução *phosphate buffered saline* (PBS) com um pH de 7.485, sujeitando-o a uma temperatura de 80 °C até ao fim do teste de resistência às condições da aplicação. O PBS é uma solução saturada de sal com composição semelhante ao líquido espinal do cérebro [51]. Realizaram-se testes de EIS nos 10 µ-elétrodos uma vez por dia, adicionando o elétrodo de referência e o contra elétrodo no líquido PBS (figura 85).



Figura 85: Configuração adotada no teste de resistência às condições da aplicação.

Definiu-se como limiar do teste o momento em que exista uma mudança brusca na impedância dos µ-elétrodos para uma frequência de 1 kHz, indicado a existência de um circuito aberto devido ao

desgaste ou fratura do material condutor. Mergulhou-se o optrode na solução salina durante um total de 72 horas, realizando a cada 24 horas um teste de EIS. Ao fim do 3º teste registou-se um aumento da impedância média dos µ-elétrodos, à frequência de 1 kHz, de 200 kΩ para 1.3 MΩ. Considerando uma estimativa cautelosa, o tempo médio de falha de vida do optrode foi apontado como 48 horas, último teste onde foi registada uma média de impedâncias inferior a 1 MΩ (figura 86).

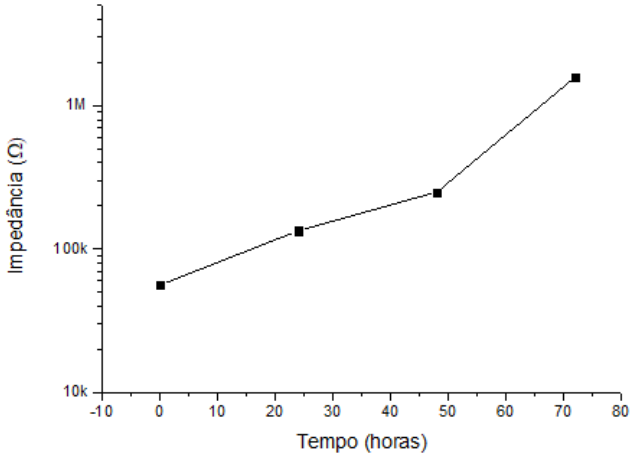


Figura 86: Gráfico da variação da impedância registada ao longo do tempo.

Utilizando a equação 7 para calcular a energia de ativação, onde T = 353,15 K (T = 80 °C), estimou-se de seguida o tempo de vida do optrode, à temperatura de 37 °C (temperatura do cérebro), empregando a equação 8 [50]:

$$tempo\ médio\ de\ vida\ (T = 310{,}15\ K) = k\frac{h}{k_B T}e^{\frac{-\Delta A\ddagger}{RT}} \qquad \text{Equação 8}$$

A tabela 10 resume os resultados da experiência de resistência do optrode às condições de aplicação. Os resultados indicam que o tempo médio de vida do optrode são de, aproximadamente, 2 anos. Tendo em conta que, o tempo dos implantes no cérebro de rato duram algumas semanas, o optrode fabricado é viável para a gravação crónica da atividade neuronal em experiências *in vivo*.

Tabela 10: Resultados do teste de aceleração do tempo de vida realizados ao optrode.

MTTF (h)	**Temperatura da solução aquecida (K)**	**Temperatura do cérebro (K)**	**ΔA (kJ/mol)**	**Tempo de vida do optrode (anos)**
48	353.15	310.15	123	2.02

6. Conclusões e trabalho futuro

6.1. Conclusões

O propósito da presente dissertação centrou-se no fabrico de um optrode em substrato de silício com um μ-LED integrado para aplicação na área da neurociência. A peculiaridade do optrode incide na sua capacidade de estimulação ótica das células do cérebro enquanto lê as células através de μ-elétrodos. A inclusão de um μ-LED permite efetuar a ativação de opsinas recorrendo à emissão de luz, uma técnica inovadora que representa menos implicações a nível de dano cerebral do que a estimulação elétrica. Outro dos pontos diferenciadores é a utilização de técnicas de fabrico que implicam menores custos de produção do que aquelas que foram apresentadas durante o capítulo do estado de arte. As técnicas de fabrico do optrode incluíram a fotolitografia para a padronização (pistas/contactos) e encapsulamento, corte com lâmina e deposição física de vapor.

Os resultados do processo de fabrico indicam um optrode robusto com uma agulha de ponta afiada com 720 μm de espessura e 8 mm de comprimento, suficiente para alcançar zonas profundas do cérebro. Além de ser um método economizador de custo e tempo, a utilização da técnica de corte com lâmina aplicada às bolachas de silício facilita a integração com processos de padronização, frequentemente utilizado na indústria MEMS e CMOS.

Do processo fotolitográfico resultou a padronização de pistas e contactos, criando um filme ótimo para a deposição dos filmes metálicos. Durante o processo de fabrico adotaram-se cuidados de limpeza como o manuseamento do optrode com uma pinça e utilização de máscara, luvas e roupa adequados. Apesar destes cuidados, os resíduos atmosféricos implicaram momentos adversos durante o fabrico, levando a cortes/curto circuitos nas pistas ou levantamento de filmes durante o processo de *lift-off*. A utilização de uma sala limpa com uma temperatura estável seria uma das soluções inerentes à resolução do problema de limpeza e discrepância entre o tempo necessário para revelação do polímero fotossensível resultante das oscilações de temperatura.

O encapsulamento com 400 nm de nitreto de silício através da deposição física de vapor conferiu ao optrode biocompatibilidade e isolamento elétrico, ficando apenas os μ-elétrodos em contacto com o tecido neuronal.

O processo de solda durante o acoplamento do μ-LED ao optrode tornou-se um dos pontos mais críticos do fabrico do dispositivo. A colocação da solda nos contactos do μ-LED é manual e sujeita a erros que podem originar curto-circuitos entre as pistas do μ-LED e as pistas dos μ-elétrodos.

