Universidade do Minho
Escola de Engenharia

João Rui Martins Freitas

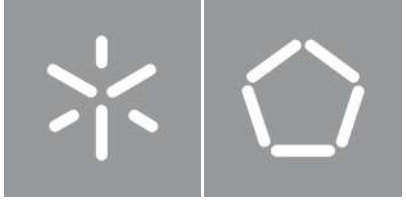
Sonda ultra-fina e flexível para aquisição de atividade neuronal

fevereiro de 2025

Sonda ultra-fina e flexível para aquisição de atividade neuronal
João Rui Martins Freitas

UMinho | 2025

Fundação para a Ciência e a Tecnologia
REPÚBLICA PORTUGUESA
EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E INOVAÇÃO
NORTE 2020
PROGRAMA OPERACIONAL REGIONAL DO NORTE
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA
Fundo Social Europeu



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

João Rui Martins Freitas

Sonda ultra-fina e flexível para aquisição de atividade neuronal

Tese de Doutoramento
Doutoramento em Engenharia Eletrónica e de Computadores
Especialidade de Instrumentação e Microssistemas Eletrónicos

Trabalho efetuado sob a orientação de
Professor Doutor Higino Correia
Doutora Sara Pimenta

fevereiro de 2025

Direitos de Autor e Condições de Utilização do Trabalho por Terceiros

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

Licença concedida aos utilizadores deste trabalho:



Atribuição-NãoComercial-SemDerivações

CC BY-NC-ND

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/

Agradecimentos

Gostaria de começar por agradecer aos meus orientadores, Professor Doutor Higino Correia e Doutora Sara Pimenta, por todo o apoio, orientação, disponibilidade e simpatia ao longo do trabalho desenvolvido durante estes quatro anos. Em especial à Doutora Sara Pimenta pela sua constante disponibilidade e pela ajuda naquelas tarefas mais delicadas em que os tremores das minhas mãos não ajudavam mesmo nada.

A todos os colegas de laboratório, atuais e passados, um muito obrigado por todo o apoio e camaradagem ao longo destes anos.

Ao Doutor João F. Oliveira, ao Doutor Leandro A. A. Aguiar e ao Dr. João Luís Machado do Instituto de Investigação em Ciências da Vida e Saúde (ICVS), um especial agradecimento pela sua disponibilidade e pelos registos eletrofisiológicos que possibilitaram a validação das sondas na reta final deste trabalho.

Por fim, mas em primeiro lugar no meu coração, aos meus avós, pais, irmão, cunhada e afilhado, a minha profunda e eterna gratidão por nunca deixarem de acreditar, motivar e me apoiar ao longo desta jornada.

A investigação foi suportada pela bolsa de investigação concedida pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) com a referência 2020.07708.BD e com o doi: `https://doi.org/10.54499/2020.07708.BD`.

"Some believe uncertainty is an evil that should be dispelled through divination. Others claim it's change that is evil. But that isn't true either. Every minute of every day, we each become someone new. We shouldn't fear change itself, but only who we might change into. Knowing one's path is most important."

— Misty Olszewski/Erica Lindbeck

Declaração de Integridade

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Universidade do Minho, Guimarães, fevereiro de 2025

João Rui Martins Freitas

Resumo

Sonda ultra-fina e flexível para aquisição de atividade neuronal

O cérebro humano, com cerca de 86 mil milhões de neurónios, transmite informações de forma complexa. Doenças como epilepsia e *Alzheimer* afetam a qualidade de vida, tornando essencial o estudo do cérebro para desenvolver tratamentos inovadores. As sondas neuronais implantáveis, que registam ou modulam a atividade neuronal, evoluíram nas últimas décadas e são amplamente utilizadas no tratamento de doenças como *Parkinson* e epilepsia.

A resposta imunitária provocada por sondas neuronais rígidas pode ser minimizada com o uso de sondas flexíveis que imitam a suavidade e os movimentos do cérebro. Nos últimos anos, sondas neuronais flexíveis de polímeros, como a poliimida (PI), têm sido desenvolvidas para reduzir o desfasamento mecânico entre a sonda e o tecido cerebral, melhorando a qualidade dos sinais registados.

O foco desta tese de doutoramento foi a implementação de uma sonda neuronal flexível, com a padronização de microelétrodos de platina (Pt) num substrato de PI fotossensível. Foram produzidas duas iterações da sonda: a primeira com microelétrodos de platina eletrodepositada e a segunda com microelétrodos de platina depositada através de pulverização catódica por magnetrão de corrente contínua (DC). Estas sondas apresentam uma haste com um comprimento de 6 mm, secção transversal de 130 µm $\times$ 9 µm, pistas com uma largura de 5 µm e um *pitch* de 10 µm e onze microelétrodos com uma área ativa de 9 µm $\times$ 9 µm. A caraterização eletroquímica dos microelétrodos resultou em valores de impedância a 1 kHz de 350 kΩ e 327 kΩ para as duas iterações, respetivamente. A validação da segunda iteração da sonda consistiu na gravação da atividade neuronal extracelular num rato anestesiado, onde foram registados diversos potenciais de ação e potenciais de campo local intracraniano (LFPs).

Foi também fabricada uma guia de onda com um núcleo e encapsulamento de TiO_2 e SiO_2, respetivamente. Esta guia de onda foi projetada para transmitir luz com um comprimento de onda (λ) de 470 nm, para utilização futura em aplicações optogenéticas excitatórias da opsina *channelrhodopsin-2* (ChR2). Para a determinação das dimensões otimizadas das *gratings* para o acoplamento e desacoplamento da luz, foram realizadas simulações recorrendo ao método de elementos finitos (FEM) e ao método das diferenças finitas no domínio do tempo (FDTD). As dimensões da *grating* de transmissão de acoplamento foram um período da *grating* (Λ) de 650 nm e um *duty-cycle* de 63 % e para a *grating* de transmissão de desacoplamento foram um Λ de 800 nm e um *duty-cycle* de 64 %, sendo obtida uma atenuação ótica do dispositivo de $10{,}58$ dB. Por fim, foi também realizado o estudo de um material alternativo (SiN) para o fabrico do núcleo da guia de onda.

Palavras-chave atividade neuronal, guias de onda, microelétrodos, sondas neuronais flexíveis

Abstract

Ultra-thin and flexible probe for neuronal activity recording

The human brain, with around 86 billion neurons, transmits information in a complex way. Diseases such as epilepsy and Alzheimer's affect the quality of life, making it essential to study the brain in order to develop innovative treatments. Implantable neuronal probes, which record or modulate neuronal activity, have evolved in recent decades and are widely used in the treatment of diseases such as Parkinson's and epilepsy.

The immune response generated by rigid neuronal probes can be minimized with the use of flexible probes that mimic the smoothness and movements of the brain. In recent years, flexible neuronal probes patterned on polymeric substrates, such as polyimide (PI), have been developed to reduce the mechanical mismatch between the probe and the brain tissue, improving the quality of the recorded signals.

The focus of this PhD was the implementation of a flexible neuronal probe, with the patterning of Pt microelectrodes on a photosensitive PI substrate. Two iterations of the probe were developed: the first one with eletrodeposited platinum (Pt) microelectrodes and the second one with Pt microelectrodes deposited by direct current (DC) magnetron sputtering. These probes have a shaft with a length of 6 mm, a cross-section of $130\,\mu\text{m} \times 9\,\mu\text{m}$, signal lines with a width of $5\,\mu$m and a pitch of $10\,\mu$m, and eleven microelectrodes with an active area of $9\,\mu\text{m} \times 9\,\mu$m. The electrochemical characterization of the microelectrodes resulted in impedance values at 1 kHz of $350\,\text{k}\Omega$ and $327\,\text{k}\Omega$ for the two iterations, respectively. The validation of the second iteration of the probe consisted of recording extracellular neuronal activity in an anesthetized rat, where several action potentials and local field potentials (LFPs) were recorded.

A waveguide with a core and encapsulation of TiO_2 and SiO_2, respectively, was also microfabricated. This waveguide was designed to transmit light with a wavelength (λ) of 470 nm, for future use in optogenetic excitatory applications of the channelrhodopsin-2 (ChR2) opsin. In order to determine the optimized dimensions of the gratings for light coupling and decoupling, simulations were carried out using the finite element method (FEM) and the finite-difference time-domain method (FDTD). The dimensions of the coupling transmission grating were obtained with a grating period (Λ) of 650 nm and a duty-cycle of $63\,\%$ and for the decoupling transmission grating a Λ of 800 nm and a duty-cycle of $64\,\%$, with an optical attenuation of the device of 10.58 dB. Finally, a study was also performed about an alternative material (SiN) for fabricating the waveguide core.

Keywords flexible neuronal probes, microelectrodes, neuronal activity, waveguides

Conteúdo

I Documento **1**

1 Introdução **2**

1.1 Cérebro Humano: Fisiologia e Principais Distúrbios 2

1.2 Sondas Neuronais 7

1.3 Optogenética 9

1.4 Motivação e Objetivos 12

1.5 Organização da Tese 14

2 Sondas Neuronais: Estado da Arte **16**

2.1 Sondas Neuronais Rígidas 17

2.1.1 Interação Elétrica 17

2.1.2 Interação Ótica 23

2.1.3 Interação Microfluídica 28

2.2 Sondas Neuronais Flexíveis 35

2.2.1 Interação Elétrica 35

2.2.2 Interação Ótica 47

2.2.3 Interação Microfluídica 51

3 Simulações Óticas **56**

3.1 Simulações Óticas FEM de uma Guia de Onda 56

3.2 Simulações Óticas FDTD de uma Guia de Onda 65

4 Tecnologias de Microfabricação **71**

4.1 Definição das Tecnologias de Fabrico 71

4.1.1 Fotolitografia 71
4.1.2 Evaporação por Feixe de Eletrões (e-beam) 72
4.1.3 Pulverização Catódica por Magnetrão 73
4.1.4 Eletrodeposição 75
4.1.5 Deposição por Camada Atómica (ALD) 76
4.1.6 Corrosão Iónica Reativa (RIE) 77
4.2 Fabrico de uma Sonda Neuronal Flexível com Microelétrodos de Pt Eletrodepositada . . 78
4.2.1 Padronização da Geometria da Sonda Neuronal Flexível 78
4.2.2 Padronização dos Contactos, Pistas e Microelétrodos Metálicos da Sonda Neuronal Flexível 82
4.2.3 Encapsulamento da Sonda Neuronal Flexível 85
4.2.4 Eletrodeposição de Pt 87
4.3 Fabrico de uma Sonda Neuronal Flexível com Microelétrodos de Pt Depositada por Pulverização Catódica por Magnetrão DC 88
4.4 Fabrico da Guia de Onda 91
4.4.1 Padronização do Núcleo da Guia de Onda com TiO_2 92
4.4.2 Revestimento do Núcleo da Guia de Onda com SiO_2 Depositado por PEALD . . 94
4.4.3 Padronização do Revestimento da Guia de Onda com Recurso a RIE 95

5 Técnicas de Caraterização e Resultados Experimentais 98
5.1 Técnicas de Caraterização 98
5.1.1 Microscopia de Força Atómica (AFM) 98
5.1.2 Elipsometria Espetroscópica (SE) 100
5.1.3 Espetroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS) 101
5.1.4 Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM) e Espetroscopia Dispersiva de Raios-X (EDS) 105
5.1.5 Espetroscopia de Fotoeletrões Excitados por Raios-X (XPS) 106
5.2 Caraterização da Sonda Neuronal Flexível com Integração de Microelétrodos de Pt Eletrodepositada 107
5.3 Caraterização da Sonda Neuronal Flexível com Integração de Microelétrodos de Pt Depositada por Pulverização Catódica por Magnetrão DC 109
5.4 Validação da Sonda Neuronal Flexível com Integração de Microelétrodos de Pt Depositada por Pulverização Catódica por Magnetrão DC 113

5.5 Caraterização dos Filmes-Finos que Compõem a Guia de Onda 117
5.6 Estudo de SiN como Material do Núcleo da Guia de Onda 119

6 Conclusões e Trabalho Futuro **125**
6.1 Conclusões 125
6.2 Trabalho Futuro 128

Bibliografia **129**

II Apêndices **162**

A Publicações **163**

B Declaração de Ética **165**

Lista de Figuras

1.1 Disposição dos lobos presentes no córtex cerebral humano 3
1.2 Ilustração de vários tipos de neurónios 5
1.3 Representação gráfica e propagação de um potencial de ação num neurónio 6
1.4 Matriz de microfios de 64 canais 8
1.5 Sondas de Michigan 8
1.6 Diferentes configurações da matriz de Utah 9
1.7 Ilustração das diferentes etapas da técnica optogenética 10
1.8 Diferentes categorias de *optrodes* usadas em optogenética 12
1.9 Sonda neuronal ultra-fina e flexível desenvolvida 14

2.1 Diferentes sondas neuronais usadas na compreensão do funcionamento do cérebro e em BMI 16
2.2 Representação de sondas neuronais padronizadas em substratos rígidos com interação elétrica 23
2.3 Representação de sondas neuronais padronizadas em substratos rígidos com interação ótica 28
2.4 Representação de sondas neuronais padronizadas em substratos rígidos com interação microfluídica 34
2.5 Representação de sondas neuronais padronizadas em diferentes substratos flexíveis com interação elétrica 40
2.6 Representação de dispositivos eletrónicos inteligentes e flexíveis, utilizando substratos de polímeros elásticos e polímeros condutores avançados 42
2.7 Representação de dispositivos flexíveis optogenéticos com interação ótica baseada em μ-LEDs 50

2.8 Representação de dispositivos flexíveis optogenéticos com interação ótica baseada em guias de onda 51
2.9 Representação de dispositivos flexíveis optogenéticos com interação microfluídica . . . 55

3.1 Esquemático das dimensões utilizadas nas simulações óticas FEM de uma guia de onda 57
3.2 Malha aplicada ao modelo 3D da guia de onda 58
3.3 Resultado da simulação de *ray tracing* de uma guia de onda com núcleo de TiO_2 e encapsulamento de SiO_2 59
3.4 Resultados das simulações de potência ótica e irradiância no detetor situado na saída do núcleo da guia de onda 60
3.5 Ilustração das propriedades de dispersão de uma típica *grating* de transmissão de relevo superficial quando uma onda incidente monocromática é difratada em várias ondas que se propagam nas direções especificadas pela *grating equation* 61
3.6 Esquemático no plano cartesiano xy das dimensões utilizadas nas simulações óticas FEM de uma guia de onda com *gratings* de transmissão 61
3.7 Malha aplicada ao modelo 2D da guia de onda e *gratings* de transmissão 62
3.8 Resultado da simulação de *ray tracing* de uma guia de onda e *gratings* de transmissão e da potência ótica transmitida pela *grating* de transmissão de desacoplamento 63
3.9 Resultado da simulação com dimensões otimizadas de *ray tracing* de uma guia de onda e *gratings* de transmissão e da potência ótica transmitida pela *grating* de desacoplamento 65
3.10 Esquemático do modelo 2D no plano cartesiano xy dos parâmetros e configuração inicial utilizada nas simulações óticas FDTD de uma guia de onda com uma *grating* de transmissão de acoplamento no *software Ansys Lumerical* 67
3.11 Representação do percurso de uma onda eletromagnética com uma expressão de cor de intensidade de campo elétrico normalizada pré- e pós-otimização de diferentes parâmetros para uma obtenção de eficiência de acoplamento máxima 68
3.12 Modelo 2D no plano cartesiano xy da configuração inicial utilizada nas simulações óticas FDTD de uma guia de onda com uma *grating* de transmissão de acoplamento e uma *grating* de transmissão de desacoplamento no *software Ansys Lumerical* 69
3.13 Representação do percurso de uma onda eletromagnética com uma expressão de cor de intensidade de campo elétrico normalizada pré- e pós-otimização de diferentes parâmetros para uma obtenção de eficiência de desacoplamento máxima 70

4.1 Esquemático de um sistema de litografia por projeção digital DMD 72
4.2 Esquemático de um sistema de e-beam e processo de deposição 73
4.3 Representação esquemática de um sistema de pulverização catódica por magnetrão e processo de deposição 74
4.4 Esquemático de um processo de eletrodeposição 75
4.5 Representação de um ciclo ALD térmico e PEALD 77
4.6 Eventos durante a corrosão num equipamento RIE e seu respetivo esquemático 78
4.7 Máscara digital desenhada no *software KLayout* para a padronização da geometria da sonda neuronal flexível utilizada no *μ-MLA Tabletop Maskless Aligner* 80
4.8 Geometria da sonda neuronal flexível fabricada com recurso a um *μ-MLA Tabletop Maskless Aligner* 81
4.9 Esquemático do processo fotolitográfico para a padronização da geometria da sonda neuronal flexível através da utilização da PI fotossensível *LTC 9305* 82
4.10 Máscara digital desenhada no *software KLayout* para a padronização dos contactos, pistas e microelétrodos da sonda neuronal flexível utilizada no *μ-MLA Tabletop Maskless Aligner* 84
4.11 Contactos, pistas e microelétrodos metálicos em Ti da sonda neuronal flexível obtidos após o *lift-off* da camada sacrificial de polímero fotossensível 85
4.12 Esquemático do processo de padronização dos contactos, pistas e microelétrodos da sonda neuronal flexível 85
4.13 Máscara digital desenhada no *software KLayout* para a padronização do encapsulamento da sonda neuronal flexível utilizada no *μ-MLA Tabletop Maskless Aligner* 86
4.14 Sonda neuronal flexível encapsulada 86
4.15 Visão geral do processo de fabrico da sonda neuronal flexível com integração de microelétrodos de Pt eletrodepositada 88
4.16 Sondas neuronais flexíveis obtidas após a libertação do substrato de Si 90
4.17 Visão geral do processo de fabrico da sonda neuronal flexível com integração de microelétrodos de Pt depositada por pulverização catódica por magnetrão DC 91
4.18 Máscara digital desenhada no *software KLayout* para a padronização do núcleo da guia de onda utilizada no *μ-MLA Tabletop Maskless Aligner* 93
4.19 Espessura medida por elipsómetro *in situ* durante o crescimento de SiO_2 PEALD 95

4.20 Máscara digital desenhada no *software KLayout* para a padronização de uma máscara em *AZ nLOF 2070* utilizada no *μ-MLA Tabletop Maskless Aligner* 96
4.21 Guia de onda obtida após finalização do processo de fabrico 96
4.22 Visão geral do processo de fabrico da guia de onda 97

5.1 Esquemático de deteção do movimento da ponta do cantiléver de um equipamento AFM 99
5.2 Curva van der Waals com regiões e modos de funcionamento de um equipamento AFM 100
5.3 Esquemático e exemplo de uma análise SE 101
5.4 Gráficos de Nyquist e gráficos de Bode de magnitude e fase de alguns circuitos elétricos equivalentes 102
5.5 Diferentes configurações de células eletroquímicas 104
5.6 Esquemático de um equipamento SEM e exemplo de uma imagem SEM e respetiva análise EDS 105
5.7 Espetro de fotoelectrões do níquel gerado pela incidência de fotões de $1253{,}6$ eV provenientes da radiação Mg Kα 107
5.8 *Setup* utilizado para realizar as medições de EIS na sonda neuronal flexível pré- e pós-eletrodeposição de Pt 108
5.9 Diagramas de Bode dos resultados EIS dos microelétrodos pré- e pós-eletrodeposição de Pt 109
5.10 PCB desenvolvida para o acesso aos microelétrodos através da ligação da sonda neuronal flexível com um *channel recording headstage* 110
5.11 *Setup* utilizado para realizar as medições de EIS na sonda neuronal flexível através da PCB desenvolvida 111
5.12 Diagramas de Bode dos resultados EIS dos microelétrodos, acedidos através da PCB desenvolvida, de três sondas neuronais flexíveis distintas 112
5.13 Testes de inserção da sonda neuronal flexível num fantoma cerebral ($0{,}6$ % gel de agarose) 113
5.14 Sondas neuronais flexíveis *dummy* usadas em testes *in vivo* de inserção cerebral num rato através de diferentes abordagens 114
5.15 Testes *in vivo* de inserção cerebral num rato anestesiado através de diferentes abordagens e destaque da pegada de inserção 115
5.16 *Setup* de eletrofisiologia e localização do registo de atividade extracelular 116
5.17 Diferentes formatos de potenciais de ação registados pela SNF3 116
5.18 Representação PSD de LFPs registados por diferentes sondas neuronais 117

5.19 Curvas de índice de refração em função do comprimento de onda dos filmes-finos de TiO_2 e SiO_2 118
5.20 Espetro XPS do filme-fino de SiO_2 fabricado com recurso a PEALD 119
5.21 Curvas do índice de refração em função do comprimento de onda obtidas em vários filmes-finos de SiN 122
5.22 Espetro EDS de duas amostras distintas de filmes-finos de SiN 123
5.23 Topografia AFM de duas amostras distintas de filmes-finos de SiN 123

Lista de Tabelas

2.1 Sondas neuronais padronizadas em substratos flexíveis com interação elétrica 43

4.1 Parâmetros de configuração do equipamento de *spin-coating* para obter um filme de $4\,\mu m$ de espessura de *LTC 9305* 79

4.2 Parâmetros de configuração do equipamento de *spin-coating* para obter um filme de $7\,\mu m$ de espessura de *AZ nLOF 2070* 83

4.3 Parâmetros de configuração do equipamento de *spin-coating* para obter um filme de $4\,\mu m$ de espessura de *AZ 4562* 92

5.1 Parâmetros de deposição de filmes-finos de SiN por pulverização catódica reativa RF . . 120

5.2 Parâmetros de ajuste no *software* do elipsómetro *alpha–SE* dos filmes-finos de SiN depositados 121

Acrónimos, Siglas e Símbolos

R_a rugosidade média

Λ período da *grating*

Φ desvio de fase

λ comprimento de onda

θ_c ângulo crítico

θ_i ângulo de incidência

θ_m ângulo de difração

h_e profundidade de corrosão

l_e comprimento de corrosão

n índice de refração

µ-ILEDs micro díodos inorgânicos emissores de luz

µ-LEDs micro díodos emissores de luz

µ-OLEDs micro díodos orgânicos emissores de luz

µ-PDs micro fotodetetores

µ-SHM misturador microfluídico em espinha de peixe escalonado

1D unidimensional

2D bidimensional

3D tridimensional

AC corrente alternada

AFM microscopia de força atómica

Al alumínio

ALD deposição por camada atómica

AMPA α*-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*

AP5 *(2R)-amino-5-phosphonovaleric acid*

APS *active pixel sensor*

Ar árgon

Au ouro

AVC acidente vascular cerebral

B boro

BDEAS *bis(diethylamino)silane*

BHE barreira hemato-encefálica

BLE SoC *Bluetooth Low Energy System-on-Chip*

BMI interface cérebro-máquina

CA *cornu ammonis*

CCP plasma acoplada de forma capacitiva

CDs *cyclodextrins*

CE contra-elétrodo

CED administração de fármacos por convecção

CEICVS Comissão de Ética para a Investigação em Ciências da Vida e da Saúde

CF_4 *tetrafluoromethane*

ChR2 *channelrhodopsin-2*

ChRmine *channelrhodopsin-mine*

CIC_{max} capacidade máxima segura de entrega de cargas

CMEMS *Center for MicroElectroMechanical Systems*

CMOS semicondutor de óxido de metal complementar

CNQX *cyanquixaline*

CNTs nanotubos de carbono

CSC capacidade de armazenamento de cargas

Cu cobre

CV voltametria cíclica

CVD deposição química de vapores

DBR refletor de *Bragg* distribuído

DBS estimulação cerebral profunda

DC corrente contínua

DCU unidade de controlo digital

DGAV Direção-Geral de Alimentação e Veterinária

DIBS pulverização catódica com feixe duplo de iões

DMD dispositivo digital de microespelhos

DNQ *diazonaphthoquinone*

DRIE corrosão iónica reativa profunda

DWL litografia por escrita direta

e-beam evaporação por feixe de eletrões

EBL litografia por feixe de eletrões

ECHs hidrogeis eletricamente condutores

ECoG eletrocorticografia

EDS espetroscopia dispersiva de raios-X

EIS espetroscopia de impedância eletroquímica

ELA esclerose lateral amiotrófica

EMI interferência eletromagnética

EPD deposição eletroforética

FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia

FDTD método das diferenças finitas no domínio do tempo

FEM método de elementos finitos

FPC *flexible printed cable*

FPGA *field programmable gate array*

FSCV voltametria cíclica de varrimento rápido

FsLDW escrita direta por laser femtosegundo

FWHM largura a meia altura

GABA γ*-aminobutyric acid*

GaN-on-Si nitreto de gálio sobre silício

GaN/InGaN MQW poços quânticos múltiplos de nitreto de gálio/nitreto de índio-gálio

GPC crescimento por ciclo

GUIs interfaces gráficas de utilizador

H hidrogénio

HR *halorhodopsin*

IAD deposição assistida por iões

IBE corrosão por feixe de iões

IBL litografia por feixe de iões

ICVS Instituto de Investigação em Ciências da Vida e Saúde

IL córtex infra-límbico

InGaN nitreto de índio-gálio

InGaP fosforeto de índio-gálio

IPA álcool isopropílico

Ir irídio

IrOx óxido de irídio

IV infravermelho

LDs díodos laser

LEDs díodos emissores de luz

LFP potencial de campo local intracraniano

LIGA litografia galvânica

LiPo polímero de lítio

LPCVD deposição química de vapores em baixa pressão

M2 córtex motor secundário

MEMS sistemas microeletromecânicos

miniSTAR *minimal-stimulation-artifact*

MNFab *MicroNano Fabrication Laboratory*

MSE erro quadrático médio

N azoto atómico

NFC comunicação de campo próximo

Ni níquel

NMDA *N-methyl-D-aspartate*

nMOS metal óxido-semicondudor tipo-n

NWB *Neurodata Without Borders*

O oxigénio atómico

O_2 oxigénio molecular

OMS Organização Mundial da Saúde

PBS solução salina tratada com fosfato

PCB placa de circuito impresso

Pd paládio

PDMS *polydimethylsiloxane*

PEALD deposição por camada atómica melhorada por plasma

PEB cura pós-exposição

PECVD deposição química de vapores assistida por plasma

PEDOT *poly(3,4-ethylenedioxythiophene)*

PEDOT:PSS *poly(3,4-ethylenedioxythiophene) polystyrene sulfonate*

PEG *polyethylene glycol*

PEGMA *PEG methacrylate*

pHEMA *poly(2-hydroxyethyl methacrylate)*

PI poliimida

PL córtex pré-límbico

PML *perfectly matched layer*

PMMA *polymethyl methacrylate*

POC perturbação obsessivo-compulsiva

PSD densidade espetral de potência

PSTHs histogramas de tempo peri-estímulo

Pt platina

Ptb Pt-*black*

PtIr platina-irídio

PtW platina-tungsténio

PV efeito fotovoltaico

PVD deposição física de vapores

RE elétrodo de referência

REALD deposição por camada atómica melhorada por radicais

RF radiofrequência

RIE corrosão iónica reativa

RMS valor eficaz

SE elipsometria espetroscópica

SEM microscopia eletrónica de varrimento

Si silício

SiN nitreto de silício

SiNAPS *Simultaneous Neural Active Pixel Sensor CMOS-probe*

SiO_2 dióxido de silício

SNF sonda neuronal flexível

SNR razão sinal-ruído

STM microscopia de varrimento por efeito de túnel

Ti titânio

TIA amplificador de transimpedância

TiN nitreto de titânio

TiO_2 dióxido de titânio

TIR reflexão interna total

TM transverse mode

UE União Europeia

UV ultravioleta

V_{lim} potencial limiar

V_{rep} potencial de repouso

VGA amplificador de ganho variável

VTA área tegmental ventral

W tungsténio

WE elétrodo de trabalho

WS deteção de trabalho

XPS espetroscopia de fotoeletrões excitados por raios-X

Parte I

Documento

Capítulo 1

Introdução

O presente capítulo apresenta a fisiologia e os principais distúrbios do cérebro humano. É ainda apresentada uma breve evolução das sondas neuronais, usadas na compreensão do funcionamento do cérebro. Além disso, é introduzido o conceito de optogenética e as diferentes sondas neuronais utilizadas nessa técnica. Para terminar, apresentam-se a motivação e principais objetivos desta tese de doutoramento, bem como a organização deste documento.

1.1 Cérebro Humano: Fisiologia e Principais Distúrbios

As funções cerebrais estão intimamente relacionadas com a nossa personalidade e comportamento, sendo estas as qualidades que mais nos identificam como humanos. Os nossos membros e alguns órgãos podem ser danificados, removidos ou transplantados sem afetar as nossas qualidades humanas, mas um pequeno dano cerebral pode modificar radicalmente o nosso comportamento, perceção, consciência, ou personalidade [1].

O cérebro humano partilha a mesma estrutura básica e organização funcional que outros cérebros de mamíferos. No entanto, em comparação com o cérebro dos roedores, o cérebro humano é vasto e complexo. Este está divido em dois hemisférios, direito e esquerdo, cada um com funções especializadas. Nas pessoas destras, a linguagem e o cálculo estão principalmente localizados no hemisfério esquerdo, enquanto que a perceção espacial está fortemente associada ao hemisfério direito. No caso das pessoas esquerdinas, esta localização das funções nos hemisférios encontra-se invertida. Quando ambos os hemisférios analisam estímulos semelhantes, os resultados geralmente diferem. O hemisfério esquerdo tende a focar-se nas componentes individuais do estímulo, ao passo que o hemisfério direito

tende a focar-se no aspeto global do estímulo [1].

Cada hemisfério cerebral é dividido em quatro lobos: frontal, parietal, temporal e occipital. A fissura lateral e o sulco central delineiam os lobos frontal, temporal e parietal, enquanto que a demarcação entre os lobos occipital, parietal e temporal é arbitrária. No lobo frontal, encontram-se as áreas de controlo motor, típicas dos primatas. No entanto, a maior parte do lobo frontal humano está envolvida em funções complexas, como o comportamento social e a personalidade, sendo também onde se localiza uma das áreas associadas à linguagem, conhecida como área de Broca. No lobo parietal, localiza-se o córtex somatossensorial, responsável pelo processamento sensorial tátil e proprioceptivo, contribuindo para a perceção consciente da posição do corpo. Partes do lobo temporal, juntamente com partes do lobo parietal, formam a segunda área linguística, designada por área de Wernicke. Além disso, o lobo temporal é também composto pelas áreas responsáveis pelo reconhecimento facial, hipocampo, responsável pela memória, córtex auditivo e córtex olfativo. Quanto ao lobo occipital, é predominantemente ocupado pelo córtex visual primário, responsável pelo processamento visual direto, e pelo córtex visual secundário, responsável pela interpretação visual [1]. A disposição dos lobos presentes no córtex cerebral humano pode ser observada na figura 1.1.

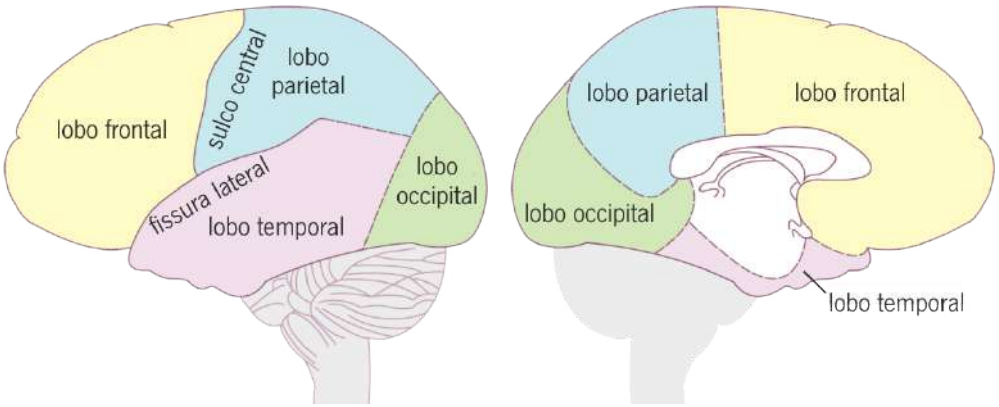


Figura 1.1: Disposição dos lobos presentes no córtex cerebral humano: (a) Vista lateral; (b) Vista sagital (figura adaptada com autorização de *Elsevier Science & Technology Journals*, de [1]; autorização veiculada através de *Copyright Clearance Center, Inc.*).

O cérebro é composto por dois tipos de células: neurónios e células da glia. Um neurónio típico possui dendrites, responsáveis por receber informação de outros neurónios ou de recetores sensoriais, e um único axónio, responsável por transmitir sinais para outros neurónios ou músculos. Os axónios podem variar em comprimento, desde muito curtos até muito longos, podendo alcançar metade do comprimento do corpo de um animal. Quando o sinal elétrico alcança o fim do axónio, é libertado um transmissor

químico que influencia outro neurónio. Existem neurónios com diferentes formas e tamanhos. Alguns possuem corpos celulares grandes, com cerca de $50\,\mu m$, enquanto outros têm corpos celulares pequenos, de aproximadamente $10\,\mu m$ [1].

No sistema nervoso, o segundo tipo de células são as células da glia. Inicialmente, pensava-se que as células da glia tinham funções principalmente nutritivas e protetoras, mas o entendimento do seu papel expandiu-se consideravelmente nos últimos anos. Atualmente, as células da glia são vistas como parceiras funcionais dos neurónios, com papéis fundamentais na regulação da atividade neuronal e na comunicação entre neurónios. Diversos subtipos de células da glia protegem o cérebro de alterações químicas, enquanto outras desempenham funções de vigilância imunitária ou modificam as propriedades dos sinais neuronais [1].

As células regulam o seu ambiente químico interno controlando o movimento de iões e moléculas através das suas membranas. Os neurónios bombeiam uma grande quantidade de iões através das suas membranas, criando uma diferença de potencial entre o interior e o exterior das células, conhecida como potencial de membrana. A estimulação de um neurónio pode desencadear um aumento abrupto no potencial de membrana, denominado potencial de ação. Um potencial de ação numa área específica da célula desencadeia potenciais de ação em redor, numa reação em cadeia, propagando-se quase instantaneamente através da célula e ao longo do seu axónio [1].

Os neurónios recebem estímulos nos seus filamentos sensíveis, denominados dendrites. A membrana que envolve cada dendrite possui canais pequeníssimos que regulam o fluxo de iões positivos e negativos através da mesma. Alguns desses canais iónicos são sensíveis a estímulos químicos ou físicos e podem causar variações de potencial na membrana. Se ocorrer um número mínimo dessas variações de potencial simultaneamente, é desencadeado um potencial de ação. Quando um potencial de ação é desencadeado, este sinal nítido e acentuado é propagado ao longo do axónio. A extremidade do axónio divide-se em múltiplos ramos terminais, conhecidos como terminais axónicos. Um potencial de ação desencadeia a libertação de compostos químicos de sinalização pelos terminais axónicos, denominados de neurotransmissores. Estes neurotransmissores estabelecem um modelo de ligação chave-fechadura com os recetores na célula alvo. Os recetores são estruturas proteicas modeladas para receber transmissores específicos. Quando é efetuada a combinação entre neurotransmissores e recetores, o resultado pode levar à abertura de canais iónicos ou desencadear outras mudanças. Os recetores de neurotransmissores encontram-se sobretudo nas dendrites de outros neurónios, mas também na superfície de células musculares, células da glia ou células glandulares. A interação física estreita entre os terminais axónicos e uma concentração de recetores de uma outra célula é denominada de sinapse [1]. Os vários tipos de

neurónios são ilustrados na figura 1.2 (a), enquanto a sua estrutura básica é ilustrada na figura 1.2 (b).

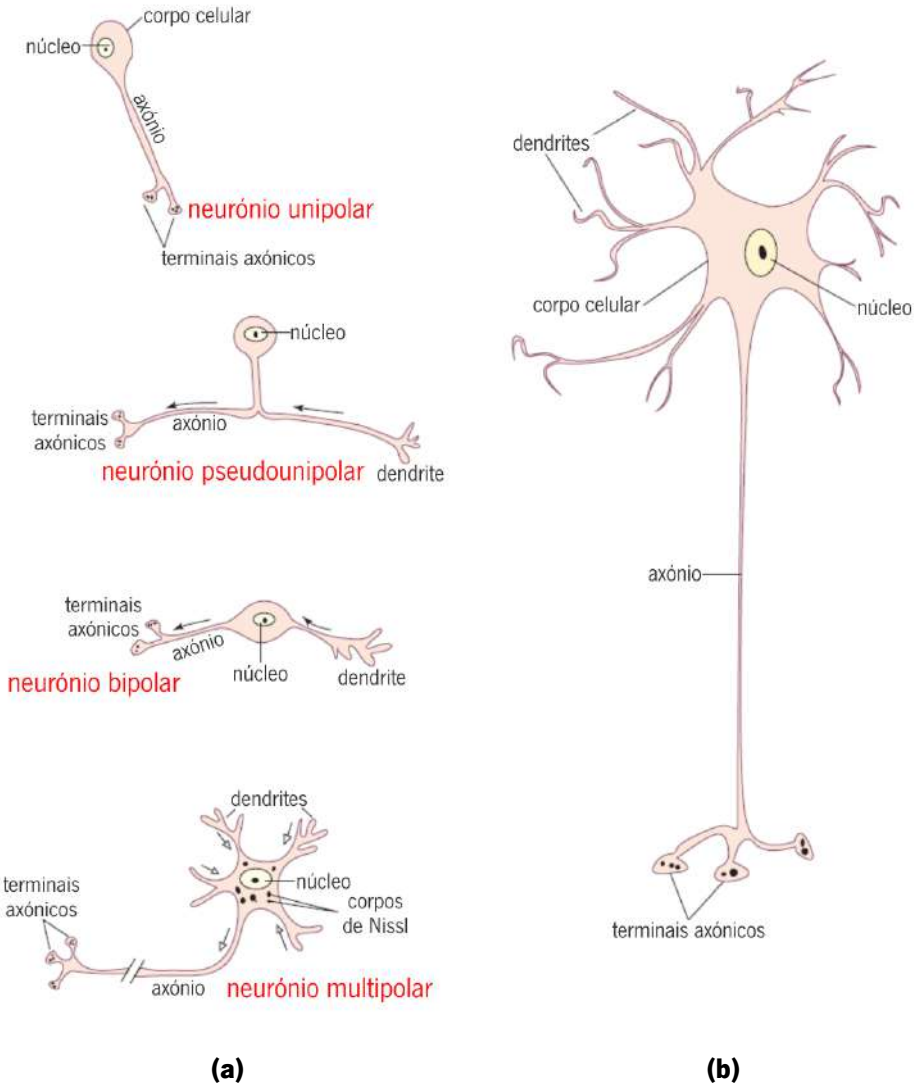


Figura 1.2: Ilustração de vários tipos de neurónios: (a) Os neurónios unipolares possuem um axónio mas não possuem dendrites. Os neurónios pseudounipolares possuem um axónio e uma única dendrite, fundidos no corpo celular. Os neurónios bipolares possuem um axónio e uma única dendrite, enquanto que os neurónios multipolares possuem várias dendrites; (b) Estrutura básica de um neurónio com várias ramificações de dendrites. O axónio divide-se em vários ramos finos denominados de terminais axónicos, que estabelecem contacto sináptico com outros neurónios ou células musculares (figura adaptada com autorização de *Elsevier Science & Technology Journals*, de [1]; autorização veiculada através de *Copyright Clearance Center, Inc.*).

Como pode ser observado na figura 1.3 (a), o potencial de ação foi gerado através de um estímulo supralimiar, representado a roxo, enquanto que a resposta a um estímulo sublimiar está representada a vermelho. O potencial de repouso (V_{rep}) geralmente varia entre -85 mV e -60 mV. O potencial limiar

(V_{lim}) é a tensão mais negativa necessária a ser atingida pelo estímulo supralimiar para desencadear um potencial de ação, sendo -53 mV um valor típico. A despolarização normalmente atinge a sua velocidade máxima a uma tensão próxima de 0 mV e o pico de ultrapassagem é o pico em relação a essa referência. A repolarização ocorre mais lentamente do que a despolarização. A amplitude do potencial de ação é definida como o pico relativo à V_{rep}, ou mais comum, à tensão mais negativa atingida durante a hiperpolarização. A largura do potencial de ação é medida a 50 % da sua amplitude [2]. Na figura 1.3 (b), a resposta a um estímulo supralimiar é iniciada no corpo celular, onde este passa a estar despolarizado. A despolarização é propagada através do axónio, enquanto a parte inicial da membrana repolariza e entra em seguida num estado de repouso, iniciando o período refratário [3].

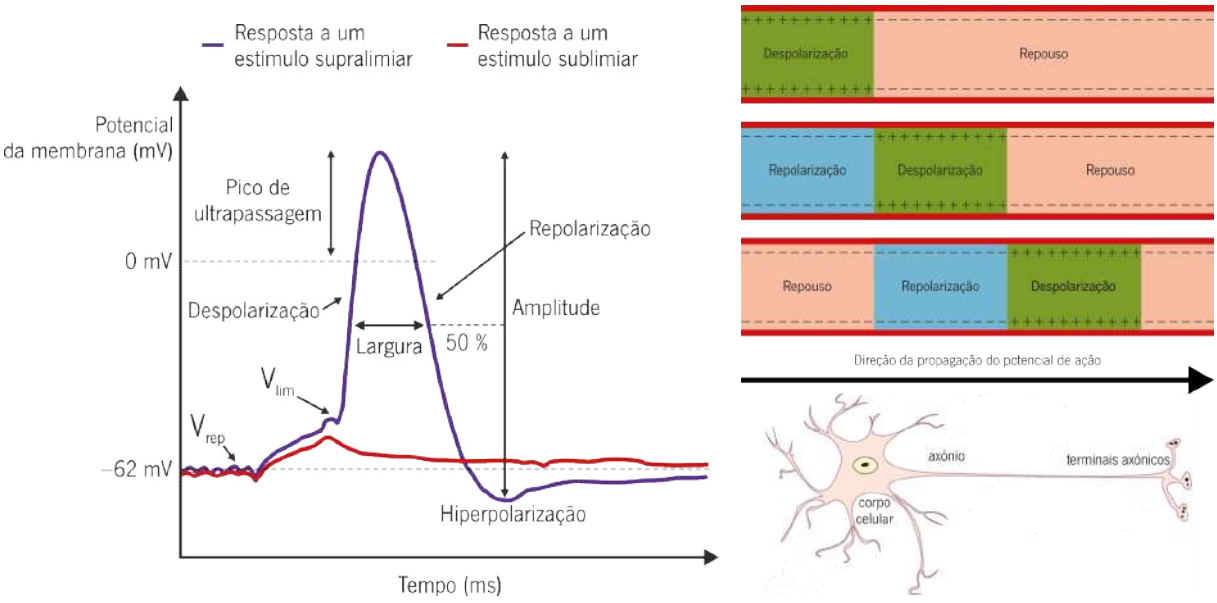


Figura 1.3: Representação gráfica e propagação de um potencial de ação num neurónio: (a) Representação do potencial da membrana a um estímulo supralimiar e a um estímulo sublimiar (adaptado de [2]); (b) Direção da propagação de um potencial de ação ao longo de um neurónio (adaptado de [1, 3]).

A literatura mostra de forma consistente que as perturbações mentais e neurológicas, coletivamente designadas por "perturbações do cérebro", constituem um importante problema de saúde pública na Europa, com uma elevada prevalência e um peso substancial da doença [4–6]. Estas perturbações são as que mais contribuem para a carga de morbidade de todas as causas, afetando uma proporção significativa da população [4]. Apesar do peso crescente, existe uma falta de sensibilização para o caráter generalizado destas perturbações [5]. A coocorrência de perturbações mentais e neurológicas aumenta ainda mais o peso da doença [7].

A depressão, a esquizofrenia e as perturbações de pânico são exemplos de perturbações mentais, enquanto que a demência, a epilepsia e a esclerose múltipla são perturbações neurológicas. Ambos os grupos são frequentemente agrupados sob o termo perturbações neuropsiquiátricas [4]. Um estudo conduzido por Wittchen *et al.* [4] em 2011 concluiu que mais de um terço da população da União Europeia (UE) sofria de perturbações mentais, o que equivale a um número estimado de 164,7 milhões de pessoas. O número total de perturbações neuropsiquiátricas, que incluem perturbações mentais e neurológicas, é ainda maior. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2019, estimava-se que globalmente 280 milhões de pessoas sofressem de depressão, 40 milhões de distúrbio bipolar, 24 milhões de esquizofrenia, 14 milhões de distúrbios alimentares e, por fim, 40 milhões de comportamento disruptivo e transtornos dissociativos [8].

1.2 Sondas Neuronais

A utilização de corrente elétrica no tratamento de doenças neurológicas foi documentado pela primeira vez em 1757 por Benjamin Franklin, que a aplicou em pacientes com paralisia nos membros inferiores [9]. Em 1939, Hodgkin *et al.* [10] realizaram o primeiro registo de potenciais de ação dentro de uma fibra nervosa. Este registo foi realizado num axónio gigante ($500\,\mu m$) de uma lula, utilizando um micro-elétrodo. Em 1952, Hodgkin *et al.* [11] deram outro importante contributo com a descrição analítica do mecanismo excitatório dos nervos e a consequente geração de potenciais de ação. Ao longo dos anos, as sondas neuronais tornaram-se uma ferramenta chave no registo dos potenciais de ação dos neurónios, na estimulação de regiões cerebrais específicas e na compreensão do funcionamento do cérebro [12].

A partir de 1950, os microelétrodos de metal de fio único passaram a ser consistentemente usados para registar a atividade elétrica em ambientes extracelulares. Estes microelétrodos consistem num fio metálico isolado, exceto na ponta onde ocorre o registo dos sinais elétricos [12]. Em 1958, Strumwasser [13] documentou a descarga de neurónios individuais em esquilos terrestres da Califórnia por um período mínimo de uma semana, utilizando microfios de aço inoxidável isolados, com um diâmetro de $80\,\mu m$ e com a ponta exposta após um corte transversal. A figura 1.4 mostra uma matriz de microfios de 64 canais.