Os processos de caraterização mecânica ditaram que o optrode apresenta condições para penetrar o tecido neuronal sem adversidades. A sua robustez permite que durante a implantação o optrode não se mexa, permitindo estimulação e gravação neuronal precisa. A força compressiva registada na implantação do cérebro foi, em média, três vezes superior à força compressiva registada na gelatina agar-agar. A maior força compressiva registada foi no cérebro de vitelo cadáver, atingindo o máximo de 16 mN para velocidade de inserção de 3 mm/s. O optrode mostrou-se capaz de perfurar tanto a gelatina agar-agar como o cérebro de vitelo cadáver sem partir. A força necessária para extrair o optrode do cérebro de vitelo cadáver foi, em média, três vezes superior à força registada na gelatina agar agar. A força máxima distensível registada foi no cérebro de vitelo cadáver alcançando um máximo de -9.7 mN para 3 mm/s de velocidade de implantação.

A caraterização ótica determinou que o comprimento de onda correspondente ao pico de emissão da luz dos dois μ-LED's (467 nm para o μ-LED ELC-470-37 e 466 nm para o μ-LED C470DA2432) encontravam-se na gama de comprimento de onda adequado para a excitação da opsina ChR2 (400 nm-500 nm). Nos testes de medição da potência ótica, apenas o μ-LED ELC-470-37 conseguiu atingir potência suficiente para realizar a estimulação das células do tecido neuronal (1.2 mW/mm^2 > 1 mW/mm^2) para uma corrente de estimulação do μ-LED igual ou superior a 16 mA. O μ-LED C470DA2432 esteve próximo do valor de fotoestimulação (1mW/mm^2), no entanto não foi suficiente, conseguindo apenas alcançar potência de 0.92 mW/mm^2. Deste modo o μ-LED ELC-470-37 é o único capaz de satisfazer as condições de fotoestimulação das opsinas de ChR2 com um comprimento de onda de 467 nm e uma potência ótica de 1.2 mW/mm^2.

A caraterização eletroquímica ditou que os valores de impedância registados da leitura dos μ-elétrodos através do teste de espetroscopia de impedância variam entre 365.8 kΩ e 421.5 kΩ, sendo apropriados para a leitura da atividade neuronal (< 1 MΩ). Por fim realizou-se o teste de resistência do optrode às condições da aplicação, simulando as condições impostas durante uma implantação cerebral (líquido espinal e temperatura do cérebro). A variável para simular a aceleração do tempo de vida do dispositivo foi a temperatura, sujeitando o optrode a 80 °C. O teste de resistência às condições de

aplicação apontou para um tempo de vida do optrode a rondar os 2 anos, bastante superior aos testes de gravação crónica realizados atualmente (*in vivo*) que duram apenas algumas semanas.

Após o término das caraterizações do optrode executadas em ambiente *in vitro*, verificou-se a criação de um produto viável e fiável. O optrode encontra-se pronto para ser validado *in vivo* através de testes de implantação em ratos, sendo esta validação externa ao projeto desenvolvido. A validação do produto a ser realizada, eventualmente em ratos, poderá ajudar a melhorar o conhecimento das doenças neuronais inerentes ao cérebro (como *Alzheimer*, *Parkinson* ou ansiedade) com o intuito de ajudar no seu tratamento e melhorar a qualidade de vida do paciente.

A espessura do optrode ficou desde logo limitada pela espessura das bolachas de silício (525 µm). A utilização de bolachas de silício com uma espessura menor permitiria diminuir a espessura do optrode, diminuindo por sua vez os danos provocados nos tecidos neuronais.

O fabrico do optrode tem uma duração total de 5 dias, sendo que são fabricados 4 optrodes em simultâneo. O optrode fabricado é viável para a implantação crónica, sendo capaz de efetuar a estimulação e gravação neuronal.

6.2. Trabalho futuro

O próximo passo a ser adicionado ao projeto deverá ser a inclusão de um sistema que realize a monotorização da temperatura dissipada pelo μ-LED ao longo do tecido neuronal. A sugestão passa pelo acoplamento de uma termorresistência em filme-fino a fim de controlar o aquecimento do tecido neuronal devido à dissipação de energia sob a forma de calor por parte do μ-LED. Desta forma será possível prevenir eventuais danos irreversíveis a nível celular causados pelo incremento da temperatura.

As dimensões do optrode e a densidade dos μ-elétrodos foram limitadas pelas dimensões do μ-LED comercial. Para diminuir a largura do optrode e aumentar a densidade de μ-elétrodos, futuramente poderá ser incluída também a microfabricação de μ-LED's. Outro fator que contribuiria para o aumento da densidade dos μ-elétrodos é a diminuição da largura das pistas. Aumentando a densidade dos μ-elétrodos seria possível obter maior fiabilidade dos sinais lidos.

Outra possibilidade aberta por esta dissertação, passa pela agregação do optrode numa unidade de comunicação sem fios que realize o processamento (leitura e filtragem) e envio em tempo real dos sinais que estão a ser lidos para outra interface exterior de forma a serem analisados. A utilização de uma interface sem fios daria liberdade de movimentos ao animal em estudo, facilitando a estimulação e gravação neuronal.

Durante o desenvolvimento do projeto e de maneira a reduzir a espessura e aumentar a flexibilidade do optrode, estudou-se uma nova receita de fabrico utilizando um substrato flexível (processo descrito no Anexo B). É proposta a utilização de poliimida fotossensível depositada por centrifugação e padronizada por UV. A poliimida é um material biocompatível e por isso irá facilitar os processos de encapsulamento (não sendo necessário encapsular na parte de trás da agulha). Outro dos aspetos a considerar é a flexibilidade do substrato, permitindo que o optrode se adapte aos micromovimentos do tecido neuronal.

Bibliografia

[1] A. M. Aravanis *et al.*, "An optical neural interface: in vivo control of rodent motor cortex with integrated fiberoptic and optogenetic technology.," *J. Neural Eng.*, vol. 4, no. 3, 2007.

[2] A. L. Hodgkin and A. F. Huxley, "Action potentials recorded from inside a nerve fibre," *Nature*, vol. 144, pp. 710–711, 1939.