Com os avanços das técnicas de microfabricação de circuitos integrados e deposição de filmes finos na década de 1970, Wise *et al.* [15] realizaram um trabalho pioneiro ao desenvolverem a primeira sonda planar multielétrodos, baseada em substrato de silício (Si). Em 1985, Najafi *et al.* [16] deram continuidade ao desenvolvimento das sondas planares, utilizando tecnologia semicondutor de óxido de

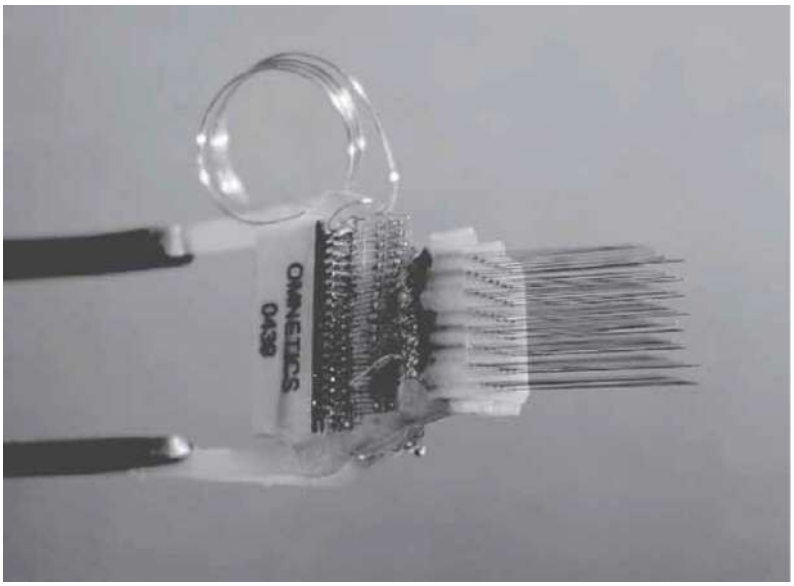


Figura 1.4: Matriz de microfios de 64 canais (figura reproduzida com autorização de *Taylor & Francis Group LLC - Books*, de [14]; autorização veiculada através de *Copyright Clearance Center, Inc.*).

metal complementar (CMOS), o que possibilitou a amplificação e multiplexação de sinais. Este tipo de estrutura designa-se de sonda de Michigan. Na figura 1.5 (a), está ilustrado um diagrama da estrutura básica de uma sonda de Michigan de haste única e na figura 1.5 (b), uma sonda de Michigan de haste múltipla de 32 canais.

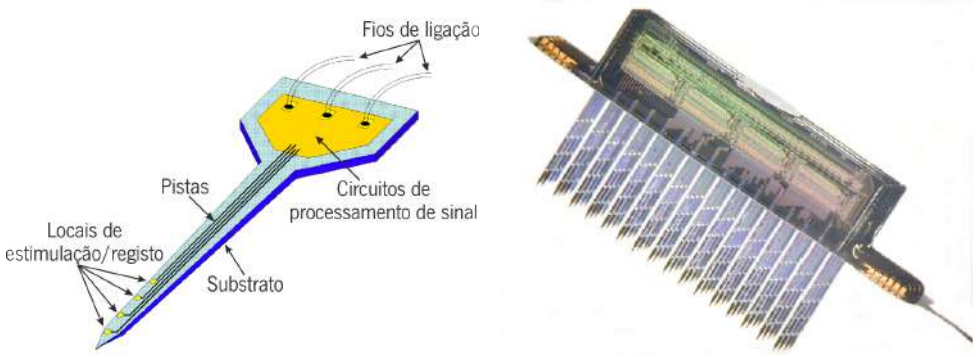
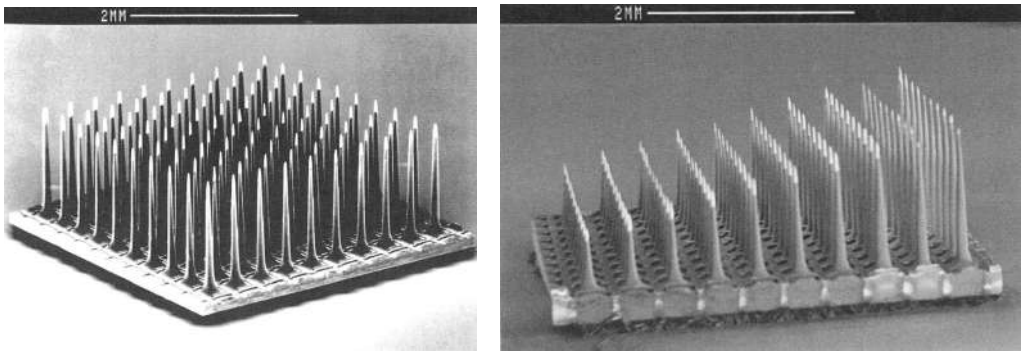


Figura 1.5: Sondas de Michigan: (a) Diagrama da estrutura básica de uma sonda de Michigan de haste única; (b) Sonda de Michigan de haste múltipla de 32 canais (© 2008 IEEE. Figura reproduzida, com autorização, de [17]).

Em 1991, Campbell *et al.* [18] introduziram um novo método de fabrico que possibilitou a produção de uma sonda tridimensional com uma matriz de 100 elétrodos, destinada à implantação no córtex visual de felinos. Esta configuração específica é conhecida como matriz de Utah, representada na

figura 1.6 (a). Uma variação da matriz de Utah, denominada de matriz de Utah inclinada, apresenta elétrodos de diferentes comprimentos, permitindo a estimulação ou o registo de atividade neuronal em diferentes profundidades, com representação na figura 1.6 (b) [19].



(a) **(b)**

Figura 1.6: Diferentes configurações da matriz de Utah: (a) Matriz de Utah usada na estimulação ou registo de atividade neuronal à mesma profundidade; (b) Matriz de Utah inclinada usada na estimulação ou registo de atividade neuronal a diferentes profundidades (figura reproduzida com autorização de © 2003 *John Wiley & Sons, Inc.*, de [19]; autorização veiculada através de *Copyright Clearance Center, Inc.*).

1.3 Optogenética

As sondas neuronais até agora apresentadas são normalmente utilizadas no registo e/ou estimulação elétrica dos neurónios e apresentam resultados promissores em tratamentos terapêuticos. No entanto, estas não apresentam qualquer especificidade celular, podendo assim provocar efeitos secundários neurofisiológicos [20].

Em 2005, Boyden *et al.* [21] descreveram pela primeira vez o uso da optogenética no controlo ótico geneticamente direcionado da atividade neuronal, numa escala de milissegundos. Um ano mais tarde, Deisseroth *et al.* [22] surgiram com a primeira definição genérica de optogenética. Na edição de janeiro de 2011 da revista científica *Nature Methods*, a optogenética foi eleita como "Método do ano 2010", o que levou à necessidade de uma definição mais abrangente. Nesse mesmo ano, Karl Deisseroth, definiu a optogenética como a junção de métodos genéticos e óticos para estimular ou inibir funções específicas em células fotossensíveis de tecido vivo [23].

A optogenética revolucionou a análise do circuito neuronal ao introduzir proteínas fotossensíveis, chamadas opsinas, em tipos de células específicas, permitindo respostas claramente definidas a um estímulo ótico [21, 23, 24]. A figura 1.7 mostra o mecanismo da técnica optogenética, que se inicia com os proces-

sos de transcrição e expressão. Os sistemas virais representam atualmente a abordagem mais popular dos processos de expressão *in vivo* [25]. Estes vetores virais são responsáveis pela introdução de opsinas no cérebro do indivíduo. Consequentemente, as células neuronais visadas expressam a opsina introduzida e, quando expostas à luz, as proteínas fotorrecetoras promovem um efeito biológico nessas células específicas com uma resolução temporal bem definida [24]. Graças a essa especificidade, a *halorhodopsin* (HR) e a *channelrhodopsin-2* (ChR2) podem ser expressas no mesmo neurónio-alvo, possibilitando a hiperpolarização e a despolarização do potencial de membrana, através do uso de luz amarela ou luz azul, respetivamente [26]. Segundo Zhou *et al.* [27], o perfil bibliométrico de optogenética tem demonstrado uma tendência de crescimento rápido desde 2010, com um crescimento anual de $52{,}82\,\%$, tendo atingido um pico de 922 publicações em 2021. É ainda possível destacar Portugal na vigésima posição global dos países com mais produção de artigos científicos na área e a décima terceira posição global dos países mais influentes, usando como métrica a média de citações por artigo científico [27].

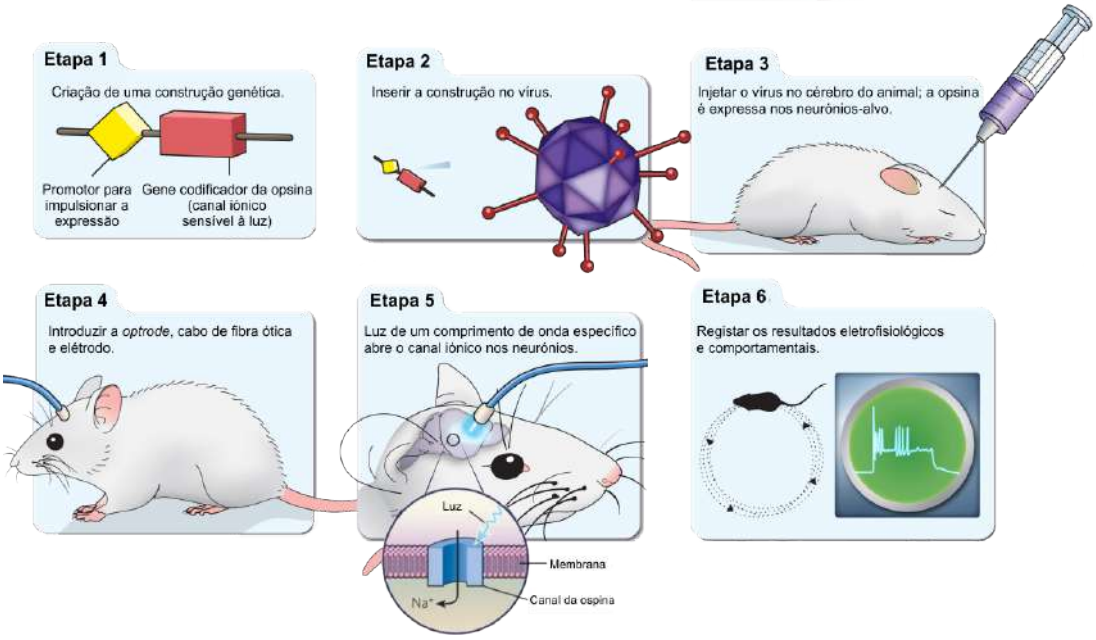


Figura 1.7: Ilustração das diferentes etapas da técnica optogenética (figura adaptada com autorização de *Springer Nature*, de [28]).

As sondas neuronais utilizadas em optogenética são denominadas de *optrodes*. Estas sondas são otimizadas para direcionar a luz numa população de células geneticamente modificadas, originando assim efeitos biológicos específicos nas células. Tipicamente, as *optrodes* integram simultaneamente componentes elétricos e óticos para registo e componentes óticos para estimulação/inibição da atividade neuronal, respetivamente [29–32].

Os recentes avanços na área de microfabricação conduziram ao desenvolvimento de microestruturas

totalmente integradas em dispositivos de pequena escala. Atualmente, existem diversas metodologias de *optrodes*, classificáveis como dispositivos com integração personalizada de fibras óticas, guias de onda ou micro díodos emissores de luz (μ-LEDs) [29]. As *optrodes* com fibras óticas integradas (figura 1.8 (a)) podem possuir locais de fotoestimulação (saída de luz para iluminação das células neuronais) e locais de receção de sinais de fluorescência (emitidos pelas células). Existem ainda *optrodes* com uma de guia de onda (figura 1.8 (b)), proporcionando um local de fotoestimulação, ou *optrodes* com múltiplas guias de onda integradas, de forma a aumentar o número de locais de fotoestimulação [33]. As *optrodes* com fibras óticas ou guias de onda integradas realizam a fotoestimulação por meio de uma fonte de luz externa acoplada na parte exterior da sonda neuronal. As fontes mais comuns são díodos emissores de luz (LEDs), díodos laser (LDs) e as lâmpadas de xénon [29]. Por outro lado, nas *optrodes* com μ-LEDs integrados (figura 1.8 (c)), a fotoestimulação realiza-se na proximidade imediata dos neurónios-alvo, maximizando assim a potência ótica fornecida às células neuronais [34]. As atuais configurações destas *optrodes* estão segmentadas em dispositivos não implantáveis para estimulação neuronal superficial [35] e sondas implantáveis para estimulação cerebral profunda (DBS) [24]. Começam também a surgir as *optrodes* multimodais (figura 1.8 (d)) onde são incorporados fotodíodos para a medição de fluorescência, elétrodos para o registo de sinais elétricos e fibras óticas em conjunto com LEDs para efetuar a fotoestimulação [30–32].

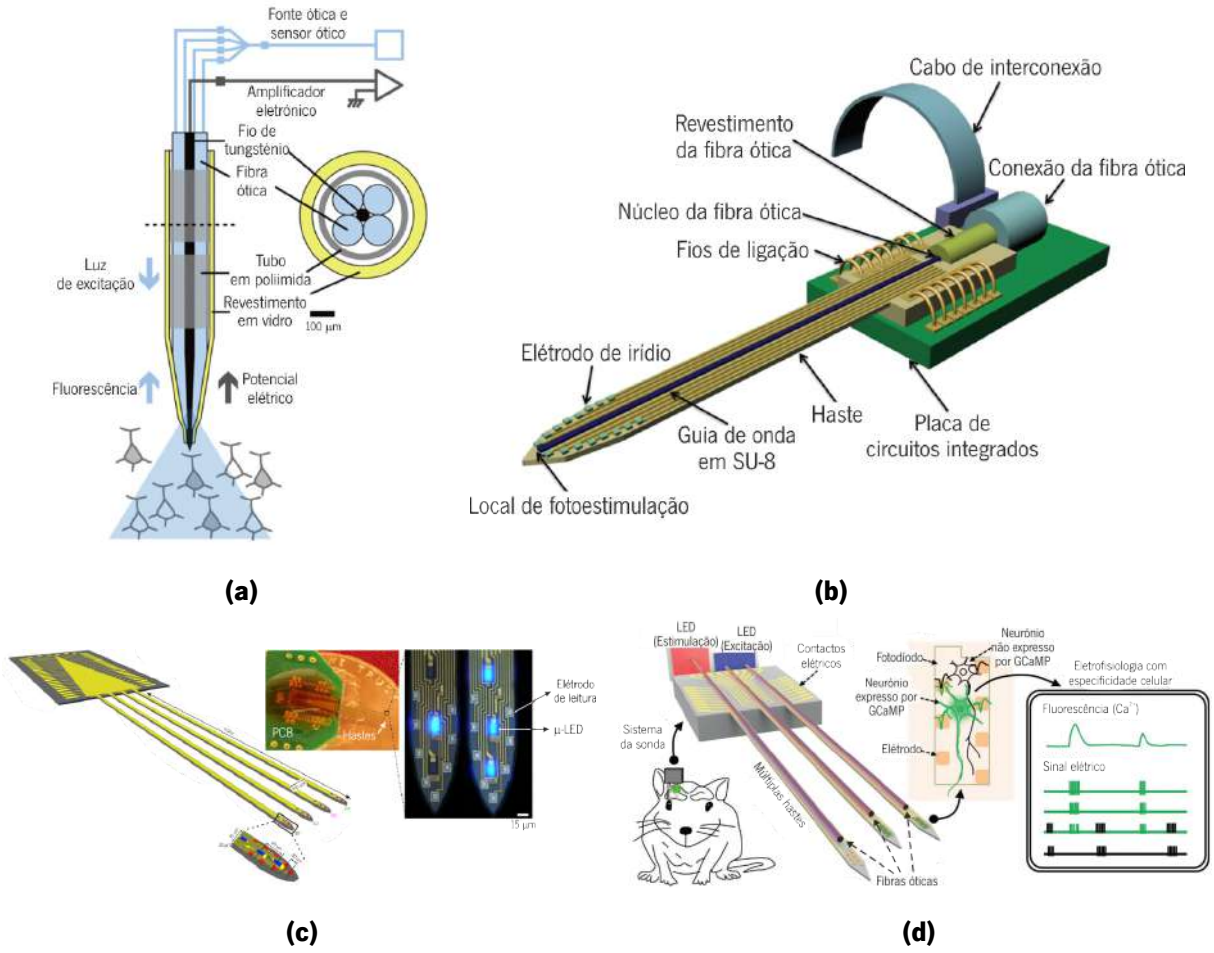


Figura 1.8: Diferentes categorias de *optrodes* usadas em optogenética: (a) Esquemático de uma *optrode* com fibras óticas integradas (figura adaptada de [36], com autorização de *Elsevier*); (b) Esquemático de uma *optrode* com uma guia de onda integrada (© 2010 IEEE. Figura adaptada, com autorização, de [37]); (c) Esquemático e fotografia de uma *optrode* com µ-LEDs integrados (figura adaptada de [24], com autorização de *Elsevier*); (d) Esquemático de uma *optrode* multimodal (figura adaptada de [31]).

1.4 Motivação e Objetivos

O cérebro humano é composto por cerca de 86 mil milhões de neurónios, que geram e transmitem informações em padrões complexos [38]. As doenças que afetam o cérebro, como a epilepsia, esclerose lateral amiotrófica (ELA), demência e acidente vascular cerebral (AVC) afetam a qualidade de vida dos seres humanos [39]. O conhecimento sobre o cérebro e os seus mecanismos de funcionamento desempenham um papel importante no potencial de cura das doenças cerebrais no futuro ou, pelo menos, de redução dos seus efeitos, através do desenvolvimento de tratamentos inovadores. As sondas neuronais implantáveis são dispositivos importantes utilizados para registar ou modular a atividade neuronal, sendo

que as últimas décadas foram marcadas por um enorme desenvolvimento [40, 41]. As sondas neuronais implantáveis são usadas de forma rotineira em estudos com animais e são empregues clinicamente em DBS, que é uma forma de tratamento usado na Doença de *Parkinson*, epilepsia, depressão e perturbação obsessivo-compulsiva (POC) [40–45].

O Si tem sido amplamente utilizado como substrato para a implementação de sondas neuronais, especialmente devido à sua rigidez e reprodutibilidade durante os processos de microfabricação. No entanto, existe um elevado desfasamento mecânico entre as sondas de Si (módulo de *Young* 150 GPa–170 GPa [46]) e o tecido cerebral (módulo de *Young* 3 kPa–100 kPa [46]), o que aumenta os danos nos tecidos e a resposta imunológica, conduzindo à degradação gradual da sonda neuronal. Nos últimos anos, foram desenvolvidas sondas neuronais flexíveis de base polimérica para atenuar o desfasamento entre a sonda e o cérebro e todos os seus efeitos, numa tentativa de manter a viabilidade da sonda e melhorar a qualidade dos sinais registados [46–50]. Alguns dos polímeros mais comuns utilizados na implementação de sondas neuronais flexíveis são a poliimida (PI), o *parylene-C*, o policarbonato, a epóxi, o *polydimethylsiloxane* (PDMS) e o SU-8. O módulo de *Young* destes polímeros situa-se entre 1 MPa e 5 GPa [51].

Esta tese de doutoramento propõe a implementação de uma sonda neuronal ultra-fina e flexível, com a padronização de microelétrodos de platina (Pt) num substrato de PI fotossensível. Além disso, é estudada a viabilidade da implementação de uma guia de onda, direcionando a aplicação futura da sonda neuronal para estudos na área de optogenética. Assim, os principais objetivos desta tese englobaram:

i. Fabrico da estrutura da sonda neuronal flexível em PI fotossensível;

ii. Padronização de microelétrodos de Pt na sonda neuronal flexível;

iii. Design e fabrico de uma placa de circuito impresso (PCB) para acoplamento da sonda neuronal flexível;

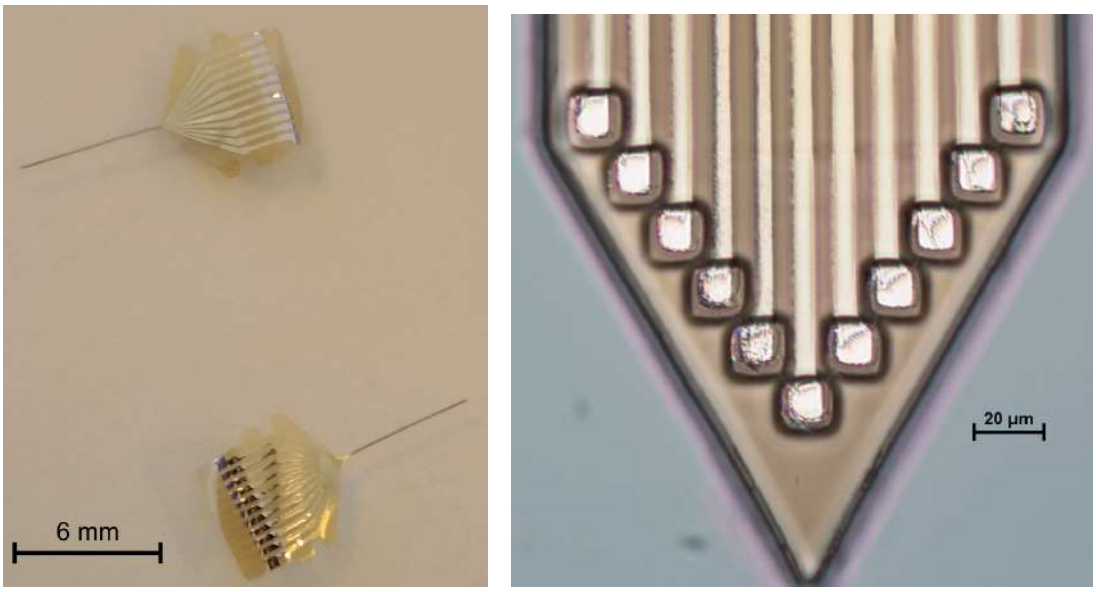
iv. Caraterização eletroquímica dos microelétrodos na sonda neuronal flexível;

v. Testes *in vivo* da sonda neuronal flexível com microelétrodos;

vi. Simulações óticas de uma guia de onda a integrar na sonda neuronal flexível;

vii. Fabrico e caraterização da guia de onda.

Este trabalho de doutoramento decorreu nas instalações do MNFab (*MicroNano Fabrication Laboratory*) do CMEMS (*Center for MicroElectroMechanical Systems*) da Universidade do Minho e resultou no fabrico e validação *in vivo* de uma sonda neuronal ultra-fina e flexível, podendo esta ser vista na figura 1.9.



(a) **(b)**

Figura 1.9: Sonda neuronal ultra-fina e flexível desenvolvida: (a) Vista geral da sonda neuronal; (b) Microelétrodos de Pt localizados na ponta da sonda neuronal.

1.5 Organização da Tese

Esta tese encontra-se dividida em duas partes.

A parte I engloba seis capítulos.

O capítulo 1 apresenta a fisiologia e principais distúrbios do cérebro humano, uma breve evolução das sondas neuronais usadas para o estudo do cérebro e ainda aborda a técnica de optogenética. No final do capítulo são ainda apresentados a motivação e objetivos deste trabalho de doutoramento.

O capítulo 2 apresenta o estado da arte das sondas neuronais padronizadas em substrato rígido ou flexível e com diferentes funcionalidades (interação elétrica, ótica ou microfluídica).

O capítulo 3 apresenta as simulações óticas de guias de onda baseadas no método de elementos finitos (FEM) e no método das diferenças finitas no domínio do tempo (FDTD).

O capítulo 4 apresenta as tecnologias de microfabricação usadas no fabrico da sonda neuronal flexível e da guia de onda.

O capítulo 5 apresenta as diferentes técnicas usadas na caraterização das microestruturas fabricadas e os diferentes resultados experimentais deste trabalho de doutoramento.

Por fim, o capítulo 6 apresenta as principais conclusões do trabalho efetuado e as perspetivas de trabalho futuro.

A parte II engloba dois apêndices.

O apêndice A apresenta a lista de publicações em revistas científicas e conferências, relacionadas com o trabalho de doutoramento desenvolvido.

Por fim, o apêndice B apresenta a declaração de ética relativa à investigação com animais.

Capítulo 2

Sondas Neuronais: Estado da Arte

O presente capítulo apresenta o estado da arte das sondas neuronais. São abordadas as sondas padronizadas em substratos rígidos e flexíveis, bem como, as suas diferentes interações (elétrica, ótica e microfluídica). Todas estas sondas são usadas na compreensão do funcionamento do cérebro e em interface cérebro-máquina (BMI) (figura 2.1).

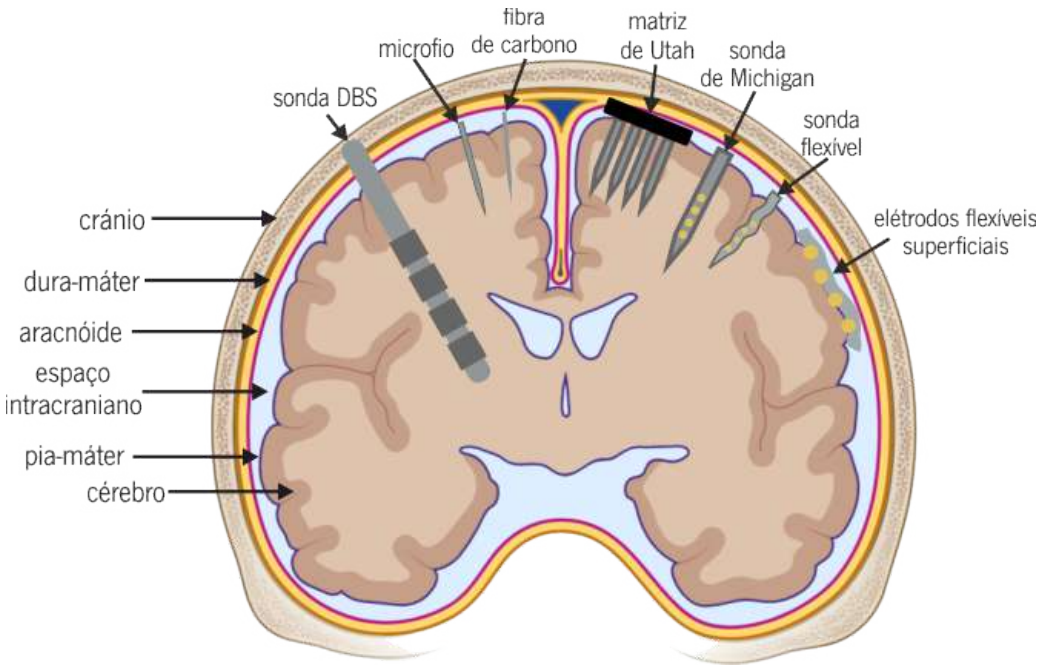


Figura 2.1: Diferentes sondas neuronais usadas na compreensão do funcionamento do cérebro e em BMI (figura adaptada de [52]).

2.1 Sondas Neuronais Rígidas

O Si tem sido amplamente utilizado como substrato para a implementação de sondas neuronais rígidas, especialmente devido à sua reprodutibilidade durante a microfabricação. No entanto, existe um elevado desfasamento mecânico entre as sondas de Si (módulo de *Young* 150 GPa–170 GPa [46]) e o tecido cerebral (módulo de *Young* 3 kPa–100 kPa [46]), o que aumenta os danos nos tecidos e a resposta imunológica, conduzindo à degradação gradual da sonda neuronal. Apesar das grandes descobertas e avanços alcançados com sondas neuronais rígidas, a natureza destas ferramentas leva ao encapsulamento e degradação gradual do dispositivo devido à resposta imunitária gerada pelo tecido neuronal [53].

Durante a última década, os contínuos avanços nas tecnologias de materiais e de processamento resultaram no desenvolvimento de uma ampla variedade de sondas neuronais implantáveis com capacidades e funcionalidades melhoradas. Estas sondas neuronais aumentaram significativamente a nossa compreensão das funções dos circuitos neuronais e dos mecanismos subjacentes às doenças neurológicas. Além disso, algumas destas sondas também ofereceram novas oportunidades para tratamentos clínicos de doenças neurológicas [54]. Podem destacar-se as sondas neuronais de alta densidade para registo de atividade neuronal [55], sondas de registo opto-eletrofisiológico de alta resolução temporal sem degradação da qualidade de sinal [56] e as sondas multimodais com múltiplas hastes [57]. Estas últimas podem integrar uma guia de onda para estimulação ótica, canais microfluídicos para administração de fármacos e matrizes de microelétrodos para registo de sinais neuronais em diferentes regiões cerebrais.

2.1.1 Interação Elétrica

A principal vantagem dos dispositivos neuronais, especialmente dos microelétrodos implantáveis para o registo eletrofisiológico em tempo real, é a elevada resolução temporal [58]. Esta tecnologia pode tornar-se uma ferramenta poderosa para compreender as redes neuronais a nível celular, considerando um registo de alta densidade da atividade neuronal com resolução de um único neurónio [59]. Estas sondas neuronais são baseadas em materiais e técnicas de processamento frequentemente utilizadas em sistemas microeletromecânicos (MEMS) e em tecnologia CMOS.

Obaid *et al.* [60] apresentaram uma nova abordagem que aproveita a escalabilidade e o poder de processamento eletrónico dos dispositivos baseados em CMOS, combinados com uma interface neuronal tridimensional (3D) (figura 2.2 (a)). O conceito central envolveu um conjunto de microfios isolados, acoplados perpendicularmente a uma matriz amplificadora CMOS de grande escala. Ao organizar os mi-

crofios em conjuntos, foi possível controlar a disposição espacial e a estrutura 3D da extremidade distal, com um plano de contacto robusto no lado proximal ligado a uma matriz de píxeis plana. Esta arquitetura proporcionou uma matriz de microfios sobre a superfície do cérebro, semelhante à estrutura de uma matriz de Utah. A conceção modular permitiu que uma variedade ampla de tipos e tamanhos de microfios fosse acoplada a diferentes chips CMOS. A densidade dos microfios na extremidade proximal e distal pode ser ajustada de forma independente, permitindo adaptar o espaçamento entre os microfios conforme necessário. A mesma plataforma fundamental é escalável, podendo variar de algumas centenas a dezenas de milhares de elétrodos, oferecendo capacidades tanto para registo como para estimulação. O conceito central consistiu em agrupar microfios isolados utilizando um revestimento de sacrifício em cada um deles para definir a separação fio a fio. Os microfios isolados foram preparados por deposição de um revestimento de vidro ou polímero ou por trefilagem térmica de um fio de vidro/metal. Foram obtidos conjuntos de microfios metálicos de diâmetros de $5\,\mu m$–$25\,\mu m$ e materiais condutores de ouro (Au), tungsténio (W), liga de platina-irídio (PtIr) e liga de platina-tungsténio (PtW). Cada microfio sem isolamento foi enrolado em torno de um fuso de $10\,cm$, seguido da deposição de uma camada isoladora de vidro com $\sim 1\,\mu m$ de espessura, utilizando a decomposição de silano num forno a $300\,^{\circ}C$, proporcionando uma camada isoladora inorgânica robusta. Uma camada de sacrifício de *parylene-C* foi depositada por deposição química de vapores (CVD) nos microfios isolados garantindo um espaçamento entre microfios suficiente, criando assim um comportamento de conjunto de microfios que penetram individualmente durante a inserção no tecido, em vez de um objeto sólido. Os aspetos fundamentais da conceção foram o desenvolvimento de um contacto de alta qualidade microfio-CMOS e um sistema mecanicamente robusto para um funcionamento a longo prazo. Estes requisitos foram atingidos através da corrosão de $\sim 20\,\mu m$ do isolamento de *parylene-C* e do isolamento de vidro, revelando assim microfios sem isolamento na extremidade proximal. De seguida, o conjunto de microfios foi comprimido mecanicamente contra o chip CMOS, sendo os fios dobrados e cravados contra a superfície do chip. Após o acoplamento, a eficiência da ligação entre os microfios e os píxeis foi avaliada com base na condutividade elétrica e nas características de ruído de cada píxel. A conexão entre o conjunto e o chip foi robusta, com mais de $90\,\%$ dos fios estabelecendo contacto de forma consistente com um píxel. As propriedades elétricas dos microfios foram analisadas para avaliar se o processo de acoplamento aumentava o ruído de gravação na matriz do sensor CMOS. Inicialmente, as caraterísticas de impedância de microfios individuais feitos de quatro metais diferentes (Au, PtW 92/8, PtIr 90/10 e W) foram estudadas na gama dos $0{,}1\,MHz$ a $1\,MHz$ em solução salina tratada com fosfato (PBS). Os testes revelaram impedâncias inferiores a $1\,M\Omega$ a $1\,kHz$ e mostraram uma forte dependência do material e do diâmetro do microfio. Com o objetivo de melhorar a

qualidade dos registos neuronais, óxido de irídio (IrOx) foi eletrodepositado em cada microfio, resultando numa significativa redução da impedância. Devido à baixa impedância obtida de $200\,\text{k}\Omega \pm 27\,\text{k}\Omega$ e à sua biocompatibilidade a longo prazo, o PtIr 90/10 foi selecionado como o material preferencial de fabrico dos microfios. Foram também obtidos os valores de ruído da conexão do conjunto de microfios metálicos ao dispositivo CMOS. Após a conexão, o valor eficaz (RMS) do ruído em cada canal de um conjunto de 251 microfios de núcleos de PtIr, com $15\,\mu\text{m}$ de diâmetro, isolamento de vidro de $1\,\mu\text{m}$ e espaçados a $100\,\mu\text{m}$, foi de $\leq 5{,}97\,\mu\text{V} \pm 2{,}20\,\mu\text{V}$ RMS ($0{,}01$ kHz–10 kHz). Este valor foi minimamente superior ao valor RMS do ruído sem conexão, de $5{,}0\,\mu\text{V} \pm 1{,}5\,\mu\text{V}$ RMS ($0{,}01$ kHz–10 kHz). O dispositivo foi validado através do registo de atividade neuronal em testes *ex vivo* na retina de um rato e em testes *in vivo* nos córtices motor e somatossensorial e no estriado dorsal de ratos que se deslocavam livremente.

O projeto *NeuroSeeker* [61–65] apresentou uma sonda neuronal com microelétrodos de baixa impedância baseados em nitreto de titânio (TiN) e fabricada segundo a tecnologia CMOS de $130\,\text{nm}$ (figura 2.2 (b)). Esta sonda neuronal possui uma haste de $8\,\text{mm}$ de comprimento, $100\,\mu\text{m}$ de largura e $50\,\mu\text{m}$ de espessura. Além disso, esta sonda apresenta diferentes versões consoante o número de microelétrodos, 128 [63], 255 [64] e 1356 [62]. Os microelétrodos apresentam um formato quadrangular ($20\,\mu\text{m} \times 20\,\mu\text{m}$), densamente espaçados ($2{,}5\,\mu\text{m}$) e baixa impedância ($50\,\text{k}\Omega$ a 1 kHz). O último estudo utilizando sondas neuronais *NeuroSeeker* foi apresentado por Horváth *et al.* [65], onde foi disponibilizado um extenso conjunto de dados eletrofisiológicos ($n = 109$ e $\sim 0{,}9$ TB) recolhidos no neocortéx de 20 ratos anestesiados, utilizando uma sonda neuronal com 128 microelétrodos, proporcionando uma elevada resolução espacial. Além de disponibilizarem publicamente os registos contínuos em bruto e de banda larga, partilharam também os resultados da triagem dos potenciais de ação, incluindo os tempos dos potenciais de ação, as formas de onda de potenciais de ação multicanal e várias propriedades espaço-temporais de unidades individuais. Juntamente com os sinais neuronais foram também disponibilizadas diversas métricas de qualidade de classificação, de forma a ajudar a selecionar unidades individuais com a qualidade adequada à sua aplicação. Todos estes dados foram disponibilizados no formato *Neurodata Without Borders* (NWB), sendo este um formato de dados padrão em neurofisiologia.

Jun *et al.* [66] apresentaram uma sonda neuronal denominada de *Neuropixels 1.0* onde foi utilizada, pela primeira vez em animais não imobilizados, a combinação de uma resolução espácio-temporal elevada com uma cobertura de grande volume (figura 2.2 (c)). Estas sondas neuronais foram concebidas e fabricadas com os seguintes objetivos: (i) proporcionar locais de registo densos e abrangentes, capazes de isolar neurónios individuais em grandes regiões do cérebro; (ii) possuir uma área de secção transversal reduzida para minimizar os danos no tecido cerebral; (iii) baixo nível de ruído; (iv) resistência

a artefactos de movimento e outras interferências; (v) transmissão eficiente de dados, conseguida através da integração de amplificadores analógicos de baixo ruído, multiplexadores e digitalizadores na base da sonda neuronal; (vi) garantir a estabilidade do registo a longo prazo; e (vii) assegurar um processo de fabrico escalável e de baixo custo. Cada sonda possui 384 canais de registo que podem, de forma programável, endereçar 960 microelétrodos de TiN de baixa impedância ($149\,\mathrm{k\Omega} \pm 6\,\mathrm{k\Omega}$), com uma área de $12\,\mu\mathrm{m} \times 12\,\mu\mathrm{m}$ e um *pitch* de $20\,\mu\mathrm{m}$, dispostos ao longo de uma única haste com $10\,\mathrm{mm}$ de comprimento e uma secção transversal de $70\,\mu\mathrm{m} \times 20\,\mu\mathrm{m}$. A haste foi fabricada simultaneamente, com o mesmo processo CMOS, com uma base de $6\,\mathrm{mm} \times 9\,\mathrm{mm}$ onde os sinais de tensão registados são filtrados, amplificados, multiplexados e digitalizados, permitindo a transmissão direta de dados digitais sem ruído a partir da mesma. A combinação de locais de registo densamente distribuídos e a elevada contagem de canais permitiu isolar com precisão a atividade de centenas de neurónios por cada sonda implantada. Utilizando duas sondas neuronais, foi registada a atividade de mais de 700 neurónios individuais de cinco estruturas cerebrais num rato acordado. A funcionalidade totalmente integrada e o tamanho reduzido destas sondas neuronais permitiram o registo da atividade de grandes populações de neurónios de várias estruturas cerebrais, em animais que se deslocavam livremente. Foi também possível combinar com sucesso os registos de sondas *Neuropixels 1.0* com a estimulação optogenética de populações neuronais excitatórias e inibitórias *in vivo*. Steinmetz *et al.* [55] apresentaram uma nova versão da *Neuropixels*, denominada por *Neuropixels 2.0* (figura 2.2 (c)). Embora as sondas *Neuropixels 1.0* de haste única ofereçam uma cobertura densa ao longo de uma linha cerebral, algumas estruturas cerebrais são mais eficazmente registadas com outras geometrias. Para registar estruturas em camadas ou profundas, como o isocórtex, o estriado, o hipocampo ou o colículo superior, pode ser ideal realizar uma amostragem densa num plano perpendicular à superfície do cérebro. Para enfrentar estes desafios, foi desenvolvida a sonda *Neuropixels 2.0* juntamente com um programa de código aberto para correção de movimentos e seleção de potenciais de ação. Para registar a atividade de neurónios individuais de forma estável ao longo de meses, a sonda possui uma geometria mais densa e linearizada, permitindo que o programa realize correções de movimento *post hoc*. Uma versão de quatro hastes da sonda recolhe, de forma densa, a atividade num plano de aproximadamente $1\,\mathrm{mm}$ por $10\,\mathrm{mm}$, com 5120 microelétrodos de registo endereçáveis através de 384 canais de registo. Foi também demonstrado um esquema em que vários locais são registados simultaneamente num único canal, permitindo que a sonda capture a atividade de neurónios com grandes potenciais de ação numa maior extensão de tecido cerebral. Estes avanços possibilitam medições estáveis e a longo prazo da atividade neuronal, numa escala sem precedentes. Cada haste da *Neuropixels 2.0* possui $10\,\mathrm{mm}$ de comprimento, secção transversal de $70\,\mu\mathrm{m} \times 24\,\mu\mathrm{m}$

e apresenta duas colunas de microelétrodos com um *pitch* de $32\,\mu m$ entre elas e um espaçamento de $15\,\mu m$ ao longo do seu comprimento. Um processo de compensação de tensões garante uma deflexão inferior a $100\,\mu m$ da base até à ponta em cada haste. Os microelétrodos em TiN poroso possuem uma área de $12\,\mu m \times 12\,\mu m$ e apresentam uma impedância de $148\,k\Omega \pm 8\,k\Omega$ a $1\,kHz$. A ponta afilada da sonda tem um comprimento de $175\,\mu m$, com um ângulo de $\sim 20°$. O *pitch* entre hastes na versão de quatro hastes é de $250\,\mu m$. A base, fixada a uma PCB, de $2{,}2\,mm \times 8{,}7\,mm$, consome $36{,}5\,mW$ de potência e regista 384 sinais de banda completa ($0{,}5\,Hz$ a $10\,kHz$), com uma amostragem a $30\,kHz$ e uma resolução de $14\,bit$. A taxa de transmissão de dados é de $\sim 23\,MB\,s^{-1}$. O nível médio de ruído obtido na gama dos potenciais de ação de $300\,Hz$ a $10\,kHz$ foi de $8{,}2\,\mu V$ RMS, considerando também o ruído do microelétrodo. A amplitude máxima dos potenciais de ação registados foi de $800\,\mu V$. Foi obtida uma diafonia média entre microelétrodos na versão de haste única a $1\,kHz$ de $0{,}35\,\%$ e de $1{,}51\,\%$ na versão de quatro hastes. Foi também registado um aumento de temperatura no cérebro, causado pela implantação das sondas, inferior a $1\,°C$. Variantes da *Neuropixels 1.0* estão já a ser utilizadas em estudos de diferentes áreas cerebrais humanas [67–69]. Devido ao movimento lateral cerebral durante e após a inserção, as hastes das sondas *Neuropixels 1.0* podem partir, o que levou Paulk *et al.* [67] a utilizar uma sonda neuronal personalizada mais robusta, denominada por *Neuropixels 1.0-S*, com uma espessura de $100\,\mu m$. Pelas mesmas razões, Chung *et al.* [68] e Leonard *et al.* [69] utilizaram a variante *Neuropixels 1.0 NHP Short* com espessuras disponíveis de $97\,\mu m$ ou de $122\,\mu m$, indicada para animais de grande porte.

O projeto *Simultaneous Neural Active Pixel Sensor CMOS-probe* (SiNAPS) [70–74] apresentou uma inovadora sonda CMOS de alta resolução, concebida para registos de atividade neuronal *in vivo* (figura 2.2 (d)). Angotzi *et al.* [70] apresentaram um dispositivo baseado no conceito modular *active pixel sensor* (APS), onde um pequeno circuito frontal está localizado sob cada elétrodo. Utilizando o padrão de tecnologia CMOS $0{,}18\,\mu m$, fabricaram uma sonda neuronal que integra 512 elétrodos-píxeis de registo (*pitch* de $28\,\mu m$ e elétrodos de $20\,\mu m \times 20\,\mu m$) dispostos numa matriz, com uma área de $80\,\mu m \times 5\,mm$, ao longo de uma haste com uma secção transversal de $120\,\mu m \times 30\,\mu m$ e $6{,}5\,mm$ de comprimento. Com base no conceito APS, foram desenvolvidos módulos com 32 elétrodos-píxeis, nos quais os dados neuronais são amplificados localmente no ponto de registo e lidos de forma multiplexada por divisão de tempo. Um amplificador de ganho variável (VGA) permitiu uma amplificação adicional do sinal, até 8 vezes, antes da conversão analógica para digital fora do *chip*. O circuito integrado no píxel oferece amplificação do sinal e filtragem passa-baixo de primeira ordem, permitindo reduzir os componentes de ruído de alta frequência e o *aliasing* que podem ocorrer na leitura por multiplexação por divisão de tempo.

Cada elétrodo-píxel inclui também um interruptor analógico metal óxido-semicondudor tipo-n (nMOS) que permite o acesso direto ao contacto do elétrodo através de uma pista metálica comum, encaminhada diretamente para fora do *chip*. A sonda inclui também uma unidade de controlo digital (DCU), utilizada para comunicação bidirecional com um módulo de aquisição baseado em FPGA (*field programmable gate array*) e para controlar as operações do dispositivo. O circuito *front-end* de baixo ruído *in-pixel* funciona como um amplificador filtro passa-baixo ($F_{-3\,dB} = 4$ kHz) com um ganho de $45{,}0$ dB $\pm$ $0{,}4$ dB em todos os 512 elétrodos de registo simultâneo. O ruído de entrada medido foi de $24{,}5$ µV$\pm 4{,}1$ µV RMS na gama de 1 Hz a 1 kHz reduzindo-se para cerca de $7{,}50$ µV $\pm$ $0{,}67$ µV RMS na gama de 300 Hz a $7{,}5$ kHz. Foi obtida uma impedância média por elétrodo de $14{,}0$ MΩ $\pm$ $0{,}6$ MΩ a 1 kHz numa solução salina, sendo esta reduzida para 529 kΩ $\pm$ 128 kΩ após a eletrodeposição de Pt. Foi também avaliado o consumo de energia com todos os circuitos constantemente ligados, sendo obtido um consumo de 6 µW por elétrodo de registo, com uma tensão de alimentação de $1{,}8$ V. Em condições normais de funcionamento, este valor foi reduzido em cerca de 30 % devido às técnicas de gestão de energia implementadas no sistema, que colocam a maioria dos circuitos em modo de espera quando não são necessários. Estas condições de consumo muito baixo cumpriram as restrições de dissipação de energia exigidas pelos registos *in vivo*. É ainda de destacar que, mesmo após uma hora de funcionamento contínuo, a sonda não apresentou um aumento significativo de temperatura. A validação *in vivo* da sonda SiNAPS consistiu no registo do potencial de campo local intracraniano (LFP) e potenciais de ação em diferentes regiões do córtex somatossensorial de um rato anestesiado. Por fim, a sonda SiNAPS de haste única foi iterada numa versão de quatro hastes com 1024 elétrodos de registo [71].