[3] A. F. Huxley and A. L. Hodgkin, "A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve," *J.Physiol*, vol. 117, pp. 500–544, 1952.

[4] G. Kook, S. W. Lee, H. C. Lee, I. J. Cho, and H. J. Lee, "Neural probes for chronic applications," *Micromachines*, vol. 7, no. 10, pp. 1–20, 2016.

[5] O. Yizhar, L. E. Fenno, T. J. Davidson, M. Mogri, and K. Deisseroth, "Primer Optogenetics in Neural Systems," *Neuron*, vol. 71, no. 1, pp. 9–34, 2011.

[6] J. G. Bernstein and E. S. Boyden, "Optogenetic tools for analyzing the neural circuits of behavior," *Trends Cogn. Sci.*, vol. 15, no. 12, pp. 592–600, Dec. 2011.

[7] F. Wu, E. Stark, P. C. Ku, K. D. Wise, G. Buzsáki, and E. Yoon, "Monolithically Integrated μLEDs on Silicon Neural Probes for High-Resolution Optogenetic Studies in Behaving Animals," *Neuron*, vol. 88, no. 6, pp. 1136–1148, 2015.

[8] S. Dufour and Y. De Koninck, "Optrodes for combined optogenetics and electrophysiology in live animals," *Neurophotonics*, vol. 2, no. 3, p. 031205, Jul. 2015.

[9] O. Yizhar, L. E. Fenno, T. J. Davidson, M. Mogri, and K. Deisseroth, "Optogenetics in Neural Systems," *Neuron*, vol. 71, no. 1, pp. 9–34, 2011.

[10] S. A. Deadwyler and R. E. Hampson, *The significance of neural ensemble codes during behavior and cognition*. 1997.

[11] B. Ghane-Motlagh and M. Sawan, "Design and Implementation Challenges of Microelectrode Arrays: A Review," *Mater. Sci. Appl.*, vol. 04, no. 08, pp. 483–495, 2013.

[12] F. Strumwasser, *Long-Term Recording from Single Neurons in Brain of Unrestrained Mammals*, 127th ed. .

[13] M. HajjHassan, V. Chodavarapu, and S. Musallam, "NeuroMEMS: Neural probe microtechnologies," *Sensors*, vol. 8, no. 10, pp. 6704–6726, 2008.

[14] A. C. M. Peixoto, "High-aspect-ratio tridimensional electrode arrays for neural applications," Universidade do Minho, 2015.

[15] S. B. Goncalves, A. C. Peixoto, A. F. Silva, and J. H. Correia, "Fabrication and mechanical characterization of long and different penetrating length neural microelectrode arrays," *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 25, no. 5, 2015.

[16] A. C. Peixoto, A. F. Silva, N. S. Dias, and J. H. Correia, "High-aspect-ratio neural electrode array fabrication using thermomigration process," *Procedia Eng.*, vol. 47, pp. 574–577, 2012.

[17] Y. Y. Chen *et al.*, "Design and fabrication of a polyimide-based microelectrode array: Application in neural recording and repeatable electrolytic lesion in rat brain," *J. Neurosci. Methods*, vol. 182, no. 1, pp. 6–16, 2009.

[18] S. Myllymaa, K. Myllymaa, and R. Lappalainen, "Flexible implantable thin film neural electrodes."

[19] K. Lee, J. He, R. Clement, S. Massia, and B. Kim, "Biocompatible benzocyclobutene (BCB)-based neural implants with micro-fluidic channel," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 20, no. 2, pp. 404–407, 2004.

[20] L. Guo, G. S. Guvanasen, X. Liu, C. Tuthill, T. R. Nichols, and S. P. Deweerth, "A PDMS-based integrated stretchable microelectrode array (isMEA) for neural and muscular surface interfacing," *IEEE Trans. Biomed. Circuits Syst.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–10, 2013.

[21] S. H. Cho, H. M. Lu, L. Cauller, M. I. Romero-Ortega, J. B. Lee, and G. A. Hughes, "Biocompatible SU-8-based microprobes for recording neural spike signals from regenerated peripheral nerve fibers," *IEEE Sens. J.*, vol. 8, no. 11, pp. 1830–1836, 2008.

[22] S. Takeuchi, D. Ziegler, Y. Yoshida, K. Mabuchi, and T. Suzuki, "Parylene flexible neural probes integrated with microfluidic channels," *Lab Chip*, vol. 5, no. 5, p. 519, 2005.

[23] Y. X. Kato, S. Furukawa, K. Samejima, N. Hironaka, and M. Kashino, "Photosensitive-polyimide based method for fabricating various neural electrode architectures," *Front. Neuroeng.*, vol. 5, no. June, 2012.

[24] D. H. Baek *et al.*, "A dry release of polyimide electrodes using Kapton film and application to EEG signal measurements," *Microsyst. Technol.*, vol. 17, no. 1, pp. 7–14, 2011.

[25] A. Arbor, "A 16-SITE NEURAL PROBE INTEGRATED WITH A WAVEGUIDE FOR OPTICAL STIMULATION Il-Joo Cho , Hyoung Won Baac and Euisik Yoon Department of Electrical Engineering and Computer Science," *Electr. Eng.*, pp. 995–998, 2010.

[26] E. Stark, T. Koos, and G. Buzsáki, "Diode probes for spatiotemporal optical control of multiple neurons in freely moving animals," *J. Neurophysiol.*, vol. 108, no. 1, pp. 349–363, Jul. 2012.

[27] H. Cao, L. Gu, S. K. Mohanty, and J. C. Chiao, "An integrated μLED optrode for optogenetic stimulation and electrical recording," 2013.

[28] F. Wu *et al.*, "An implantable neural probe with monolithically integrated dielectric waveguide and

recording electrodes for optogenetics applications," *J. Neural Eng.*, vol. 10, no. 5, 2013.

[29] National Association for Biomedical Research (NABR), "Mice & Rats: The Essential Need for Animals in Medical Research," pp. 23–24, 2005.

[30] G. Buzsáki, "Large-scale recording of neuronal ensembles," *Nat. Neurosci.*, vol. 7, no. 5, pp. 446–451, 2004.

[31] K. L. Mitterling *et al.*, "Cellular and subcellular localization of estrogen and progestin receptor immunoreactivities in the mouse hippocampus," *J. Comp. Neurol.*, vol. 518, no. 14, pp. 2729–2743, 2010.

[32] E. S. Boyden, F. Zhang, E. Bamberg, G. Nagel, and K. Deisseroth, "Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity," *Nat. Neurosci.*, vol. 8, no. 9, pp. 1263–1268, Sep. 2005.

[33] H. Lee, R. V. Bellamkonda, W. Sun, and M. E. Levenston, "Biomechanical analysis of silicon microelectrode-induced strain in the brain," *J. Neural Eng.*, vol. 2, no. 4, pp. 81–89, 2005.

[34] I. G. Machado, "Falhas de estruturas de aço soldadas devido a reduzida ductilidade," *Soldag. e Insp.*, vol. 18, no. 4, pp. 391–403, 2013.

[35] T. Nohira, K. Yasuda, and Y. Ito, "Pinpoint and bulk electrochemical reduction of insulating silicon dioxide to silicon," *Nat. Mater.*, vol. 2, p. 397, May 2003.

[36] G. M. Bancroft, I. Adams, L. L. Coatsworth, C. D. Bennewitz, J. D. Brown, and W. D. Westwood, "ESCA study of sputtered platinum films," *Anal. Chem.*, vol. 47, no. 3, pp. 586–588, Mar. 1975.

[37] M. Das, K. Bhimani, and V. K. Balla, "In vitro tribological and biocompatibility evaluation of sintered silicon nitride," *Mater. Lett.*, vol. 212, pp. 130–133, 2018.

[38] D.-I. C. Koch and D.-I. T. J. Rinke, "Photolithography: Basics of Microstructuring," 1st ed., M. GmbH, Ed. MicroChemicals GmbH, 2017, pp. 24–187.

[39] B. Coleman, "Semiconductor Wafer Dicing Techniques," 4,729,971, 1988.

[40] J. H. Correia and J. P. Carmo, *Introdução às microtecnologias no silício*. 2010.

[41] Y. K. Yap and D. Zhang, "Physical Vapor Deposition," in *Encyclopedia of Nanotechnology*, vol. 96, no. 19, Dordrecht, United States: Springer Netherlands, 2015, pp. 1–8.

[42] J. Singh and D. E. Wolfe, "Nanostructured component fabrication by electron beam-physical vapor deposition," *J. Mater. Eng. Perform.*, vol. 14, no. 4, pp. 448–459, 2005.

[43] P. . J. Kelly and R. . D. Arnell, "Magnetron sputtering: a review of recent developments and applications," *Vacuum*, vol. 56, no. 3, pp. 159–172, 2000.

[44] Microchemicals, "AZ 351B : General Purpose Developer." [Online]. Available: http://www.microchemicals.com/micro/az_351b_developer.pdf.

[45] H. O. Pierson, "Handbook of Chemical Vapor Deposition (CVD): Principles, Technology, and Applications," Noyes Publications, Ed. Noyes Publications, 1992, p. 282.

[46] R. Pomfret, K. Sillay, and G. Miranpuri, "An Exploration of the Electrical Properties of Agarose Gel: Characterization of Concentration Using Nyquist Plot Phase Angle and the Implications of a More Comprehensive In Vitro Model of the Brain," *Ann. Neurosci.*, vol. 20, no. 3, Jul. 2013.

[47] "Datasheet ELC-470-34," 2016. [Online]. Available: http://www.roithner-laser.com/datasheets/led_chip/elc-470-34.pdf. [Accessed: 20-Aug-2006].

[48] Cree, "Cree® Direct Attach™ DA2432™ LEDs CxxxDA2432-Sxxx00-2 Data Sheet," 2014. [Online]. Available: http://www.cree.com/led-chips/media/documents/CPR3FM.pdf. [Accessed: 20-Jun-2018].

[49] H. Speed and L. A. Area, "FDS100 Si Photodiode Datasheet," 2006. [Online]. Available: http://saaubi.people.wm.edu/TeachingWebPages/Physics252_Spring2007/Week10/Thorlabs_FDS100_specsheet.pdf. [Accessed: 20-Aug-2006].

[50] L. A. Escobar and W. Q. Meeker, "A Review of Accelerated Test Models," *Stat. Sci.*, vol. 21, no. 4, pp. 552–577, Nov. 2006.

[51] ANIARA, "Phosphate Buffered Saline, pH 7.2," 1885. [Online]. Available: https://www.aniara.com/mm5/PDFs/IFU/PBS28-eng.pdf. [Accessed: 20-Aug-2007].

Anexo A

Protocolo de fabrico do optrode em substrato de silício com µ-LED integrado

Corte das bolachas de silício

1. **Preparação**
    - Fixar as bolachas de silício na mesa do DAD-2H/6T com fita adesiva.
    - **Cortes de 30 mm**
        - Alinhar amostra pelo corte da bolacha de silício;
        - Introduzir parâmetros no programa para realizar 3 cortes com saltos de 30 mm.
    - **Cortes de 75 mm**
        - Rodar a amostra 90º;
        - Introduzir parâmetros no programa para realizar 2 cortes com saltos de 75 mm.
    - **Limpar** as amostras com água desionizada.

Litografia para deposição das pistas/contactos

1. **Preparação**
    - Limpar caixas metálicas com papel embebido em IPA;
    - Preparar placa de aquecimento:
        - Nivelar e forrar com folha de alumínio;
        - Definir temperatura de 110ºC.
    - Limpar máscaras:
        - Água, IPA, água e secar com pistola de azoto.
    - Preparar banho ultrassónico:
        - Limpeza do banho:
            - Esvaziar o recipiente e ligar o compressor;
            - Abrir válvula “ultrasonic/to drain”;
            - Limpar com água desionizada;
            - Encher recipiente:
                - Fechar válvula “ultrasonic/to drain”;

- Usar água desionizada para encher o recipiente.