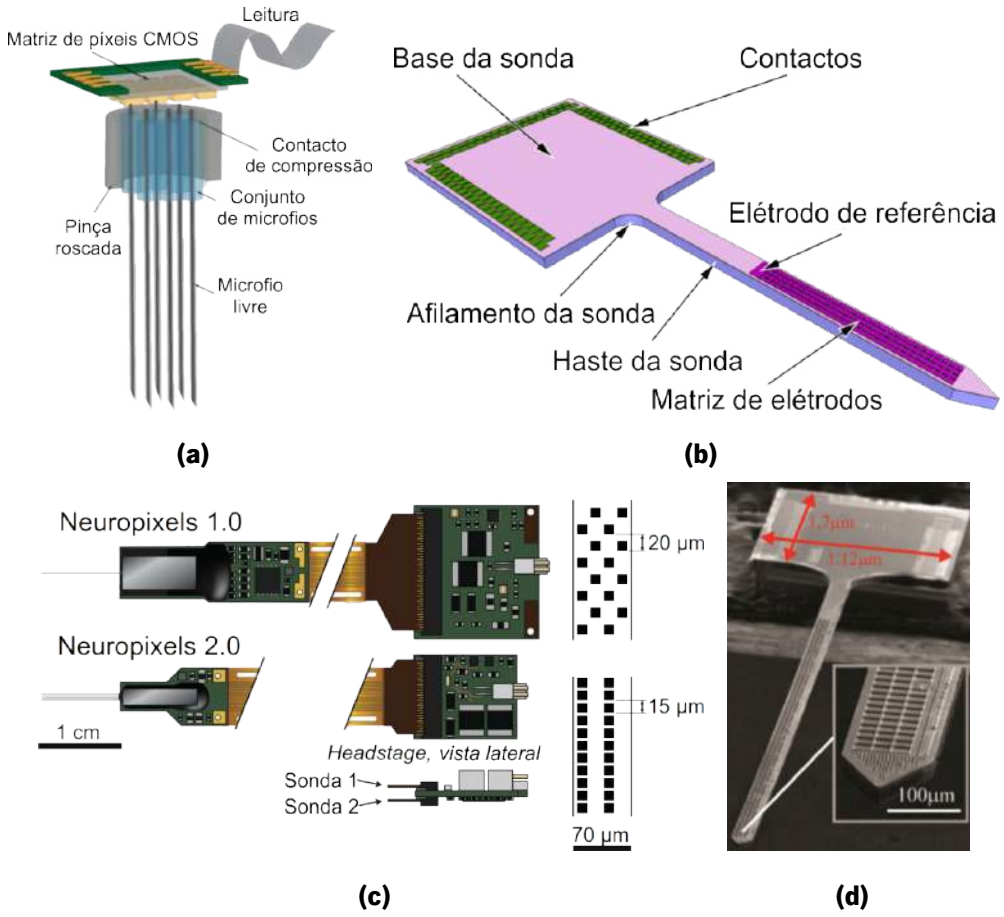


Figura 2.2: Representação de sondas neuronais padronizadas em substratos rígidos com interação elétrica: (a) Esquemático do *chip* CMOS integrado com o conjunto de microfios (figura adaptada de [60]); (b) Esquemático da sonda neuronal *NeuroSeeker* baseada em tecnologia CMOS de 130 nm (figura adaptada de [63], com autorização de *Elsevier*); (c) Esquemático comparativo das configurações dos dispositivos *Neuropixels 1.0* e *Neuropixels 2.0* (figura adaptada de [55]); (d) Imagem SEM da sonda neuronal CMOS SiNAPS de haste única (figura adaptada de [70]).

2.1.2 Interação Ótica

Como foi referido na secção 1.3, em 2005 surgiu um novo conceito na área da neurociência denominado por optogenética e em 2010 foi formalmente definido como a junção de métodos genéticos e óticos para estimular ou inibir funções específicas em células fotossensíveis de tecido vivo [23]. A optogenética revolucionou a análise do circuito neuronal ao introduzir proteínas fotossensíveis, chamadas opsinas, em tipos de células específicas, permitindo respostas claramente definidas a um estímulo ótico [21, 23, 24]. Esta capacidade de manipulação da atividade cerebral gerou uma variedade de estudos neuronais, especialmente na investigação de distúrbios cerebrais [75]. Com a introdução deste novo conceito de eletrofi-

siologia com optogenética, tornou-se necessário adaptar as ferramentas e as metodologias utilizadas em neurociência [76, 77].

Kim *et al.* [56] apresentaram *optrodes* μ-LEDs *minimal-stimulation-artifact* (miniSTAR), que permitem eliminar eficazmente o artefacto de estimulação (figura 2.3 (a)). As *optrodes* miniSTAR utilizam LEDs monoliticamente integrados, com dimensões comparáveis às de um neurónio, para a estimulação ótica de alta resolução espacial dos neurónios-alvo. A estrutura de múltiplas camadas metálicas na miniSTAR suprime o artefacto de estimulação induzido por interferência eletromagnética (EMI), enquanto o substrato de Si fortemente dopado com boro (B) elimina o artefacto induzido por efeito fotovoltaico (PV). Adicionalmente, o controlo da modelação de impulsos transitórios reduziu a magnitude do artefacto de estimulação residual em todos os microelétrodos de registo para valores inferiores de $50\,\mu$V pico-a-pico, sem comprometer a resolução temporal da estimulação ótica. As miniSTAR foram fabricadas utilizando *wafers* LED de nitreto de gálio sobre silício (GaN-on-Si), poços quânticos múltiplos de nitreto de gálio/nitreto de índio-gálio (GaN/InGaN MQW) com substratos de Si fortemente dopados com B. Cada miniSTAR possui quatro hastes, cada uma com três μ-LEDs e oito microelétrodos de registo em irídio (Ir), com dimensões de superfície exposta de $10\,\mu\text{m} \times 15\,\mu\text{m}$ e $11\,\mu\text{m} \times 13\,\mu\text{m}$, respetivamente. Após o fabrico de cada miniSTAR, o desempenho dos μ-LEDs e dos microelétrodos foi caraterizado para verificar a sua viabilidade em opto-eletrofisiologia *in vivo*. Os μ-LEDs geraram na sua superfície uma irradiância de $1\,\text{mW mm}^{-2}$ e de $50\,\text{mW mm}^{-2}$ quando era aplicada aos seus terminais uma tensão de $2{,}86\,\text{V} \pm 0{,}02\,\text{V}$ e de $3{,}46\,\text{V} \pm 0{,}10\,\text{V}$, respetivamente, garantindo assim o requisito mínimo optogenético de irradiância capaz de ativar a ChR2 [24, 78]. Os valores da magnitude e fase de impedância dos microelétrodos obtidos foram de $1{,}15\,\text{M}\Omega \pm 0{,}07\,\text{M}\Omega$ e de $-68{,}33^\circ \pm 5{,}11^\circ$ a $1\,$kHz, respetivamente, sendo valores aceitáveis para registos extracelulares *in vivo* de alta qualidade [79]. Foi demonstrado *in vivo* a eliminação do artefacto de estimulação supralimiar em testes opto-eletrofisiológicos com a implantação da miniSTAR no hipocampo de um rato.

Lanzio *et al.* [80] apresentaram uma *optrode* capaz de emitir luz em dois comprimentos de onda distintos, controlando espacialmente a localização da saída de cada comprimento de onda enquanto regista a atividade neuronal (figura 2.3 (b)). Estas funcionalidades permitiram ativar o tipo desejado de opsina, possibilitando a inibição e a ativação individual ou simultânea da atividade neuronal no local de interesse ao longo da haste. Isto foi conseguido ao acoplar a luz de uma fibra ótica a estruturas nanofotónicas, como acopladores direcionais, para dividir dois comprimentos de onda em diferentes guias de onda, cada um correspondente a uma gama específica de absorção de opsina. Cada guia de onda integra vários ressoadores em anel como interruptores óticos passivos, permitindo selecionar

a localização da saída de luz. Foram também combinados a estes elementos, 64 microelétrodos de Au para o registo simultâneo da atividade neuronal, com uma área de $10\,\mu m \times 8{,}5\,\mu m$ e um *pitch* de $30\,\mu m$. Devido à pequena dimensão do acoplador e dos ressoadores em anel, inferior a $5\,\mu m$ e $30\,\mu m$ de largura, respetivamente, a haste da *optrode* possui uma secção transversal de $45\,\mu m \times 15\,\mu m$ e um comprimento de $1\,mm$. Os circuitos nanofotónicos foram caraterizadas a nível ótico através da acoplação de uma fibra ótica de modo único à entrada da borda da guia de onda e monitorizando os componentes óticos de saída com um microscópio ótico. Foi utilizado um díodo laser com uma potência ótica de $10\,mW$ e considerando as perdas óticas do dispositivo, que atingiram $\sim 30\,dB$, a potência ótica obtida nas *gratings* de saída foi de $5\,\mu W$–$10\,\mu W$. Devido às dimensões da *grating* ($15\,\mu m \times 4\,\mu m$), foi estimada uma irradiância de $150\,mW\,mm^{-2}$. As perdas óticas totais do dispositivo foram distribuídas pelo acoplamento fibra ótica/guia de onda ($10\,dB$), desalinhamento durante a fixação da fibra ótica ($5\,dB$), dispersão na guia de onda ($6\,dB$–$8\,dB$), eficiência de acoplamento do ressoador em anel ($3\,dB$) e eficiência de desacoplamento da *grating* ($3\,dB$).

Chou *et al.* [31] apresentaram uma sonda neuronal multimodal multi-haste, integrando monoliticamente um fotodíodo para medir sinais fluorescentes específicos de tipos celulares, um conjunto de microelétrodos para registo neuronal e fibras óticas e LEDs para emissão de luz excitatória (figura 2.3 (c)). Esta combinação permite o registo simultâneo de fluorescência e sinais elétricos, possibilitando a eletrofisiologia específica do tipo celular e o estudo do papel de tipos específicos de células nos circuitos neuronais. Além disso, a estrutura multi-haste possibilita o registo de sinais neuronais multimodais provenientes de diferentes regiões do cérebro, o que é fundamental para o estudo dos circuitos neuronais. As hastes da sonda neuronal foram concebidas com um comprimento máximo de $6\,mm$, de modo a que a sonda possa aceder a toda a região cerebral de um rato adulto, e uma secção transversal de $113\,\mu m \times 40\,\mu m$. Os 7 microelétrodos foram posicionados nas proximidades da área ativa do fotodíodo com uma densidade muito elevada (*pitch* de $50\,\mu m$). O *pitch* dos microelétrodos permitiu medir com precisão as atividades de todos os neurónios situados acima da região ativa do fotodíodo, possibilitando a estimativa da localização dos neurónios através de triangulação. O fotodíodo foi concebido para ter uma grande área ativa, permitindo-lhe captar a maioria dos fotões emitidos pelo soma do neurónio localizada sobre o mesmo. Foi incorporado um filtro de banda estreita sobre o fotodíodo capaz de bloquear eficazmente a luz excitatória e permitir apenas a passagem da emissão fluorescente específica. Foram caraterizados os desempenhos óticos e elétricos dos componentes individuais do sistema integrado. O desempenho do filtro ótico foi otimizado através do ajuste da concentração do corante absorvente dissolvido numa camada de $2{,}4\,\mu m$ de SU-8 transparente. Um filtro ótico com 4 wt % de corante absorvente foi usado devido à sua transmi-

tância moderada na região verde (~ 40 % nos 520 nm) para que o máximo possível de luz de emissão de fluorescência possa passar o filtro ótico e ser registado pelo fotodíodo. De seguida foi caraterizado o desempenho optoeletrónico do fotodíodo integrado com o filtro. A responsividade nos 475 nm diminui de $0{,}36$ A W^{-1} sem filtro para $0{,}48 \times 10^{-2}$ A W^{-1} com filtro, enquanto que nos 520 nm houve uma diminuição ligeira, de $0{,}40$ A W^{-1} para $0{,}22$ A W^{-1}. Por fim, foi avaliada a impedância dos microelétrodos de Au revestidos a Pt-*black* (Ptb), sendo obtida uma magnitude e fase a 1 kHz de $16{,}1\,\text{k}\Omega \pm 0{,}1\,\text{k}\Omega$ e $35{,}7° \pm 1{,}7°$, respetivamente. Para validar o desempenho do sistema proposto, foram realizados testes *ex vivo* na região *cornu ammonis* (CA) 1 do hipocampo de uma fatia de cérebro de um rato, tendo sido registada atividade neuronal evocada. Após esta validação, foi necessário confirmar a sua capacidade para realizar registos óticos e elétricos simultâneos num ambiente *in vivo*, permitindo a eletrofisiologia específica do tipo celular. Uma sonda de haste única foi inicialmente inserida no cérebro de um rato até que a sua ponta alcançou a camada piramidal da região CA1 do hipocampo. Posteriormente, a sonda registou atividade neuronal espontânea, registando simultaneamente os sinais elétricos e fluorescentes. De seguida, foi demonstrada a capacidade do sistema realizar eletrofisiologia específica do tipo celular. Para tal, foi concebida uma sonda composta por três hastes com comprimentos diferentes, otimizada para investigar a via colateral de Schaffer. Foi confirmado que a sonda multi-haste é capaz de identificar atividades específicas de tipo celular em várias regiões do circuito neuronal ao registar sinais elétricos e de fluorescência. Registaram-se potenciais de ação espontâneos e induzidos pela luz em diferentes hastes. Ambos os tipos de atividade contribuíram para o sinal de fluorescência, de forma semelhante ao que foi observado com a sonda de haste única. Estes resultados mostraram que o sistema de sonda de fluorescência multi-haste possibilita a identificação de diferentes tipos de células que formam os circuitos neuronais entre subpopulações específicas de neurónios, permitindo um estudo detalhado da conetividade funcional específica do tipo celular dentro do circuito neuronal.

Taal *et al.* [81] apresentaram sondas monoliticamente integradas, de alta densidade e com um grande campo de visão para estimulação neuronal (figura 2.3 (d)). As sondas incorporam um total de 1024 micro díodos orgânicos emissores de luz (µ-OLEDs) com duas cores distintas (azul e laranja), distribuídos em 256 dispositivos em cada uma das quatro hastes. Os µ-OLEDs têm uma área de superfície de 21 µm $\times$ 19 µm, com um *pitch* de $24{,}5$ µm. O dispositivo foi concebido num *chip* de circuito integrado, utilizando o processo CMOS de 130 nm. A base da sonda contém um condensador de desacoplamento e a lógica de endereçamento. A partir da base, estendem-se quatro hastes de 6 mm de comprimento, com um *pitch* de 250 µm entre elas, cada uma com duas filas de 128 controladores de ânodos. Nestas hastes, 1024 contactos de alumínio (Al), com uma área de 21 µm $\times$ 19 µm e um *pitch* de $24{,}5$ µm,

servem como contactos de ânodo para os μ-OLEDs. A ponta de 1 mm de comprimento de cada haste contém apenas um condensador de desacoplamento, o que faz com que o ânodo mais distante possa ser implantado a uma profundidade de 5 mm. Cada ânodo inclui lógica de controlo para endereçamento local. Cada haste possui uma secção transversal de 100 μm $\times$ 55 μm. A integração direta dos μ-OLEDs com controladores CMOS minimizou as capacitâncias parasitas associadas a interconexões mais longas, permitindo alcançar tempos de subida e descida dos μ-OLEDs de 40 ns e 20 ns, respetivamente. A operação pulsada dos μ-OLEDs a 10 kHz com *duty-cycle* de 50 % foi utilizada para reduzir a degradação causada pelo efeito de Joule e maximizar a irradiância. Cada píxel OLED azul emite uma irradiância média de $0{,}25$ mW mm^{-2}, enquanto que cada píxel OLED laranja atingiram uma irradiância média de $0{,}10$ mW mm^{-2}. Com uma corrente máxima de polarização de 35 μA a 7 V e funcionamento pulsado a 10 kHz, o consumo máximo de energia dos μ-OLEDs azuis por píxel foi de 245 μW. Para os μ-OLEDs laranja, o consumo máximo de energia foi de 49 μW. Para a validação do dispositivo, foi fabricada separadamente uma sonda com uma matriz de microelétrodos transparente e flexível. Esta sonda foi fabricada de modo a ter um orifício localizado na ponta, cuja dimensão exterior corresponde à ponta da haste com μ-OLEDs. Foram realizadas inserções no córtex somatossensorial de ratos anestesiados, onde a haste com μ-OLEDs foi acoplada à sonda de registo flexível, sendo ambas inseridas em conjunto como uma estrutura laminada, graças a fortes interações hidrofóbicas, com um alinhamento bem sucedido e com uma precisão de ± 8 μm. Como os microelétrodos passivos cobrem apenas metade da haste com μ-OLEDs, ambas as sondas foram implantadas a uma profundidade de $1{,}3$ mm, proporcionando uma interface com 128 μ-OLEDs e 32 microelétrodos. Após a inserção, foram registados potenciais de ação e LFP induzidos pelas sondas com μ-OLEDs azuis e μ-OLEDs laranjas, em neurónios modificados com as opsinas ChR2 e *channelrhodopsin-mine* (ChRmine), respetivamente. Com estes resultados, foi demonstrada a capacidade de estimular populações de neurónios a várias escalas temporais e espaciais, aplicando diferentes padrões de iluminação estruturada, incluindo desde a estimulação de neurónios individuais com μ-OLEDs únicos, até grandes populações de neurónios através da excitação sincronizada utilizando conjuntos de μ-OLEDs.

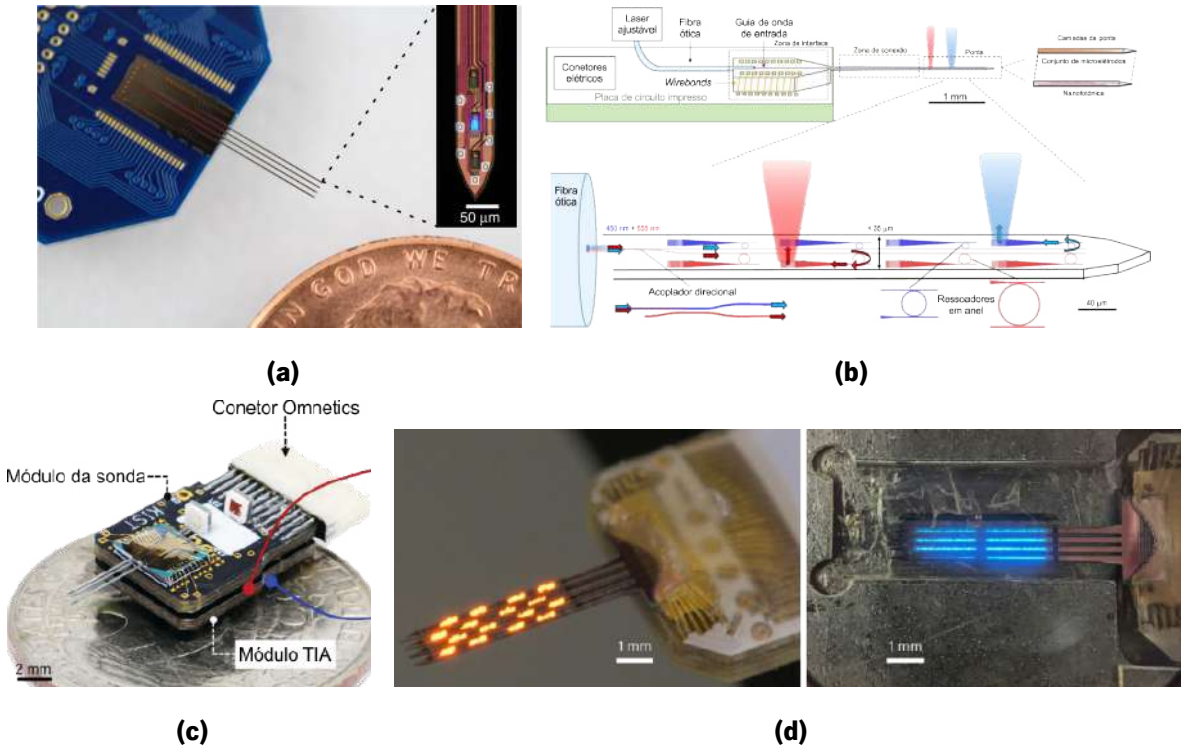


Figura 2.3: Representação de sondas neuronais padronizadas em substratos rígidos com interação ótica: (a) Fotografia da *optrode* miniSTAR e imagem microscópica da ponta de uma das hastes (figura adaptada de [56]); (b) Esquemático da *optrode* nanofotónica multicor (figura adaptada com autorização de *IOP Publishing, Ltd*, de [80]; autorização veiculada através de *Copyright Clearance Center, Inc.*); (c) Fotografia do sistema *optrode* multimodal multi-haste em conjunto com um módulo amplificador de transimpedância (TIA) (figura adaptada de [31]); (d) Fotografias de sondas integradas monoliticamente com µ-OLEDs laranjas e azuis (figura adaptada de [81]).

2.1.3 Interação Microfluídica

Alguns fármacos podem ser utilizados de forma terapêutica no tratamento de doenças cerebrais, como tumores, doenças neurodegenerativas (p. ex., Doença de *Alzheimer* e Doença de *Parkinson*) e epilepsia. No entanto, a administração convencional de medicamentos para tratar doenças cerebrais é dificultada pela barreira hemato-encefálica (BHE), que é uma barreira de difusão essencial para o funcionamento normal do cérebro e para a manutenção da homeostase cerebral. A maioria dos medicamentos biotecnológicos são moléculas grandes que não conseguem atravessar a BHE. Uma das estratégias para superar este problema é a infusão direta de um fármaco no tecido cerebral através da implantação de uma sonda neuronal, sendo este conceito denominado como administração de fármacos por convecção (CED). A CED permite a administração de medicamentos localmente, reduzindo os seus efeitos nos tecidos saudáveis

e noutros órgãos [82–85].

Shin *et al.* [57] apresentaram sondas neuronais MEMS multifuncionais de múltiplas hastes, integradas monoliticamente com canais microfluídicos para administração de fármacos, guias de onda para estimulação neuronal e matrizes de microelétrodos para registo de sinais neuronais (figura 2.4 (a)). Estas estruturas de múltiplas hastes permitiram o mapeamento detalhado de circuitos neuronais de longo alcance entre diferentes regiões do cérebro a nível celular. A integração dos canais microfluídicos e das guias de onda é fundamental, pois as capacidades de estimulação ótica e de administração de fármacos são indispensáveis nos sistemas de sondas neuronais para um estudo aprofundado dos circuitos neuronais funcionais e para a modulação precisa dos circuitos neuronais *in vivo*. A sonda neuronal multifuncional constituída por quatro hastes (p. ex., S1, S2, S3 e S4), inclui canais microfluídicos, uma guia de onda em SU-8 e oito microelétrodos de Ir com uma área de $20\,\mu m \times 20\,\mu m$ em cada haste. Cada uma das hastes foi fabricada com um comprimento mínimo de 7 mm, uma largura de $128\,\mu m$, uma espessura de $40\,\mu m$ e um espaçamento entre hastes de $200\,\mu m$. Como o principal objetivo foi a investigação da conetividade funcional entre as regiões CA3 e CA1 no hipocampo de ratos, as hastes S1 e S2 foram implantadas na região CA3 e as hastes S3 e S4 foram implantadas na região CA1. A haste S1 foi fabricada com um comprimento adicional de $200\,\mu m$ em comparação com as outras três hastes, permitindo a sua implantação no lado esquerdo da região CA3. Consequentemente, a haste S1 foi integrada com funcionalidades duplas, possibilitando a aplicação de estímulos óticos e químicos na região CA3, enquanto esta e as outras hastes registavam sinais neuronais nas regiões CA3 e CA1. Para a modulação química, foi concebido um misturador microfluídico em espinha de peixe escalonado (μ-SHM) com duas entradas, integrado na haste S1. Este μ-SHM serviu como um componente essencial na mistura de dois fluidos distintos que exibem um fluxo laminar com baixo número de Reynolds. O μ-SHM foi integrado para permitir a administração simultânea de dois fármacos diferentes ou a administração de um único fármaco com variações de concentração em tempo real na região alvo do cérebro. Para avaliar o desempenho da sonda neuronal antes de esta ser utilizada em experiências *in vivo*, foram analisados três aspetos cruciais relacionados com as funcionalidades da mesma. A primeira análise foi o registo da impedância dos 32 microelétrodos de Ir, tendo sido obtida uma impedância média de $665\,k\Omega \pm 43\,k\Omega$ a 1 kHz. De seguida foi avaliada a irradiância emitida pela guia de onda, sendo utilizada uma luz com comprimento de onda (λ) de 473 nm (azul). Através de uma fibra ótica, foi fornecida uma potência ótica de 32 mW à guia de onda, sendo obtida uma irradiância de $757\,mW\,mm^{-2}$ na saída da guia de onda, garantindo assim o requisito mínimo optogenético até uma distância de $\sim 330\,\mu m$. Por fim, foi avaliado o desempenho dos canais microfluídicos incorporados ligados ao μ-SHM. Foram registadas as taxas de fluxo através dos canais microfluídicos

na haste S1, quer expostos ao ar ou inseridos num gel de agarose, aplicando uma pressão de entrada (70 kPa–170 kPa) nas duas entradas. Foi escolhido um gel de agarose a $0{,}9$ % w/v, representando uma matriz ligeiramente mais densa do que o cérebro, para garantir a infusão e a dispersão do fármaco no mesmo. Foram obtidas taxas de fluxo de 350 nL min^{-1} (ao ar) e de 230 nL min^{-1} a 100 kPa. Para investigar a interação funcional entre diferentes regiões do cérebro, é crucial estimular localmente uma ou mais regiões através de estímulos elétricos, químicos ou óticos, e monitorizar as atividades neuronais em áreas adjacentes. Por conseguinte, começou-se por validar a capacidade de fornecer estimulação ótica localizada, implantando a sonda neuronal simultaneamente na região CA1 do hipocampo e no córtex somatossensorial. Estas duas regiões foram deliberadamente escolhidas porque se sabe que existe uma conexão unidirecional do córtex somatossensorial ao hipocampo, e não vice-versa. Após a implantação, foram registados potenciais de ação espontâneos nas quatro hastes. Após um período de estabilização de 30 min, foi aplicada uma estimulação ótica na região CA1 utilizando a guia de onda presente na haste S1, ao mesmo tempo que eram registados os sinais neuronais provenientes das quatro hastes. Foi observada atividade neuronal evocada e sincronizada por pulsos de luz (1 Hz, *duty-cycle* de 50 %, irradiância de 167 mW mm^{-2} e uma potência ótica total de 100 µW) exclusivamente a partir da haste S1. Para uma análise precisa dos sinais neuronais, foi utilizado um algoritmo personalizado para classificar os potenciais de ação. Os gráficos *raster* dos sinais neuronais ordenados, revelaram diferenças quantitativas na taxa de disparo dos neurónios presentes no hipocampo. Em contraste, a taxa de disparo dos neurónios presentes no córtex somatossensorial permaneceu inalterada. Estes resultados confirmaram que a luz emitida através da guia de onda na haste S1 estimulou especificamente os neurónios próximos à área de estimulação, concluindo que a sonda neuronal multi-haste possibilitou a realização de estimulação ótica localizada. Foi também investigada a conetividade funcional na região CA3-CA1 como um dos circuitos trissinápticos do hipocampo de um rato, devido às ligações funcionais entre estas duas regiões através das colaterais de Schaffer. As hastes S1 e S2 foram implantadas na região CA3 e as hastes S3 e S4 na região CA1. Após a implantação e a confirmação de atividade neuronal espontânea em ambas as regiões, foi utilizada luz azul (473 nm) através do guia de onda na haste S1 para estimular os neurónios presentas em CA3 (1 Hz com um *duty-cycle* de 50 %, irradiância de 167 mW mm^{-2} e uma potência ótica total de 100 µW) enquanto eram registados os sinais neuronais nos 32 microelétrodos distribuídos pelas quatro hastes. Foram então registados potenciais de ação em CA3 evocados por pulsos de luz azul, bem como potenciais de ação em CA1 sincronizados com os sinais de CA3. Após análises detalhadas utilizando gráficos *raster* dos sinais neuronais e os respetivos histogramas de tempo peri-estímulo (PSTHs), foi confirmado que os neurónios piramidais de CA1 foram excitados quase simultaneamente pelas trans-

missões sinápticas de CA3 para CA1. Consequentemente, a taxa de disparo dos neurónios em CA3 e CA1 aumentou significativamente durante a estimulação ótica localizada na região de CA3. Para demonstrar a modulação da conetividade funcional através da transmissão sináptica entre CA3 e CA1, foi injetado o antagonista dos recetores de α-*amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid* (AMPA), *cyanquixaline* (CNQX) (20 µM, $0{,}25$ µL min^{-1}, 1 µL) e o antagonista dos recetores de *N-methyl-D-aspartate* (NMDA), *(2R)-amino-5-phosphonovaleric acid* (AP5) (50 µM, $0{,}25$ µL min^{-1}, 1 µL) através dos canais microfluídicos incorporados na haste S1. Após a injeção de CNQX e AP5 em CA3 durante quatro minutos, foram estimulados oticamente os neurónios na região CA3 vinte minutos depois, com o objetivo de garantir uma distribuição adequada e tempo de reação suficiente dos dois antagonistas dos recetores de CA3 para CA1. Quando CA3 foi estimulada oticamente, as atividades neuronais sincronizadas dos neurónios em CA1 diminuíram significativamente, apesar do aumento persistente das atividades dos neurónios em CA3. Isto deveu-se ao facto de a via excitatória entre CA3 e CA1 ter sido bloqueada pelos antagonistas administrados através da haste S1. Foram também comparadas as atividades neuronais em CA3 e CA1 antes e depois da estimulação ótica e após a injeção dos antagonistas. As taxas de disparo estimadas a partir dos gráficos *raster* em pilha e dos PSTHs estavam em excelente concordância com as evoluções temporais dos potenciais de ação registados a partir da sonda neuronal. Resumindo, ao administrar CNQX e AP5 através dos canais microfluídicos, a sonda neuronal multifuncional de múltiplas hastes conseguiu modular com sucesso a via excitatória do hipocampo entre os neurónios piramidais de CA3 e CA1.

Sharma *et al.* [86] apresentaram uma *optrode* multifuncional que integra uma sonda neuronal de Si com um canal microfluídico e uma fibra ótica de vidro numa estrutura compacta (figura 2.4 (b)). Esta configuração pretende minimizar o refluxo da solução injetada, permitindo uma administração localizada e a aplicação de luz intensa sem aumentar a inflamação ao redor das sondas de registo. Foi demonstrado, pela primeira vez, a utilização de um dispositivo para a administração de solução viral, implantação crónica durante várias semanas para permitir a expressão viral e fotoestimulação de neurónios próximos ao local de administração, enquanto é registada a atividade neuronal tanto na área de administração como nas áreas adjacentes, em ratos acordados que se deslocavam livremente. Foram concebidas sondas microfluídicas baseadas em Si, constituídas por um único canal microfluídico com 11 µm de largura e 32 microelétrodos de registo de IrOx, com 30 µm de diâmetro, numa haste afilada com $7{,}5$ mm de comprimento e uma secção transversal de 150 µm $\times$ 50 µm. Os microelétrodos foram distribuídos numa distância de $2{,}3$ mm da ponta da sonda, com um *pitch* de 60 µm na ponta da haste (microelétrodos 1–16) e de 85 µm na parte superior da haste (microelétrodos 17–32). Esta configuração foi concebida de modo a que quando a *optrode* é implantada no cérebro de ratos, metade dos microelétrodos de registo

estejam localizados no córtex pré-límbico (PL) e a outra metade no córtex infra-límbico (IL). Cada sonda contém um único canal microfluídico que termina em dois orifícios de saída estreitamente espaçadas. Estes orifícios foram especialmente concebidos para estarem situados apenas num dos lados da haste da sonda. Foram concebidas duas versões diferentes da sonda microfluídica, diferenciadas pela localização da saída de fluido ao longo do comprimento da haste. A sonda IL apresenta orifícios de saída de fluido na parte inferior da haste, enquanto que a sonda PL apresenta orifícios de saída de fluido na parte superior da haste. As sondas microfluídicas foram combinadas com fibras óticas de vidro para obter duas configurações de *optrode*. A ponta da fibra ótica foi orientada para uma posição $150\,\mu m \pm 100\,\mu m$ acima das portas microfluídicas tanto na *optrode* configurada para PL como para IL. Esta disposição permite administrar e visar optogeneticamente uma área (PL ou IL) enquanto é registada a atividade neuronal em ambas as áreas. Na *optrode* configurada para PL, a ponta da fibra foi posicionada perto da parte superior da haste, direcionando a fotoestimulação para o PL. Na *optrode* configurada para IL, a ponta da fibra foi posicionada perto da parte inferior da haste, direcionando a fotoestimulação para o IL. Após o fabrico da *optrode* multifuncional, esta foi analisada para obter as suas caraterísticas elétricas e microfluídicas. Os microelétrodos de IrOx apresentaram, em média, um valor de impedância de $168\,k\Omega \pm 9\,k\Omega$ a 1 kHz. Para uma sonda PL com um canal microfluídico de $11\,\mu m$ de largura e $9{,}6$ mm de comprimento, foi obtido uma taxa de fluxo de $167\,nL\,min^{-1}$ a 100 kPa. Para demonstrar a administração simultânea e o registo eletrofisiológico *in vivo*, foi utilizada uma sonda microfluídica configurada para PL para administrar localmente um agente farmacológico conhecido por induzir um efeito significativo na atividade neuronal. Foi realizada uma implantação aguda, administrando bicuculina, antagonista dos recetores γ-*aminobutyric acid* (GABA), enquanto era registada a atividade neuronal com a sonda microfluídica. Foi observado um aumento claro da atividade neuronal imediatamente após a administração, sob a forma de LFP, bem como no aumento da taxa de disparo de neurónios individuais. Foi também testada a viabilidade da *optrode* multifuncional para uma implantação crónica com administração viral de ChR2, estimulação optogenética e registo eletrofisiológico. Foi utilizada a optrode configurada para PL, que administrou o vetor viral AAV5-hSyn-ChR2-eYFP através do canal microfluídico da sonda durante a cirurgia de implantação. Após aguardar seis semanas pós-implantação, garantindo assim uma expressão viral suficiente, verificou-se uma resposta optogenética através do registo de potenciais de ação, limitada aos microelétrodos posicionados na parte superior da haste da sonda, localizada na região alvo do PL. Com base nestes resultados, foi validada a *optrode* multifuncional como uma ferramenta eficaz na administração viral direcionada e manipulação optogenética, combinada com registo eletrofisiológico em animais que se deslocavam livremente.

Mu *et al.* [87] apresentaram um método capaz de integrar estruturas microfluídicas em sondas neuronais através da impressão 3D aditiva por polimerização de dois fotões (figura 2.4 (c)). Esta tecnologia de impressão 3D oferece um elevado grau de flexibilidade no processo de fabrico, ao construir microestruturas 3D camada a camada, permitindo a impressão direta de canais microfluídicos nas hastes das sondas neuronais, ao mesmo tempo que são criados conetores fluídicos personalizados na base da sonda. É relevante salientar que este método evita alterações nos processos de microfabricação em Si para sondas neuronais, que em casos de fluxos de processos avançados de fabrico em fundição, podem ser proibitivamente dispendiosos e morosos na sua modificação para integração monolítica de microfluídica. Uma das sondas neuronais fotónicas fabricadas com um canal microfluídico impresso em 3D consistiu numa base com $1{,}7$ mm de largura e $2{,}7$ mm de comprimento, e uma haste de 4 mm de comprimento. A haste da sonda é composta por guias de onda de nitreto de silício (SiN), pistas de metal de Al e microelétrodos de TiN, com uma espessura de aproximadamente 100 µm. Um conjunto de acopladores de fibra ótica para chip, localizados ao longo da superfície da base da sonda, direcionam a luz para o chip a partir de uma fibra ótica. As guias de onda conduzem a luz ao longo da haste, terminando na extremidade distal, onde estão localizadas *gratings* de emissão. Cada *grating* tem uma largura de 6 µm e um comprimento de 25 µm, com um *pitch* de 400 nm e um *duty-cycle* de 50 %, resultando num feixe emitido de baixa divergência. O canal microfluídico impresso em 3D na sonda apresenta um comprimento total de $4{,}3$ mm, com a entrada localizada na base da sonda e a saída na haste. As dimensões externas do canal na haste são de 80 µm de largura e 30 µm de altura, enquanto as dimensões internas são de 70 µm de largura e 18 µm de altura. Um conetor fluídico de 1 mm de comprimento na base da sonda facilita a ligação a um tubo de entrada, com um diâmetro de entrada de 750 µm. Após o fabrico da sonda neuronal, foram obtidas as caraterísticas fluídas e óticas da mesma. A sonda neuronal foi inserida $1{,}5$ mm num bloco de gel de agarose a 1 % w/v, corante vermelho foi injetado pelo canal microfluídico a 10 µL min^{-1}, e o perfil de difusão do corante foi visualizado por câmaras alinhadas à frente e ao lado da haste da sonda. Após 3 s, o perfil de difusão do corante apresentava extensões transversais e axiais de aproximadamente $0{,}33$ mm e $0{,}36$ mm, respetivamente, abrangendo duas *gratings* de emissão. Passados 13 s, a extensão axial aumentou para cerca de $0{,}6$ mm, cobrindo três das quatro *gratings* de emissão na haste. Foi medida uma resistência de fluxo do canal microfluídico de ~ 30 kPa min µL^{-1}, sendo esta considerada moderada. De seguida, foram realizadas medições da transmissão ótica e dos perfis dos feixes. A transmissão foi definida como a eficiência do sistema de varrimento ótico, da fibra e da sonda neuronal combinados, ou seja, a relação entre a potência ótica emitida pelas *gratings* e a potência do laser de entrada no sistema de varrimento ótico. A transmissão a um λ de 473 nm variou de -27 dB a -20 dB, com uma mediana de

aproximadamente -22 dB, nas *gratings* na sonda. A variação significativa na transmissão foi atribuída a pequenos desalinhamentos que ocorreram durante a fixação da fibra à superfície do chip da sonda. Os perfis de feixe superior e lateral da sonda neuronal foram observados numa solução de fluoresceína, onde uma luz emitida de 473 nm excitou a fluoresceína e microscópios de fluorescência posicionados acima e ao lado da sonda capturaram a fluorescência gerada. Foi observado um ângulo médio de emissão de cerca de $19°$ relativamente à normal da haste. Foram também avaliados os perfis de feixe na direção vertical, sendo que a largura a meia altura (FWHM) média do feixe após percorrer uma distância de 300 µm foi de cerca de 37 µm. Os perfis do feixe em gel de agarose foram também caraterizados pela adição de fluoresceína no bloco de gel de agarose. A única diferença obtida em relação à solução de fluoresceína foi uma diminuição da FWHM para 33 µm. Como demonstração de prova de conceito, as sondas foram validadas para fotólise a 405 nm da fluoresceína *caged* em solução e em tecido cerebral fixo, demonstrando um *uncaging* localizado e endereçável.

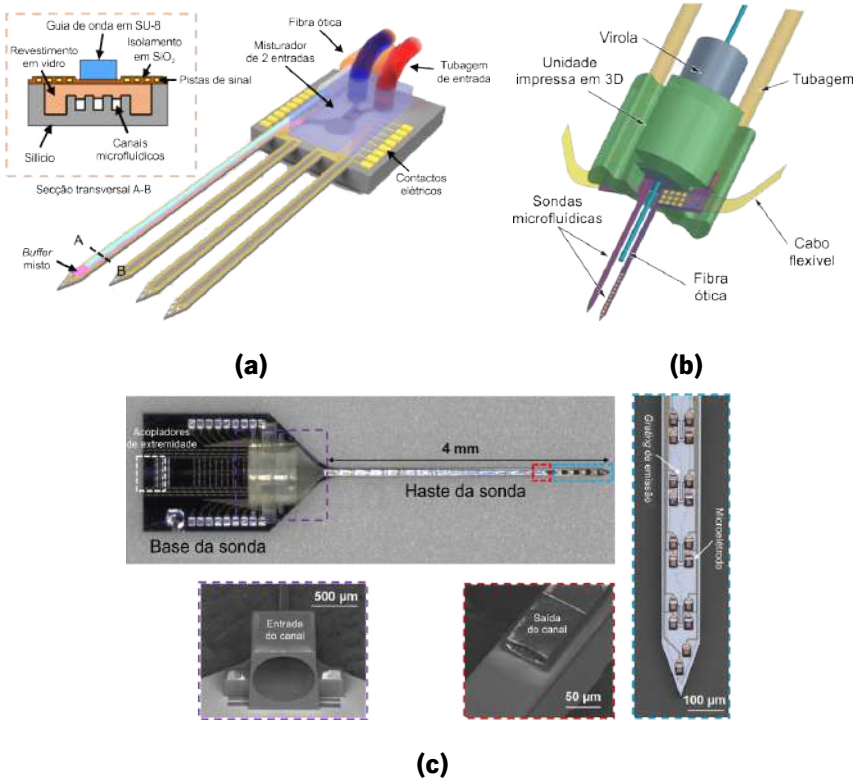


Figura 2.4: Representação de sondas neuronais padronizadas em substratos rígidos com interação microfluídica: (a) Esquemático do dispositivo multifuncional multi-haste com secção transversal da haste da sonda (figura adaptada de [57]); (b) Esquemático de uma *optrode* multifuncional baseada em sondas neuronais microfluídicas e numa fibra ótica (figura adaptada de [86]); (c) Fotografias e imagens SEM da sonda neuronal fotónica com um canal microfluídico impresso em 3D [87].

2.2 Sondas Neuronais Flexíveis

A resposta imunitária gerada pelo tecido neuronal devido à presença de uma sonda neuronal rígida pode ser minimizada com a utilização de sondas neuronais que imitam a flexibilidade, a suavidade e os movimentos à escala micro do cérebro [88]. Nos últimos anos, foram desenvolvidas sondas neuronais flexíveis e de base polimérica para atenuar o desfasamento entre a sonda e o cérebro e todos os seus efeitos, numa tentativa de manter a viabilidade da sonda e melhorar a qualidade dos sinais registados [46–50]. Alguns dos polímeros mais comuns utilizados na implementação de sondas neuronais flexíveis são a PI [51], o *parylene-C* [89], o PDMS [40] e o SU-8 [90]. O módulo de *Young* destes situa-se entre 1 MPa e 5 GPa [51]. A flexibilidade de uma sonda neuronal representa um desafio durante a sua inserção no cérebro, devido à forte possibilidade de deformação da mesma. No entanto, existem algumas estratégias para ultrapassar esse desafio, nomeadamente revestir as sondas com moléculas absorvíveis que conferem uma rigidez temporária à sonda (p. ex., *polyethylene glycol* (PEG)) ou, ainda, utilizar transportadores/auxiliadores mecânicos para guiar as sondas às regiões cerebrais de interesse [51].

Recentemente, a evolução das sondas neuronais flexíveis em termos das suas funções e aplicabilidade foi marcada com o aparecimento de sondas que integram não só elementos elétricos mas também óticos [91] (p. ex., µ-LEDs), sondas com uma elevada densidade de microelétrodos [92], ou ainda sondas que integram microcanais para a administração de químicos [40].

2.2.1 Interação Elétrica

Como mencionado anteriormente, uma interface neuronal é definida como um substrato isolado com contactos elétricos para registar ou estimular a atividade neuronal. As sondas neuronais flexíveis surgiram na década de 2000, principalmente para superar a incompatibilidade mecânica entre as sondas rígidas e o tecido neuronal. Além disso, as sondas neuronais flexíveis são especialmente adequadas para registos *in vivo* a longo prazo (experiências neuronais crónicas), mesmo para sondas neuronais maiores que podem integrar um maior número de locais de registo [93, 94]. Como exemplo, Vomero *et al.* [94] relataram que as sondas neuronais flexíveis de PI de maiores dimensões (100 µm de largura) podem levar a mais alterações celulares e moleculares na interface sonda/tecido, mas não comprometem a qualidade dos registos *in vivo*, pelo menos no prazo de 12 semanas, em comparação com as sondas neuronais de PI mais finas (30 µm de largura).

A PI é um dos substratos poliméricos mais utilizados para a implementação de sondas neuronais com interação elétrica. A PI pode ser dividida em dois tipos principais, fotossensível e não-fotossensível.