- Ligar mesa do banho ultrassónico:
  - Temperatura = 40°C;
  - Potência = 9;
  - Tempo = 20 minutos;
  - Carregar no botão "HEATER" para começar a aquecer o banho.

- Limpar as 4 amostras:
  - Com papel e acetona**;**
  - Pôr amostras na caixa de vidro e encher de acetona;
    - Levar amostras ao banho ultrassónico sem a tampa da caixa de vidro nem a tampa do recipiente;
    - Ligar botão "ULTRASONIC" para iniciar.
  - No fim, tirar caixa de vidro do recipiente:
    - Pegar nas amostras com a pinça, uma a uma do recipiente de acetona;
    - Limpá-las com água, IPA, água e secar com pistola de azoto;
    - Pôr amostras na placa de aquecimento:
      - Durante 20 min a 110 ºC;
      - Pôr caixa metálica por cima das amostras.

- Preparar aparelho de centrifugação:
  - Forrar o interior com folha de alumínio, de maneira a não ficar nenhuma parte exposta (figura 40 a));
  - Programar com os seguintes parâmetros:

Step 1:

- RPM: 1500;
- Time: 5;
- R/sec2: 200;

Step 2:

- RPM: 2500;
- Time: 15;
- R/sec2: 200;

2. **Ligar Mask Aligner,** que deve ficar pelo menos 30 minutos a aquecer;

3. **Revestimento por centrifugação do polímero fotossensível:**
    - Medir 4 ml de Negative Photoresist AZ® nLOF 2070 deitando-o cuidadosamente num gobelé de 5 ml para não fazer bolhas;
    - Tirar amostra diretamente da placa de aquecimento com a pinça e colocá-la no dispositivo de revestimento por centrifugação;
        - Ter sempre uma caixa metálica por cima da placa de aquecimento, mesmo sem as amostras.
    - Colocar e centrar a amostra no aparelho de centrifugação;
    - Com a pistola de azoto, soprar na superfície da amostra para tirar resíduos que lá tenham caído:
        - De notar que se houver algum resíduo ou bolha perto da zona dos contactos, o polímero fotossensível irá acumular-se nessa área, dificultando o processo de remoção do polímero fotossensível com o revelador.
    - Deitar polímero fotossensível calma e continuadamente de maneira a não criar bolhas, começando pelo centro da amostra;
    - Proceder ao revestimento por centrifugação;
    - Retirar a amostra com a pinça e limpar a base da mesma com papel e acetona;
    - Colocar a amostra na caixa metálica e repetir os procedimentos para as amostras seguintes.
4. **Curar polímero fotossensível:**
    - Levar as amostrar à placa de aquecimento durante 10 min a 110 ºC para tornar o polímero sensível à luz UV (com caixa metálica colocada por cima).
5. **Limpar aparelho de centrifugação** com papel embebido em acetona;
6. **Reidratação:**
    - Isolar a sala de qualquer entrada de luz e apagar a luz da sala.
    - Com a pinça, retirar as amostras da placa de aquecimento com a luz da sala desligada, para a caixa metálica que estava na placa de aquecimento;
    - Pôr a tampa na caixa e deixar a reidratar durante 20 min.
7. **Exposição à luz UV**
    - Expor as amostras ao UV, uma de cada vez:
        - Tempo = 5.4 s:

- Fazer **duas vezes exposição de 2.7 s** visto que a escala do equipamento não permite uma exposição completa de 5.4 s.

8. **Cura de pós-exposição:**
   - Colocar as amostras 10 min na placa de aquecimento a 110 ºC (com caixa metálica por cima);
   - No fim, retirar as amostras da placa de aquecimento e deixá-las a **arrefecer na caixa metálica durante 10 min**.
9. **Revelador:**
   - Numa caixa de vidro, deitar 250 ml de AZ® 726 (MIF);
   - Colocar "comprimido" magnético no revelador;
   - Colocar caixa no agitador magnético e definir para o nível 3;
   - Colocar as 4 amostras no suporte de vidro e deixar atuar durante 60 s em cada posição descrita na figura A1. Caso a temperatura ambiente do laboratório seja superior a 25 ºC, usar 30 s em cada posição.
   - Retirar o suporte de vidro do revelador e lavar com água;
   - Retirar uma amostra de cada vez, lavar com água e secar com azoto;
   - Analisar se as amostras precisam de mais tempo;
     - As linhas que correspondem às pistas deverão ser iguais ou mais espessas do que as linhas que correspondem a espaços vazios.
   - Com a pistola de azoto, limpar superfície da amostra e guardá-la de imediato numa caixa de armazenamento.

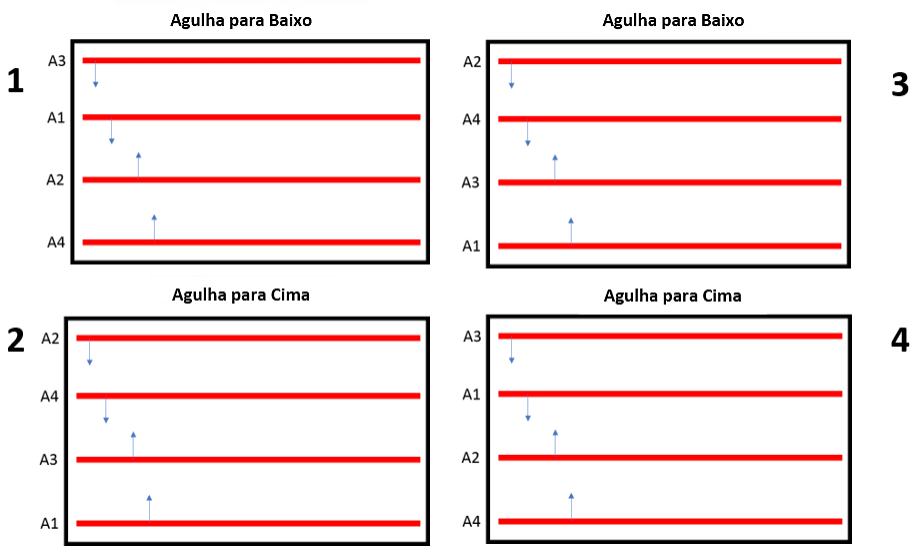


Figura A1: Esquema de colocação das amostras para o revelador.