Rousche *et al.* [95] apresentaram um conjunto de elétrodos intracorticais flexíveis à base de PI fotossensível. O dispositivo de quatro hastes tem dois microelétrodos por haste, elétrodos de Au padronizados em PI. Após o fabrico do dispositivo utilizando tecnologias padrão, foram estudadas as caraterísticas elétricas e mecânicas, utilizando medições de impedância e testes de flambagem. Além disso, foram efetuados testes de capacidade bioativa para avaliar o desempenho a longo prazo da matriz à base de PI. Foi confirmado o potencial deste tipo de interface para aplicações a longo prazo de implantes no cérebro. A capacidade de registo desta interface foi também avaliada através da sua implantação em ratos (após incisão das meninges), tendo sido obtidos registos de atividade neuronal de múltiplas unidades cerebrais em animais anestesiados e completamente acordados. Takeuchi *et al.* [96] apresentaram uma matriz 3D flexível de sondas neuronais fabricada em PI não-fotossensível. Cada sonda tem três elétrodos de registo em titânio (Ti), sendo primeiro padronizados num substrato de PI. Além disso, as sondas possuem uma placa magnética na parte de trás (eletrodeposição de níquel (Ni)), formando-se uma estrutura 3D) quando aplicado um campo magnético. Foram utilizadas tecnologias de microfabricação padrão para a implementação das sondas. O conjunto foi caraterizado em termos da impedância dos elétrodos e inserido num rato anestesiado (após remoção da dura-máter), registando com êxito a atividade neuronal espontânea do córtex visual. Xiang *et al.* [97] relataram uma sonda neuronal flexível ultra-fina fabricada em PI não-fotossensível com quatro microelétrodos de Au. O fabrico deste dispositivo ultra-fino, utilizando várias técnicas de microfabricação, reduz ainda mais a resposta imunitária do tecido cerebral. No entanto, foi revestida uma camada de maltose biocompatível e biodegradável na sonda neuronal para facilitar a sua implantação, sendo esta camada facilmente dissolvida pelos fluidos corporais. Além disso, os microelétrodos de Au foram revestidos com uma camada de nanotubos de carbono (CNTs) para diminuir a impedância dos microelétrodos, melhorando as capacidades de registo. Esta sonda foi caraterizada em termos de impedância, confirmando a redução da impedância com os CNTs. Adicionalmente, foram efetuados testes de flambagem e de dissolução de maltose, comprovando a viabilidade da sonda. Finalmente, a sonda ultra-fina foi inserida num rato anestesiado, registando com sucesso a atividade neuronal espontânea do hipocampo. Pimenta *et al.* [92] relataram uma sonda neuronal flexível de dupla camada com alta densidade de elétrodos de Au estreitamente espaçados, fabricada em PI não-fotossensível. O fabrico desta sonda baseou-se em procedimentos padrão de microfabricação e de sala limpa. O design de camada dupla da sonda proporcionou um maior número de elétrodos (16×2) e uma rigidez adicional ao dispositivo, evitando a deformação da sonda durante a sua implantação. O processo de fabrico foi totalmente validado com a análise da composição química e a metrologia das propriedades elétricas, estruturais e mecânicas do dispositivo, através de espetroscopia dispersiva de raios-X (EDS)

e espetroscopia de fotoeletrões excitados por raios-X (XPS), espetroscopia de impedância eletroquímica (EIS), microscopia eletrónica de varrimento (SEM) e ensaios de tração e de compressão. A aplicabilidade da sonda neuronal fabricada foi também avaliada através de testes *in vivo* em ratos, registando a atividade neuronal espontânea e evocada do córtex com uma elevada razão sinal-ruído (SNR) e um trauma agudo reduzido. Finalmente, foi também avaliada a pegada de inserção, ou seja, o tamanho do orifício no córtex do rato após a implantação da sonda, que corresponde aproximadamente às dimensões da sonda neuronal (haste com comprimento de 6 mm e secção transversal de $150\,\mu\text{m} \times 24\,\mu\text{m}$). Guo *et al.* [98] apresentaram um dispositivo BMI flexível para registo neuronal minimamente invasivo. A BMI contém um substrato flexível de PI fotossensível com uma espessura ultra-fina e uma guia de Si concebida para uma implantação precisa. Este dispositivo foi implementado com processos convencionais de microfabricação. Foram padronizados oito elétrodos de diferentes diâmetros e distribuídos uniformemente para o registo do LFP e dos potenciais de ação, sendo eletrodepositada Ptb para aumentar a capacidade de armazenamento de cargas (CSC) e reduzir a impedância dos elétrodos. Para garantir a fixação entre o substrato flexível e a guia durante a implantação, foi aplicado PEG para unir temporariamente o substrato flexível à ponta da guia. As propriedades mecânicas da BMI foram avaliadas através de um sistema de análise termomecânica dinâmica e de testes de flambagem. Foi também efetuada uma caraterização eletroquímica dos elétrodos, antes e depois da eletrodeposição de Ptb, através de voltametria cíclica (CV) e EIS. A BMI flexível desenvolvida foi validada através da sua implantação no córtex motor primário de um rato, onde foram registados com sucesso, 30 dias após a implantação, potenciais de ação e LFP. Para avaliar a biocompatibilidade do dispositivo *in vivo*, foi realizada uma histologia *post-mortem* 30 dias após a implantação. Uma sonda neuronal de controlo ($30\,\mu$m de espessura) com a mesma largura foi implantada na mesma região cerebral. No caso do dispositivo BMI ultra-fino, verificou-se um menor encapsulamento glial e uma maior densidade de neurónios em torno do local de implantação, sendo o dispositivo responsável por uma menor cavidade tecidular, sugerindo assim uma baixa citotoxicidade do substrato de PI selecionado.

O *parylene-C* é também amplamente utilizado como substrato flexível para o fabrico de sondas neuronais com interação elétrica. Castagnola *et al.* [99] apresentaram uma sonda neuronal flexível de *parylene-C* com microelétrodos de Au revestidos com *poly(3,4-ethylenedioxythiophene)* (PEDOT). A sonda neuronal foi fabricada usando tecnologias padrão e eletropolimerização. Os microelétrodos revestidos com PEDOT foram caraterizados usando EIS e CV, comprovando a sua viabilidade para registos neuronais. Foram também realizadas medições eletrofisiológicas (*in vivo* em ratos anestesiados e em fatias de cérebro *in vitro*), confirmando que os elétrodos revestidos com PEDOT permitem o registo de bons

sinais eletrofisiológicos com um SNR muito elevado. Zhao *et al.* [100] relataram uma sonda neuronal flexível baseada numa haste de tubo de *parylene-C* com um comprimento de $18{,}2$ mm, que pode atingir estruturas cerebrais profundas. Este dispositivo integra elétrodos de Au, foi implementado com processos convencionais de microfabricação e foi caraterizado mecanicamente (testes de força de inserção) e eletroquimicamente (EIS). Finalmente, a sonda foi testada em ratos anestesiados, permitindo o registo de LFP da amígdala, sendo esta uma das regiões mais profundas do cérebro. Wang *et al.* [89] apresentaram a conceção, fabrico, caraterização e implementação *in vivo* de uma matriz de sondas neuronais em *parylene-C* com 64 elétrodos de Pt. Estes encontram-se propositadamente posicionados em 8 hastes individuais, para corresponder anatomicamente a regiões específicas do hipocampo, permitindo o registo da atividade em regiões cerebrais profundas em ratos que se deslocavam livremente. As matrizes foram fabricadas utilizando técnicas de micromaquinagem de superfície e reforçadas mecanicamente para evitar a deformação durante a implantação cirúrgica. A técnica de suporte mecânico envolveu um suporte de polímero biodegradável que cobre parcialmente a haste, reduzindo assim temporariamente o comprimento da haste sem suporte durante a implantação e, consequentemente, aumentando a sua rigidez, permitindo assim o acesso a regiões cerebrais mais profundas, preservando ao mesmo tempo uma área de secção transversal baixa. As propriedades mecânicas resultantes das hastes reforçadas foram avaliadas através de testes de flambagem e de força de inserção e os microelétrodos avaliados eletroquimicamente através de CV e EIS. As matrizes foram depois implementadas *in vivo* em ratos que se moviam livremente, obtendo-se registos agudos e crónicos das células piramidais nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo.

O SU-8 é também utilizado para o fabrico de sondas neuronais flexíveis com interação elétrica. Altuna *et al.* [101] apresentaram uma sonda baseada em SU-8 com elétrodos planares de Au para aquisição de atividade neuronal. A sonda neuronal foi implementada usando processos convencionais de microfabricação. A viabilidade dos elétrodos de Au foi confirmada através de EIS. Finalmente, a sonda neuronal foi implantada no hipocampo dorsal de um rato anestesiado, registando com sucesso potenciais de ação e LFP. Marchoubeh *et al.* [102] apresentaram uma sonda em SU-8 com um conjunto de nove elétrodos microbanda de Au, para a deteção de baixas concentrações de químicos em espaços confinados e estudos *in vivo* de tecidos biológicos. Estes elétrodos são adequados para experiências de ciclo redox (geração-recolha) em que é possível uma ativação/desativação seletiva. Os elétrodos foram fabricados com modificações aos procedimentos litográficos padrão, e a forma da sonda foi obtida por corte a laser. As propriedades eletroquímicas dos elétrodos foram avaliadas através de CV e de ciclos redox. O ciclo redox envolveu a ativação simultânea de cinco elétrodos de banda adjacentes na matriz, em que o segundo

e o quarto foram colocados em curto-circuito para servirem de geradores e o primeiro, o terceiro e o quinto foram colocados em curto-circuito para servirem de coletores, produzindo um comportamento previsível e limites de deteção para um composto modelo e para a dopamina. A avaliação dos danos nos tecidos cerebrais foi efetuada após a implantação de três dispositivos diferentes no estriado dorsal de um rato anestesiado. Os dispositivos utilizados foram uma sonda de microdiálise, um elétrodo de fibra de carbono e uma sonda "SU-8 em branco" (substrato SU-8 sem microelétrodos padronizados). A sonda em SU-8 mostrou danos relativamente baixos nos tecidos, oferecendo as vantagens dos elétrodos de fibra de carbono simples mais pequenos, mas com as capacidades adicionais de elétrodos múltiplos e ciclos redox. Chik *et al.* [103] reportaram uma sonda neuronal baseada numa estrutura de suporte de SU-8 e num conjunto de microelétrodos de Au altamente flexíveis, com revestimentos eletrodepositados de hidrogel *poly(2-hydroxyethyl methacrylate)* (pHEMA) e polímero condutor *poly(3,4-ethylenedioxythiophene) polystyrene sulfonate* (PEDOT:PSS). O pHEMA serviu de amortecedor entre o tecido e a camada de PEDOT:PSS, protegendo o tecido neuronal do reduzido desfasamento mecânico, reduzindo o efeito de quaisquer forças externas a atuar sobre a camada de PEDOT:PSS e evitando a delaminação do mesmo. O pHEMA também possui uma elevada capacidade de adesão celular, o que pode ajudar os microelétrodos a fixarem-se aos neurónios e reduzir o seu movimento relativo causado pelo movimento do cérebro. O fabrico dos microelétrodos consistiu na junção de métodos fotolitográficos e eletropolimerização para a deposição de PEDOT:PSS e pHEMA de modo a ficarem confinados apenas à área dos microelétrodos padronizados em Au. Os microelétrodos foram caraterizados eletroquimicamente através de EIS e CV para a obtenção da sua impedância, CSC e capacidade máxima segura de entrega de cargas (CIC_{max}). Foram também efetuados testes de inserção da sonda neuronal num fantoma cerebral ($0{,}6\,\%$ gel de agarose). A sonda neuronal foi validada em testes eletrofisiológicos agudos e crónicos *in vivo* na região do hipocampo do cérebro de um rato. Após a implantação da sonda neuronal foram registados potenciais de ação espontâneos. Em seguida, foi validada a capacidade de estimulação da sonda para produzir alterações fisiologicamente realistas nas atividades neuronais na região do hipocampo. Por fim, foram realizados testes para demonstrar a capacidade e a estabilidade da sonda no registo neuronal crónica (3 semanas) em ratos que se deslocavam livremente, com a implantação da sonda no hipocampo.

Nos parágrafos anteriores foram apresentadas algumas das sondas neuronais com interação elétrica mais relevantes, padronizadas em substratos flexíveis (resumidas na tabela 2.1). A figura 2.5 apresenta exemplos de sondas neuronais, mais especificamente padronizadas em PI não-fotossensível (figura 2.5 (a)), PI fotossensível (figura 2.5 (b)), *parylene-C* (figura 2.5 (c)) e SU-8 (figura 2.5 (d)). É importante referir que a principal desvantagem das sondas neuronais flexíveis é a sua dificuldade de

implantação no cérebro. As três principais estratégias relatadas na literatura para ultrapassar esse problema são: (i) uso de uma guia de inserção (p. ex., microfio de W, microfio de aço inoxidável, guia de Si, ou guia de diamante) [95, 100, 104–106]; (ii) revestimento da haste com uma camada biocompatível e biodegradável (p. ex., maltose, PEG, sacarose ou hidrogel) [46, 47, 97, 105, 106]; e (iii) aumento da espessura da haste da sonda neuronal (p. ex., multicamada polimérica) [92, 101].

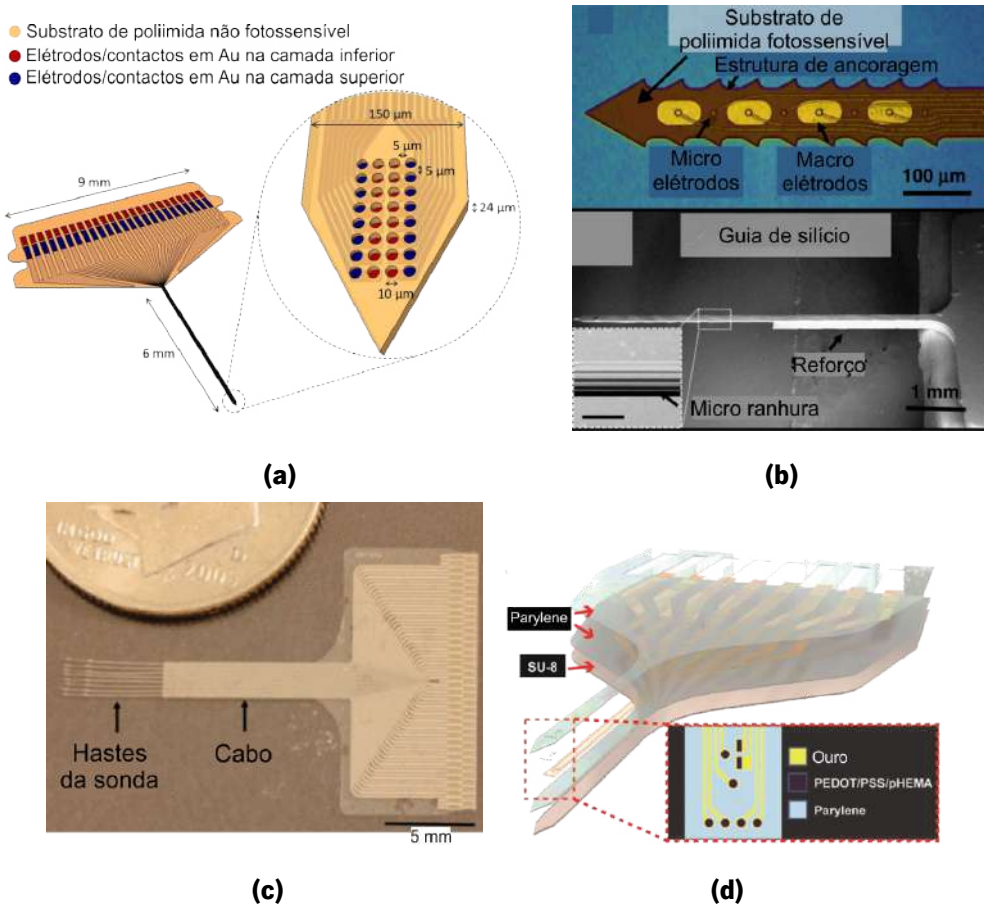


Figura 2.5: Representação de sondas neuronais padronizadas em diferentes substratos flexíveis com interação elétrica: (a) Sonda neuronal padronizada em substrato de PI não-fotossensível [92]; (b) Sonda neuronal padronizada em substrato de PI fotossensível [98]; (c) Sonda neuronal padronizada em substrato de *parylene-C* (© 2020 IEEE. Figura reproduzida, com autorização, de [89]); (d) Sonda neuronal padronizada em substrato de SU-8 (figura reproduzida com autorização de © 2022 *John Wiley & Sons, Inc.*, de [103]; autorização veiculada através de *Copyright Clearance Center, Inc.*).

Outras interfaces neuronais flexíveis podem também ser referidas, incluindo interfaces flexíveis com uma densidade ultra-elevada de elétrodos [107], interfaces flexíveis nanoeletrónicas [108–110], interfaces neuronais injetáveis em forma de malha [111–113], matrizes flexíveis de eletrocorticografia (ECoG) superficial [114–116] e interfaces com interação elétrica em conjunto com interações óticas e microfluí-

dicas, sendo estas exploradas nas secções 2.2.2 e 2.2.3, respetivamente.

Recentemente, foram desenvolvidos uma série de dispositivos eletrónicos inteligentes e flexíveis, utilizando substratos de polímeros elásticos e polímeros condutores avançados. Embora os polímeros condutores convencionais sejam macios, eles não são extensíveis, o que limita a sua utilização em bioeletrónica altamente extensível [117]. Para superar este obstáculo, Jiang *et al.* [118] desenvolveram uma rede de polímeros supramoleculares destinada à construção de bioeletrónica altamente condutora e extensível (figura 2.6 (a)). Foi concebido um aditivo supramolecular reticulado, composto por uma estrutura de PEG e *cyclodextrins* (CDs) deslizantes implementadas com cadeias laterais de *PEG methacrylate* (PEGMA). Ao incorporar este reticulador supramolecular com PEDOT:PSS, conseguiram desenvolver uma nova rede supramolecular com três avanços significativos na bioeletrónica flexível: (i) alta condutividade de aproximadamente $2700\,\mathrm{S\,cm^{-1}}$ a $0\,\%$ de deformação e cerca de $6000\,\mathrm{S\,cm^{-1}}$ a $100\,\%$ de deformação; (ii) elevada elasticidade, sem formação de fissuras, mesmo com uma deformação de pelo menos $100\,\%$; e (iii) fotolitografia direta até $2\,\mu\mathrm{m}$. Liu *et al.* [119] reportaram a utilização de PEDOT:PSS na sintetização de hidrogeis eletricamente condutores (ECHs) e fabricaram dispositivos eletrónicos elásticos baseados nestes ECHs (figura 2.6 (b)). Ao incorporar líquidos iónicos na solução de PEDOT:PSS, foram obtidos geis iónicos com redes interligadas de PEDOT:PSS. Posteriormente, utilizaram geis iónicos e polímeros elastoméricos fluorados para desenvolver componentes eletrónicos extensíveis, com os geis iónicos convertidos em hidrogeis de PEDOT:PSS puro e altamente condutores através de um processo de troca de água e hidratação. O dispositivo apresentou um módulo de *Young* na ordem de $10\,\mathrm{kPa}$.

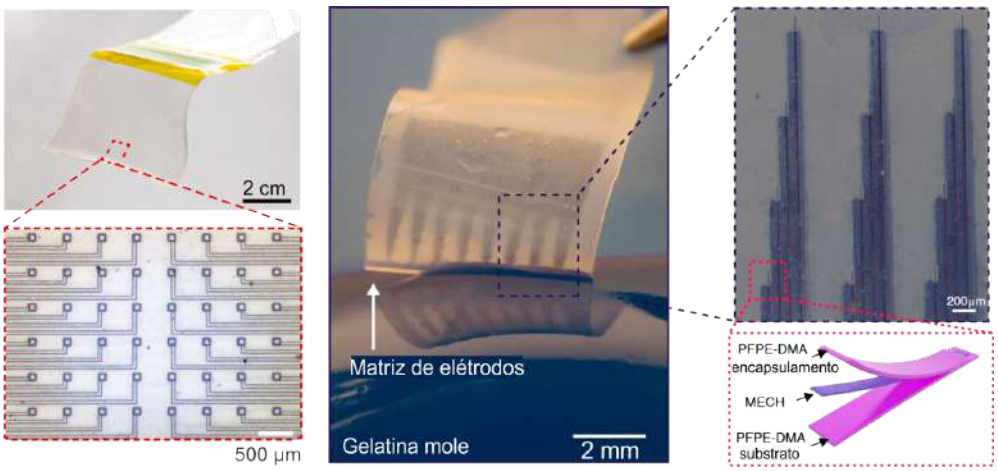


Figura 2.6: Representação de dispositivos eletrónicos inteligentes e flexíveis, utilizando substratos de polímeros elásticos e polímeros condutores avançados: (a) Fotografia e imagem microscópica de uma matriz de elétrodos extensíveis que permite a monitorização eletrofisiológica estável de tecidos deformáveis (figura adaptada de [118]); (b) Fotografia, imagem microscópica e esquemático de um dispositivo eletrónico elástico baseado em ECHs (figura adaptada com autorização de *Springer Nature*, de [119]).

Tabela 2.1: Sondas neuronais padronizadas em substratos flexíveis com interação elétrica.

Referência	Substrato	Microelétrodos	Tecnologias de fabrico	Caraterização e/ou validação
Rousche et al. [95]	PI fotossensível	Au	Litografia Evaporação por feixe de eletrões (e-beam) Evaporação térmica Corrosão iónica reativa (RIE) Corrosão química em solução aquosa	EIS Testes de flambagem Testes de capacidade bioativa Testes *in vivo* em ratos
Takeuchi et al. [96]	PI não-fotossensível	Ti	Litografia Eletrodeposição Evaporação térmica RIE Corrosão iónica reativa profunda (DRIE) Corrosão química em solução aquosa	EIS Testes *in vivo* em ratos

Xiang et al. [97]	PI não-fotossensível	Au revestido com CNTs	Litografia e-beam Evaporação térmica RIE Dissolução anódica de metais Deposição eletroforética (EPD)	EIS Testes de flambagem Testes de dissolução de maltose Testes *in vivo* em ratos
Pimenta et al. [92]	PI não-fotossensível	Au	Litografia RIE Corrosão química em solução aquosa CVD Pulverização catódica por corrente contínua (DC)	EIS Análise química Testes estruturais e mecânicos Testes *in vivo* em ratos Avaliação da pegada de inserção

Guo et al. [98]	PI fotossensível	Au revestido a Ptb	Litografia Evaporação térmica Pulverização catódica por DC Corrosão por feixe de iões (IBE) DRIE Deposição química de vapores assistida por plasma (PECVD) RIE Eletrodeposição	EIS CV Análise termomecânica dinâmica Testes de flambagem Testes *in vivo* em ratos Histologia post-mortem
Castagnola et al. [99]	*Parylene-C*	Au revestido com PEDOT	Litografia e-beam RIE CVD Eletropolimerização	EIS CV Testes *in vitro* em fatias de cérebro Testes *in vivo* em ratos
Zhao et al. [100]	*Parylene-C*	Au	Litografia Evaporação térmica Corrosão química em solução aquosa DRIE	EIS Testes de força de inserção Testes *in vivo* em ratos

Wang et al. [89]	*Parylene-C*	Pt	Micromaquinagem de superfície CVD Fotolitografia RIE e-beam DRIE Tratamento térmico	EIS CV Testes de flambagem Testes de força de inserção Testes *in vivo* em ratos
Altuna et al. [101]	SU-8	Au	Litografia Pulverização catódica por DC Corrosão química em solução aquosa Dissolução anódica de metais	EIS Terstes *in vivo* em ratos
Marchoubeh et al. [102]	SU-8	Au	Fotolitografia Evaporação térmica Corrosão química em solução aquosa Micromaquinagem a laser	CV Avaliação de ciclo redox Testes *in vivo* em ratos Histologia *post-mortem*
Chik et al. [103]	SU-8	Au revestido com pHEMA e PEDOT:PSS	Fotolitografia Evaporação térmica RIE Eletropolimerização	EIS CV Testes de força de inserção Testes *in vivo* em ratos

2.2.2 Interação Ótica

Diversos investigadores descreveram estudos optogenéticos utilizando fibras óticas alinhadas e fixas a sondas neuronais com elétrodos padronizados [31, 86, 92], permitindo a estimulação ótica e o registo da atividade neuronal. Esta abordagem não permite a proximidade entre os elementos elétricos e óticos e não é escalável [75]. Nos últimos anos, surgiram outras abordagens, nomeadamente sondas neuronais que integram elementos elétricos e óticos, as quais são interfaces cruciais para estudos de optogenética. Estes elementos óticos incluem μ-LEDs integrados próximos aos elétrodos ou guias de onda padronizadas ao longo do eixo de uma sonda neuronal [51, 75, 77].

A integração de μ-LEDs em sondas neuronais tem sido utilizada para estimulação ótica, mas predominantemente em substratos rígidos, devido aos desafios associados à incorporação de μ-LEDs em substratos flexíveis. À medida que os dispositivos optogenéticos implantáveis se tornaram flexíveis, macios e miniaturizados, o processo de microfabricação e a conceção das sondas μ-LEDs implantáveis ganharam importância para superar os desafios térmicos, mecânicos e geométricos entre os dispositivos e os tecidos [77].

Kim *et al.* [120] apresentaram um sistema optoeletrónico flexível, implantável e recarregável sem fios, que pode ser controlado remotamente e de forma seletiva através de um *smartphone* (figura 2.7 (a)). Combinando as caraterísticas vantajosas de designs alimentados por bateria e sem bateria, este sistema de dispositivos permite uma implantação completa e sem complicações em animais, um funcionamento fiável em qualquer lugar e um carregamento sem fios sem necessidade de intervenção, todos eles aspetos desejáveis para a optogenética crónica *in vivo*. O sistema optoeletrónico sem fios é composto por quatro partes funcionais principais: (i) sondas neuronais optoeletrónicas em substrato de PI para fotoestimulação através de micro díodos inorgânicos emissores de luz (μ-ILEDs); (ii) um circuito de gestão de energia com uma antena de bobine flexível e uma bateria recarregável de polímero de lítio (LiPo) para carregamento e funcionamento sem fios; (iii) um *Bluetooth Low Energy System-on-Chip* (BLE SoC) para controlo sem fios; e (iv) um encapsulamento de PDMS, *parylene-C* e *Ecoflex GEL*, garantindo assim a biocompatibilidade do dispositivo. O sistema de carregamento sem fios foi validado através de uma operação simulada *in vivo* num recipiente com um solução salina ($0{,}9\,\%$), sendo o carregamento caraterizado em diferentes localizações do recipiente. O encapsulamento polimérico do dispositivo foi caraterizado através de testes mecânicos e térmicos. Os testes mecânicos asseguraram uma excelente conformidade, bem como compatibilidade biomecânica, desejáveis para implantes subdérmicos. Os testes térmicos verificaram a dissipação eficaz do calor gerado durante o carregamento sem fios e o funcionamento dos μ-ILEDs, evitando assim que o tecido cerebral sofra danos térmicos. O aumento máximo de temperatura durante

o funcionamento do dispositivo (μ-ILEDs a funcionar a 40 Hz com uma duração de pulso de 10 ms) foi mínimo ($\sim 1{,}1\,^{\circ}$C), satisfazendo assim a norma para o funcionamento térmico seguro de dispositivos médicos, ou seja, incremento máximo de temperatura permitido em relação à temperatura corporal de $2\,^{\circ}$C, ISO 14708–1:2014(E) [121]. Foram também efetuados testes de durabilidade dentro de uma solução salina ($0{,}9$ %) a duas temperaturas diferentes, $37\,^{\circ}$C e $90\,^{\circ}$C. O encapsulamento polimérico proporcionou uma excelente impermeabilização, o que permitiu que o dispositivo funcionasse de forma estável durante, pelo menos, 55 dias a $<90\,^{\circ}$C. Por fim, o dispositivo foi validado *in vivo* através de experiências optogenéticas em cérebros de ratos que se deslocavam livremente.

Li *et al.* [122] apresentaram uma manipulação bidirecional da atividade neuronal utilizando uma sonda optogenética com dois μ-LEDs de duas cores distintas, sem fios, em sinergia com a co-expressão de duas opsinas espectralmente distintas num modelo de roedor (figura 2.7 (b)). A sonda flexível inclui μ-LEDs de filmes-finos montados verticalmente, apresentando emissões de vermelho e azul, a partir da mesma localização, permitindo operações crónicas *in vivo* com a biocompatibilidade desejada. A estrutura da sonda é constituída por um substrato de PI revestido de cobre (Cu), um μ-LED vermelho de fosforeto de índio-gálio (InGaP), um filtro dielétrico à base de dióxido de silício (SiO_2) e dióxido de titânio (TiO_2), e um μ-LED azul de nitreto de índio-gálio (InGaN). O revestimento de Cu em PI serve como um dissipador de calor, reduzindo a temperatura de funcionamento da sonda. Todos os dispositivos (LEDs vermelhos, LEDs azuis e filtros) são fabricados em filmes-finos, através de *lift-off* epitaxial, e montados verticalmente através de impressão por transferência. A transparência ótica intrínseca das camadas ativas no μ-LED azul permite a passagem das emissões do μ-LED vermelho com perdas mínimas. Além disso, o filtro reflete seletivamente a luz azul e transmite a luz vermelha, aumentando a eficiência emissiva de ambos os μ-LEDs. O comportamento térmico da sonda foi avaliada através de testes em fantomas cerebrais e em ratos vivos, sendo o aumento da temperatura medido através de uma câmara de infravermelhos e um termopar. Ambos os testes produziram resultados semelhantes e de acordo com modelos térmicos obtidos em simulações através do método de elementos finitos (FEM). Durante o funcionamento por pulsos (frequência de 20 Hz, duração de pulso de 10 ms, corrente de 0 mA–10 mA), os aumentos de temperatura dos tecidos provocados pelo μ-LED vermelho foram limitados a $1\,^{\circ}$C. O funcionamento do μ-LED azul induziu um efeito térmico mais elevado, uma vez que a utilização da opsina inibitória requer a injeção contínua de corrente, no entanto, o aquecimento dos tecidos foi controlado a $2\,^{\circ}$C, limitando a corrente a 5 mA. A validação final do dispositivo consistiu em experiências optogenéticas bidirecionais *in vitro* em fatias de cérebros de ratos e em experiências optogenéticas bidirecionais *in vivo* em ratos que se deslocavam livremente.

Obaid *et al.* [32] apresentaram um dispositivo optoelétrico flexível multimodal que integra microelétrodos de nanogrelhas de Au transparentes diretamente em cima de μ-LEDs, micro fotodetetores (μ-PDs) e filtros óticos, capaz de efetuar o registo de fluorescência e o registo elétrico na mesma localização e sem diafonia (figura 2.7 (c)). O processo de microfabricação consistiu em fotolitografia, litografia por feixe de eletrões (EBL), e-beam e técnicas de impressão por microtransferência. Os resultados experimentais demonstraram que a nanogrelha de Au apresenta uma transmitância superior a $81\,\%$ na gama dos $400\,\text{nm}$–$800\,\text{nm}$ e uma baixa impedância eletroquímica normalizada a $1\,\text{kHz}$ de $6{,}3\,\Omega\,\text{cm}^2$. O conjunto μ-LED e μ-PD/filtro ótico exibiu uma elevada seletividade de comprimento de onda e uma excelente linearidade ($R^2 > 0{,}99$) na deteção de sinais de luz verde de baixa intensidade. O desempenho do filtro ótico foi otimizado através do ajuste da concentração do corante absorvente dissolvido numa camada de SU-8 transparente. Um filtro ótico com $2{,}5\,\text{wt}\,\%$ de corante absorvente foi usado devido à sua transmitância moderada na região verde ($\sim 40\,\%$ nos $520\,\text{nm}$) para que o máximo possível de luz de emissão de fluorescência possa passar o filtro ótico e ser registado pelo μ-PD. A integração das nanogrelhas de Au no filtro ótico resultou em mudanças não significativas na razão de transmitância, devido à transmitância elevada e uniforme das nanogrelhas de Au na região do visível. A estabilidade e flexibilidade a longo prazo foram testadas através da imersão do dispositivo em PBS a $37\,^\circ\text{C}$ durante 40 dias e 5000 ciclos de flexão contra um raio de $5\,\text{mm}$, onde não foram detetadas mudanças significativas nas caraterísticas óticas e elétricas. O comportamento térmico do dispositivo foi avaliado em condições atmosféricas, através da operação dos μ-LEDs com irradiâncias entre os $10\,\text{mW}\,\text{mm}^{-2}$ e os $20\,\text{mW}\,\text{mm}^{-2}$, *duty-cycles* de $0\,\%$–$90\,\%$ e frequências na gama dos $0{,}5\,\text{Hz}$–$50\,\text{Hz}$. Os aumentos máximos de temperatura registados foram abaixo dos limites térmicos ($2\,^\circ\text{C}$ [121]) permitidos para o funcionamento seguro de dispositivos médicos.

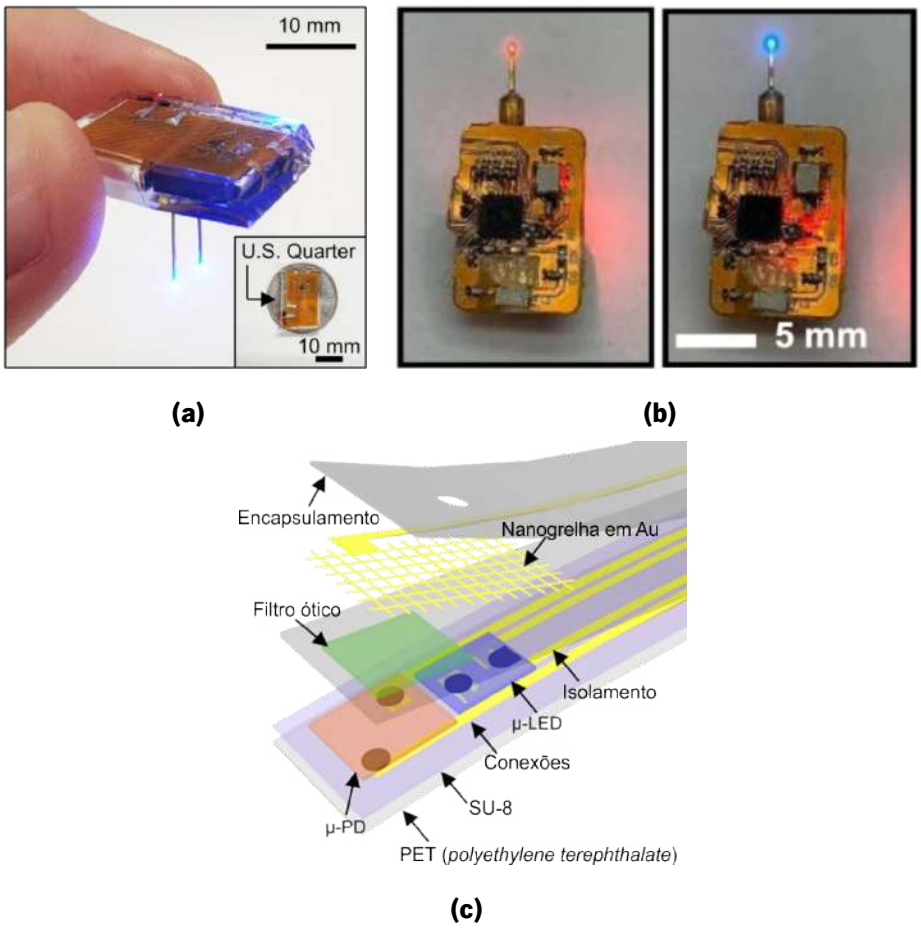


Figura 2.7: Representação de dispositivos flexíveis optogenéticos com interação ótica baseada em μ-LEDs: (a) Sistema optoeletrónico flexível, com implantação subdérmica e recarregável sem fios (figura adaptada de [120]); (b) Sistema optoeletrónico flexível com manipulação bidirecional da atividade neuronal utilizando uma sonda optogenética com dois μ-LEDs de cores distintas (figura adaptada de [122]); (c) Sistema optoelétrico flexível para fluorescência ótica multimodal e registo elétrico (figura adaptada com autorização de [32]. © 2023, *American Chemical Society*).

Como mencionado anteriormente, a outra possibilidade de realizar a estimulação ótica consiste em integrar uma guia de onda na sonda neuronal. Kampasi *et al.* [123] descreveram a conceção e micro-fabricação de uma *optrode* flexível com uma guia de onda e microelétrodos de registo (figura 2.8 (a)). O dispositivo flexível foi fabricado num substrato de PI, integrando guias de onda em *EpoCore* e *OrmoClearFX* (material à base de *polymethyl methacrylate* (PMMA)), acopladas a LDs de 635 nm, e microelétrodos de Pt/Ir. Após o fabrico, as caraterísticas óticas das guias de onda foram avaliadas, tendo sido obtidas perdas de transmissão de $7{,}6$ dB cm^{-1} no *EpoCore* e de $4{,}8$ dB cm^{-1} no *OrmoClearFX*. Foi também efetuada a caraterização elétrica dos microelétrodos, consistindo na análise da impedância e o ruído elétrico em PBS. Foi obtida uma impedância de $413{,}0$ k$\Omega \pm 54{,}6$ kΩ a 1 kHz e um ruído elétrico mínimo registado

pelos microelétrodos, na ausência de estimulação ótica, de $14{,}5\,\mu V \pm 2{,}4\,\mu V$ pico-a-pico.

Zhou *et al.* [124] apresentaram um dispositivo multimodal flexível baseado num material biológico natural, seda, para uma manipulação optogenética e registo simultâneo de sinais eletrofisiológicos do cérebro (figura 2.8 (b)). Esta *optrode* consistiu numa guia de onda flexível em seda e 128 microelétrodos de Au, revestidos com PEDOT, distribuídos por 4 hastes de PI. A fibra de seda foi avaliada por meio de testes mecânicos e óticos. Através dos testes mecânicos foi obtido um módulo de *Young* de $38{,}7\,MPa$ para a fibra desidratada e de $3{,}53\,MPa$ para a fibra hidratada. Os testes óticos resultaram em perdas de propagação de $3\,dB\,cm^{-1}$ para a fibra de seda hidratada. Após a eletrodeposição de PEDOT sobre os microelétrodos de Au, a impedância dos mesmos passou dos $\sim 500\,k\Omega$ para os $\sim 40\,k\Omega$ a $1\,kHz$. O dispositivo multimodal foi validado *in vivo* através da sua implantação e realizados estudos optogenéticos em ratos que se deslocavam livremente. Por fim, para avaliar a biocompatibilidade do dispositivo *in vivo*, foram realizadas análises imunohistoquímicas *post-mortem* 60 dias após a implantação. Uma fibra ótica de quartzo de controlo ($200\,\mu m$ de diâmetro) foi implantada na mesma região cerebral que a *optrode* de seda ($200\,\mu m$ de diâmetro). No caso da *optrode* de seda, verificou-se uma menor criação de cicatrizes gliais e menor agregação microglial, bem como menor apoptose neuronal.

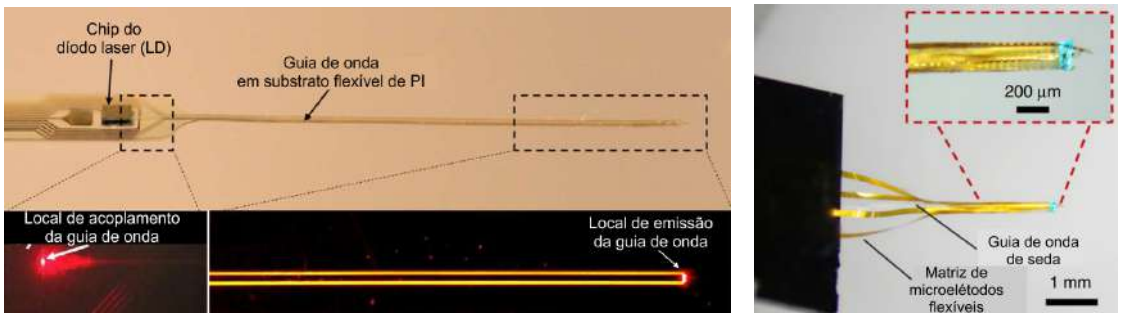


Figura 2.8: Representação de dispositivos flexíveis optogenéticos com interação ótica baseada em guias de onda: (a) *Optrode* em substrato flexível de PI, guia de onda polimérica e microelétrodos de registo (figura adaptada de [123]); (b) *Optrode* com uma guia de onda flexível de seda e microelétrodos de registo distribuídos por 4 hastes flexíveis de PI (figura adaptada de [124]).

2.2.3 Interação Microfluídica

A microfluídica pode possibilitar a modulação farmacológica minimamente invasiva dos tecidos neuronais, administrando um fluido no cérebro através de microcanais. As sondas neuronais com interação microfluídica podem ajudar a desvendar as complexas relações entre os circuitos neuronais e os neu-

rotransmissores. No início da década de 2000, registou-se um desenvolvimento dos dispositivos microfluídicos baseados na micromaquinação de Si para realizar a CED. No entanto, enquanto que as sondas neuronais rígidas induzem mais danos no tecido cerebral, as sondas neuronais poliméricas com canais microfluídicos reduzem o trauma do tecido neuronal [125].

Qazi *et al.* [126] desenvolveram uma abordagem combinatória de dispositivos sem fios aplicados em neurofarmacologia e optogenética *in vivo*, resultando num sistema multimodal capaz de controlo crónico e seletivo em animais que se deslocam livremente (figura 2.9 (a)). Estas sondas neuronais flexíveis permitem um acesso optofluídico biocompatível a longo prazo ao tecido neuronal nas profundezas do cérebro, bem como a administração crónica de fármacos com controlo temporal através dos seus cartuchos de fármacos substituíveis *plug-n-play*. Este pequeno e leve dispositivo (volume: $1260\,\mathrm{mm}^3$; peso: $2\,\mathrm{g}$) permite a manipulação neuronal programável e combinatória com quatro fármacos distintos e dois comprimentos de onda distintos. Os volumes fornecidos por este dispositivo *plug-n-play* ($0{,}5\,\mu\mathrm{L}$–$2\,\mu\mathrm{L}$) utilizando cartuchos substituíveis são mais práticos para experiências que analisam o papel de sistemas neuroquímicos específicos e também mais viáveis para produtos químicos que podem degradar-se ou não são capazes de manter a sua qualidade se forem armazenados à temperatura do corpo durante vários meses. Este dispositivo é controlável através de um *smartphone* e integra um módulo BLE SoC, que oferece uma cobertura de longo alcance ($10\,\mathrm{m}$–$100\,\mathrm{m}$), acesso omnidirecional, sem limitação de linha de visão, capacidade de seletividade para alvos específicos e caraterísticas expansíveis de controlo de circuito fechado. Este design de fácil utilização e estabilidade crónica permite estudos a longo prazo dos circuitos neuronais, proporcionando acesso farmacológico e optogenético repetido e intacto à mesma região com apenas uma cirurgia.

Wu *et al.* [127] apresentaram uma plataforma optofluídica multicanal, sem fios, sem baterias e miniaturizada, destinada a optogenética e fotofarmacologia, concebida especificamente para utilização em pequenos animais que se deslocam livremente, isolados ou em grupos que interagem em grandes recintos. As principais características deste sistema superam as limitações das tecnologias alternativas através da utilização de: (i) sondas multilaterais personalizáveis com interconexões microfluídicas e eletrónicas flexíveis, permitindo uma versatilidade de posicionamento no sistema nervoso e possibilitando padrões de modulação sincronizados ou dessincronizados na mesma região ou em regiões diferentes; (ii) válvulas de retenção microfluídicas passivas que proporcionam um controlo preciso da dinâmica do fluxo; (iii) designs que suportam capacidades de controlo multicanal independente e em tempo real de todos os parâmetros relevantes no fornecimento de fluidos e na iluminação ótica, bem como a possibilidade de endereçamento individual de vários dispositivos num único campo experimental através de comuni-

cação de campo próximo (NFC); e (iv) opções de engenharia que aproveitam componentes comerciais de baixo custo, procedimentos de fabrico e montagem escaláveis, interfaces gráficas de utilizador (GUIs) de código aberto fáceis de utilizar e métodos de implantação simples para facilitar uma ampla utilização pela comunidade neurocientífica. Os módulos multicanal oferecem diversas possibilidades em protocolos experimentais que dependem de farmacologia programável e/ou optogenética. Podem ser integrados até 4 canais para estimulação ótica ou administração de fluidos em sondas unilaterais ou bilaterais, conforme os objetivos. O módulo bilateral possui duas sondas que podem ser implantadas em hemisférios distintos, permitindo padrões sincronizados ou dessincronizados de modulação ótica e/ou farmacológica na mesma ou em diferentes regiões cerebrais (figura 2.9 (b)). Cada sonda inclui um canal microfluídico para administração de fármacos e um μ-ILED para estimulação ótica de comprimento de onda único. O módulo unilateral possui dois canais microfluídicos e dois μ-ILEDs com o mesmo comprimento de onda ou comprimentos de onda diferentes, todos numa única sonda (figura 2.9 (c)). Este dispositivo unilateral pode suportar a excitação e/ou inibição utilizando optogenética em dois comprimentos de onda, farmacologia com dois fármacos e optogenética e fotofarmacologia simultânea, num único local. O dispositivo foi validado *in vivo* através do controlo do comportamento motor de ratos que se deslocavam livremente por meio de operações multicanais independentes. O alvo foi o córtex motor secundário (M2), utilizando um único procedimento de implantação padrão. A configuração do dispositivo consistiu em duas sondas bilaterais, cada uma com capacidades de optogenética e administração de fármacos: sonda 1/2 com LED 1/LED 2 (optogenética) e Bomba 1/Bomba 2 (administração de fármacos), implantadas no M2 direito/esquerdo, respetivamente. Após a ativação, o M2 induziu comportamentos motores robustos, que foram observados de forma fiável e quantificados utilizando algoritmos de estimativa de pose baseados em aprendizagem automática.

Kim *et al.* [128] apresentaram a primeira interface neuronal capaz de interagir ativamente com os neurónios através das quatro principais modalidades: (i) deteção de neurotransmissores; (ii) registo eletrofisiológico; (iii) administração de fármacos; e (iv) estimulação ótica de populações neuronais (figura 2.9 (d)). Esta sonda de fibra multimodal e flexível foi fabricada através de um processo de trefilagem térmica de microfios, que permite a integração de alta densidade de componentes funcionais com vários materiais, tais como polímeros, metais e fibras de carbono. A fibra permite a monitorização em tempo real da libertação transitória de dopamina *in vivo*, a estimulação em tempo real de populações neuronais específicas através de optogenética, a eletrofisiologia de unidades únicas de neurónios individuais na ponta da mesma e a estimulação química através da administração de fármacos. Esta fibra melhora a acessibilidade e a funcionalidade de análise bidirecional de mecanismos neuroquímicos em sondas neu-

ronais implantáveis. O desempenho da fibra multimodal foi avaliado para determinar as suas capacidades de administração química, transmissão ótica, impedância e deteção química. O microcanal demonstrou elevadas taxas de fluxo de fluido de $75\,\%$–$95\,\%$ e a administração precisa de produtos-alvo à ponta da fibra num fantoma cerebral. A guia de onda apresentou perdas de transmissão entre os $0{,}885\,\mathrm{dB\,cm^{-1}}$ e os $0{,}899\,\mathrm{dB\,cm^{-1}}$, independentemente da inclusão dos elétrodos de W e de fibra de carbono. Os valores obtidos de impedância dos elétrodos de W e de fibra de carbono foram de $34{,}9\,\mathrm{k\Omega} \pm 8{,}1\,\mathrm{k\Omega}$ e $126{,}9\,\mathrm{k\Omega} \pm 18{,}3\,\mathrm{k\Omega}$ a $1\,\mathrm{kHz}$, respetivamente. As caraterísticas eletroquímicas do elétrodo de fibra de carbono foram estudadas para a deteção de dopamina. Foram efetuadas análises de voltametria cíclica de varrimento rápido (FSCV) com concentrações crescentes de dopamina (até $2\,\mu\mathrm{M}$) a níveis fisiológicos. O voltamograma revelou amplitudes de pico redox crescentes com o aumento da concentração na caraterística oxidação ($0{,}43\,\mathrm{V}$) e redução ($0{,}06\,\mathrm{V}$). Uma análise quantitativa adicional demonstrou uma relação linear ($R^2 = 0{,}996$) entre a concentração de dopamina e a amplitude da corrente de pico redox, com uma elevada sensibilidade de $172{,}56\,\mathrm{nA\,\mu M^{-1}}$. Esta fibra multimodal apresentou um módulo de *Young* de $2{,}832\,\mathrm{GPa}$ com uma resistência à tração de $168{,}352\,\mathrm{MPa}$ e uma rigidez à flexão de $14{,}4201\,\mathrm{N\,m^{-1}}$ a $1\,\mathrm{Hz}$. Por fim, para avaliar o desempenho *in vivo* da fibra multimodal, foram efetuados estudos optogenéticos em cérebros de ratos. Registou-se a dinâmica rápida da dopamina e os sinais eletrofisiológicos na área tegmental ventral (VTA) de ratos, provocados por estimulação ótica a uma frequência de $50\,\mathrm{Hz}$, largura de pulso de $4\,\mathrm{ms}$, irradiância de $10\,\mathrm{mW\,mm^{-2}}$, número fixo de 50 pulsos e separados por períodos de repouso de $3\,\mathrm{min}$. Foi também monitorizada a libertação de dopamina induzida pela administração de um fármaco para uma maior validação da monitorização *in vivo*. A fibra multimodal foi também capaz de registar atividade neuronal espontânea na VTA de ratos, sendo identificados potenciais de ação e LFP.

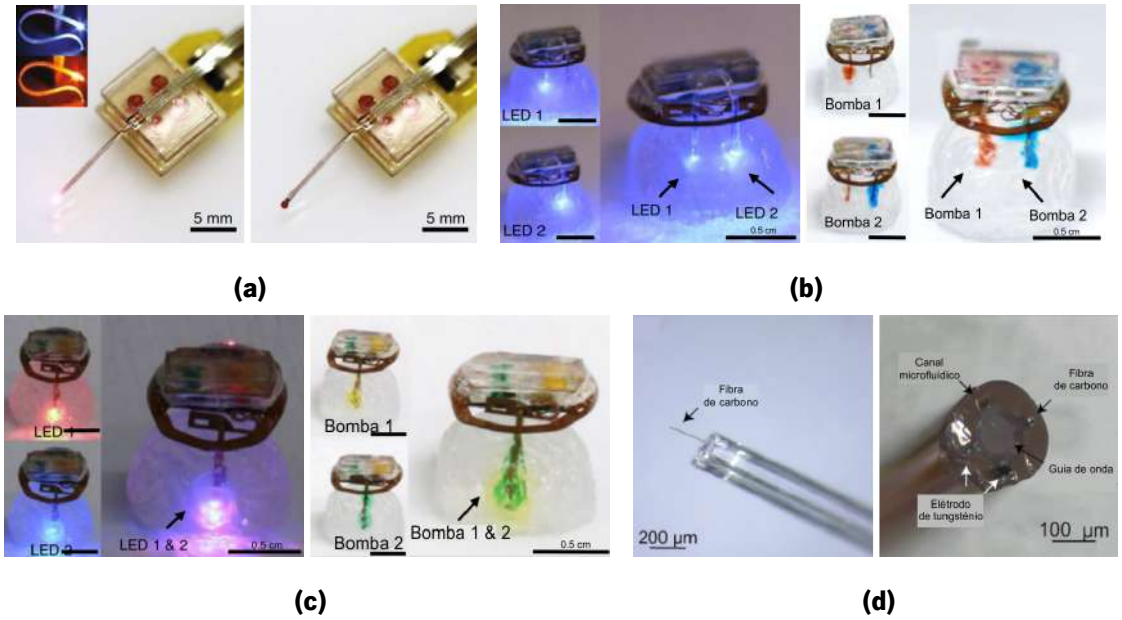


Figura 2.9: Representação de dispositivos flexíveis optogenéticos com interação microfluídica: (a) Sonda neuronal flexível optofluídica constituída por uma sonda microfluídica integrada com µ-ILEDs para a administração simultânea de fluidos e fotoestimulação (figura adaptada com autorização de *Springer Nature*, de [126]); (b) Dispositivos flexíveis optofluídicos bilaterais operados em modo simples e modo duplo para fotoestimulação e administração de fluidos (figura adaptada de [127]); (c) Dispositivos flexíveis optofluídicos unilaterais de dois canais com fotoestimulação simples/dupla de dois comprimentos de onda e com modos simples/duplo de administração de líquido (figura adaptada de [127]); (d) Ponta da fibra multimodal com elétrodo de fibra de carbono exposto e secção transversal onde é possível visualizar todos os seus componentes (figura adaptada de [128]).

Capítulo 3

Simulações Óticas

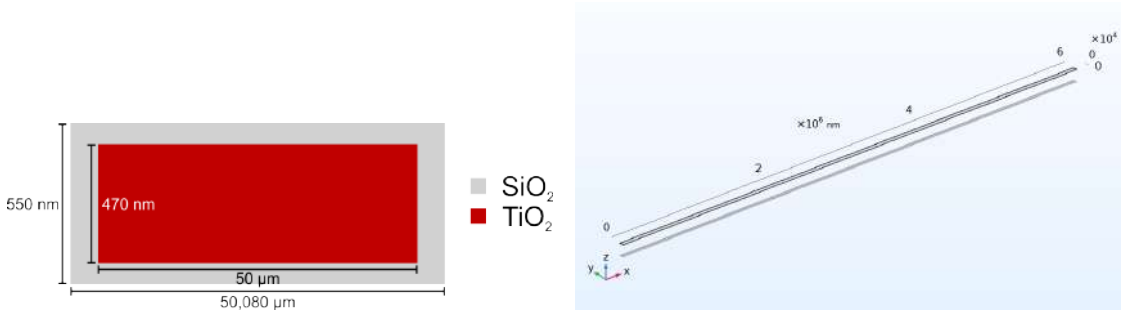
O presente capítulo apresenta as simulações óticas de guias de onda, com e sem *gratings* de transmissão, baseadas em FEM e FDTD.

3.1 Simulações Óticas FEM de uma Guia de Onda

Antes e durante a otimização do processo de fabrico da guia de onda, foram realizadas diferentes simulações FEM no *software COMSOL Multiphysics*. Estas simulações, que irão ser apresentadas de seguida, serviram para determinar a atenuação da potência ótica ao longo da guia de onda e verificar o comportamento da luz quando são adicionadas *gratings* de transmissão à guia de onda.

Para a simulação da atenuação da potência ótica ao longo da guia de onda, foi desenhado um modelo 3D de uma guia de onda com um núcleo de TiO_2 e um encapsulamento de SiO_2. O núcleo da guia de onda apresenta uma secção transversal de $50\,\mu m \times 0{,}47\,\mu m$, um encapsulamento de $40\,nm$ e um comprimento de $6\,mm$, como pode ser visto na figura 3.1.

Após o desenho do modelo 3D da guia de onda, foi realizado um estudo de *ray tracing*, numa interface geométrica. Foi adicionada uma malha tetraédrica livre geral ao modelo, com parâmetros de tamanho máximo de elementos de $10{,}2\,\mu m$, tamanho mínimo de elementos de $150\,nm$, taxa máxima de crescimento de elementos $1{,}45$, fator de curvatura de $0{,}5$ e resolução de regiões estreitas de $0{,}6$ (figura 3.2). Como materiais para o núcleo e encapsulamento da guia de onda, foram escolhidos o TiO_2 [129–131] e o SiO_2 [132–134], com índices de refração (n) medidos experimentalmente de $2{,}6$ e de $1{,}45$, respetivamente, para um λ de $470\,nm$ (azul), sendo este o comprimento de onda capaz de ativar a opsina ChR2 usada em aplicações optogenéticas. Para todos os domínios exteriores foi selecionado um $n = 1$,



(a) **(b)**

Figura 3.1: Esquemático das dimensões utilizadas nas simulações óticas FEM de uma guia de onda: (a) Secção transversal da guia de onda no plano cartesiano yz (representação não está à escala); (b) Projeção ortogonal do modelo 3D da guia de onda no *software COMSOL Multiphysics*.

representados por ar. Como fonte de luz não polarizada com uma potência ótica de $1{,}2371 \times 10^{-3}$ W [135], a superfície da entrada do núcleo da guia de onda foi configurada como emissão de limite com 200 raios por emissão, vetor cónico de direção dos raios com uma densidade uniforme, 100 raios no espaço vetorial de ondas, eixo do cone de $\vec{r}(1,0,0)$ e um ângulo de cone de $17\pi/90$. Este ângulo de cone foi escolhido para se conseguir obter uma reflexão interna total (TIR) da luz propagada pela guia de onda, que ocorre quando o ângulo de incidência (θ_i) é superior ao ângulo crítico (θ_c). O θ_c do modelo projetado foi obtido através da seguinte equação:

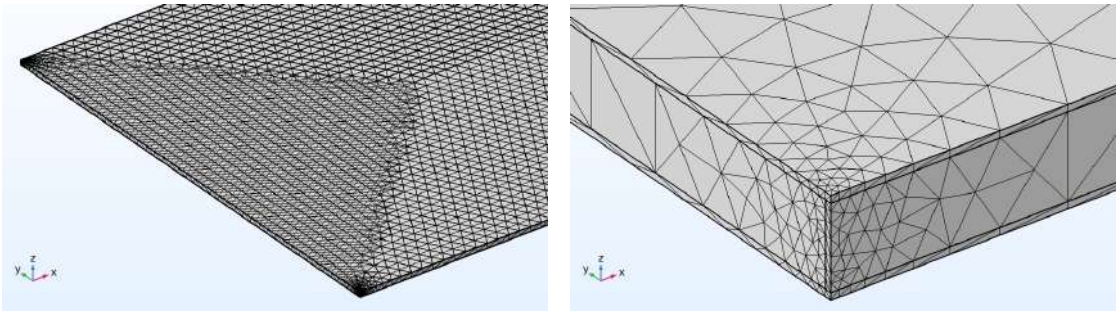
$$\sin\theta_c \;=\; \frac{n_t}{n_i} \tag{3.1}$$

onde n_t representa o índice de refração do meio de transmissão e n_i representa o índice de refração do meio de imersão [136]. Introduzindo os valores de $n_t = n_{SiO_2}$ e de $n_i = n_{TiO_2}$ na equação 3.1, definidos anteriormente, obtém-se um $\theta_c = 33{,}9°$. O θ_i do modelo projetado foi determinado através da equação da soma interna de triângulos retângulos:

$$\theta_i + \frac{\alpha}{2} + 90° \;=\; 180° \tag{3.2}$$

onde α representa o ângulo do cone. Convertendo $17\pi/90$ para graus ($34°$) e introduzindo na equação 3.2, obtém-se um $\theta_i = 73°$. Com os valores de θ_i e θ_c determinados, confirma-se então uma TIR, pois $\theta_i > \theta_c$. Para obter a potência ótica e irradiância na saída do núcleo da guia, a sua superfície foi configurada como um limite detetor de raios, que computa a potência ótica, e com uma condição de parede que fixa os raios, onde de seguida é selecionada esta parede com um sub-nó de potência de raios depositados, que computa a irradiância. Para uma melhor visualização dos resultados da simulação de

ray tracing, a superfície exterior do encapsulamento da guia de onda foi configurada com uma condição de parede que resulta em que todos os raios que escapam do núcleo e entrem em contacto com a mesma não sejam representados visualmente.



(a) **(b)**

Figura 3.2: Malha aplicada ao modelo 3D da guia de onda: (a) Projeção ortogonal do modelo 3D da guia de onda com a aplicação de uma malha tetraédrica livre; (b) Projeção ortogonal amplificada do modelo 3D da guia de onda onde é possível visualizar o tamanho mínimo dos elementos da malha tetraédrica livre.

Como primeiro resultado da simulação, obteve-se um *ray trcing*, representado na figura 3.3 (a), onde é possível visualizar a fonte da luz na entrada do núcleo da guia de onda (figura 3.3 (b)) e verificar que a distância máxima percorrida pelos raios, devido às reflexões internas da guia de onda, foi de $1{,}83 \times 10^7$ nm ou $18{,}3$ mm e encontra-se na saída do núcleo da guia de onda (figura 3.3 (c)), correspondendo a aproximadamente três vezes o comprimento da guia de onda. Como segundo resultado desta simulação, pode-se observar o valor de potência ótica transmitida ao detetor de $1{,}0144 \times 10^{-3}$ W (figura 3.4 (a)), o valor médio no detetor de irradiância de $4{,}32 \times 10^7$ W m^{-2} (figura 3.4 (b)) e a distribuição dos valores de irradiância no detetor, sendo os valores máximos de irradiância de $2{,}34 \times 10^8$ W m^{-2}, localizados na interseção dos limites exteriores do detetor (figura 3.4 (c) e figura 3.4 (d)).

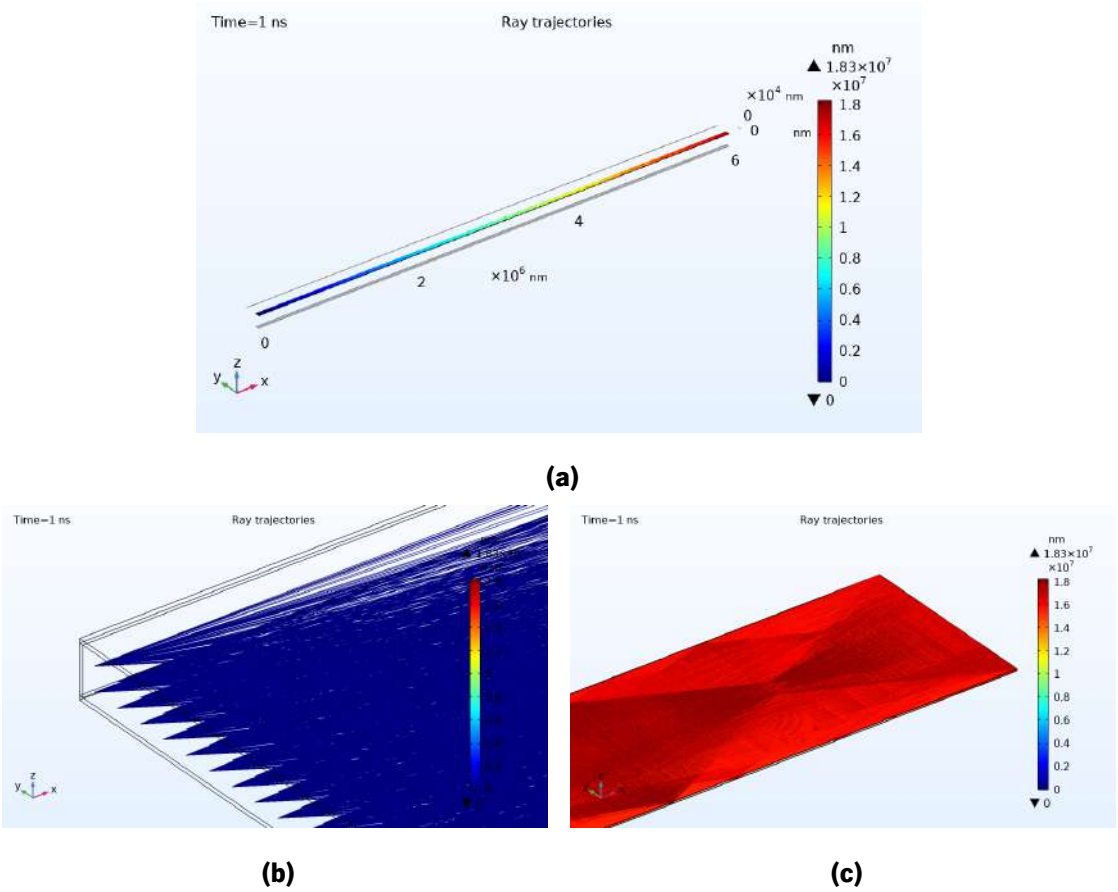


Figura 3.3: Resultado da simulação de *ray tracing* de uma guia de onda com núcleo de TiO_2 e encapsulamento de SiO_2: (a) *Ray tracing* com uma expressão de cor de distância percorrida; (b) Origem do *ray tracing* com uma expressão de cor de distância percorrida; (c) Distância máxima percorrida do *ray tracing* com uma expressão de cor de distância percorrida.

Com o resultado da potência ótica obtida na simulação, é assim possível calcular a atenuação da potência ótica ao longo da guia de onda através da seguinte equação:

$$A(dB) = 10 \log_{10} \frac{P_{src}}{P_{tgt}} \tag{3.3}$$

onde $A(dB)$ representa a atenuação em decibel, P_{src} representa a potência ótica de entrada na guia de onda em watt e P_{tgt} representa a potência ótica de saída na guia de onda em watt. Introduzindo os valores de $P_{src} = 1{,}2371 \times 10^{-3}$ W e de $P_{tgt} = 1{,}0144 \times 10^{-3}$ W na equação 3.3, obtém-se uma $A(dB) = 0{,}86$ dB, sendo assim transmitida 82 % da potência ótica desde a entrada da guia de onda até à sua saída.

Após a simulação para determinar a atenuação da potência ótica ao longo da guia de onda, fez-se uma nova simulação para verificar o comportamento da luz quando são adicionadas *gratings* de transmissão à

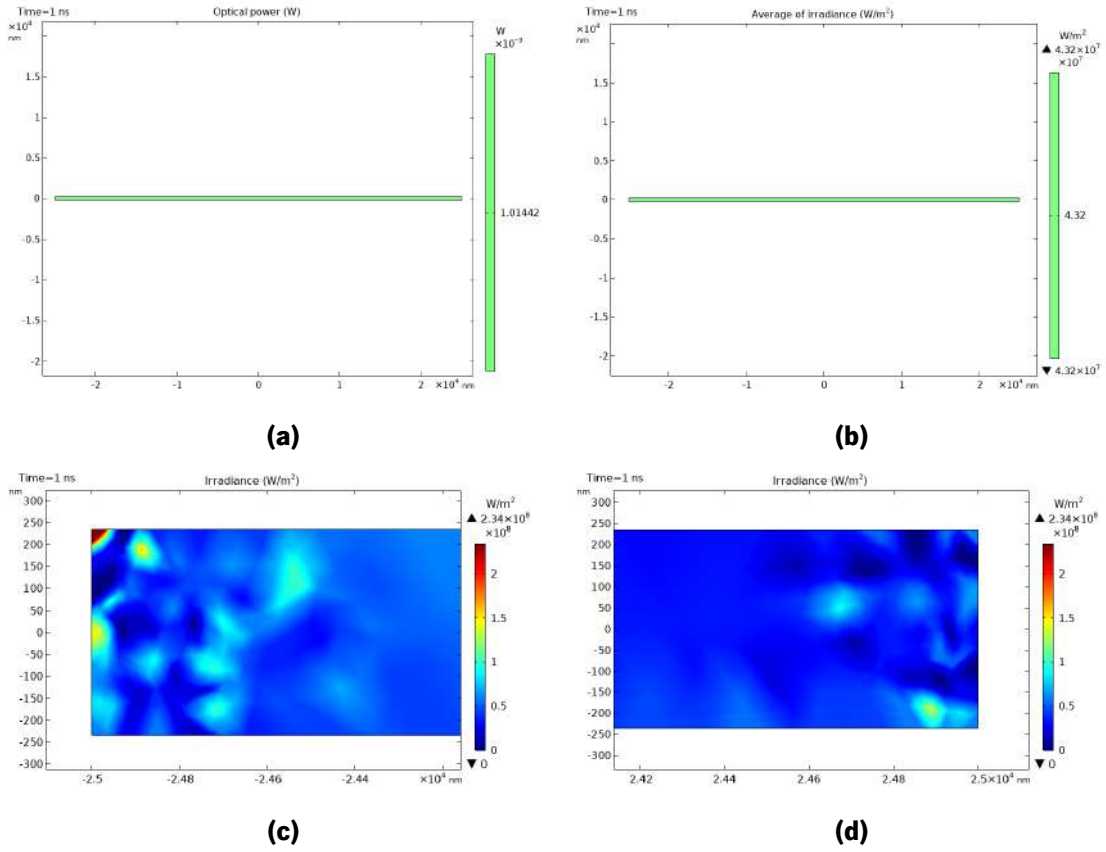


Figura 3.4: Resultados das simulações de potência ótica e irradiância no detetor situado na saída do núcleo da guia de onda: (a) Potência ótica transmitida ao detetor; (b) Valor médio de irradiância obtido no detetor; (c) e (d) Distribuição de valores de irradiância obtidos nos limites do detetor.

guia de onda. Os acopladores de *gratings* de difração consistem numa estrutura periódica unidimensional (1D) definida sobre ou na camada da guia de onda. A periodicidade faz com que a luz seja difratada por estas estruturas em direções específicas. Isto pode ser interpretado considerando a *grating* 1D como um conjunto de centros de dispersão, situados na interface entre as fendas e os dentes da *grating*, que possuem uma relação de fase constante devido à regularidade da estrutura. Essa constância de fase leva a uma interferência fortemente influenciada pelo ângulo de incidência [136, 137]. Uma *grating* típica de transmissão pode ser vista na figura 3.5 e caraterizada pela *grating equation*:

$$n_m \sin\theta_m \;=\; n_i \sin\theta_i + m\frac{\lambda}{\Lambda} \tag{3.4}$$

onde n_m representa o índice de refração do meio de transmissão, θ_m representa o ângulo de difração, o n_i representa o índice de refração do meio de imersão, o θ_i representa o ângulo de incidência, o m representa o índice da ordem de difração, o λ representa o comprimento de onda da luz transmitida e o Λ representa o período da *grating* [136, 137].

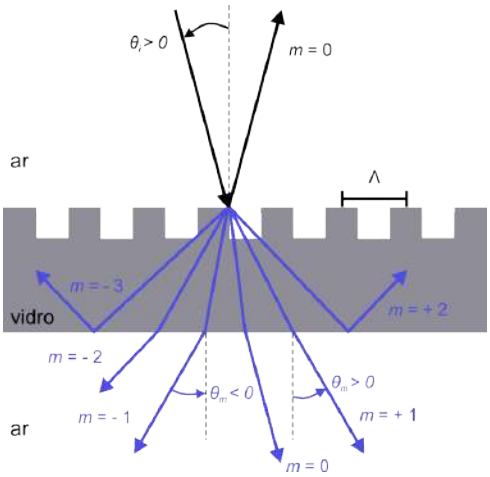


Figura 3.5: Ilustração das propriedades de dispersão de uma típica *grating* de transmissão de relevo superficial quando uma onda incidente monocromática é difratada em várias ondas que se propagam nas direções especificadas pela equação 3.4 [137].

Para esta simulação, foi desenhado um modelo bidimensional (2D) de uma guia de onda com um núcleo de TiO_2 e um encapsulamento de SiO_2, *gratings* de transmissão em TiO_2 e um substrato de Si. O substrato de Si apresenta um comprimento de 60 µm e uma altura de 2 µm. A da guia de onda apresenta um núcleo com um comprimento de 30 µm, altura de 470 nm, um encapsulamento superior com uma altura de 120 nm, um encapsulamento inferior com uma altura de 1 µm e um comprimento de 60 µm. Por fim, as *gratings* de transmissão [137] apresentam um Λ de $2{,}35$ µm, um comprimento de corrosão (l_e) de $1{,}175$ µm e uma profundidade de corrosão (h_e) de 235 nm, como pode ser visto na figura 3.6. Devido à especificação técnica de tamanho mínimo de estruturas (1 µm) do equipamento de litografia por escrita direta (DWL) *µ-MLA Tabletop Maskless Aligner* da *Heidelberg Instruments* [138] que foi usado para os processos fotolitográficos, definiu-se um *duty-cycle* das *gratings* de 50 % e obteve-se uma razão de $\frac{\lambda}{\Lambda} = 0.2$ para os valores de $\lambda = 470$ nm e o Λ descrito anteriormente. Introduzindo os valores de $n_m = 2{,}6$, $n_i = 1{,}45$, $\theta_i = 10°$, $m = +7$ e $\frac{\lambda}{\Lambda} = 0.2$ na equação 3.4, obtém-se um $\theta_m = 39{,}44°$. Devido a este resultado, só índices de ordem de difração iguais ou superiores a 7 resultam numa TIR.

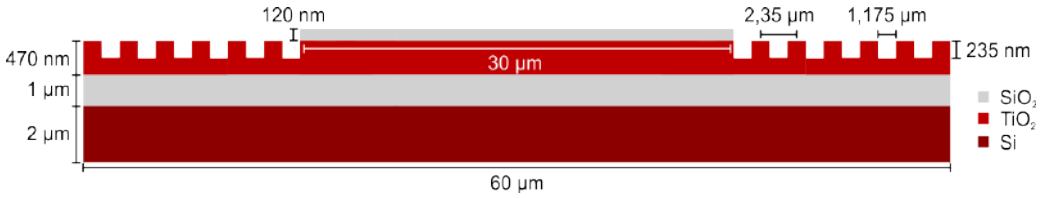


Figura 3.6: Esquemático no plano cartesiano xy das dimensões utilizadas nas simulações óticas FEM de uma guia de onda com *gratings* de transmissão (representação não está à escala).

Após o desenho do modelo 2D da guia de onda com *gratings* de transmissão, foi realizado um estudo de *ray tracing*, numa interface geométrica. Foi adicionada uma malha triangular livre geral ao modelo, com parâmetros de tamanho máximo de elementos de 465 nm, tamanho mínimo de elementos de $1{,}22$ nm, taxa máxima de crescimento de elementos $1{,}1$, fator de curvatura de $0{,}2$ e resolução de regiões estreitas de 1 (figura 3.7). Como materiais utilizados, foi selecionado para o núcleo da guia de onda e *gratings* de transmissão o TiO_2, para o encapsulamento superior e inferior da guia de onda o SiO_2 e para o substrato o Si, com índices de refração (n) de $2{,}6$, $1{,}45$ e de $4{,}485$, respetivamente, para um λ de 470 nm. Para todos os domínios exteriores foi selecionado um $n = 1$, representados por ar. Como fonte de luz não polarizada e uma potência ótica por unidade de espessura de $54\,845$ W m^{-1} [139], foi criada uma grelha, com a localização em $q_{x,0}$, sendo x definido por uma gama de valores com início em 500 nm, *step* de 1 nm e um fim em $14{,}8$ µm, e em $q_{y,0} = 6$ µm. Para definir um θ_i da fonte de luz de $10°$, usou-se um vetor de direção dos raios $\vec{L}_0(-1, -5.68)$. Para obter a potência ótica sobre a *grating* de transmissão de desacoplamento, foi criada uma superfície com $5{,}3$ µm de comprimento a uma altura de $3{,}8$ µm e configurada como um limite detetor de raios com uma condição de parede que fixa os raios. Para uma melhor visualização dos resultados da simulação de *ray tracing*, foi criado um limite que elimina todos os raios de luz que interajam com o mesmo, com as coordenadas $x_{min} = -46$ µm, $x_{max} = 15{,}05$ µm, $y_{min} = -0{,}05$ µm e , $y_{max} = 8$ µm.

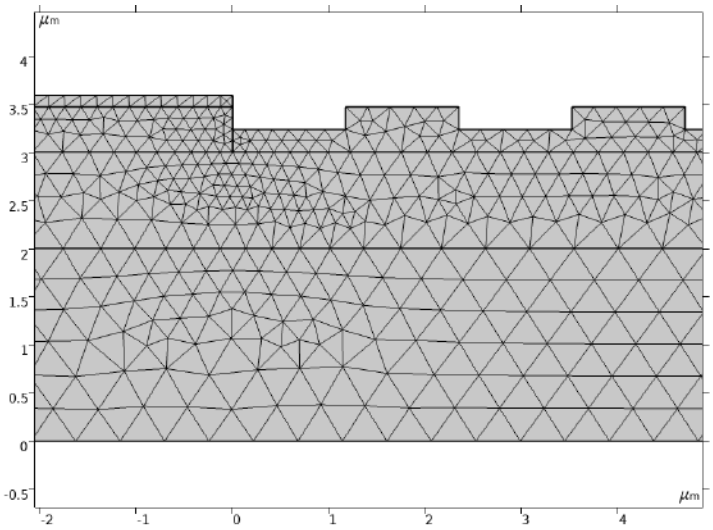


Figura 3.7: Malha aplicada ao modelo 2D da guia de onda e *gratings* de transmissão.

Na figura 3.8 (a), pode-se observar o *ray tracing* obtido com uma expressão de cor de distância percorrida, com uma inserção parcial de luz numa guia de onda através de uma *grating* de transmissão de acoplamento e com um θ_i de $10°$. Após a inserção de luz na guia de onda, esta é transmitida ao longo da mesma através de uma TIR, como pode ser visto na figura 3.8 (b). Por fim, quando a luz acaba

de percorrer a guia de onda, esta escapa maioritariamente para o exterior através de uma *grating* de transmissão de desacoplamento com uma potência ótica de $27{,}35$ W (figura 3.8 (c) e figura 3.8 (d)).

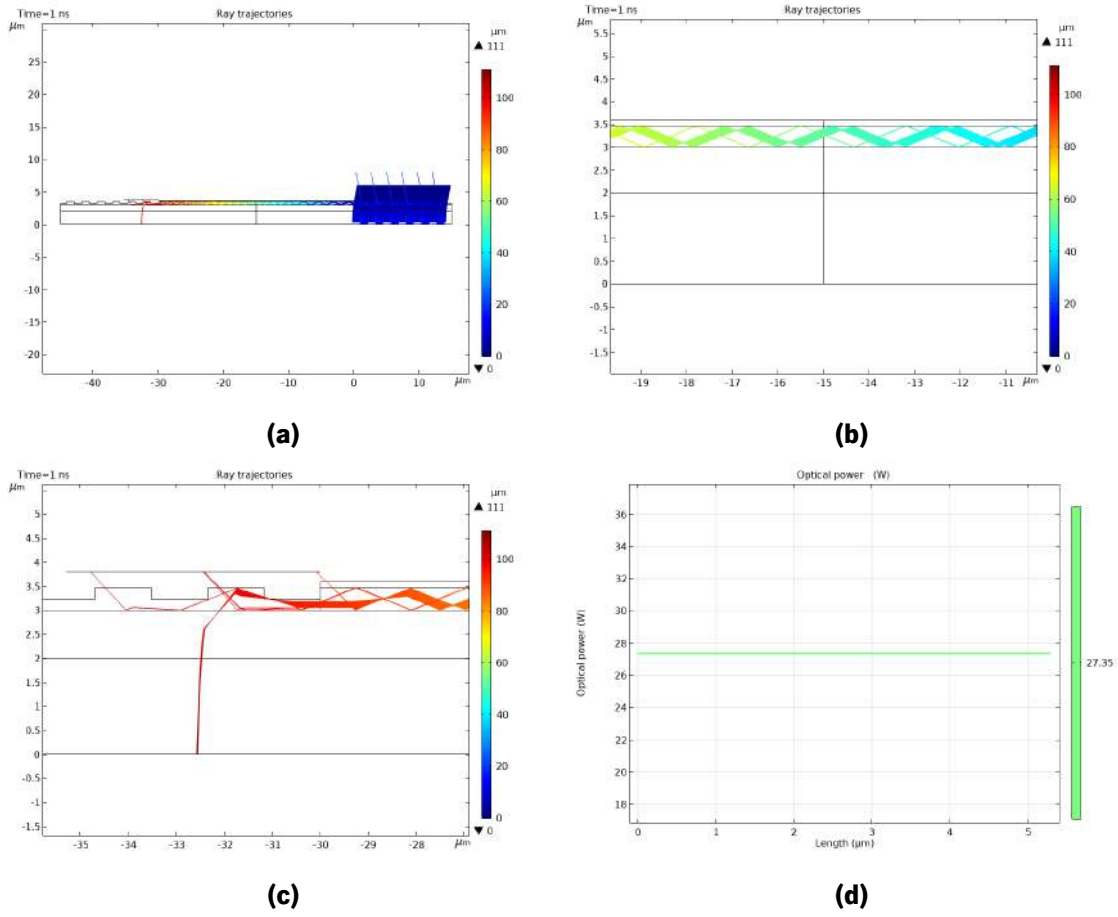


Figura 3.8: Resultado da simulação de *ray tracing* de uma guia de onda e *gratings* de transmissão e da potência ótica transmitida pela *grating* de transmissão de desacoplamento: (a) *Ray tracing* com uma expressão de cor de distância percorrida; (b) Propagação da luz no interior da guia de onda; (c) Saída da luz através da *grating* de transmissão de desacoplamento; (d) Potência ótica transmitida pela *grating* de transmissão de desacoplamento.

Apesar das restrições referidas anteriormente sobre o equipamento fotolitográfico, procedeu-se à realização de simulações FDTD, que vão ser descritas na secção 3.2, para otimizar as dimensões das *gratings* de transmissão de acoplamento e desacoplamento, melhorando assim a sua eficiência de acoplamento. Com as dimensões otimizadas, procedeu-se então a uma nova simulação FEM de *ray tracing* de uma guia de onda com *gratings* de transmissão para observar o seu novo comportamento.

Para esta nova simulação, todos os parâmetros da simulação anterior foram mantidos, com exceção das dimensões das *gratings* de transmissão e do comprimento do detetor de potência ótica. A *grating* de transmissão de acoplamento apresenta agora um Λ de 650 nm e um l_e de $240{,}5$ nm, obtendo assim um

duty-cycle de $63\,\%$ e uma razão $\frac{\lambda}{\Lambda}$ de $0{,}723$. Introduzindo assim os valores de $n_m = 2{,}6$, $n_i = 1{,}45$, $\theta_i = 10°$, $m = +2$ e o novo valor de $\frac{\lambda}{\Lambda} = 0.723$ na equação 3.4, obtém-se um $\theta_m = 40{,}77°$, conseguindo assim uma maior eficiência de acoplamento. A *grating* de transmissão de desacoplamento apresenta agora um Λ de 800 nm e um l_e de 288 nm, obtendo assim um *duty-cycle* de $64\,\%$. O comprimento do detetor de potência ótica foi atualizado para $2{,}9$ µm.

Na figura 3.9 (a), pode-se observar o *ray tracing* obtido com uma expressão de cor de distância percorrida, com uma inserção parcial de luz numa guia de onda através de uma *grating* de transmissão de acoplamento e com um θ_i de $10°$. Após a inserção de luz na guia de onda, esta é transmitida ao longo da mesma através de uma TIR, como pode ser visto na figura 3.9 (b). Por fim, quando a luz acaba de percorrer a guia de onda, esta escapa para o exterior através de uma *grating* de transmissão de desacoplamento com uma potência ótica de $133{,}55\,$W (figura 3.9 (c) e figura 3.9 (d)). Com esta otimização das dimensões das *gratings* de transmissão de acoplamento e desacoplamento, conseguiu-se assim um aumento da potência ótica transmitida de cerca de 5 vezes, em relação à simulação anterior.

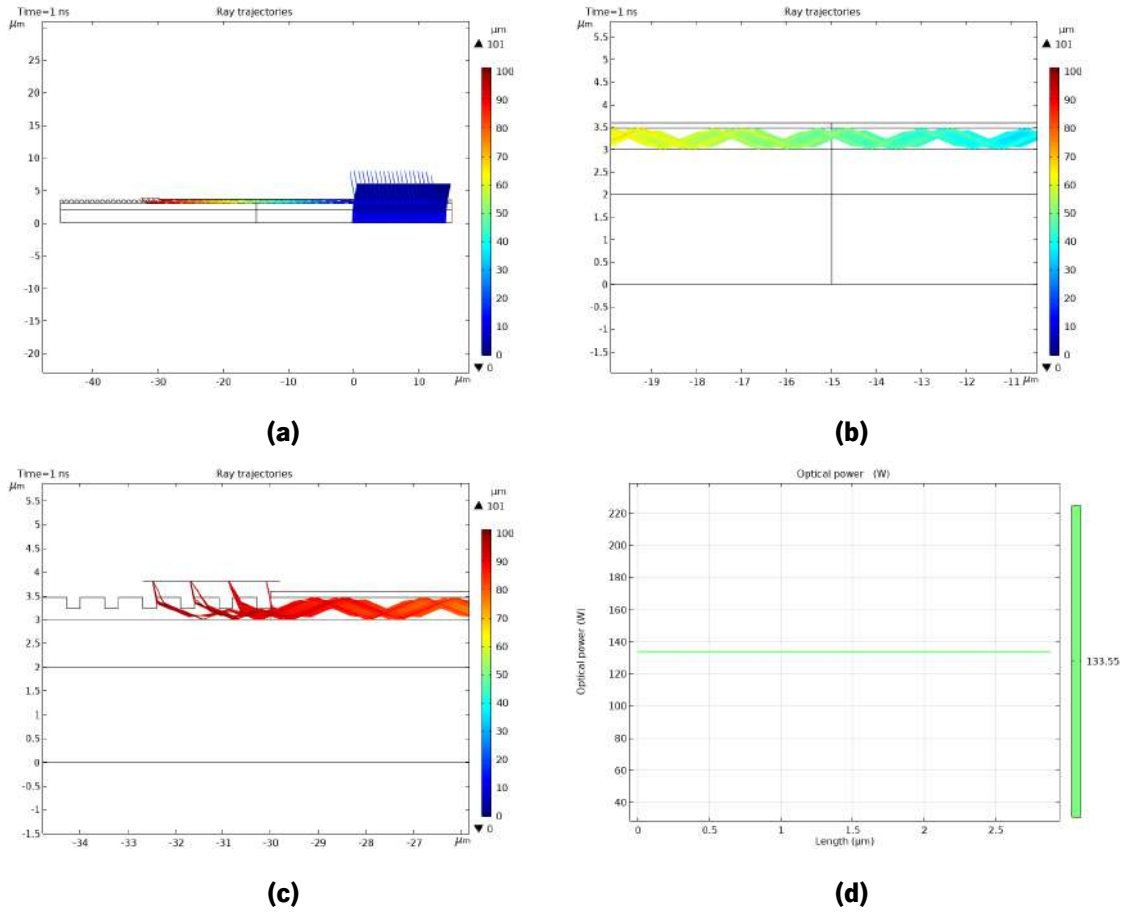


Figura 3.9: Resultado da simulação com dimensões otimizadas de *ray tracing* de uma guia de onda e *gratings* de transmissão e da potência ótica transmitida pela *grating* de desacoplamento: (a) *Ray tracing* com uma expressão de cor de distância percorrida; (b) Propagação da luz no interior da guia de onda; (c) Saída da luz através da *grating* de transmissão de desacoplamento; (d) Potência ótica transmitida pela *grating* de transmissão de desacoplamento.

3.2 Simulações Óticas FDTD de uma Guia de Onda

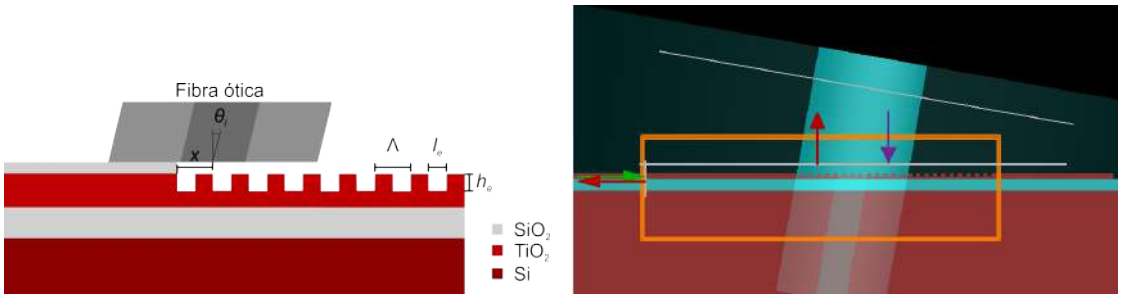
Como foi referido na secção 3.1, foram realizas simulações FDTD no *software Ansys Lumerical*. Estas simulações serviram para otimizar as dimensões das *gratings* de transmissão de acoplamento e de desacoplamento e o posicionamento de uma fibra ótica de modo único, através da maximização de eficiência de acoplamento e desacoplamento para um comprimento de onda específico.

Como pode ser visto na figura 3.10 (a), foi desenhado um modelo 2D de uma fibra ótica de modo único com um núcleo de SiO_2 e um encapsulamento dopado de SiO_2, uma guia de onda com um núcleo de TiO_2 e um encapsulamento de SiO_2, *grating* de transmissão de acoplamento em TiO_2 e um substrato de Si. A fibra ótica de modo único apresenta um núcleo com um comprimento de $9\,\mu m$, encapsulamento com um

comprimento de 50 µm, uma altura de 20 µm, um θ_i de 10° e origem em $x = 4{,}54$ µm e $y = 0{,}04$ µm. O substrato de Si apresenta um comprimento de 90 µm e uma altura de 9 µm. A da guia de onda apresenta um núcleo com um comprimento de 40 µm, altura de 470 nm, um encapsulamento superior com uma altura de 120 nm, um encapsulamento inferior com uma altura de 1 µm e um comprimento de 90 µm. Por fim, a *grating* de transmissão de acoplamento apresenta um Λ de 680 nm, um l_e de 340 nm, obtendo assim um *duty-cycle* de 50 %, e uma h_e de 235 nm.

Após o desenho do modelo 2D da guia de onda com uma *grating* de transmissão de acoplamento, foi realizada um simulação FDTD com uma área de 29 µm $\times$ $8{,}13$ µm, centrada em $(2, -0.775)$ e uma condição de limite *perfectly matched layer* (PML) que absorve todas as ondas que entram em contacto com a mesma. Foi selecionada uma malha de tipo *auto non-uniform*, com uma precisão de 3, refinamento *conformal variant 0*, fator de estabilidade dt de $0{,}99$ e *step* mínimo de $0{,}25$ nm. Para se conseguir determinar a eficiência de acoplamento foram utilizados dois portos FDTD. O porto 1 foi centrado na coordenada $(3.43, 1.21)$ com um comprimento de 35 µm, configurado como fonte de luz polarizada com um λ de 470 nm, eixo de injeção y, rotação de -10°, desvio de rotação de $6{,}35$ µm, direção para trás, amplitude 1, fase 0 e modo fundamental transverse mode (TM). O porto 2 foi centrado na coordenada $(-12.3, 3)$ com uma altura de 3 µm, eixo de injeção x, direção para a frente, amplitude 1, fase 0 e modo fundamental TM. Como materiais utilizados, foram selecionados para o núcleo e encapsulamento da fibra ótica o SiO_2 e o SiO_2 dopado disponíveis na lista de materiais do *software Ansys Lumerical*, para o núcleo da guia de onda e *grating* de transmissão de acoplamento o TiO_2, para o encapsulamento da guia de onda o SiO_2 e para o substrato o Si, com índices de refração (n) de $1{,}444$, $1{,}434$, $2{,}6$, $1{,}45$ e de $4{,}485$, respetivamente, para um λ de 470 nm. Para todos os materiais de fundo foi selecionado um $n = 1$, representados por ar. Como parâmetros de otimização, foram selecionados o Λ, o l_e, o *duty-cycle* e a posição da fibra x. A configuração inicial da simulação ótica FDTD no *software Ansys Lumerical* pode ser observada na figura 3.10 (b). Para a obtenção de uma eficiência de acoplamento máxima, foi selecionado um algoritmo *particle swarm* e três parâmetros a otimizar: (i) x; (ii) Λ; e (iii) *duty-cycle*. Estes parâmetros foram configurados com gamas de $1{,}5$ µm–5 µm, 100 nm–800 nm e 10 %–95 %, respetivamente.