Deposição das pistas/contactos

1. **Preparar amostras para deposição de titânio:**
    - Ordenar e colar amostras no suporte da câmara de deposições (figura 49);
    - Colocar o suporte dentro da câmara e fazer vácuo.
2. **Deposição de titânio/alumínio:**
    - Pressão na câmara terá de ser pelo menos 7×10^{-6} mbar para iniciar a deposição;
    - Definir 7 kV no controlador do feixe de eletrões;
    - Depositar 15 nm de Ti ajustando a corrente do feixe de eletrões para ter uma taxa de deposição de ≈ 1 Å/s (≈ 50 mA);
    - Esperar que câmara arrefeça até cerca de 10 °C acima da temperatura ambiente;
    - Pressão na câmara terá de ser pelo menos 7×10^{-6} mbar para iniciar a deposição;
    - Rodar para Al no controlador do feixe de eletrões e definir 7 kV;
    - Depositar 200 nm de Al ajustando a corrente do feixe de eletrões para ter uma taxa de deposição ≥ 20 Å/s (≈ 70 mA);
    - Esperar que a câmara arrefeça até certa de 10°C acima da temperatura ambiente antes de retirar as amostras.
3. **Preparar para deposição de platina:**
    - Colocar o alvo de platina no magnetrão e fazer vácuo.
4. **Deposição de platina:**
    - Pressão na câmara terá de ser pelo menos 7×10^{-6} mbar para fazer a deposição;
    - Fornecer um fluxo constante de 20 sccm de árgon, corrente de 0.30 mA, potencial elétrico de 353 V, potência de 110 W e regular a pressão para 6×10^{-3} mbar;
    - Depositar 60 nm platina por pulverização catódica por corrente contínua;
    - Esperar que câmara arrefeça até cerca de 10 °C acima da temperatura ambiente antes de retirar as amostras;
5. **Retirar amostras da câmara;**

Remoção do polímero fotossensível

1. **Preparação:**
    - Pôr água a ferver na chaleira elétrica;
    - Deitar o TechniStrip® NI555 na caixa de vidro com o "comprimido" magnético, pôr a caixa dentro do recipiente de aço inox e colocar o conjunto em cima da placa de aquecimento;
    - Conectar o sensor de temperatura à placa de aquecimento e ligá-la;
    - Deitar a água fervida no recipiente de aço inox, colocar o sensor na água (não no TechniStrip® NI555) e aumentar a temperatura para 75 °C;
    - Pôr o comprimido a rodar.
2. **Remoção do polímero fotossensível:**
    - Quando chegar aos 75 °C, colocar as amostras no TechniStrip® NI555;
    - Virar amostras de 10 em 10 minutos e fazer pelo menos 20 minutos de banho;
    - Se o polímero fotossensível estiver completamente removido, mergulhar amostra numa tina com água;
    - Evitar usar o jato de água diretamente na estrutura depositada.
    - Secar amostra com a pistola de azoto e guardar na devida caixa de armazenamento;
    - Quando o processo estiver terminado, baixar temperatura para 10 °C, desligar a placa e só depois tirar o sensor da água.

Litografia do encapsulamento

1. **Preparação:**
    - Preparar placa de aquecimento:
        - Nivelar, forrar com folha de alumínio e definir temperatura de 110 °C.
    - Desidratar amostras:
        - Pôr amostras na placa de aquecimento, deixando-as lá ficar durante 20 minutos (pôr caixa metálica por cima das amostras enquanto estão na placa de aquecimento).
2. **Preparar aparelho de centrifugação**:
    - Forrar o interior com folha de alumínio, de maneira a não ficar nenhuma parte exposta;
    - Programar com os seguintes valores:

      Step 1:

- RPM: 1500;
- Time: 6;
- R/sec2: 300;

Step 2:

- RPM: 2000;
- Time: 3;
- R/sec2: 300;

3. **Revestimento por centrifugação do polímero fotossensível:**
    - Medir 4 ml de AZ 4562 deitando-o cuidadosamente num gobelé de 5 ml para não fazer bolhas;
    - Retirar amostra da placa de aquecimento com a pinça e colocá-la no aparelho de revestimento por centrifugação (ter sempre uma caixa metálica por cima da placa de aquecimento, mesmo sem as amostras).
    - Centrar amostra no aparelho de centrifugação;
    - Com a pistola de azoto, soprar na superfície da amostra para tirar resíduos que lá tenham caído:
        - De notar que se houver algum resíduo ou bolha perto da zona dos contactos, o polímero fotossensível irá acumular-se nessa área, dificultando o processo de remoção do polímero fotossensível com o revelador;
    - Deitar polímero fotossensível calma e continuadamente de maneira a não criar bolhas, começando pelo centro da amostra;
    - Proceder ao revestimento por centrifugação;
    - Retirar a amostra com a pinça e limpar a base da mesma com papel e acetona;
    - Colocar a amostra na caixa.
4. **Evaporação de solventes:**
    - Pôr caixa metálica com as amostras na câmara limpa (colocar tampa com furo na caixa);
    - Deixar as amostras a evaporar os solventes durante 45 min.
        - Este passo é importante para promover a aderência do polímero fotossensível ao substrato.
5. **Ligar MaskAligner,** que deve ficar pelo menos 30 min a aquecer.
6. **Limpar aparelho de centrifugação** com papel embebido em acetona**;**