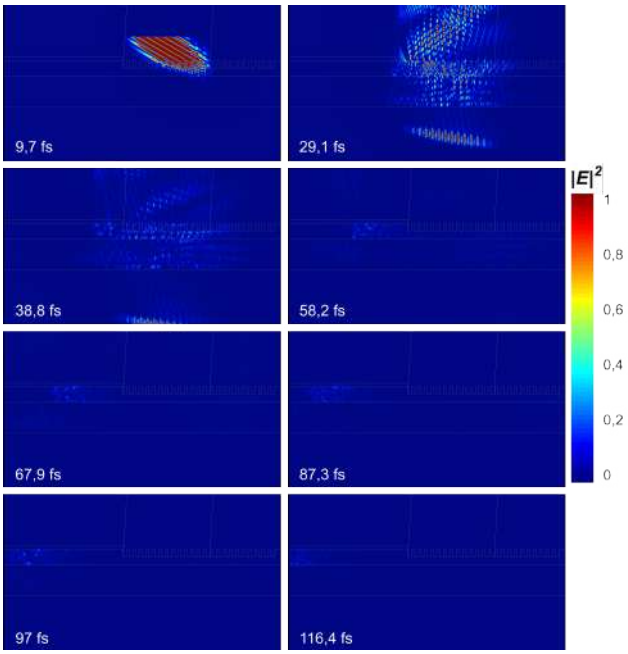
Após a simulação, foi obtida uma máxima eficiência de acoplamento de 18 %, equivalente a uma $A(dB) = 7{,}45$ dB, para um $x = 3{,}32$ µm, $\Lambda = 650$ nm e um *duty-cycle* $= 63$ %. Na figura 3.11, pode-se observar o percurso de uma onda eletromagnética com uma expressão de cor de intensidade de campo elétrico normalizada pré-otimização (figura 3.11 (a)) e pós-otimização (figura 3.11 (b)) dos parâmetros anteriormente descritos para uma obtenção de eficiência de acoplamento máxima. Como se pode verificar pela análise da figura 3.11 (b), a onda eletromagnética que percorre a guia de onda



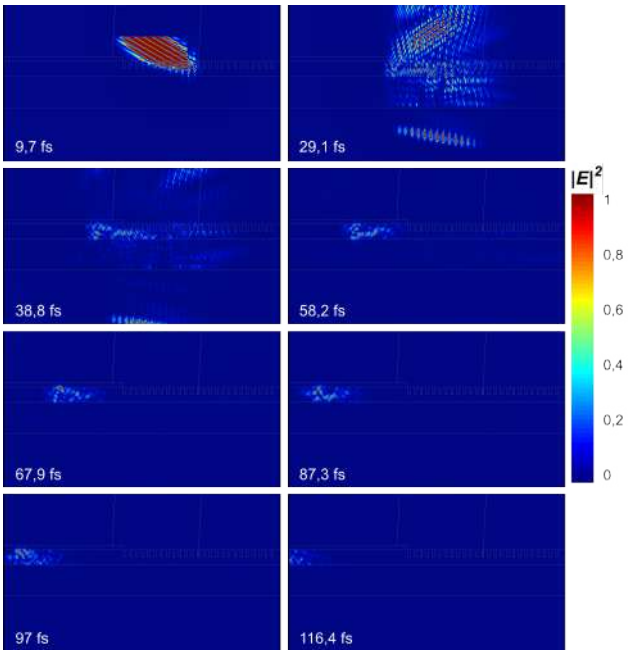
(a) **(b)**

Figura 3.10: Esquemático do modelo 2D no plano cartesiano xy dos parâmetros e configuração inicial utilizada nas simulações óticas FDTD de uma guia de onda com uma *grating* de transmissão de acoplamento no *software Ansys Lumerical*: (a) Esquemático de diferentes parâmetros utilizados na simulação inicial (representação não está à escala); (b) Visualização do modelo 2D das dimensões e configuração inicial no *software Ansys Lumerical*.

apresenta uma maior intensidade de campo elétrico normalizada, confirmando assim a importância do posicionamento da fibra ótica de modo único e dos parâmetros Λ e *duty-cycle* da *grating* de transmissão de acoplamento na obtenção de uma eficiência de acoplamento máxima.



(a)



(b)

Figura 3.11: Representação do percurso de uma onda eletromagnética com uma expressão de cor de intensidade do campo elétrico normalizada pré- e pós-otimização de diferentes parâmetros para uma obtenção de eficiência de acoplamento máxima: (a) Percurso de uma onda eletromagnética pré-otimização; (b) Percurso de uma onda eletromagnética pós-otimização.

Após a simulação e análise dos resultados da otimização FDTD do parâmetro de posicionamento da fibra ótica de modo único e dos parâmetros da *grating* de transmissão de acoplamento, foi desenhado

um novo modelo 2D com a adição de uma *grating* de transmissão de desacoplamento (figura 3.12). Para a obtenção dos valores otimizados do Λ e *duty-cycle* da nova *grating* de transmissão de desacoplamento, foram mantidos os parâmetros otimizados da *grating* de transmissão de acoplamento e os parâmetros de configuração inicial, com exceção da área de simulação FDTD, configuração do porto 2 e configuração dos parâmetros a otimizar. A área de simulação FDTD passou a $55\,\mu\text{m} \times 8{,}13\,\mu\text{m}$ e centrada em $(-11.0725, -0.775)$. O porto 2 passou a estar centrado na coordenada $(-31.65, 0.56)$ com um comprimento de $18{,}19\,\mu\text{m}$, eixo de injeção y e direção para a trás. Por fim, para a obtenção de uma eficiência de desacoplamento máxima, foram selecionados dois parâmetros a otimizar, Λ e *duty-cycle*, com as gamas $100\,\text{nm}$–$800\,\text{nm}$ e $10\,\%$–$95\,\%$, respetivamente.

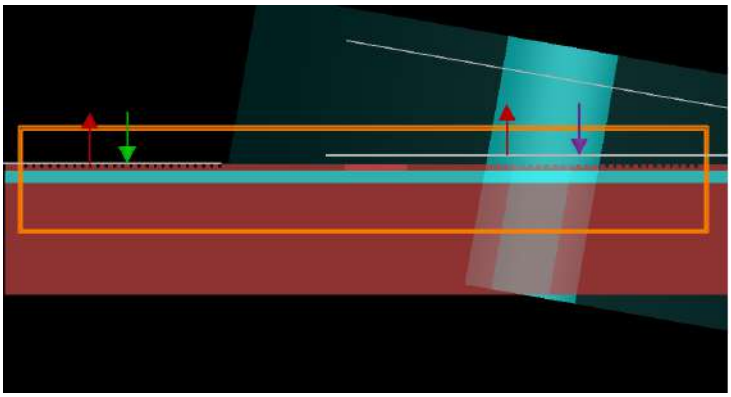


Figura 3.12: Modelo 2D no plano cartesiano xy da configuração inicial utilizada nas simulações óticas FDTD de uma guia de onda com uma *grating* de transmissão de acoplamento e uma *grating* de transmissão de desacoplamento no *software Ansys Lumerical*.

Após a simulação, foi obtida uma máxima eficiência de desacoplamento de $8{,}75\,\%$, equivalente a uma $A(dB) = 10{,}58\,\text{dB}$, para um $\Lambda = 800\,\text{nm}$ e um *duty-cycle* $= 64\,\%$. Na figura 3.13, pode-se observar o percurso de uma onda eletromagnética com uma expressão de cor de intensidade de campo elétrico normalizada pré-otimização (figura 3.13 (a)) e pós-otimização (figura 3.13 (b)) dos parâmetros da *grating* de transmissão de desacoplamento para uma obtenção de eficiência de desacoplamento máxima. Como se pode verificar pela análise da figura 3.13 (b), a onda eletromagnética que percorre a guia de onda e é desacoplada pela *grating* de transmissão de desacoplamento, refrata mais luz e com uma maior intensidade de campo elétrico normalizada para o exterior da guia de onda e menos em luz refletida na direção do encapsulamento inferior e do núcleo da guia de onda, validando a importância dos parâmetros Λ e *duty-cycle* da *grating* de transmissão de desacoplamento na obtenção de uma eficiência de desacoplamento máxima.

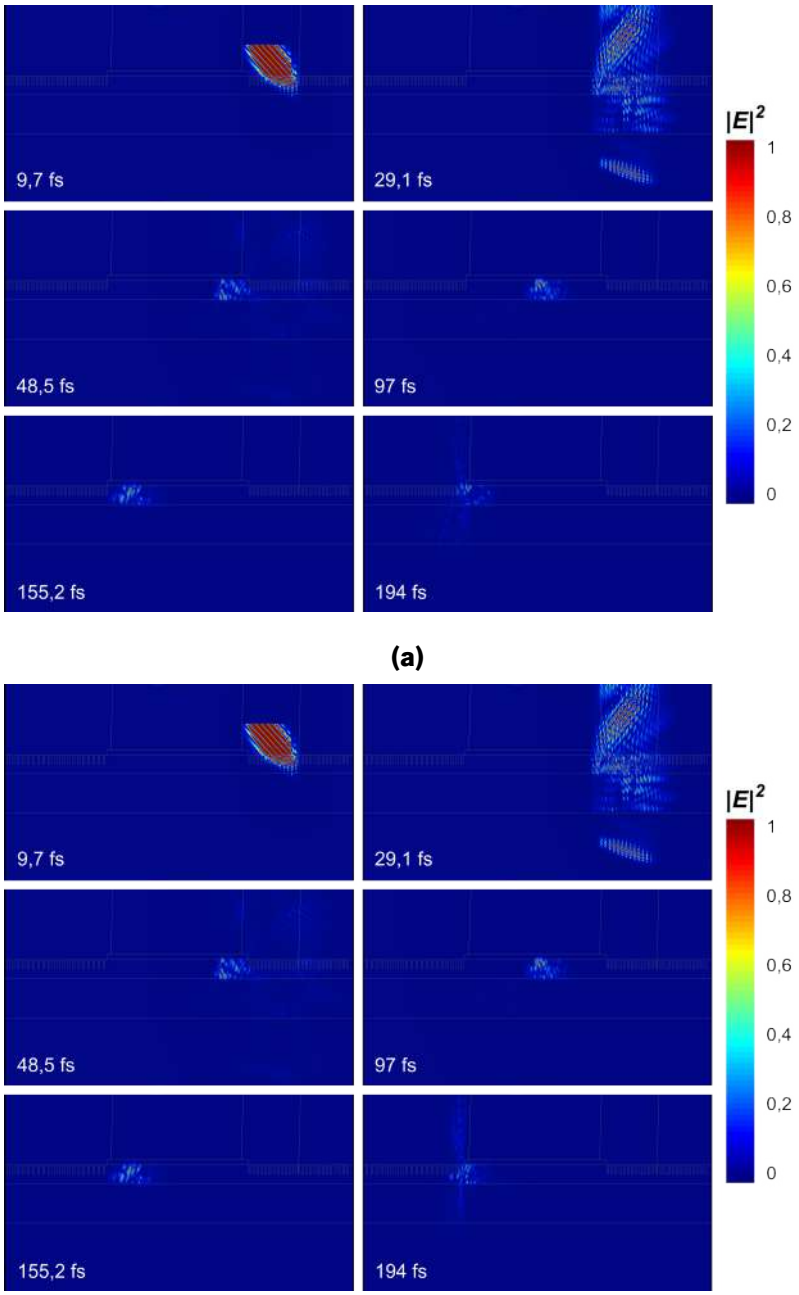


Figura 3.13: Representação do percurso de uma onda eletromagnética com uma expressão de cor de intensidade do campo elétrico normalizada pré- e pós-otimização de diferentes parâmetros para uma obtenção de eficiência de desacoplamento máxima: (a) Percurso de uma onda eletromagnética pré-otimização; (b) Percurso de uma onda eletromagnética pós-otimização.

Com os resultados destas simulações óticas FDTD, os valores otimizados dos diferentes parâmetros das *gratings* de transmissão de acoplamento e desacoplamento foram utilizados na secção 3.1 para a obtenção de resultados otimizados das simulações óticas FEM.

Capítulo 4

Tecnologias de Microfabricação

Este capítulo apresenta as diferentes tecnologias usadas nos processos de microfabricação da sonda neuronal flexível, incluindo as microestruturas padronizadas na mesma, microelétrodos e guia de onda.

4.1 Definição das Tecnologias de Fabrico

4.1.1 Fotolitografia

A fotolitografia é um processo de padronização em que um polímero fotossensível é exposto seletivamente à luz, utilizando uma máscara, criando uma imagem latente no polímero que pode ser dissolvida de forma seletiva, permitindo o acesso ao substrato subjacente [140]. Existem três tipos de polímeros fotossensíveis: positivo, negativo e de inversão de imagem. No polímero fotossensível positivo, as áreas expostas à luz tornam-se solúveis durante o processo de revelação. Em contraste, o polímero fotossensível negativo torna-se insolúvel quando exposto à luz. O polímero de inversão de imagem pode comportar-se como positivo ou negativo. Caso seja submetido a uma cura pós-exposição (PEB), comporta-se como negativo, caso contrário, age como positivo. Dependendo do tipo de polímero fotossensível utilizado, o padrão na máscara pode produzir diferentes resultados após a revelação. A fotolitografia pode ser realizada com diversas técnicas, dependendo da fonte de luz utilizada, sendo as mais comuns: (i) radiação UV para litografia ótica; (ii) raios-X para litografia galvânica (LIGA); e (iii) feixe de eletrões ou feixe de iões para litografia por feixe de partículas [141].

As tecnologias de litografia sem máscaras físicas, como a EBL, a litografia por feixe de iões (IBL), a escrita direta por laser femtosegundo (FsLDW), a interferometria de múltiplos feixes e a litografia por projeção digital, foram desenvolvidas e têm desempenhado um papel crucial na modelação em micro e

nano escala para a produção de dispositivos nas áreas da microeletrónica, biochips, fotónica, entre outras. Entre estas técnicas, a litografia por projeção digital com recurso a um dispositivo digital de microespelhos (DMD) permite a produção rápida de estruturas complexas, tendo a sua resolução alcançado o nível sub-micrométrico através da otimização da fonte de luz e da razão de ampliação da objetiva [142]. Na figura 4.1 pode ser observado o esquemático de um sistema de litografia por projeção digital DMD. Este sistema converte uma máscara digital em várias imagens individuais, através do modulador espacial de luz DMD, sendo depois projetadas na amostra e obtida a padronização desejada.

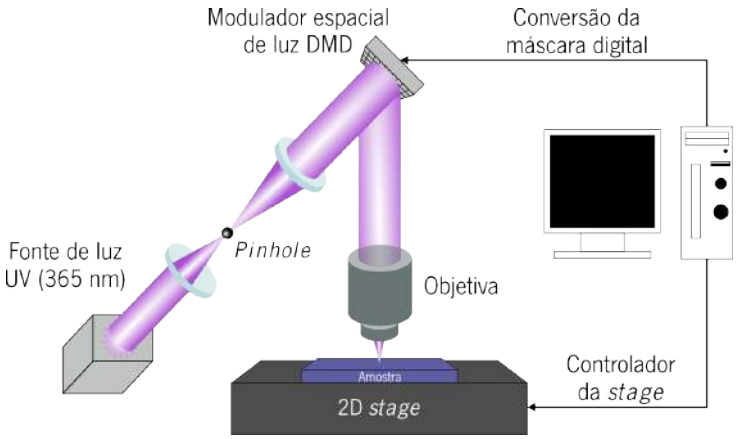


Figura 4.1: Esquemático de um sistema de litografia por projeção digital DMD.

4.1.2 Evaporação por Feixe de Eletrões (e-beam)

A tecnologia de deposição física de vapores (PVD) engloba métodos como a evaporação, o revestimento iónico e a pulverização catódica. Esta tecnologia é extremamente versátil, permitindo a deposição de quase todos os tipos de materiais inorgânicos, como metais, ligas, compostos e alguns materiais orgânicos. As taxas de deposição podem variar entre $10\,\text{Å}\,\text{min}^{-1}$–$750\,000\,\text{Å}\,\text{min}^{-1}$, com as taxas mais elevadas resultantes do uso de fontes aquecidas por um feixe de eletrões. No processo de evaporação, os vapores são gerados a partir de um material posicionado numa fonte, que é aquecida por métodos como resistência direta, radiação, correntes induzidas, feixe de eletrões, feixe de laser ou descarga de arco. Normalmente, o processo ocorre em vácuo, permitindo que os átomos evaporados se desloquem sem colisões diretas, seguindo uma linha reta até se condensarem no substrato [143].

A e-beam utiliza eletrões para evaporar materiais ou promover a dissociação de precursores moleculares em ambiente de vácuo, permitindo a criação de filmes-finos. Este método supera as limitações das fontes de evaporação por aquecimento resistivo. Com o avanço dos sistemas comerciais de feixe de eletrões, esta técnica ganhou popularidade na produção de filmes metálicos, destacando-se pela elevada

precisão no controlo da taxa de deposição e pela facilidade em evaporar metais com pontos de fusão elevados. Um filamento, geralmente de W, é aquecido a uma temperatura elevada pela passagem de uma corrente intensa. A essa temperatura, a superfície do filamento emite um fluxo de eletrões com energia cinética que são acelerados, direcionados e focados por eletroímanes para bombardear o material alvo. O bombardeamento de alta energia aquece o material até atingir o seu ponto de fusão e, subsequentemente, provocar a sua evaporação ou sublimação [144]. A representação esquemática de um sistema de e-beam pode ser observado na figura 4.2.

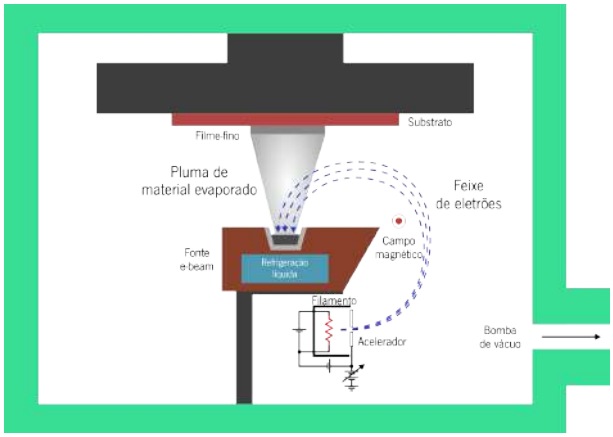


Figura 4.2: Esquemático de um sistema de e-beam e processo de deposição.

4.1.3 Pulverização Catódica por Magnetrão

A pulverização catódica por magnetrão é uma das técnicas mais consolidadas e amplamente utilizadas nas indústrias para a produção de revestimentos em diversos materiais, incluindo metais, semicondutores e ligas. Antes do início do processo de deposição, é induzido vácuo na câmara, sendo de seguida introduzido árgon (Ar), que serve como gás de pulverização. A pulverização catódica por magnetrão utiliza um campo elétrico e magnético intenso para bombardear a superfície do alvo escolhido com iões de Ar, formados a partir da colisão entre átomos de Ar e eletrões confinados no campo magnético. Esses iões são atraídos para o alvo, carregado negativamente (cátodo), e o bombardeamento provoca a ejeção de partículas do alvo, que são subsequentemente depositadas como um filme-fino no substrato, localizado no ânodo, oposto ao alvo. Dependendo da fonte de energia utilizada, a pulverização catódica por magnetrão pode ser classificada em dois tipos: (i) pulverização catódica por magnetrão DC e (ii) pulverização catódica por magnetrão RF. Embora a pulverização catódica por magnetrão DC seja relativamente mais económica do que a RF, esta apenas pode ser aplicada a alvos condutores, como metais ou semicondutores dopados. Adicionalmente, gases reativos como o oxigénio ou o azoto são utilizados para reagir com os materiais

pulverizados, permitindo a produção de filmes-finos de óxidos ou nitretos. Este método é conhecido como pulverização catódica reativa por magnetrão [145].

Na pulverização catódica por magnetrão DC, os eletrões ejetados do cátodo são acelerados para longe dele, mas não são usados de forma eficiente para manter a descarga. No entanto, ao aplicar um campo magnético apropriado, é possível desviar os eletrões para que permaneçam próximos da superfície do alvo. Com uma disposição adequada dos ímanes, os eletrões podem circular num percurso fechado sobre a superfície do alvo. Este intenso fluxo de eletrões gera um plasma de alta densidade, a partir do qual se podem extrair iões para pulverizar o material do alvo [146].

Quando se utilizam alvos não condutores, a RF é a única opção capaz de depositar filmes-finos por pulverização catódica por magnetrão. Quando se é acoplado de forma capacitiva uma fonte de alta frequência RF (geralmente $13{,}56$ MHz) a um elétrodo, com uma grande variação de tensão pico-a-pico, cria-se um potencial alternado positivo/negativo na sua superfície. Durante parte de cada meio-ciclo, esse potencial acelera os iões em direção à superfície, conferindo-lhes energia suficiente para causar pulverização catódica, ao passo que, em meios-ciclos alternados, os eletrões alcançam a superfície do alvo de modo a evitar qualquer acumulação de carga [143, 146].

A representação esquemática de um sistema de pulverização catódica por magnetrão pode ser visualizado na figura 4.3.

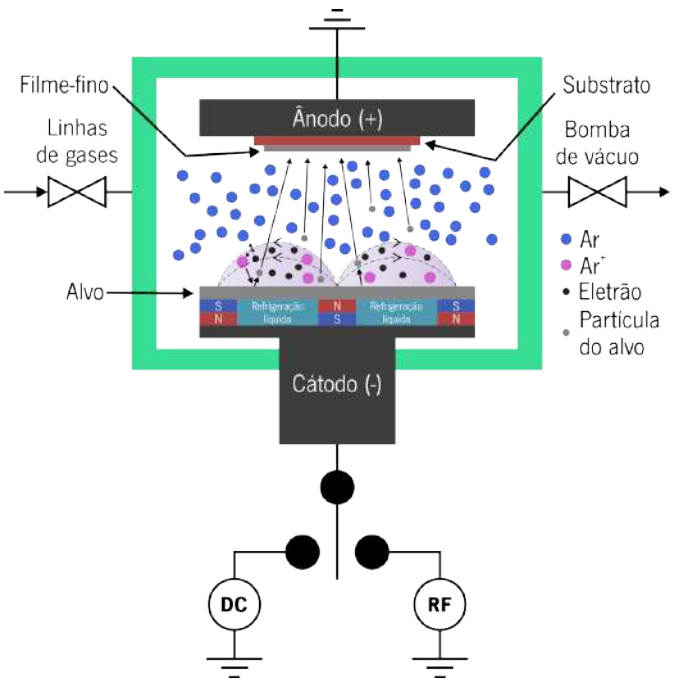


Figura 4.3: Representação esquemática de um sistema de pulverização catódica por magnetrão e processo de deposição.

4.1.4 Eletrodeposição

A eletrodeposição é uma tecnologia de deposição de materiais sobre uma superfície mediante a aplicação de um campo elétrico. Os materiais que podem ser eletrodepositados incluem diversos metais, ligas metálicas, semicondutores, óxidos metálicos, nanomateriais e polímeros condutores. A estrutura e a morfologia finais dos materiais eletrodepositados são fortemente influenciadas por dois fatores principais: (i) o substrato utilizado, uma vez que a eletrodeposição é um processo dependente da superfície; e (ii) o ambiente eletroquímico, ou seja, a composição do eletrólito. Tradicionalmente, a eletrodeposição é realizada em eletrólitos aquosos devido à alta solubilidade de muitos sais metálicos, bem como à elevada condutividade e baixa viscosidade dos solventes aquosos. Esta técnica é amplamente reconhecida na ciência dos materiais pela sua simplicidade e baixo consumo energético, podendo ser realizada à temperatura ambiente. Uma das grandes vantagens da eletrodeposição é a possibilidade de ajustar as propriedades e a estrutura do material eletrodepositado, através da modificação dos parâmetros eletroquímicos, como a densidade de corrente e o potencial aplicado. Além disso, a composição dos eletrólitos também desempenha um papel crucial nas caraterísticas do material eletrodepositado, permitindo obter diferentes composições e morfologias mediante a adição de vários aditivos inorgânicos ou orgânicos [147].

Conforme representado na figura 4.4, o processo de eletrodeposição envolve a imersão do objeto a ser revestido num recipiente contendo o eletrólito e um contra-elétrodo. Em seguida, ambos os elétrodos são conetados a uma fonte de alimentação externa para permitir o fluxo de corrente. O objeto a revestir é ligado ao terminal negativo da fonte, fazendo com que os iões metálicos se reduzam a átomos metálicos, formando assim o revestimento na superfície [148].

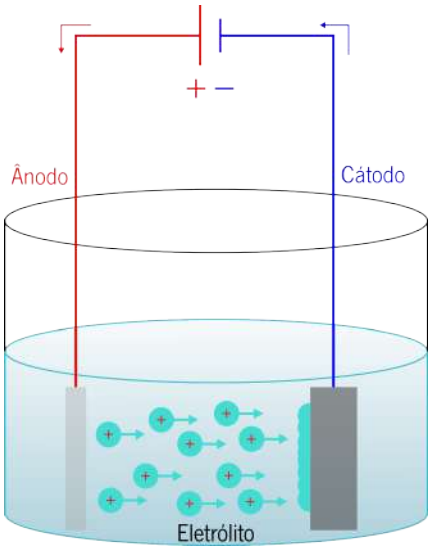


Figura 4.4: Esquemático de um processo de eletrodeposição.

4.1.5 Deposição por Camada Atómica (ALD)

A deposição por camada atómica (ALD) tornou-se uma técnica importante na deposição de filmes-finos e é amplamente utilizada. Numa operação típica de ALD, um filme é formado num substrato ao expor a sua superfície a moléculas gasosas de forma alternada. Ao contrário de CVD, no ALD os precursores não estão presentes simultaneamente no reator, sendo introduzidos em impulsos sequenciais que não se sobrepõem. Em cada impulso, as moléculas precursoras reagem com a superfície de forma auto-limitada. Quando todos os locais reativos da superfície são ocupados, a reação termina automaticamente. Desta forma, a quantidade máxima de material depositado após cada ciclo de ALD depende da interação entre o precursor e a superfície. Esta técnica permite criar filmes-finos à escala atómica com alta uniformidade e conformidade. Este método baseia-se essencialmente em sequências de reações binárias, nas quais ocorrem duas reações de superfície que resultam na deposição de um filme binário. A deposição é limitada pelo número finito de locais disponíveis na superfície. Quando ambas as reações são auto-limitadas, é possível realizá-las de forma sequencial, permitindo o crescimento controlado de um filme-fino a nível atómico [144]. A figura 4.5 ilustra as interações contínuas e auto-limitadas da superfície durante o processo cíclico de ALD.

O processo de ALD decorre dentro de uma janela de temperatura que é determinada pela estabilidade dos precursores e pela sua interação com a superfície. Quando a temperatura em que a reação começa a ocorrer é demasiado alta, essa janela de temperatura pode diminuir ou até desaparecer. Assim, em muitos processos térmicos, não há uma janela de temperatura ideal, tornando a deposição inviável. No entanto, ao utilizar um dos reagentes como um radical energético, é possível ampliar a janela de temperatura, permitindo em alguns casos, que o processo ocorra à temperatura ambiente. Este método é conhecido como deposição por camada atómica melhorada por radicais (REALD). Um radical é um átomo ou fragmento molecular instável que liberta uma quantidade significativa de energia ao regressar a uma configuração estável. Independentemente da forma como são gerados, os radicais quando aplicados num processo ALD, oferecem uma abordagem versátil para o desenvolvimento de novos processos e aplicações de filmes-finos. Entre as vantagens do REALD estão a possibilidade de deposições a temperaturas mais baixas, a maior fragmentação dos precursores, uma seleção mais ampla de precursores para a síntese de filmes-finos e a melhoria das propriedades dos materiais. Adicionalmente, se os radicais forem gerados por plasma, estes podem ser eletricamente carregados, o que intensifica o processo através do bombardeamento iónico dos substratos. A forma mais simples de gerar radicais é através de uma descarga luminescente num reator de baixa pressão. Logo, todos os reatores REALD são sistemas de deposição por camada atómica melhorada por plasma (PEALD). Estes sistemas diferenciam-se pelas várias

fontes de plasma que podem utilizar, como descargas capacitivas, descargas geradas por solenóides, descargas de micro-ondas, entre outras [149].

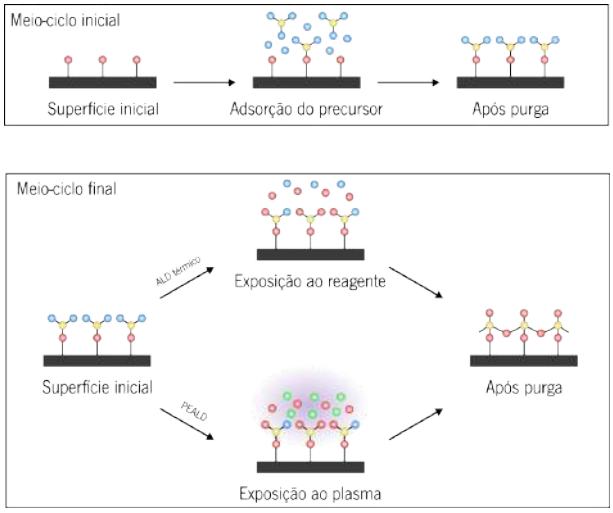


Figura 4.5: Representação de um ciclo ALD térmico e PEALD (figura adaptada de [150]).

4.1.6 Corrosão Iónica Reativa (RIE)

A RIE é um processo de plasma em que espécies reativas, como radicais e iões, excitadas por descargas de RF atacam substratos ou filmes-finos numa câmara de baixa pressão. Este processo resulta da interação sinérgica entre espécies quimicamente ativas e o bombardeamento de iões energéticos. A RIE é mais eficiente do que o bombardeamento físico puro de iões ou a corrosão química espontânea. Como o bombardeamento iónico é direcional, a RIE apresenta um caráter anisotrópico, com uma taxa de corrosão lateral reduzida e a formação de paredes laterais verticais ou quase verticais. Esta técnica é fundamental quando se pretendem criar linhas ou canais estreitos, ou quando é necessário fabricar estruturas com elevada razão [151].

A figura 4.6 (a) sumariza os eventos que ocorrem convencionalmente num processo RIE. O processo de corrosão começa com a formação de espécies reativas, que são transportadas até ao substrato e se adsorvem na sua superfície. Esta adsorção desencadeia reações que geram novas moléculas, as quais são posteriormente dessorvidas e libertadas na atmosfera. Na figura 4.6 (b) pode ser observado um equipamento RIE, composto por um reator de placas paralelas, onde o plasma e a tensão de polarização DC são gerados através de uma fonte de plasma acoplada de forma capacitiva (CCP) [152].

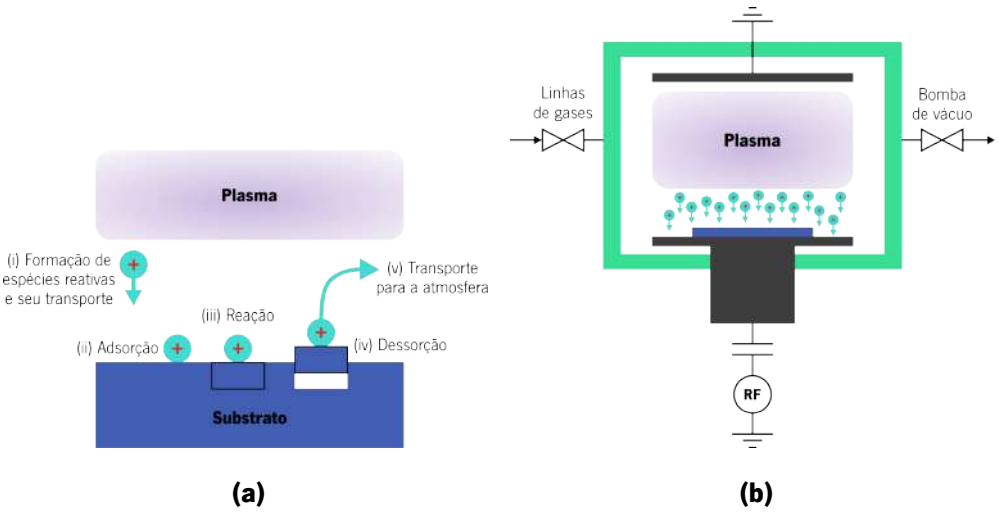


Figura 4.6: Eventos durante a corrosão num equipamento RIE e seu respetivo esquemático: (a) Eventos num processo RIE convencional; (b) Esquemático de um equipamento RIE de placas paralelas.

4.2 Fabrico de uma Sonda Neuronal Flexível com Microelétrodos de Pt Eletrodepositada

O processo de fabrico de uma versão inicial da sonda neuronal flexível com microelétrodos de Pt eletrodepositada envolveu quatro principais etapas: (i) fotolitografia e processos de cura para padronizar a geometria da sonda neuronal flexível; (ii) fotolitografia, deposição de filmes-finos de Ti e *lift-off* para padronizar os contactos, as pistas e os microelétrodos; (iii) fotolitografia e processos de cura para encapsular a sonda neuronal flexível; e (iv) eletrodeposição de Pt para o revestimento dos microelétrodos.

4.2.1 Padronização da Geometria da Sonda Neuronal Flexível

Tendo em conta as vantagens descritas na secção 2.2, foi escolhida a PI fotossensível negativa *LTC 9305* da *Fujifilm* [153] como material de padronização da geometria da sonda neuronal flexível devido à sua biocompatibilidade, excelentes caraterísticas dielétricas, resistência, flexibilidade, inércia química, durabilidade, cura a baixas temperaturas ($200\,^{\circ}$C–$250\,^{\circ}$C), estabilidade térmica até os $510\,^{\circ}$C e criação de filmes com espessuras que variam entre os $2\,\mu$m–$5\,\mu$m e resolução mínima de $3\,\mu$m [153, 154]. Após a otimização das várias etapas do processo fotolitográfico, foi obtida uma receita que produz duas unidades geométricas do corpo da sonda neuronal flexível por cada substrato sacrificial em Si, com o objetivo de se comprovar a reprodutibilidade do processo. Em cada processo realizado, eram normalmente usados quatro substratos sacrificiais de Si.

O desenvolvimento da geometria da sonda neuronal flexível começa com a preparação do substrato sacrificial onde será fabricada. O processo completo de produção da sonda neuronal flexível utiliza um substrato rígido para facilitar o manuseamento da estrutura e garantir que a sonda permanece estável na sua configuração plana. Como substrato, foram utilizadas amostras de Si de 80 mm $\times$ 30 mm e cortadas com um equipamento *dicing saw* a partir de *wafers* de Si com 10 cm de diâmetro e 525 µm de espessura.

A primeira etapa do processo de fotolitografia envolveu a limpeza dos substratos de Si. Os substratos foram submersos em acetona e submetidos a agitação ultrassónica durante 20 min, a uma temperatura de $40\,^{\circ}$C. Após o banho ultrassónico, a acetona foi removida dos substratos seguindo a sequência: água destilada/álcool isopropílico (IPA)/água destilada. Os substratos foram depois secos com azoto, aquecidos durante 20 min a $100\,^{\circ}$C numa placa de aquecimento de contacto e cobertos com uma estrutura metálica para assegurar a estabilização da temperatura e proteger as amostras de contaminação por micropartículas.

Depois de limpos os substratos de Si, foi realizada a deposição do filme de *LTC 9305* para obter uma espessura de 4 µm de PI fotossensível. A espessura desejada foi atingida ajustando os parâmetros de configuração, conforme indicado na tabela 4.1, no equipamento de *spin-coating*. Para isso, foram medidos 3 mL de *LTC 9305* num gobelé e vertidos suavemente sobre cada substrato de Si de forma contínua, garantindo a cobertura total da superfície e evitando a formação de bolhas de ar.

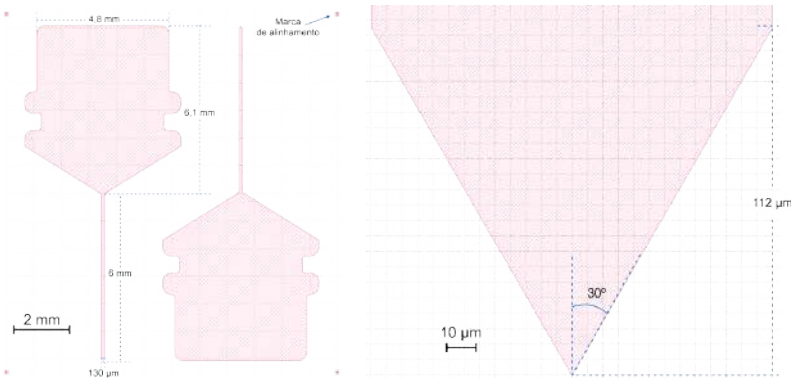
Tabela 4.1: Parâmetros de configuração do equipamento de *spin-coating* para obter um filme de 4 µm de espessura de *LTC 9305*.

Parâmetros	**Primeiro Passo**	**Segundo Passo**
Velocidade (rpm)	1000	2000
Aceleração (rpm s^{-1})	4300	4300
Tempo (s)	4	26

Após a deposição, foi necessário tornar o filme de *LTC 9305* sensível à luz ultravioleta (UV) de 365 nm e garantir a sua aderência ao substrato de Si. Para isso, foi realizada uma cura conhecida como *soft-bake*. As amostras foram colocadas numa placa de aquecimento de contacto, pré-aquecida a $100\,^{\circ}$C, na qual permanecem durante 15 min. Durante a otimização desta etapa do processo fotolitográfico, observou-se que era essencial transferir as amostras imediatamente após a centrifugação para a placa de aquecimento de contacto, pois, caso contrário, o filme de *LTC 9305* recuava progressivamente para o centro da amostra de Si.

De seguida, foram utilizadas máscaras digitais, previamente desenhadas no *software KLayout* (fi-

gura 4.7), para a padronização da geometria da sonda, utilizando o equipamento DWL *μ-MLA Tabletop Maskless Aligner* da *Heidelberg Instruments*. A geometria do topo da sonda neuronal flexível foi desenhada com uma geometria específica, respeitando os requisitos de acoplamento com o conetor *flexible printed cable* (FPC) *FH29BW–22S–0.2SHW(05)* da *Hirose Electric* [155]. É também importante de referir que foram desenhadas marcas de alinhamento em posições específicas das máscaras digitais, permitindo o correto alinhamento de futuros processos fotolitográficos. A exposição da PI fotossensível, foi proveniente de um LED UV (365 nm), configurado com uma dose de energia de 66 mJ cm^{-2}, um *defocus* de 8 e em modo *clear*, deixando assim uma imagem latente da geometria da sonda neuronal flexível.



(a) **(b)**

Figura 4.7: Máscara digital desenhada no *software KLayout* para a padronização da geometria da sonda neuronal flexível utilizada no *μ-MLA Tabletop Maskless Aligner*: (a) Visão geral da máscara digital usada na padronização da geometria da sonda neuronal flexível; (b) Visão ampliada da máscara digital onde se pode observar a ponta afilada da sonda neuronal flexível.

Após a exposição à luz UV, procedeu-se para a uma nova cura, denominada por PEB. As amostras foram colocadas na placa de aquecimento de contacto durante 10 min, pré-aquecida a 50 °C, completando assim a fotorreação iniciada durante a exposição UV. Com a PEB finalizado, as amostras foram retiradas da placa de aquecimento de contacto e colocadas dentro de um recipiente metálico fechado, arrefecendo até à temperatura ambiente.

De seguida, procedeu-se à etapa de revelação da PI fotossensível. Para efetuar a revelação das áreas expostas à luz UV, geometria da sonda neuronal flexível e marcas de alinhamento, foi utilizado o revelador *HTR-D2* da *Fujifilm* [156], que dissolve a PI fotossensível não exposta. Foi então preparada uma solução de 250 mL de *HTR-D2*, onde as amostras foram mergulhadas e colocadas num agitador magnético para garantir uma revelação uniforme. A revelação foi realizada durante 1 min, em 4 ciclos de 15 s, entre os quais a posição das amostras foi alternada. Após a revelação total das áreas expostas, as amostras

foram limpas com *RER 600* da *Fujifilm* [157], para a remoção de vestígios deixados pelo revelador. As amostras foram imersas em 250 mL de *RER 600* e colocadas num agitador magnético durante 30 s. De seguida, estas foram foram limpas com água desionizada, secas com azoto e guardadas individualmente em caixas de Petri.

Para terminar o processo de padronização da sonda neuronal flexível, as amostras foram submetidas a um processo de cura final num forno de precisão, a uma temperatura padrão de $330\,^{\circ}$C durante 4 h, com uma rampa de aquecimento de $4\,^{\circ}$C min^{-1}. Conclui-se assim a primeira etapa do fabrico de uma sonda neuronal flexível. A geometria final da sonda neuronal flexível, fabricada com recurso a um *μ-MLA Tabletop Maskless Aligner*, pode ser observada na figura 4.8. Na figura 4.9 encontra-se representado o esquemático do processo fotolitográfico de padronização da geometria da sonda neuronal flexível, recorrendo a um corte transversal das amostras.

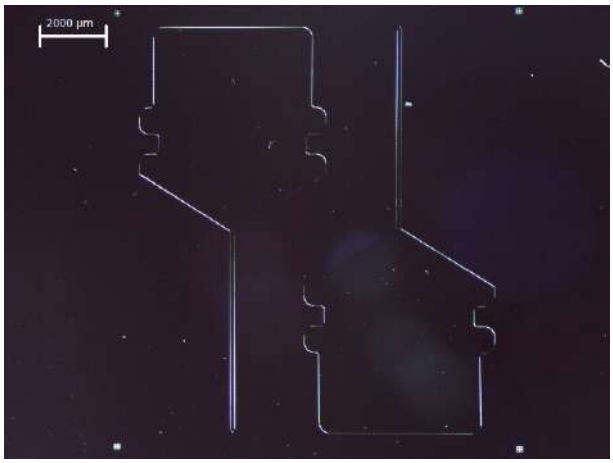


Figura 4.8: Geometria da sonda neuronal flexível fabricada com recurso a um *μ-MLA Tabletop Maskless Aligner*.

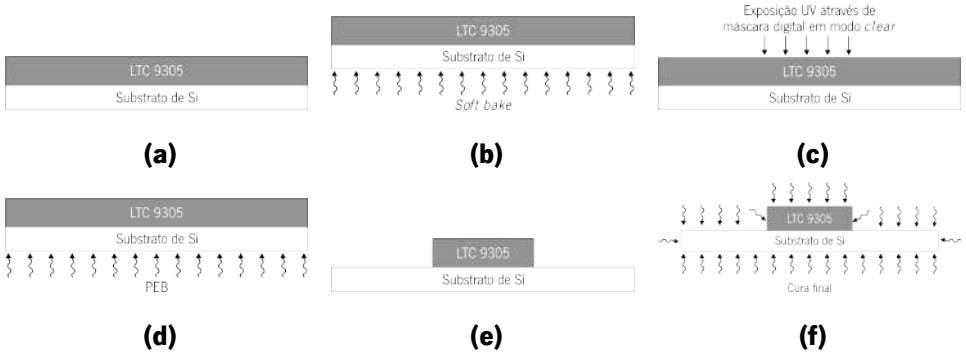


Figura 4.9: Esquemático do processo fotolitográfico para a padronização da geometria da sonda neuronal flexível através da utilização da PI fotossensível *LTC 9305*: (a) Deposição de um filme de *LTC 9305* com uma espessura de $4\,\mu m$; (b) *Soft-bake* da amostra; (c) Exposição da amostra à luz UV com recurso a uma máscara digital em modo *clear;* (d) PEB da amostra; (e) Revelação da amostra, sendo obtida a geometria final da sonda neuronal flexível; (f) Cura final da geometria da sonda neuronal flexível obtida.

4.2.2 Padronização dos Contactos, Pistas e Microelétrodos Metálicos da Sonda Neuronal Flexível

Com a obtenção da geometria da sonda neuronal flexível, passou-se de seguida para uma etapa, que consistiu na padronização dos contactos, pistas e microelétrodos metálicos sobre o corpo da sonda neuronal flexível. Para tal, foi escolhido o Ti como material para a criação de uma camada de adesão entre a PI fotossensível e metais depositados de seguida. Este material é amplamente utilizado em aplicações eletrónicas flexíveis biomédicas, devido à sua biocompatibilidade e excelente promoção da adesão entre substratos poliméricos e metais [158–160]. Para a padronização das estruturas, foi selecionado o polímero fotossensível negativo *AZ nLOF 2070* da *MicroChemicals* [161] como filme sacrificial no processo fotolitográfico de *lift-off*. Esta escolha deveu-se à sua elevada estabilidade térmica de $250\,^{\circ}C$, elevada estabilidade química, criação de perfil com *undercut* indicado para processos de *lift-off* e criação de filmes com espessuras que variam entre os $5\,\mu m$–$11\,\mu m$. O processo de *lift-off* envolve a padronização de uma máscara em polímero fotossensível sacrificial, podendo este ser positivo ou negativo, dependendo da aplicação, criando assim um padrão inverso da estrutura desejada. De seguida, é depositado um filme-fino do metal desejado sobre toda a estrutura. Após a deposição, o polímero fotossensível sacrificial e o metal depositado sobre ele são removidos utilizando um solvente, permanecendo apenas o metal depositado diretamente no substrato através de aberturas criadas no polímero fotossensível sacrificial.

O processo fotolitográfico da padronização dos contactos, pistas e microelétrodos sobre sobre o corpo da sonda neuronal flexível começou pela limpeza das amostras segundo a sequência água destilada/IPA/

água destilada, sendo de seguida secas com azoto e aquecidos durante 20 min a $100\,^{\circ}$C numa placa de aquecimento de contacto.

Depois de limpas as amostras, foi realizada a deposição do filme de *AZ nLOF 2070* para obter uma espessura de 7 µm de polímero fotossensível. A espessura desejada foi atingida ajustando os parâmetros de configuração, conforme indicado na tabela 4.2, no equipamento de *spin-coating*. Para isso, foram medidos 4 mL de *AZ nLOF 2070* num gobelé e vertidos suavemente sobre cada amostra.

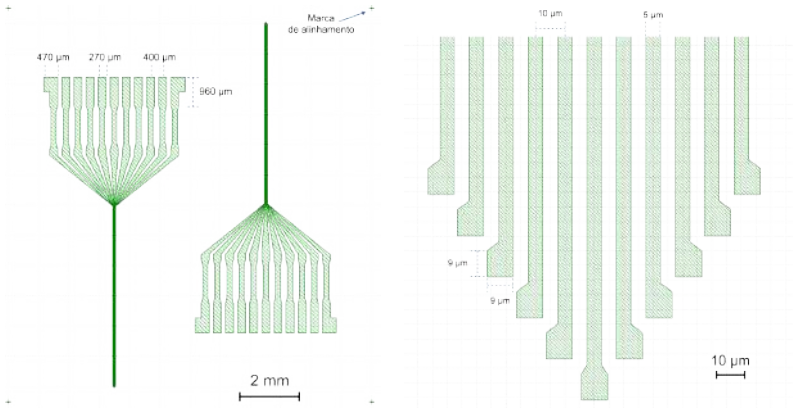
Tabela 4.2: Parâmetros de configuração do equipamento de *spin-coating* para obter um filme de 7 µm de espessura de *AZ nLOF 2070*.

Parâmetros	Primeiro Passo	Segundo Passo
Velocidade (rpm)	1500	2500
Aceleração (rpm s^{-1})	1910	1910
Tempo (s)	5	15

Após a deposição do polímero fotossensível, este foi curado através de um *soft-bake* numa placa de aquecimento de contacto, previamente aquecida a $100\,^{\circ}$C, na qual permanecem durante 10 min. De seguida, as amostras foram devidamente alinhadas, através da correspondência das coordenadas das marcas de alinhamento na máscara digital com a localização física das mesmas. Finalizando, as amostras foram expostas à luz UV com uma energia de 17 mJ cm^{-2}, um *defocus* de 6 e em modo *dark*. Para esta exposição foram utilizadas máscaras digitais representadas na figura 4.10.

Após a exposição à luz UV, procedeu-se à PEB. As amostras foram colocadas na placa de aquecimento de contacto durante 5 min, pré-aquecida a $110\,^{\circ}$C. Durante a otimização desta etapa, verificou-se a sua extrema importância na criação do *undercut* no polímero fotossensível, essencial em processos *lift-off*, pois pequenas variações na temperatura e duração da PEB, resultava em *undercuts* com declives bastantes diferentes. Devido a estes resultados, a PEB foi otimizada para a criação de superfícies de contacto com o substrato de PI fotossensível com uma resolução mínima de 3 µm. Com a PEB finalizada, as amostras foram retiradas da placa de aquecimento de contacto e colocadas dentro de um recipiente metálico fechado, arrefecendo até à temperatura ambiente.

De seguida, procedeu-se à etapa de revelação do polímero fotossensível. Para efetuar a revelação das áreas expostas à luz UV, foi utilizado o revelador *AZ 726 MIF* da *MicroChemicals* [162]. Foi então preparada uma solução de 250 mL de *AZ 726 MIF*, onde as amostras foram mergulhadas e colocadas num agitador magnético. A revelação foi realizada durante 40 s, em 4 ciclos de 10 s, entre os quais a posição das amostras foi alternada. Após a revelação total das áreas expostas, as amostras foram limpas



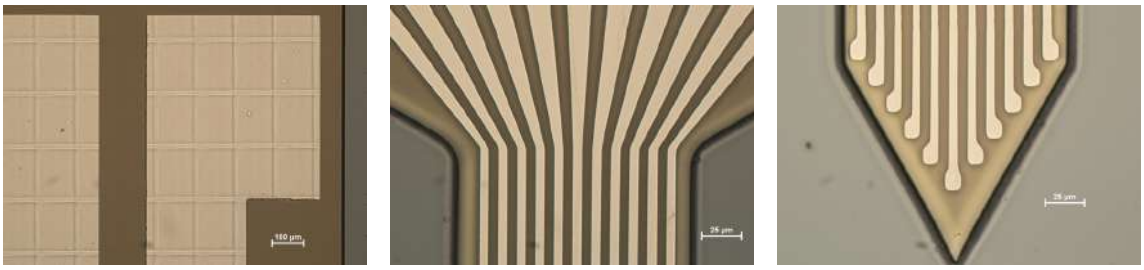
(a) **(b)**

Figura 4.10: Máscara digital desenhada no *software KLayout* para a padronização dos contactos, pistas e microelétrodos da sonda neuronal flexível utilizada no *μ-MLA Tabletop Maskless Aligner*: (a) Visão geral da máscara digital usada na padronização dos contactos, pistas e microelétrodos da sonda neuronal flexível; (b) Visão ampliada da máscara digital onde se pode observar a padronização das pistas e microelétrodos na ponta sonda neuronal flexível.

com água desionizada, secas com azoto e guardadas individualmente em caixas de Petri.

A técnica de deposição de Ti utilizada para criar a camada de adesão foi o e-beam, uma vez que este método produziu filmes-finos de Ti com melhor adesão, uniformidade e menor resistência elétrica em comparação com a pulverização catódica por magnetrão DC. O processo começou com o preenchimento do cadinho, a $75\,\%$, com *pellets* de Ti e a fixação das amostras no suporte dentro da câmara de deposição, usando fita de *kapton*. A câmara foi então selada e submetida a vácuo com uma pressão de $1{,}5 \times 10^{-6}$ mbar. Foi aplicada uma tensão de 7 kV e uma corrente de 60 mA, para alcançar uma taxa de deposição de $1{,}6\,\text{Å}\,\text{s}^{-1}$. A deposição foi finalizada ao atingir uma espessura de 100 nm.

Após a deposição, procedeu-se à dissolução do polímero fotossensível sacrificial usando o solvente *TechniStrip NI555* da *MicroChemicals* [163]. As amostras foram imersas numa solução de *TechniStrip NI555* de 250 mL, previamente colocada num agitador magnético e aquecida a $75\,^{\circ}$C, até a remoção total da camada sacrificial e a obtenção dos contactos (figura 4.11 (a)), pistas (figura 4.11 (b)) e microelétrodos (figura 4.11 (c)) metálicos. Na figura 4.12 encontra-se representado o esquemático do processo de padronização dos contactos, pistas e microelétrodos da sonda neuronal flexível, recorrendo a um corte transversal das amostras.



(a) **(b)** **(c)**

Figura 4.11: Contactos, pistas e microelétrodos metálicos em Ti da sonda neuronal flexível obtidos após o *lift-off* da camada sacrificial de polímero fotossensível: (a) Contactos metálicos em Ti; (b) Pistas metálicos em Ti; (c) Microelétrodos metálicos em Ti.

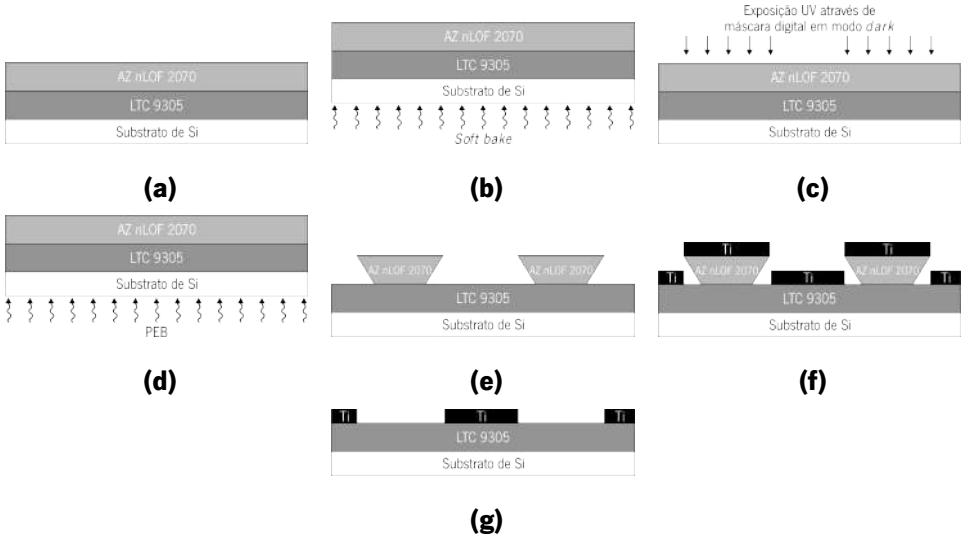


Figura 4.12: Esquemático do processo de padronização dos contactos, pistas e microelétrodos da sonda neuronal flexível: (a) Deposição da camada sacrificial de *AZ nLOF 2070* com uma espessura de 7 µm; (b) *Soft-bake* da amostra; (c) Exposição da amostra à luz UV com recurso a uma máscara digital em modo *dark;* (d) PEB da amostra; (e) Revelação da amostra; (f) Deposição de um filme-fino de Ti com uma espessura de 100 nm; (g) *Lift-off* da camada sacrificial e obtenção dos contactos, pistas e microelétrodos metálicos da sonda neuronal flexível.

4.2.3 Encapsulamento da Sonda Neuronal Flexível

Com a obtenção dos contactos, pistas e microelétrodos metálicos, passou-se de seguida para a etapa de encapsulamento da sonda neuronal flexível. Para isolar as pistas metálicas, deixando expostos os contactos e os microelétrodos metálicos, foi depositado um filme de PI fotossensível *LTC 9305*. O processo usado no encapsulamento da sonda neuronal flexível foi o idêntico ao processo descrito na secção 4.2.1,

com a exceção da máscara digital e temperatura de cura final. Para esta exposição foram utilizadas máscaras digitais representadas na figura 4.13 (a). Na figura 4.13 (b) e na figura 4.13 (c) pode-se ver as aberturas dos contactos e microelétrodos metálicos, respetivamente. A cura final da PI fotossensível foi realizada a uma temperatura mais baixa, de $250\,^{\circ}$C, pois verificou-se que se usada uma temperatura mais elevada ($330\,^{\circ}$C padrão), o filme-fino de Ti previamente padronizado sobre o corpo da sonda neuronal flexível sofria oxidação, apresentando defeitos e falhas na sua superfície. Na figura 4.14, pode-se observar o resultado do encapsulamento da sonda neuronal flexível, com as pistas isoladas (figura 4.14 (a)), contactos expostos (figura 4.14 (b)) e microelétrodos expostos (figura 4.14 (c)).

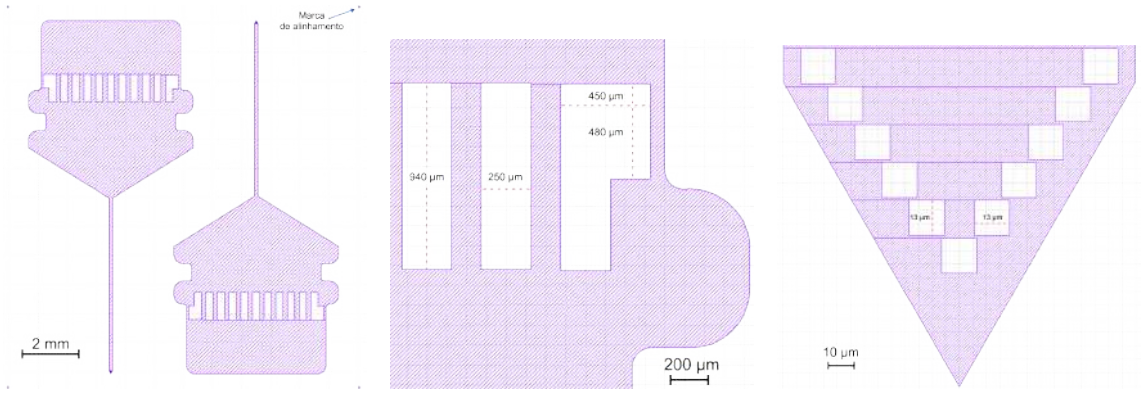


Figura 4.13: Máscara digital desenhada no *software KLayout* para a padronização do encapsulamento da sonda neuronal flexível utilizada no *µ-MLA Tabletop Maskless Aligner*: (a) Visão geral da máscara digital usada na padronização do encapsulamento da sonda neuronal flexível; (b) Visão ampliada da máscara digital onde se pode observar a abertura dos contactos da sonda neuronal flexível; (c) Visão ampliada da máscara digital onde se pode observar a abertura dos microelétrodos na ponta da sonda neuronal flexível.

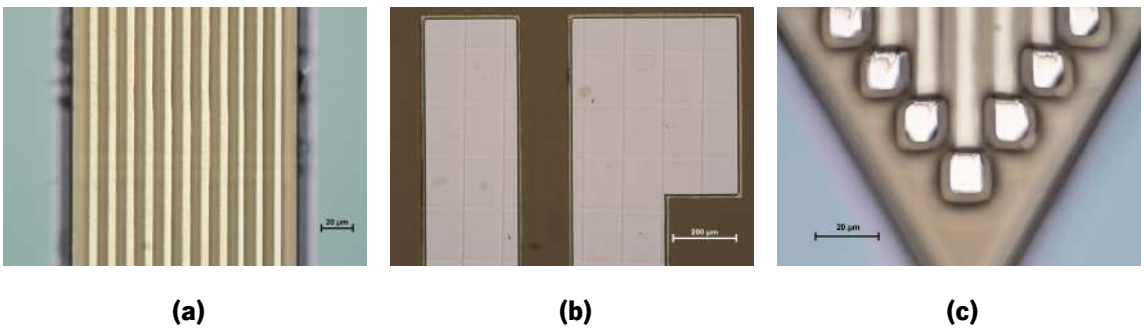


Figura 4.14: Sonda neuronal flexível encapsulada: (a) Haste da sonda neuronal flexível com pistas em Ti isoladas; (b) Contactos em Ti expostos; (c) Microelétrodos em Ti expostos.

4.2.4 Eletrodeposição de Pt

Como última etapa de fabrico da primeira versão da sonda neuronal flexível, procedeu-se então ao revestimento dos microelétrodos em Pt através de eletrodeposição. A Pt distingue-se por ser um metal com elevado potencial redox e uma forte interação com a água. É frequentemente utilizada como revestimento protetor contra a corrosão e os filmes-finos de Ti são muitas vezes platinados para a produção de ânodos insolúveis. O processo de eletrodeposição de Pt oferece várias vantagens, relacionadas com as excelentes propriedades da Pt, como a sua biocompatibilidade, elevada estabilidade química, grande resistência térmica, boas caraterísticas elétricas e alta resistência à abrasão [148]. Devido à sua biocompatibilidade, a Pt é ideal para o contacto direto com o tecido neuronal, sendo esta um transdutor eficaz de correntes iónicas, resultantes da atividade neuronal, em sinais elétricos [164].

Para proceder à eletrodeposição de Pt, foram previamente preparadas duas soluções separadamente de 2×10^{-3} mol dm^{-3} de K_2PtCl_6 e de $0{,}1$ mol dm^{-3} de $HClO_4$. A solução de K_2PtCl_6 foi conseguida através da diluição de $97{,}2$ mg do composto em pó K_2PtCl_6 em 40 mL de H_2O destilada. A solução de $HClO_4$ foi conseguida através da diluição de $0{,}6$ mL do ácido $HClO_4$ em 40 mL de H_2O destilada. Com as duas soluções preparadas, a solução de $HClO_4$ foi vertida muito lentamente na solução de K_2PtCl_6. Por fim, foi adicionada mais H_2O destilada até a solução final perfazer os 100 mL.

Com a solução preparada, deu-se início à eletrodeposição de Pt utilizando o potencióstato *Reference 600* da *Gamry Instruments* [165], numa configuração de três elétrodos: microelétrodo da sonda neuronal flexível como elétrodo de trabalho; placa de Pt como contra-elétrodo; e um elétrodo de referência Hg/Hg_2SO_4 [166]. O potencióstato foi então utilizado para efetuar uma cronopotenciometria, com uma densidade de corrente de -1167 µA cm^{-2} numa área de $8{,}1 \times 10^{-7}$ cm^2, durante 30 min. É importante mencionar que, para verificar a viabilidade do elétrodo de referência Hg/Hg_2SO_4, foi medida a sua impedância antes da eletrodeposição de Pt. Os valores de impedância obtidos (média de 2 kΩ) para o elétrodo de referência Hg/Hg_2SO_4 encontram-se dentro da faixa aceitável. A impedância do elétrodo de referência deve ser inferior a 5 kΩ, idealmente abaixo de 1 kΩ, e o valor do ângulo de fase deve estar próximo de zero, especialmente em frequências mais altas [167].

Na figura 4.15 encontra-se representada uma visão geral do processo de fabrico da sonda neuronal flexível com integração de microelétrodos de Pt eletrodepositada, recorrendo a um corte transversal das amostras. A figura apresenta a padronização da geometria da sonda neuronal flexível (figura 4.15 (a)), a padronização dos contactos, pistas e microelétrodos metálicos da sonda neuronal flexível (figura 4.15 (b) – figura 4.15 (d)), o encapsulamento da sonda neuronal flexível (figura 4.15 (e)) e o revestimento dos microelétrodos a Pt com recurso a eletrodeposição (figura 4.15 (f)).

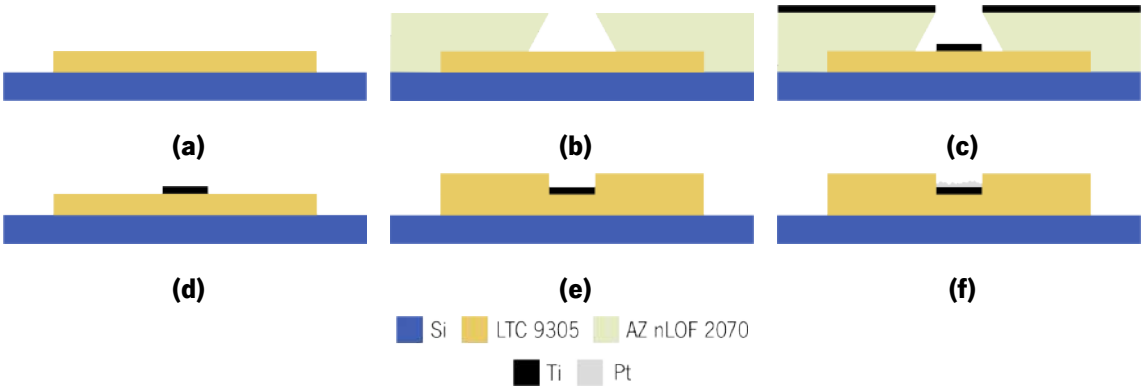


Figura 4.15: Visão geral do processo de fabrico da sonda neuronal flexível com integração de microelétrodos de Pt eletrodepositada: (a) Padronização da geometria da sonda neuronal flexível; (b) Padronização dos contactos, pistas e microelétrodos da sonda neuronal flexível; (c) Deposição de Ti com recurso a pulverização catódica por magnetrão DC; (d) *Lift-off* do polímero fotossensível sacrificial; (e) Encapsulamento da sonda neuronal flexível; (f) Revestimento dos microelétrodos a Pt com recurso a eletrodeposição.

4.3 Fabrico de uma Sonda Neuronal Flexível com Microelétrodos de Pt Depositada por Pulverização Catódica por Magnetrão DC

Após o fabrico da sonda neuronal flexível com integração de microelétrodos de Pt eletrodepositada, os seus microelétrodos foram caraterizados através da EIS para a obtenção dos valores de impedância, explicado em detalhe na secção 5.2. Contudo, passados alguns meses, a impedância dos microelétrodos foi novamente avaliada e verificou-se um retorno aos valores de impedância pré-revestimento de Pt. Assim, decidiu-se projetar uma nova sonda neuronal flexível com microelétrodos de Pt depositada por pulverização catódica por magnetrão DC.

O processo de fabrico da versão atualizada da sonda neuronal flexível com integração de microelétrodos de Pt depositada por pulverização catódica por magnetrão DC consistiu em cinco etapas: (i) deposição de uma camada sacrificial de SiO_2 (ii) fotolitografia e processos de cura para padronizar a geometria da sonda neuronal flexível; (iii) fotolitografia, deposição de uma *stack* de metais Ti–Al–Pt e *lift-off* para padronizar os contactos, as pistas e os microelétrodos; (iv) fotolitografia e processos de cura para encapsular a sonda neuronal flexível; e (v) *lift-off* da camada sacrificial de SiO_2 para a libertação da sonda neuronal flexível do substrato de Si.

Como se pode verificar na enumeração das etapas de fabrico desta nova versão da sonda neuronal flexível, foram adicionadas duas novas etapas no início e no fim do processo de fabrico, respetivamente, e alterada a etapa de fabrico dos contactos, pistas e microelétrodos metálicos. Foram assim mantidos todos os outros parâmetros descritos na secção 4.2 para as várias etapas de fabrico da sonda neuronal flexível. De forma a possibilitar a libertação da sonda neuronal flexível do substrato de Si, foi depositada uma camada sacrificial de SiO_2, com recurso a pulverização catódica por magnetrão RF, sendo esta dissolvida através de um processo de *lift-off* após a finalização do fabrico da sonda neuronal flexível. Devido aos problemas de degradação da Pt eletrodepositada, descritos anteriormente, esta foi então substituída por Pt depositada com recurso a pulverização catódica por magnetrão DC. Foi também adicionada uma camada de Al, entre as camadas de Ti e de Pt, devido à sua baixa resistividade ($2{,}6548\,\mu\Omega\,\mathrm{cm}$ [168]), garantindo assim o fabrico de pistas condutoras com uma baixa resistência elétrica.

O processo de deposição de SiO_2, com recurso a pulverização catódica por magnetrão RF, procedeu-se através da utilização de um alvo cerâmico de SiO_2 e com a fixação das amostras no suporte dentro da câmara de deposição. A câmara foi então selada e submetida a vácuo com uma pressão de $1{,}5 \times 10^{-6}$ mbar, seguindo-se a introdução de Ar com um fluxo de 20 sccm. A fonte RF foi programada com uma potência de 150 W e após a criação de plasma na câmara, foi realizada uma etapa de pré-*sputtering* de limpeza do alvo durante 10 min, sendo as amostras tapadas com recurso a um *shutter* mecânico. Com a finalização da limpeza, o *shutter* mecânico foi deslocado, começando assim a deposição de SiO_2 nas amostras com uma taxa de deposição de $0{,}8\,\text{Å}\,\mathrm{s}^{-1}$. A deposição foi finalizada ao atingir uma espessura de aproximadamente $3\,\mu\mathrm{m}$. Com a sonda neuronal finalizada, foi utilizado o *etchant Silox Vapox III* da *Transene* [169] para a libertação da sonda neuronal flexível do substrato de Si. As amostras foram imersas numa solução de *Silox Vapox III* de 250 mL, até a remoção total da camada sacrificial e da libertação da sonda neuronal flexível.

Relativamente à criação da *stack* de metais Ti–Al–Pt, foram efetuadas deposições sequenciais. Inicialmente, foram preparados dois cadinhos com *pellets* de Ti e de Al para as deposições por e-beam e usado um alvo metálico de Pt na deposição com recurso a pulverização catódica por magnetrão DC. Foi iniciada a deposição da camada de adesão de Ti descrita na secção 4.2.2, sendo procedida com a deposição de Al. Para tal, foi aplicada uma tensão de 7 kV e uma corrente de 130 mA, para alcançar uma taxa de deposição de $26\,\text{Å}\,\mathrm{s}^{-1}$. A deposição foi finalizada ao atingir uma espessura de 500 nm. Para finalizar a *stack* metálica, procedeu-se à deposição de Pt com recurso a pulverização catódica por magnetrão DC. Foi então introduzido Ar com um fluxo de 15 sccm e ajustada a pressão na câmara para os $5{,}1 \times 10^{-4}$ mbar. A fonte DC foi programada com uma potência de 100 W e após a criação de plasma

na câmara, foi realizada uma etapa de pré-*sputtering* de limpeza do alvo durante 5 min, sendo as amostras tapadas com recurso a um *shutter* mecânico. Com a finalização da limpeza, o *shutter* mecânico foi deslocado, começando assim a deposição de Pt nas amostras com uma taxa de deposição de $4{,}5\,\text{Å}\,\text{s}^{-1}$. A deposição foi finalizada ao atingir uma espessura de 100 nm.

As sondas neuronais flexíveis obtidas pelos processos descritos podem ser visualizadas na figura 4.16. Estas sondas neuronais flexíveis apresentam uma haste com um comprimento de 6 mm, secção transversal de $130\,\mu\text{m} \times 9\,\mu\text{m}$, pistas com uma largura de $5\,\mu$m e um *pitch* de $10\,\mu$m e onze microelétrodos de Pt com uma área ativa de $9\,\mu\text{m} \times 9\,\mu\text{m}$, distribuídos pela ponta afilada com um comprimento de $112\,\mu$m e um ângulo de $60°$. Na figura 4.17 encontra-se representada uma visão geral do processo de fabrico da sonda neuronal flexível com integração de microelétrodos de Pt depositada por pulverização catódica por magnetrão DC, recorrendo a um corte transversal das amostras. Na figura pode observar-se a deposição de uma camada sacrificial de SiO_2 (figura 4.17 (a)), a padronização da geometria da sonda neuronal flexível (figura 4.17 (b)), a padronização dos contactos, pistas e microelétrodos metálicos da sonda neuronal flexível (figura 4.17 (c) – figura 4.17 (e)), o encapsulamento da sonda neuronal flexível (figura 4.17 (f)) e a libertação da sonda neuronal flexível do substrato de Si (figura 4.15 (f)).

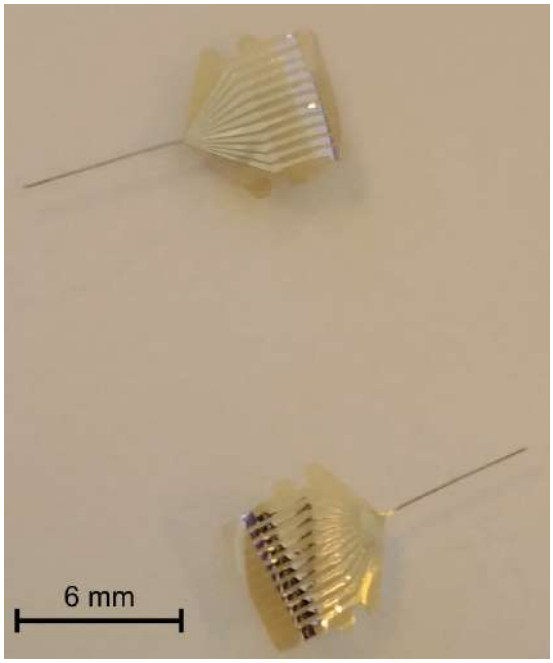


Figura 4.16: Sondas neuronais flexíveis obtidas após a libertação do substrato de Si.

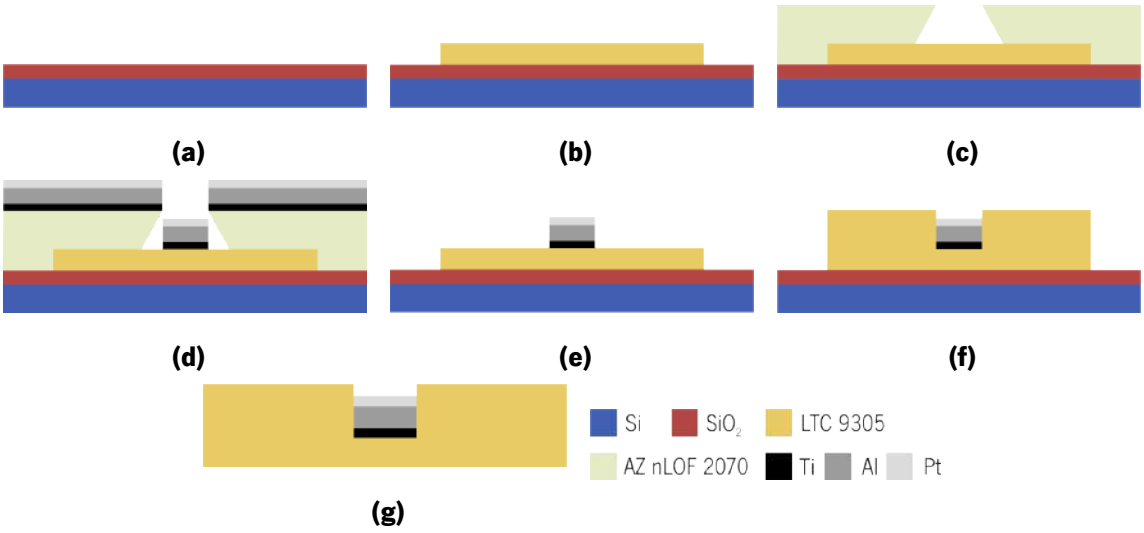


Figura 4.17: Visão geral do processo de fabrico da sonda neuronal flexível com integração de microelétrodos de Pt depositada por pulverização catódica por magnetrão DC: (a) Deposição da camada sacrificial de SiO_2; (b) Padronização da geometria da sonda neuronal flexível; (c) Padronização dos contactos, pistas e microelétrodos da sonda neuronal flexível; (d) Deposição da *stack* de metais Ti–Al–Pt com recurso a e-beam e a pulverização catódica por magnetrão DC; (e) *Lift-off* do polímero fotossensível sacrificial; (f) Encapsulamento da sonda neuronal flexível; (g) Libertação da sonda neuronal flexível do substrato de Si.

4.4 Fabrico da Guia de Onda

Simultaneamente ao fabrico da sonda neuronal flexível com integração de microelétrodos de Pt, foi também fabricada uma guia de onda para futuramente ser integrada na sonda neuronal. Esta guia de onda foi projetada para transmitir luz com um λ de 470 nm, para utilização em aplicações optogenéticas excitatórias da opsina ChR2. Como foi descrito na secção 3.1, os materiais usados no fabrico do núcleo e encapsulamento, foram o TiO_2 e o SiO_2, com índices de refração experimentais de $2{,}6$ e de $1{,}45$, respetivamente. A escolha do TiO_2 como o material do núcleo deveu-se à sua transparência numa vasta gama de comprimentos de onda, desde os comprimentos de onda visíveis até aos comprimentos de onda infravermelhos [132]. Como encapsulamento foi selecionado o SiO_2 devido ao seu inferior índice de refração e elevado contraste em relação ao TiO_2, possibilitando assim a criação de uma guia de onda capaz de transmitir luz no comprimento de onda desejado.

O processo de fabrico da guia de onda consistiu em três etapas: (i) fotolitografia, deposição de filmes-finos de TiO_2 com recurso a pulverização catódica por magnetrão RF e *lift-off* para padronizar o núcleo da guia de onda; (ii) deposição de filmes-finos de SiO_2 com recurso a PEALD na criação do revestimento da

guia de onda; (iii) padronização de uma máscara em polímero fotossensível e subsequente RIE do SiO_2, para a padronização do revestimento da guia de onda.

4.4.1 Padronização do Núcleo da Guia de Onda com TiO_2

Para a padronização do núcleo da guia de onda, foram utilizadas como substrato amostras de Si de $80\,\text{mm} \times 30\,\text{mm}$, revestidas com $1\,\mu\text{m}$ de SiO_2 de fábrica, sendo este revestimento utilizado como encapsulamento inferior da guia de onda. O polímero fotossensível usado no processo fotolitográfico foi o polímero fotossensível positivo *AZ 4562* da *MicroChemicals* [170].

A primeira etapa do processo de fotolitografia envolveu a limpeza dos substratos de Si, descrita na secção 4.2.1, com a variação de aquecimento das amostras após secagem a $110\,^{\circ}\text{C}$. Depois de limpos, foi realizada a deposição do polímero fotossensível sacrificial de *AZ 4562* para obter uma espessura de $4\,\mu\text{m}$. A espessura desejada foi atingida ajustando os parâmetros de configuração, conforme indicado na tabela 4.3, no equipamento de *spin-coating*. Para isso, foram medidos $4\,\text{mL}$ de *AZ 4562* num gobelé e vertidos suavemente sobre cada amostra.

Tabela 4.3: Parâmetros de configuração do equipamento de *spin-coating* para obter um filme de $4\,\mu\text{m}$ de espessura de *AZ 4562*.

Parâmetros	Primeiro Passo	Segundo Passo
Velocidade (rpm)	2500	5000
Aceleração ($\text{rpm}\,\text{s}^{-1}$)	1910	1910
Tempo (s)	8	22

Devido à espessura e viscosidade do filme de *AZ 4562*, procedeu-se a uma evaporação de solventes durante $45\,\text{min}$ num recipiente metálico com uma abertura. Posteriormente, as amostras foram curadas através de um *soft-bake* numa placa de aquecimento de contacto, previamente aquecida a $110\,^{\circ}\text{C}$, na qual permanecem durante $10\,\text{min}$. Como o *AZ 4562* é um polímero fotossensível positivo baseado em *diazonaphthoquinone* (DNQ), este necessita de uma certa quantidade de água para completar a fotorreação durante a exposição, que lhe foi retirada durante a etapa de *soft-bake*. Assim, as amostras foram colocadas dentro de um recipiente metálico tapado durante $30\,\text{min}$ a reidratar.

Com a reidratação finalizada, a geometria do núcleo da guia de onda foi padronizada através da utilização de máscaras digitais, demonstradas na figura 4.18. As amostras foram expostas à luz UV com uma energia de $290\,\text{mJ}\,\text{cm}^{-2}$, um *defocus* de 10 e em modo *clear*. Como se pode ver na figura 4.18, foi padronizada também a geometria triangular geral de uma *grating* de transmissão de acoplamento.

Referido anteriormente na secção 3.1, o equipamento DWL *μ-MLA Tabletop Maskless Aligner* disponível não possui resolução para a criação dos padrões necessários para o acoplamento da luz com um λ de $470\,\text{nm}$. Para contornar este requisito, seria necessário a utilização de um equipamento EBL, que não se encontra disponível nas instalações do MNFab.

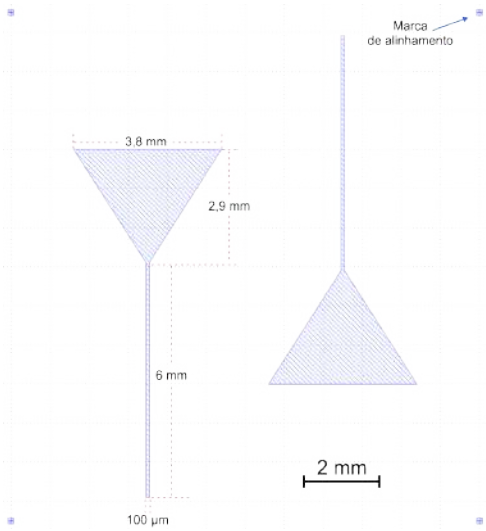


Figura 4.18: Máscara digital desenhada no *software KLayout* para a padronização do núcleo da guia de onda utilizada no *μ-MLA Tabletop Maskless Aligner*.

Para efetuar a revelação das áreas expostas à luz UV, foi utilizado o revelador *AZ 351 B* da *MicroChemicals* [171]. Foi preparada uma solução composta por $50\,\text{mL}$ de *AZ 351 B* diluídos em $200\,\text{mL}$ de água destilada, sendo as amostras submersas nessa solução e reveladas ao fim de $4\,\text{min}$. Após a revelação total das áreas expostas, as amostras foram limpas com água desionizada, secas com azoto e guardadas individualmente em caixas de Petri.

O processo de deposição de TiO_2, com recurso a pulverização catódica por magnetrão RF, procedeu-se através da utilização de um alvo metálico de Ti e com a fixação das amostras no suporte dentro da câmara de deposição. A câmara foi então selada e submetida a vácuo com uma pressão de $1{,}5 \times 10^{-6}\,\text{mbar}$, seguindo-se a introdução de Ar com um fluxo de $10\,\text{sccm}$ e oxigénio molecular (O_2) com um fluxo de $2\,\text{sccm}$, sendo a pressão na câmara ajustada para os $4 \times 10^{-3}\,\text{mbar}$. A fonte RF foi programada com uma potência de $300\,\text{W}$ e após a criação de plasma na câmara, foi realizada uma etapa de pré-*sputtering* de limpeza do alvo durante $10\,\text{min}$, sendo as amostras tapadas com recurso a um *shutter* mecânico. Com a finalização da limpeza, o *shutter* mecânico foi deslocado, começando assim a deposição de TiO_2 nas amostras com uma taxa de deposição de $0{,}3\,\text{Å}\,\text{s}^{-1}$. A deposição foi finalizada ao atingir uma espessura de $500\,\text{nm}$.

Após a deposição, procedeu-se à dissolução do polímero fotossensível sacrificial usando o solvente *AZ*

100 Remover da *MicroChemicals* [172]. As amostras foram imersas numa solução de *AZ 100 Remover* de 250 mL, previamente colocada num agitador magnético e aquecida a $75\,^{\circ}$C, até a remoção total da camada sacrificial e a obtenção do núcleo de TiO_2 da guia de onda.

4.4.2 Revestimento do Núcleo da Guia de Onda com SiO_2 Depositado por PEALD

Com a obtenção do núcleo da guia de onda, passou-se de seguida para a etapa do encapsulamento superficial da mesma. A utilização de filmes-finos ALD para o fabrico de dispositivos óticos, especificamente para o encapsulamento de guias de onda, é capaz de reduzir a sua rugosidade da superficial devido à sua excelente conformidade, reprodutibilidade e precisão. Com um encapsulamento de menor rugosidade, o desempenho das guias de onda é melhorado, devido à redução das perdas óticas [173, 174]. O equipamento utilizado nas deposições PEALD foi o *SI PEALD* da *SENTECH* [175].

O processo de crescimento de SiO_2 através de PEALD foi iniciado com o aquecimento do equipamento *SI PEALD*. Foram definidas as temperaturas do reator, linhas de gases e botija de precursor a $100\,^{\circ}$C, $125\,^{\circ}$C e $60\,^{\circ}$C, respetivamente. Após o aquecimento do equipamento ter estabilizado, as amostras foram introduzidas no reator, induzido um vácuo com uma pressão de $0{,}7$ Pa e um aquecimento de substrato de $250\,^{\circ}$C.

Após a estabilização do aquecimento do substrato, seguiu-se a abertura das linhas de gases com a introdução do precursor *bis(diethylamino)silane* (BDEAS), com um fluxo de 40 sccm, e do gás de criação de plasma O_2, com um fluxo de 200 sccm. O plasma foi obtido através do ajuste da pressão no reator para os 20 Pa e a definição de uma potência na fonte RF de 200 W. Para a estabilização da potência refletida, a *matchbox* da fonte RF foi ajustada com um *C load* de $35\,\%$ e um *C tune* de $44\,\%$. Cada ciclo de deposição PEALD é composto por dois meios-ciclos. Durante o meio-ciclo inicial, foi injetado BDEAS durante 180 ms com 5 s de purga e durante o meio-ciclo final, foi ativado o plasma durante 5 s com 1 s de purga (figura 4.19 (a)). Observou-se um aumento de espessura durante a exposição ao BDEAS, enquanto que durante a exposição ao plasma de O_2, ocorreu uma redução na espessura. Esta redução é atribuída à substituição dos grupos dietilamina na superfície por átomos de oxigénio, resultante da exposição ao plasma de O_2, o que diminui a quantidade de material aderido à superfície. Foram efetuados 1100 ciclos para a obtenção de uma espessura medida por elipsómetro *in situ* de 95 nm e um crescimento por ciclo (GPC) de $0{,}864\,\text{Å}\,\text{ciclo}^{-1}$. Na figura 4.19 (b), pode-se observar a evolução da espessura do SiO_2 PEALD com um perfil em escada. Esta evolução indica que o crescimento é auto-limitado e cíclico, comprovando assim que se trata de um processo ALD em vez de CVD. Se o crescimento não ocorresse escalonado,

isso indicaria que os tempos dos meio-ciclos não estariam ajustados corretamente e que os reagentes se misturariam no reator, resultando numa deposição por CVD em vez de ALD.

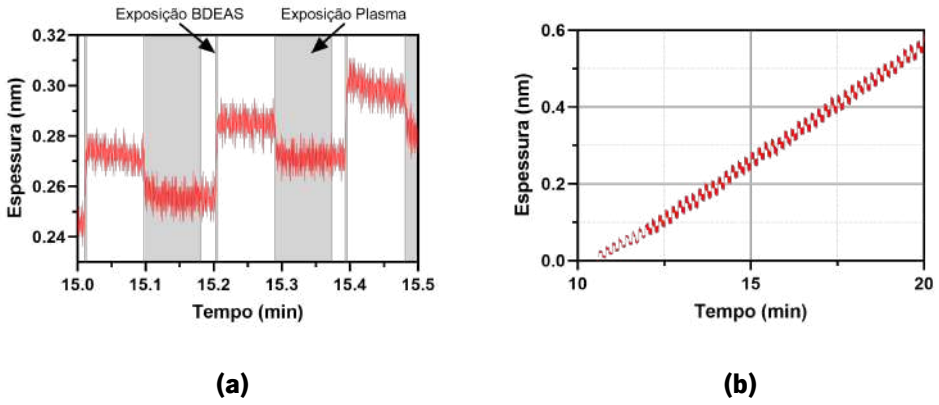


Figura 4.19: Espessura medida por elipsómetro *in situ* durante o crescimento de SiO_2 PEALD: (a) Ciclos PEALD com anotação da exposição ao precursor BDEAS e ao plasma de O_2; (b) Crescimento de SiO_2 PEALD ao longo de vários ciclos.

4.4.3 Padronização do Revestimento da Guia de Onda com Recurso a RIE

Para a padronização do revestimento da guia de onda, foi fabricada uma máscara em polímero fotossensível negativo *AZ nLOF 2070* com uma espessura elevada e com melhor capacidade de resistir à corrosão iónica, possibilitando assim a utilização de taxas de corrosão mais elevadas durante o RIE. O processo de padronização fotolitográfico da máscara de *AZ nLOF 2070* foi semelhante ao processo descrito na secção 4.2.2. As diferenças nestes processos foram as máscaras digitais utilizadas em modo *clear* (figura 4.20) e o método de revelação do *AZ nLOF 2070*, que consistiu numa imersão em revelador durante 2 mins 30 s.

Com a máscara em *AZ nLOF 2070* fabricada, passou-se à última etapa de fabrico do revestimento da guia de onda, recorrendo a um equipamento de corrosão *RIE–1C* da *SAMCO Inc.* [176]. As amostras foram introduzidas na câmara de corrosão e induzido vácuo. Seguiu-se a abertura das linhas de gases com a introdução de *tetrafluoromethane* (CF_4), com um fluxo de 40 mL min^{-1}, e de O_2, com um fluxo de 20 mL min^{-1}. O tempo de corrosão foi programado para 4 min. O plasma foi obtido através do ajuste da pressão na câmara para os 53 Pa e a definição de uma potência RF de 50 W. No início da corrosão, foram ajustados manualmente a fase e a carga, garantindo assim um potência RF refletida de 0 W. Terminado o RIE, as amostras foram imersas numa solução de *TechniStrip NI555* até a dissolução total da máscara em polímero fotossensível e a obtenção da guia de onda final.

A guia de onda fabricada pelos processos descritos pode ser visualizada na figura 4.21. Esta guia de

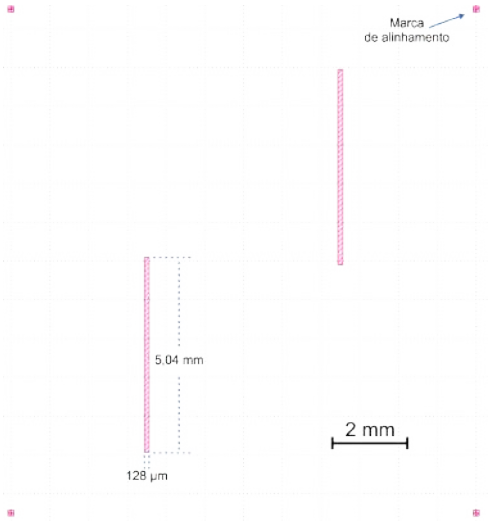
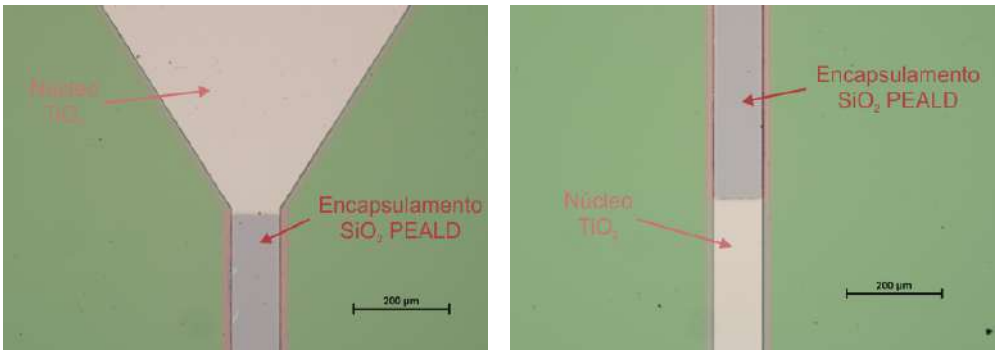


Figura 4.20: Máscara digital desenhada no *software KLayout* para a padronização de uma máscara em *AZ nLOF 2070* utilizada no *µ-MLA Tabletop Maskless Aligner*.

onda apresenta um comprimento de $5{,}04\,\text{mm}$ e uma secção transversal de $100{,}1\,\mu\text{m} \times 600\,\text{nm}$. Na figura 4.22 encontra-se representada uma visão geral do processo de fabrico das guias de onda, recorrendo a um corte transversal das amostras. A figura apresenta a padronização do núcleo da guia de onda em TiO_2 (figura 4.22 – figura-4.22 (c)), o revestimento da amostra em SiO_2 PEALD (figura 4.22 (d)), a padronização de uma máscara em polímero fotossensível (figura 4.22 (e)) e a padronização do revestimento da guia de onda com recurso a RIE do SiO_2 PEALD (figura 4.22 (f) – figura 4.22 (g)).



(a) **(b)**

Figura 4.21: Guia de onda obtida após finalização do processo de fabrico: (a) Área de conexão entre a *grating* de transmissão de acoplamento e a guia de onda; (b) Área de conexão entre a guia de onda e a *grating* de transmissão de desacoplamento.