7. **Curar polímero fotossensível:**
    - Levar as amostrar à placa de aquecimento durante 10 min:
        - com caixa metálica colocada por cima das amostras para tornar o polímero fotossensível sensível à luz UV.
    - Antes de retirar as amostras da placa de aquecimento, isolar a sala de qualquer entrada de luz.
8. **Reidratação**
    - Com a pinça, retirar as amostras da placa de aquecimento com a luz da sala desligada, pôr tampa na caixa, ligar a luz e deixá-las a reidratar **durante 30 min** na caixa metálica que estava por cima.
        - Este passo é importante para promover uma rápida remoção na fase do revelador, não comprometendo o perfil do polímero fotossensível.
9. **Exposição à luz UV**
    - Colocar e alinhar a amostra com a estrutura previamente padronizada.
    - Levar amostras à exposição ótica durante 75 s.
        - Para isso, o manípulo das unidades de tempo tem de estar nos minutos e o do tempo no 1.25 min.
        - Alinhamento as amostras o melhor possível, visto que um leve desvio da máscara irá expor pistas ou não expor qualquer zona de interesse.
10. **Corte com lâmina**
    - Iluminar a sala apenas com luz amarela durante todo o procedimento;
    - Colocar fita-cola de dupla face na película azul, usada para fazer cortes no equipamento de corte com lâmina;
    - Passar com o dedo em Sylgard® 184 Silicone Elastomer e colocar na parte de trás da amostra, de maneira a ficar apenas um pequeno rasto deste polímero na zona da estrutura fabricada (facilita depois o processo de remoção do optrode dessa fita).
    - Proceder ao corte, pela ordem indicada na figura 53:
11. **Revelador:**
    - Limpar optrode:
        - Sem remover os pedaços de silício cortados à volta do optrode, limpar o optrode com um cotonete e água destilada, passando delicadamente o cotonete com água na superfície do optrode com o polímero fotossensível;
        - Verificar no microscópio se está devidamente limpo.

- Uma grande acumulação de sujidade poderá significar a incompleta remoção do polímero fotossensível curado nas zonas encapsuladas.

- Num gobelé, preparar a solução do revelador:
  - Proporções de 1:4 (AZ® 351B:água destilada): 50 ml de AZ® 351B para 200 ml de água.
- Numa tina de vidro, deitar solução suficiente para cobrir o optrode.
- Noutra tina de vidro, e na mesma quantidade, deitar água destilada;
- Pôr o optrode primeiro na tina com água e agitando, deixar lá o elétrodo durante 30 segundos;
- De seguida, com uma pinça, tirar o optrode da tina de água e pôr na tina de revelador, agitando durante 60 segundos;
- Repetir este processo até que o único polímero fotossensível existente seja o das áreas de interesse, mudando tanto a água da tina como a solução de revelador de 3 em 3 utilizações;
- Guardar as amostras na respetiva caixa para posterior encapsulamento com nitreto de silício.

Deposição de Nitreto de Silício

1. **Preparar as amostras para deposição de nitreto de silício**
   - Ordenar e colar amostras no suporte da câmara de deposições (figura 55);
   - Colocar o alvo de silício e fazer vácuo.
2. **Deposição:**
   - Fornecer um fluxo constante de 7 sccm de árgon e 13 sccm de azoto, potência de 150 W e pressão de 6×10^{-3} mbar;
3. Depositar 400 nm de Si_3N_4 por pulverização catódica por corrente alternada;
4. Esperar que a câmara arrefeça até cerca de 10°C acima da temperatura ambiente antes de retirar as amostras;
5. Retirar as amostras da câmara;

Remoção do polímero fotossensível dos contactos

1. Pousar uma tina de vidro e deitar acetona até cobrir o optrode (a acetona deve ser lançada no elétrodo em jato);
2. Agitar a placa durante 1 minuto;

3. Passar a amostra por água destilada, secar com a pistola de azoto e ver no microscópio se o polímero fotossensível foi totalmente removido;
4. Repetir o processo se ainda houverem vestígios.

***Acoplamento do μ-LED no* optrode**

1. **Fixar o optrode:**
   - Numa peça de alumínio, fixar peça metálica com fita-cola de Kapton® (servirá de suporte ao optrode);
   - Colocar o optrode no suporte e fixá-lo pela base usando um papel e fita-cola de kapton, de forma a não se mexer durante o processo de soldadura (figura 59);
2. **Soldar o μ-LED ao optrode:**
   - Colocar pasta de solda Kester EM907 nos contactos do μ-LED com o auxílio de uma agulha (figura 60);
   - Pegar cuidadosamente no μ-LED com os contactos virados para baixo através da ajuda de uma pinça de titânio 5TA e colocar sobre o optrode;
     - No caso do μ-LED da ELC-470-37, o contacto em forma de círculo deverá ficar no contacto superior do optrode.
   - Ajustar a posição do μ-LED com a ajuda de uma agulha para que os seus contactos fiquem alinhados com os do optrode (figura 61);
   - Ligar placa de aquecimento e quando chegar a 230 °C, deixar solda a fundir durante 5 min;
   - Baixar a temperatura para 10 °C e mantê-la ligada, de modo a saber qual a temperatura da placa.
   - Verificar se μ-LED acende tal como descrito na figura 76 a).
   - Colocar adesivo instantâneo (PERMABOND 102) de forma a proteger os contactos do μ-LED (figura 61).

Acoplamento do* optrode *na PCB

1. **Soldar o conector *Omnetics*** e os fios de ligação do μ-LED à PCB (figura 62).
2. **Colar optrode na PCB com supercola;**
    - Deitar uma gota de supercola num recipiente e pincelar (usando um fio) uma pequena quantidade da cola na zona da PCB onde o optrode será colocado;
    - Pousar a parte traseira da base do optrode no local pincelado (figura A2).

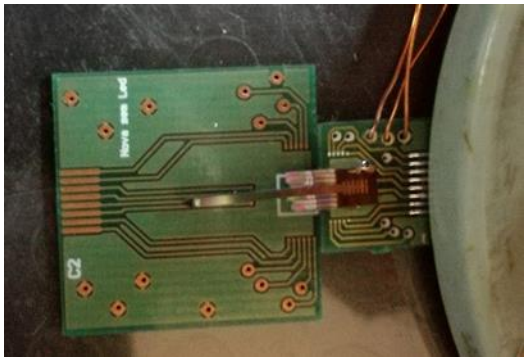


Figura A2: Optrode colada na PCB com supercola.

3. **Fazer *wire-bonding* dos contactos para a PCB;**
4. **Proteger os fios do *wire-bonding* com resina epóxi** (LOCTITE® M-31CL™ HYSOL)**:**
    - Colocar cuidadosamente a resina por cima dos fios da soldadura (figura 63);
    - Curar à temperatura ambiente durante 24 h.

Encapsulamento da parte de trás da agulha do* optrode *com (1:1) (PDMS:tolueno)

1. **Preparar forno** (ligar forno a 100 °C e deixar porta ligeiramente aberta).
2. **Preparar as amostras:**
    - Com uma seringa, medir 2 ml de Sylgard® 184 Silicone Elastomer e colocar num gobelé;
    - Medir 0.2 ml de agente de cura e deitar no mesmo gobelé;
    - Mexer bem até obter uma mistura com aspeto esbranquiçado por causa das bolhas;
    - Adicionar 2.2 g de tolueno usando uma pipeta volumétrica de plástico;
    - Utilizar um dissecador e uma bomba de vácuo para retirar as bolhas da solução.
3. **Revestimento da amostra com PDMS + tolueno:**

- Colocar um pouco da mistura de PDMS + tolueno por cima da superfície de papel preparada previamente;
- Mergulhar cuidadosamente apenas a parte de baixo da agulha do optrode na mistura de PDMS + tolueno;
- Colocar os optrodes virados ao contrário no suporte designado para ir ao forno;
    - fixar amostras ao suporte de silício pela PCB com o auxílio de fita-cola de kapton® (figura 64).

4. **Cura do PDMS e evaporação do tolueno:**
    - Colocar as amostras no forno (com a porta aberta) durante 30 minutos a uma temperatura de 100 °C;
    - Retirar as amostras do forno.
5. **Retirar optrode do suporte de silício e guardá-lo numa caixa de armazenamento.**

Anexo B

Protocolo de fabrico proposto para optrode em substrato flexível

1. Deposição de um filme de SiO_2 com pelo menos 1 µm de espessura num substrato de silício (30 mm x 75 mm).
2. Deposição por centrifugação e padronização de poliimida fotossensível com espessura entre 20 e 30 µm para a produção de um optrode suficientemente robusto (figura B1).

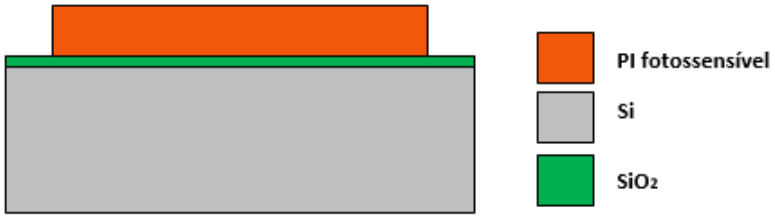


Figura B1: Padronização da base da estrutura do optrode.

3. Deposição por centrifugação e padronização do polímero fotossensível AZ® nLof 2070 para *lift-off* com espessura de 7 µm (figura B2).

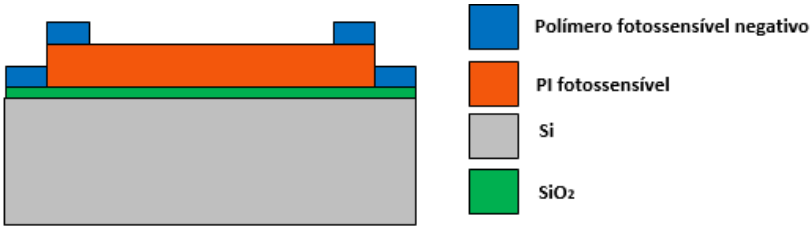


Figura B2: Padronização das pistas e contactos.

4. Deposição dos contactos e transdutor iónico e remoção do polímero fotossensível (figura B3).

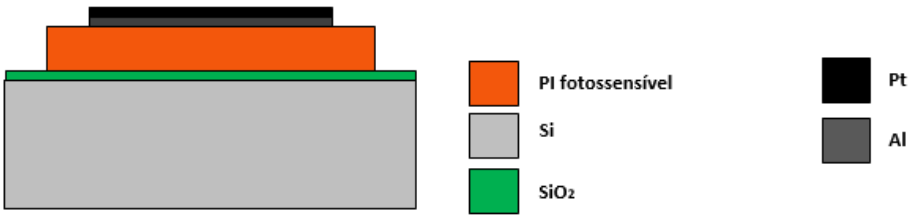


Figura B3: Após remoção do polímero fotossensível.

5. Deposição e padronização de poliimida fotossensível com 2 μm de espessura (figura B4).

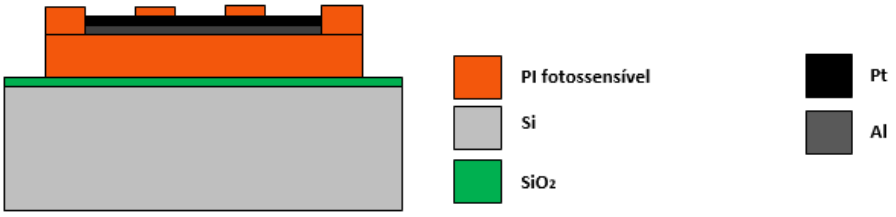


Figura B4: Padronização dos μ-elétrodos.

6. Corrosão química de SiO_2 para libertar o optrode do substrato (figura B5).

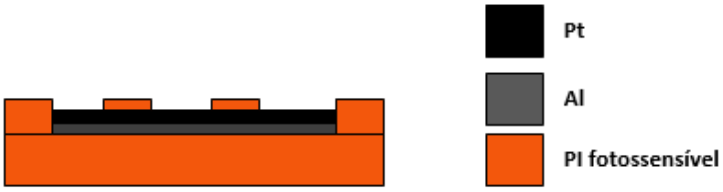


Figura B5: Optrode flexível.