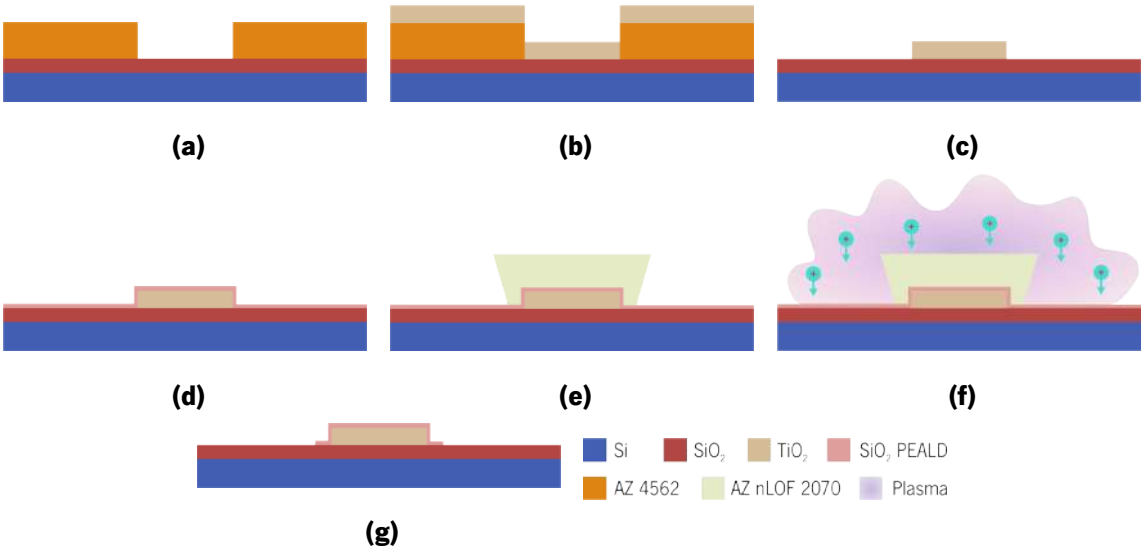


Figura 4.22: Visão geral do processo de fabrico da guia de onda: (a) Deposição da camada sacrificial de *AZ 4562*; (b) Deposição de TiO_2 com recurso a pulverização catódica por magnetrão RF; (c) *Lift-off* do polímero fotossensível sacrificial; (d) Deposição de SiO_2 com recurso a PEALD; (e) Padronização da máscara em *AZ nLOF 2070* para utilização em RIE; (f) RIE do SiO_2 PEALD; (g) Dissolução total da máscara em polímero fotossensível e a obtenção da guia de onda final.

Capítulo 5

Técnicas de Caraterização e Resultados Experimentais

No presente capítulo são descritas as diferentes técnicas usadas na caraterização das microestruturas fabricadas e a sua respetiva caraterização. A caraterização das microestruturas iniciou-se pela caraterização eletroquímica (medição da impedância) da sonda neuronal flexível com microelétrodos de Pt eletrodepositada. Seguidamente, será apresentada a caraterização eletroquímica e validação *in vivo* da sonda neuronal flexível com microelétrodos de Pt depositada por pulverização catódica por magnetrão DC. Relativamente à guia de onda, será apresentada a caraterização ótica e química dos filmes-finos que compõem o seu núcleo e o seu encapsulamento. Para terminar, será apresentado um estudo realizado acerca de um material alternativo para o núcleo da guia de onda (em SiN).

5.1 Técnicas de Caraterização

A caraterização das estruturas produzidas é fundamental para otimizar e avaliar o processo de fabrico. Foram aplicadas diversas técnicas, incluindo microscopia de força atómica (AFM), elipsometria espetroscópica (SE), EIS, SEM, EDS e XPS. Cada um destes métodos será seguidamente descrito, permitindo a análise de diferentes características das estruturas produzidas.

5.1.1 Microscopia de Força Atómica (AFM)

A AFM é uma evolução da perfilometria de contacto e da microscopia de varrimento por efeito de túnel (STM). Um estilete com uma ponta de 10 nm é montado na extremidade livre de um cantiléver. As pontas

podem ter diferentes formatos, como cónico, quadrangular ou trapezoidal. O formato do cantiléver define as suas propriedades físicas, nomeadamente a constante de força, que varia entre $0{,}1\,\mathrm{N\,m^{-1}}$–$50\,\mathrm{N\,m^{-1}}$, e a frequência de ressonância, que se situa entre $1\,\mathrm{kHz}$ e $1\,\mathrm{MHz}$. O cantiléver é ligado a um scâner piezoelétrico, que controla a posição (x, y, z) da ponta. A deflexão do cantiléver, ao deslocar-se sobre uma superfície, é medida por um sistema laser e um detetor de quadrantes, que identifica a direção da reflexão do laser num espelho montado na parte traseira do cantiléver (figura 5.1) [177].

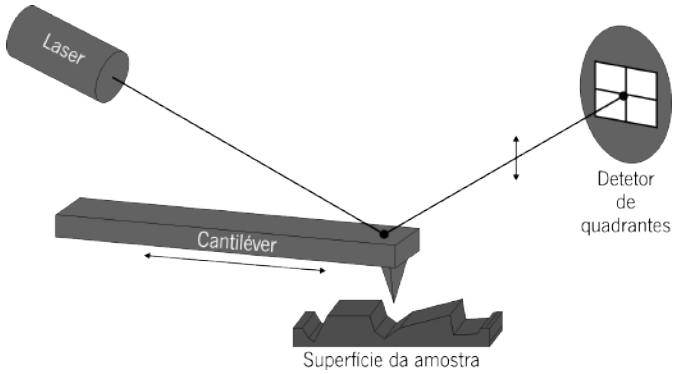


Figura 5.1: Esquemático de deteção do movimento da ponta do cantiléver de um equipamento AFM (figura adaptada de [177]).

A ponta interage com a superfície da amostra através das forças de van der Waals, exercendo uma força de repulsão em distâncias curtas e uma força de atração quando está mais afastada. As duas regiões de operação de um equipamento AFM estão representadas na figura 5.2. Dois dos modos de operação de um AFM baseiam-se nas forças repulsivas: o modo de contacto e o modo de toque intermitente. No modo de contacto, a ponta está em contacto constante com a superfície da amostra em análise. No modo de toque intermitente, a ponta toca suavemente a superfície, oscilando a uma frequência próxima da frequência de ressonância do cantiléver. As forças de atração permitem o funcionamento no modo sem contacto, não danificando a amostra porque nunca toca na sua superfície. Como a força de atração é muito pequena, a ponta oscila a uma frequência elevada, sendo detetada a alteração da amplitude e da fase da vibração devido a perdas ou ganhos de energia cinética durante a interação ponta–amostra [177, 178].

Um equipamento AFM carateriza a topografia de uma amostra (medição da sua rugosidade), mas também pode caraterizar diversas outras propriedades, ajustando os movimentos e sinais que acionam o estilete. Por exemplo, é possível identificar variações na composição do material, adesão, fricção, viscoelasticidade, assim como propriedades elétricas e magnéticas do material. Um equipamento AFM também é capaz de detetar alterações nas propriedades da superfície de uma amostra, ao mapear o desfasamento de fase entre o sinal periódico que aciona a ponta e as suas oscilações [178].



Figura 5.2: Curva van der Waals com regiões e modos de funcionamento de um equipamento AFM (figura adaptada de [177, 178]).

5.1.2 Elipsometria Espetroscópica (SE)

A elipsometria é uma técnica ótica com mais de cem anos, que se baseia na análise das mudanças no estado de polarização de um feixe de luz polarizada ao ser refletido na superfície ou nas interfaces de revestimentos. Esta técnica permite determinar a espessura, as propriedades óticas e a composição dos revestimentos. O primeiro espetro elipsométrico, na gama dos $300\,\text{nm}$–$400\,\text{nm}$, foi apresentado por Jasperson *et al.* [179] em 1969, confirmando a consolidação da SE. Ao contrário da elipsometria de comprimento de onda único, a SE é capaz de resolver dados de múltiplos comprimentos de onda utilizando modelos óticos complexos, o que permite obter informações detalhadas, precisas e confiáveis sobre as amostras [180].

As equações de reflexão e transmissão de Fresnel para luz polarizada formam a base para a análise de dados elipsométricos. Conforme ilustrado na figura 5.3 (a), a luz incidente é geralmente polarizada linearmente, com os componentes do campo elétrico alinhados paralelamente (*p*) e perpendicularmente (*s*) ao plano de incidência. Quando essa luz linearmente polarizada incide de forma oblíqua sobre uma amostra plana em camadas, sofre múltiplas interferências na amostra, alterando as amplitudes e as fases dos componentes *s* e *p* da luz. O elipsómetro mede essas variações. A mudança nas amplitudes entre os componentes *s* e *p* da luz refletida é chamada de parâmetro elipsométrico Ψ, enquanto a diferença nas fases é representada por outro parâmetro elipsométrico, designado Δ[180]. Na figura 5.3 (b) pode-se visualizar os dados obtidos através de SE em filmes-finos de TiO_2 depositados por ALD.

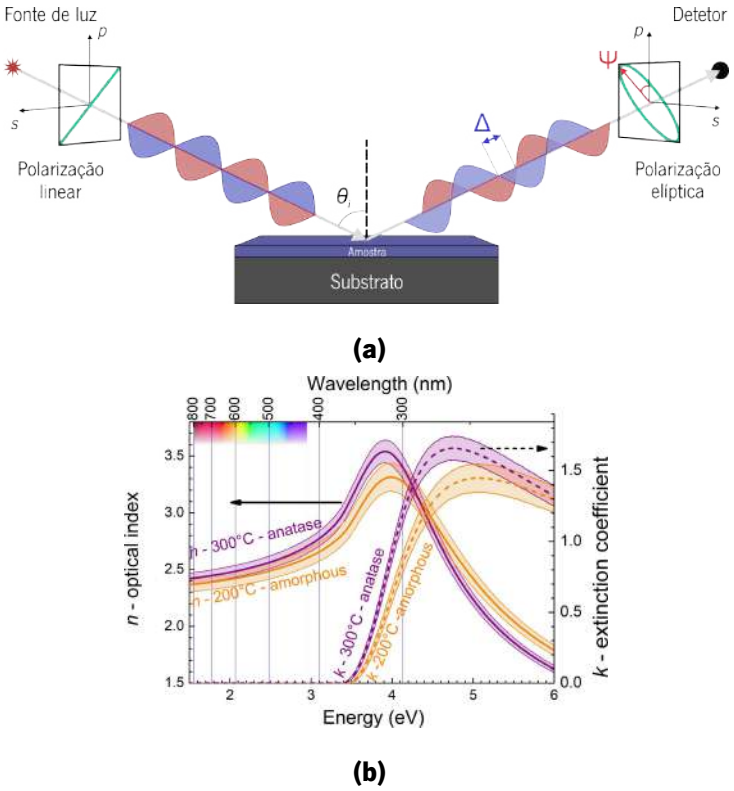
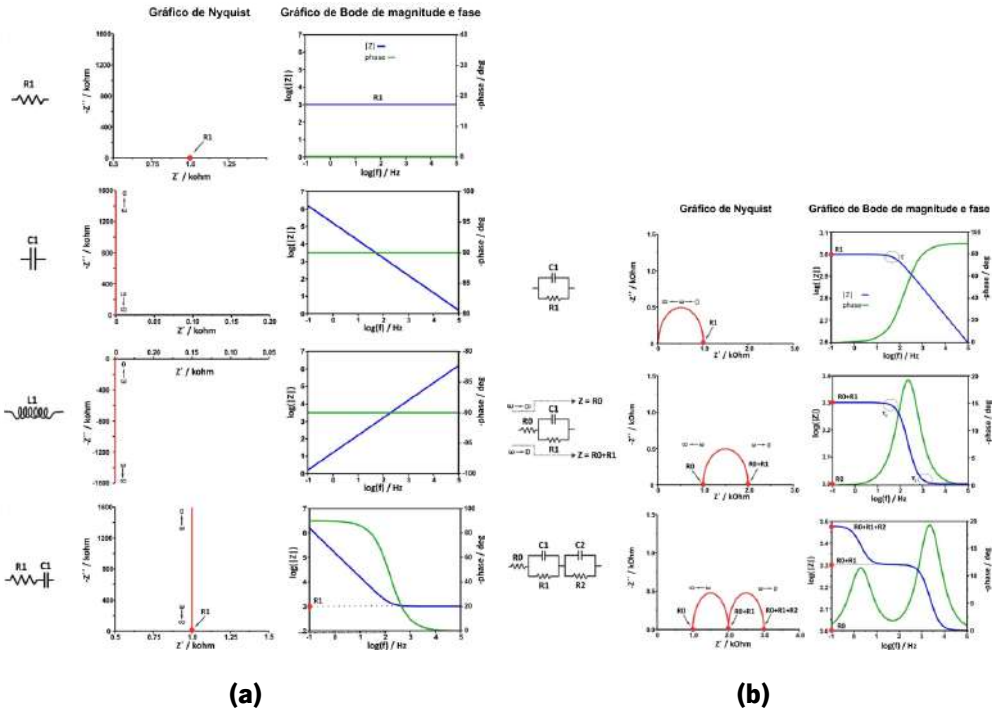


Figura 5.3: Esquemático e exemplo de uma análise SE: (a) Esquemático de SE com representação das alterações de amplitude e de fase da luz com polarização elíptica refletida por uma amostra; (b) Exemplo de dados obtidos através de SE em filmes-finos de TiO_2 depositados por ALD (figura reproduzida de [181], com autorização de *Elsevier*).

5.1.3 Espetroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS)

A EIS baseia-se na alteração de um sistema eletroquímico em equilíbrio ou em estado estacionário, aplicando um sinal sinusoidal (de tensão ou corrente alternada) ao longo de uma ampla gama de frequências e monitorizando a resposta sinusoidal (corrente ou tensão, respetivamente) do sistema à perturbação aplicada. Supondo que o sistema eletroquímico em análise é linear e invariável no tempo, ou seja, a relação entre o sinal de saída e o sinal de entrada é linear e o comportamento do sistema não muda com o tempo, a EIS funciona como uma técnica de "função de transferência", modelando o sinal de saída (corrente ou tensão alternada) em resposta ao sinal de entrada (tensão ou corrente alternada) numa vasta gama de frequências. A EIS destaca-se em relação a outras técnicas eletroquímicas pela sua capacidade de distinguir e, consequentemente, fornecer uma vasta quantidade de informações sobre os diferentes processos elétricos, eletroquímicos e físicos que ocorrem num sistema eletroquímico real. Especificamente, as medições de EIS num sistema eletroquímico podem ser representadas por um circuito elétrico equivalente

(figura 5.4), composto por componentes passivos comuns (como resistências, condensadores e bobinas) e outros elementos mais complexos, ligados de diversas formas. Para tal, a maioria dos analisadores eletroquímicos vem equipada com *software* apropriado, que permite simular os dados de impedância com base num circuito modelo. Ao trabalhar no domínio do tempo, como é o caso de algumas técnicas de voltametria comuns (CV, cronopotenciometria, etc.), certos processos tornam-se extremamente difíceis, senão impossíveis, de analisar. Em contraste, ao operar no domínio da frequência, numa ampla gama de frequências, a EIS facilita a análise de um sistema eletroquímico complexo, dividindo-o em processos individuais com diferentes constantes de tempo, que podem ser analisados mais facilmente. Os processos muito lentos são investigados em frequências muito baixas, enquanto os processos muito rápidos são examinados em frequências muito altas. Estas caraterísticas distintas tornaram a EIS uma técnica poderosa e extremamente competitiva para o estudo, otimização e desenvolvimento de diversas células eletroquímicas reais, com aplicações modernas em áreas como a ciência da corrosão, células de combustível, baterias de iões de lítio, células fotovoltaicas e biossensores [182].



(a) **(b)**

Figura 5.4: Gráficos de Nyquist e gráficos de Bode de magnitude e fase de alguns circuitos elétricos equivalentes: (a) R1 = $1\ \mathrm{k}\Omega$; (b) R0 = R1 = R2 = $1\ \mathrm{k}\Omega$ (figura adaptada de [182]).

A configuração eletroquímica mais comum envolve um sistema de 3 elétrodos, que consiste num elétrodo de trabalho (WE), num elétrodo de referência (RE) e num contra-elétrodo (CE), todos ligados a um potencióstato. O WE fornece a superfície eletrolítica onde ocorre a reação redox sob um potencial

desejado, ou seja, sob uma diferença de potencial específica em relação ao potencial estável do RE. O RE mantém um potencial estável, desde que não haja passagem de corrente através dele. O potencióstato monitoriza a diferença de potencial entre o WE e o RE, ajustando qualquer desvio em relação ao valor pretendido, definido pelo utilizador, ao gerar uma corrente entre o WE e o CE. Para assegurar que toda a corrente passe pelo CE, este geralmente possui uma superfície maior do que o WE. Cada um destes elétrodos está ligado ao potencióstato através de cabos adequados, que conduzem a corrente (WE e CE) ou medem a tensão (RE). O cabo que transporta a corrente é também conhecido como condutor de força, enquanto o que mede a tensão é designado condutor de deteção. Os analisadores eletroquímicos modernos, sendo dispositivos de 4 terminais, incluem um condutor de deteção adicional, o condutor de deteção de trabalho (WS), normalmente ligado ao WE, para uma medição mais precisa da tensão aplicada à célula eletroquímica. Além da configuração de 3 elétrodos, também existem configurações de 2 e 4 elétrodos (figura 5.5). Numa configuração de 2 elétrodos, o condutor de referência está ligado ao CE (neste caso chamado de elétrodo auxiliar), que assim desempenha uma função dupla: aplica a tensão e mede a corrente. Como resultado, em configurações de 2 elétrodos, o potencial no WE não pode ser controlado com precisão. Dependendo de como os elétrodos estão ligados aos terminais do potencióstato, pode-se medir a impedância numa área específica da célula, sendo esta área definida pelos elétrodos aos quais a tensão é aplicada [182].

Numa configuração de 3 elétrodos e 4 terminais (figura 5.5 (a)), a tensão é aplicada entre o WE e o RE. Nesta configuração, quando há uma perturbação de pequena amplitude na tensão, a impedância ao fluxo de corrente é influenciada por: (i) a resistência óhmica do eletrólito entre RE e WE, conhecida como resistência não compensada (R_u). Para um eletrólito específico, a R_u é determinada pela distância entre esses elétrodos. Na prática, essa resistência óhmica também inclui a resistência dos cabos de ligação e do próprio WE, que geralmente pode ser desconsiderada; (ii) a carga/descarga da dupla camada elétrica, que, em condições de CA, comporta-se como um condensador, representado por C_{dl}; e (iii) a resistência à polarização (R_p), que é o declive da curva tensão/corrente ($Rp = \Delta V/\Delta i$) em medições em estado estacionário. Na EIS, as condições de estado estacionário são aproximadas quando a frequência tende para zero ($f \to 0$). Se considerarmos que o WE é idealmente polarizável, então a transferência de carga entre o elétrodo e o eletrólito não é possível ou ocorre de forma infinitesimal, tornando a resistência à polarização infinita. Nesse caso, toda a corrente passa por R_u e C_{dl}, e a impedância da célula pode ser modelada por um circuito elétrico onde R_u e C_{dl} estão em série [182].

Numa configuração de 2 elétrodos e 2 terminais (figura 5.5 (b)), a tensão é aplicada entre o WE e o CE auxiliar. Assumindo que ambos os elétrodos são idealmente polarizáveis, a impedância ao fluxo de

corrente é determinada pelo C_{dl} de cada elétrodo e pela resistência óhmica da solução de medição R_s (o termo R_u não é aplicável na ausência de um RE). A impedância da célula pode ser representada por um circuito elétrico onde R_s, $C_{dl,WE}$ e $C_{dl,CE}$ estão ligados em série. Se a superfície do CE auxiliar for significativamente maior do que a do WE, o $C_{dl,CE}$ pode ser desconsiderado. Conforme referido anteriormente, a impedância mensurável na configuração de 2 elétrodos e 2 terminais inclui também a impedância resultante da resistência óhmica dos condutores. Em certos casos, como em baterias com células de 2 elétrodos de baixa impedância, a resistência óhmica dos condutores não deve ser ignorada, pelo que é recomendável realizar a medição da impedância utilizando um método de 2 elétrodos e 4 terminais [182].

Numa configuração de 4 elétrodos ou 4 terminais (figura 5.5 (c)), aplica-se uma CA (em medições galvanostáticas) entre o WE e o CE, enquanto se mede a diferença de potencial entre o RE e o WS, que é causada pela impedância da amostra. Este método é frequentemente utilizado para medir a condutividade de filmes-finos de polímero ou de eletrólitos sólidos [182].

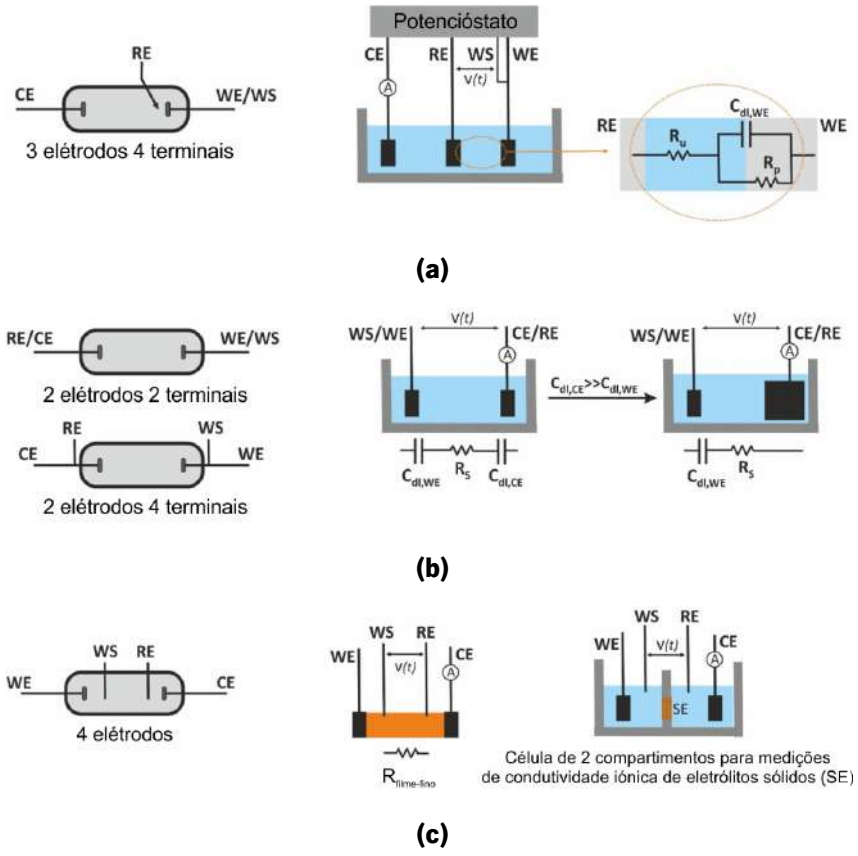


Figura 5.5: Diferentes configurações de células eletroquímicas: (a) Configuração 3 elétrodos 4 terminais; (b) Configuração 2 elétrodos 2/4 terminais; (c) Configuração 4 elétrodos (figura adaptada de [182]).

5.1.4 Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM) e Espetroscopia Dispersiva de Raios-X (EDS)

A SEM é uma ferramenta essencial para a caraterização de sistemas em escala nanométrica e micrométrica. A figura 5.6 (a) ilustra o design de um equipamento SEM, que inclui componentes para focar um feixe de eletrões numa amostra. Os eletrões são emitidos por uma fonte e acelerados através de uma pequena abertura devido a uma diferença de potencial ($250\,\mathrm{V}$ a $50\,\mathrm{keV}$). O feixe de eletrões é colimado por uma abertura e focado num ponto preciso ($0{,}5\,\mathrm{nm}$–$5\,\mathrm{nm}$) na superfície da amostra. Um conjunto de bobinas de deflexão varre e direciona o feixe de eletrões ao longo da superfície. Quando o feixe atinge a superfície da amostra, gera eletrões retrodifundidos (balísticos) e eletrões secundários. Os eletrões retrodifundidos possuem alta energia, seguem uma trajetória reta e fornecem informações quantitativas sobre os elementos presentes na amostra, possibilitando uma análise EDS. Os eletrões secundários, por sua vez, são emitidos da superfície da amostra após a dispersão do feixe de eletrões. Com energia relativamente baixa, estes eletrões são desviados por uma tensão baixa para um detetor, sendo o seu rendimento utilizado para criar uma imagem detalhada da superfície da amostra [177]. Na figura 5.6 (b) pode ser observada uma imagem SEM e a sua respetiva análise EDS.

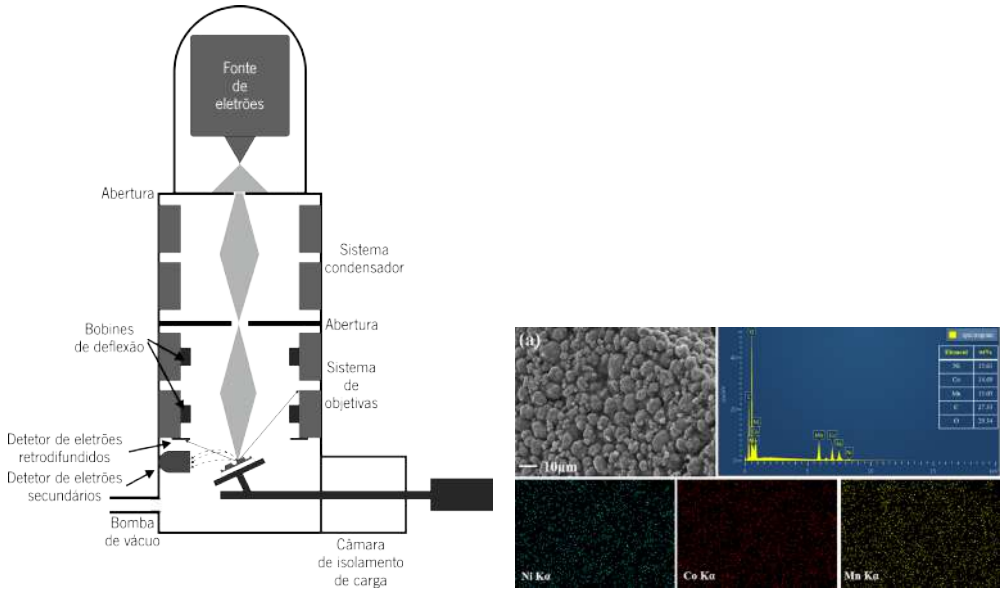


Figura 5.6: Esquemático de um equipamento SEM e exemplo de uma imagem SEM e respetiva análise EDS: (a) Principais componentes de um equipamento SEM (figura adaptada de [177]); (b) Exemplo de uma imagem SEM e respetiva análise EDS (figura reproduzida de [183], com autorização de *Elsevier*).

5.1.5 Espetroscopia de Fotoeletrões Excitados por Raios-X (XPS)

A XPS é uma técnica de espetroscopia atómica que permite obter informações detalhadas sobre a composição atómica e molecular da superfície de um material. Na XPS, a superfície da amostra é exposta a raios-X, provocando a emissão de eletrões dos átomos presentes na superfície devido à transferência direta de energia. A energia desses eletrões é então medida, permitindo identificar o átomo emissor (com exceção do hidrogénio e do hélio) com base na energia caraterística dos eletrões emitidos. Além disso, a elevada resolução energética do espetrómetro de eletrões possibilita a obtenção de informações sobre as ligações químicas presentes. A XPS baseia-se no fenómeno de fotoionização e utiliza raios-X com energias situadas na gama $200\,\text{eV}–2000\,\text{eV}$. Quando a energia do fotão é menor que as energias de ligação dos eletrões das camadas internas, o fotão interage com os níveis de valência da molécula ou do sólido, resultando na ionização através da remoção de um desses eletrões de valência. A XPS é, portanto, usada para analisar os níveis do núcleo e, consequentemente, para investigar a composição e os estados eletrónicos da superfície de uma amostra, examinando a dispersão de energia dos fotoeletrões emitidos pelo núcleo. Como cada orbital atómica do núcleo de um elemento possui uma energia de ligação caraterística, cada elemento gera um conjunto específico de picos no espetro de fotoeletrões, com energias cinéticas determinadas pela energia do fotão e pelas respetivas energias de ligação. A presença de picos em energias específicas indica a existência de um determinado elemento na amostra e a intensidade desses picos está relacionada com a concentração do elemento na área analisada. Quando a precisão da medição atinge cerca de $0{,}1\,\text{eV}$, é possível determinar o estado químico (como a valência) de um elemento. Pequenas variações na energia de ligação, também conhecidas como desvios químicos, podem ser exploradas para obter detalhes sobre o ambiente químico do elemento [184].

Os valores energéticos dos fotoeletrões emitidos pela amostra são medidos por um detetor de eletrões, resultando num espetro composto por uma série de picos de fotoeletrões. As energias de ligação associadas a esses picos são específicas para cada elemento. Dado que tanto a forma como a energia de ligação dos picos podem sofrer pequenas alterações devido ao estado químico do átomo emissor, a técnica XPS permite obter informações não apenas sobre os átomos presentes na superfície, mas também sobre as suas ligações químicas. As áreas dos picos podem ser usadas para determinar a composição da superfície do material. Devido à baixa energia dos fotoeletrões, que são facilmente absorvidos no ar ou em vácuo insuficiente, a XPS deve ser realizada em condições de ultra-alto vácuo [184].

Como exemplo de um espetro XPS, a figura 5.7 apresenta os picos de fotoeletrões de níquel resultantes da interação com fotões de Mg K$\alpha(1253{,}6\,\text{eV})$. O espetro revela os picos correspondentes a Ni 2s, $2p_{1/2}$, $2p_{3/2}$, 3s e 3p. Para maior clareza, os picos de Ni $2p_{1/2}$ e $2p_{3/2}$ são também ampliados na

parte interna da figura. É importante notar que o pico Ni 1s não aparece no espetro, pois os eletrões 1s (com uma energia de ligação de 8332 eV) não podem ser excitados por fotões com energia de $1253{,}6$ eV [184].

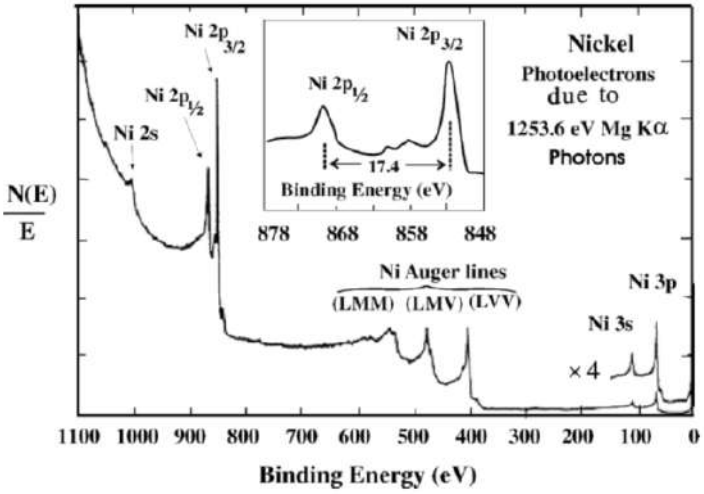


Figura 5.7: Espetro de fotoelectrões do níquel gerado pela incidência de fotões de $1253{,}6$ eV provenientes da radiação Mg Kα(figura reproduzida de [184]).

5.2 Caraterização da Sonda Neuronal Flexível com Integração de Microelétrodos de Pt Eletrodepositada

Para verificar o impacto do revestimento de Pt dos microelétrodos, procedeu-se então a medições EIS dos mesmos. Estas medidas foram efetuadas antes e após da eletrodeposição de Pt, verificando assim os seus valores de impedância e ângulo de fase. As medições de EIS são fundamentais para a caraterização da sonda neuronal flexível desenvolvida, uma vez que esta se destina a ser utilizada em estudos de optogenética, onde uma fonte de luz estimula os neurónios e os microelétrodos registam a atividade neuronal induzida pela luz. A baixa impedância é um dos principais indicadores da eficácia de um microelétrodo na captação da atividade neuronal [79, 185].

As medições EIS foram realizadas numa solução salina ($0{,}9$ % de NaCl), utilizando uma configuração de três elétrodos: o microelétrodo da sonda neuronal como WE; uma placa de Pt como CE; e um elétrodo de Ag/AgCl como RE. Para a medição, recorreu-se a um potencióstato (*Reference 600*, *Gamry Instruments*), aplicando-se um potencial AC de 10 mV RMS entre o RE e o WE, numa área de $8{,}1 \times 10^{-7}$ cm^2 e com frequências que variaram entre 1 MHz e 100 Hz. Adicionalmente, foi avaliada a viabilidade do elétrodo de referência de Ag/AgCl, tendo a sua impedância sido medida antes das medições EIS na sonda

neuronal flexível. A impedância do elétrodo de referência encontrava-se abaixo de $1\,\mathrm{k}\Omega$ ($400\,\Omega$) e a sua fase a tender para zero, tal como esperado [167]. O *setup* utilizado para realizar as medições EIS na sonda neuronal flexível encontra-se ilustrado na figura 5.8, sendo que a ligação elétrica ao microelétrodo da sonda foi assegurada através de fita adesiva de cobre e cola condutora de prata.

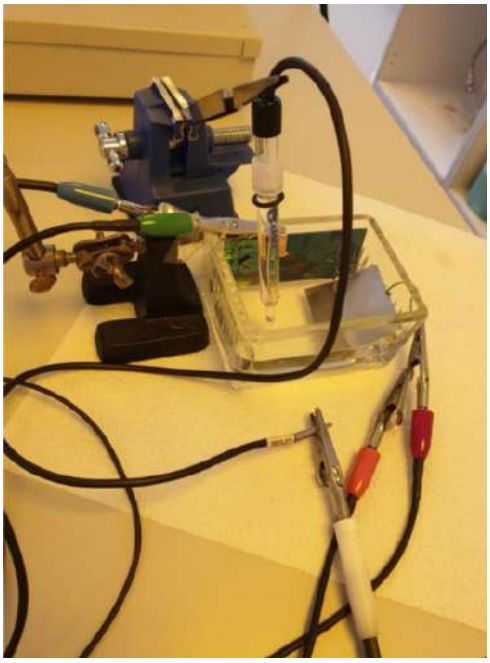


Figura 5.8: *Setup* utilizado para realizar as medições de EIS na sonda neuronal flexível pré- e pós-eletrodeposição de Pt.

Na figura 5.9, pode-se observar as mudanças nos valores de impedância e do ângulo de fase em função da frequência. Analisando os espetros, antes da eletrodeposição de Pt (figura 5.9 (a)), a sonda neuronal flexível apresenta um comportamento capacitivo, com a impedância a aumentar à medida que a frequência diminui e um desvio de fase (Φ) de aproximadamente $90°$, o que está em conformidade com o descrito na literatura para microelétrodos de Ti [186]. Após a deposição de Pt (figura 5.9 (b)), a curva de impedância começa a estabilizar por volta dos 3 kHz, indicando que o comportamento da sonda neuronal flexível passa de capacitivo para resistivo. O ângulo de fase reflete também essa transição, partindo de $0°$ e aumentando até aos $90°$. Desta forma, o circuito equivalente pode ser representado por um circuito RC em paralelo [182]. Para registo neuronal, a frequência de maior interesse é em torno de 1 kHz, dado que a duração média de um potencial de ação é de 1 ms [79]. Antes da eletrodeposição de Pt, a impedância a 1 kHz era de aproximadamente $1{,}2\,\mathrm{M}\Omega$, reduzindo-se para cerca de $350\,\mathrm{k}\Omega$ após a deposição de Pt. Como era esperado, a eletrodeposição de Pt reduziu de forma significativa a impedância, o que favorece o registo da atividade neuronal. Os valores de impedância medidos encontram-se com um valor inferior ao reportado na literatura para microelétrodos de Pt com áreas ativas reduzidas [187] e na mesma gama

para outros tipos de microelétrodos neuronais de pequenas dimensões, como os microelétrodos de Au [92].

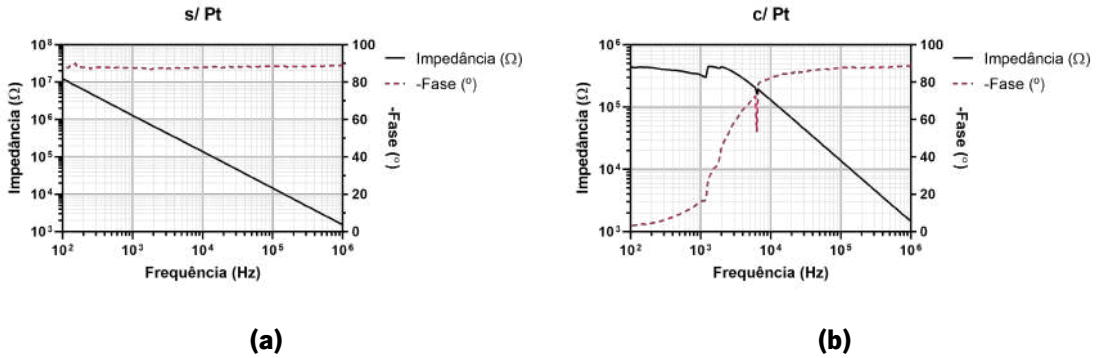


Figura 5.9: Diagramas de Bode dos resultados EIS dos microelétrodos pré- e pós-eletrodeposição de Pt: (a) Valores de impedância e ângulo de fase antes da eletrodeposição de Pt; (b) Valores de impedância e ângulo de fase após a eletrodeposição de Pt.

5.3 Caraterização da Sonda Neuronal Flexível com Integração de Microelétrodos de Pt Depositada por Pulverização Catódica por Magnetrão DC

Para a obtenção dos valores de impedância dos microelétrodos de Pt da sonda neuronal flexível com integração de microelétrodos baseados em pulverização catódica por magnetrão DC, foi necessário projetar e fabricar uma PCB pois esta versão da sonda já se encontra libertada do substrato de Si. A sonda neuronal flexível foi acoplada à PCB através de um conetor *flexible printed cable* (FPC) *FH29BW–22S–0.2SHW(05)* da *Hirose Electric* [155]. A PCB foi desenhada de forma a poder ser depois conetada (na fase de validação da sonda neuronal flexível, secção 5.4) a um *RHD 32–Channel Recording* da *Intan Technoligies* [188], através de um conetor *A79022–001* da *Omnetics* [189], para o registo e amplificação de sinais eletrofisiológicos. Na figura 5.10 (a) encontra-se representado o esquemático das ligações elétricas, na figura 5.10 (b) o esquemático da placa e, por fim, na figura 5.10 (c) pode ser visualizada a sonda neuronal flexível acoplada à PCB através do conetor *flexible printed cable* (FPC) *FH29BW–22S–0.2SHW(05)* e sucessiva conexão à *RHD 32–Channel Recording Headstage* com recurso a um conetor *omnetics A79022–001*.

As medições EIS foram realizadas na configuração de três elétrodos, descrita na secção 5.2, sendo que um conetor macho da *Omnetics* foi ligado ao conetor *A79022–001* da PCB para o acesso aos onze

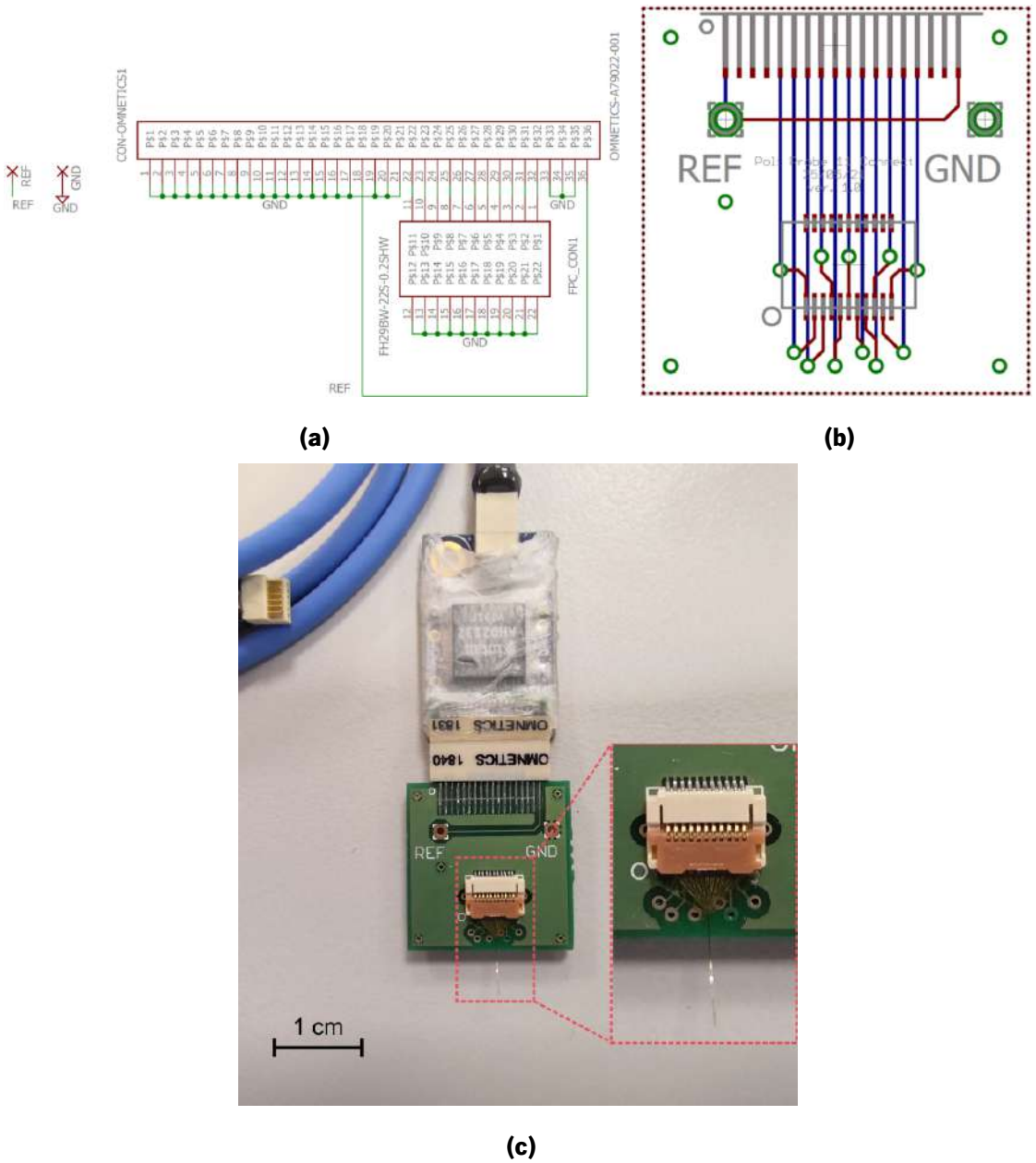


Figura 5.10: PCB desenvolvida para o acesso aos microelétrodos através da ligação da sonda neuronal flexível com um *channel recording headstage*: (a) Esquemático das ligações elétricas; (b) Esquemático da placa; (c) Sonda neuronal flexível acoplada à PCB e sucessiva conexão à *RHD 32–Channel Recording Headstage*.

microelétrodos da sonda neuronal flexível. Para a medição, recorreu-se a um potencióstato (*Reference 600*, *Gamry Instruments*), com as mesmas configurações que na secção 5.2, à exceção da frequência inicial de 10 kHz. Os microelétrodos que apresentavam a 1 kHz uma impedância superior a 2 MΩ foram considerados como um circuito aberto e descartados durante a análise. O *setup* utilizado para realizar as medições de EIS na sonda neuronal flexível através da PCB desenvolvida encontra-se ilustrado na

figura 5.11.



(a) **(b)**

Figura 5.11: *Setup* utilizado para realizar as medições de EIS na sonda neuronal flexível através da PCB desenvolvida: (a) Visão geral do *setup* utilizado; (b) Visão dos microelétrodos (WE), elétrodo $Ag/AgCl$ (RE) e placa de Pt (CE) mergulhados na solução salina.

Na figura 5.12, pode-se observar as mudanças nos valores de impedância dos microelétrodos de três sondas neuronais flexíveis distintas. Analisando os espetros, os microelétrodos mostram um comportamento capacitivo, com a impedância a aumentar à medida que a frequência diminui, conforme o descrito na literatura para microelétrodos de Pt integrados em sondas neuronais flexíveis [89]. A seguinte conclusão que se pode retirar através da análise dos espetros EIS, foi o aumento dos valores de impedância devido à degradação e oxidação dos microelétrodos com o passar do tempo, o que era de esperar (figura-5.12 (d)–figura 5.12 (f)). Por fim, os valores extremamente reduzidos de impedância da sonda neuronal flexível (SNF) 1 (figura 5.12 (a) e figura 5.12 (d)), explicam-se através do tempo superior em que esta se encontrou imersa no *etchant Silox Vapox III*, durante a libertação da sonda neuronal flexível do substrato de Si. Devido a uma maior corrosão da Pt dos microelétrodos expostos durante este processo, a sua rugosidade aumentou, o que levou a um acréscimo da sua área ativa, resultando na diminuição dos valores de impedância registados. Comparativamente aos valores de impedância para microelétrodos de Pt com áreas ativas reduzidas ($2\,\mathrm{M\Omega}$ a $1\,$kHz com um diâmetro de $10\,\mu$m [187]), foram fabricados microelétrodos de Pt com valores significativamente inferiores, mesmo após a sua degradação temporal. Estes microelétrodos de Pt, com uma área ativa de $9\,\mu\mathrm{m} \times 9\,\mu$m, apresentaram valores de impedância a $1\,$kHz de SNF1 = $12{,}19\,\mathrm{k\Omega} \pm 2{,}05\,\mathrm{k\Omega}$, SNF2 = $77{,}87\,\mathrm{k\Omega} \pm 9{,}35\,\mathrm{k\Omega}$ e SNF3 = $327\,\mathrm{k\Omega} \pm 81\,\mathrm{k\Omega}$, após o seu fabrico. Com a degradação temporal, foram registados valores de impedância a $1\,$kHz de SNF1 = $73{,}35\,\mathrm{k\Omega} \pm 14{,}88\,\mathrm{k\Omega}$, SNF2 = $272\,\mathrm{k\Omega} \pm 235\,\mathrm{k\Omega}$ e SNF3 = $367\,\mathrm{k\Omega} \pm 158\,\mathrm{k\Omega}$.

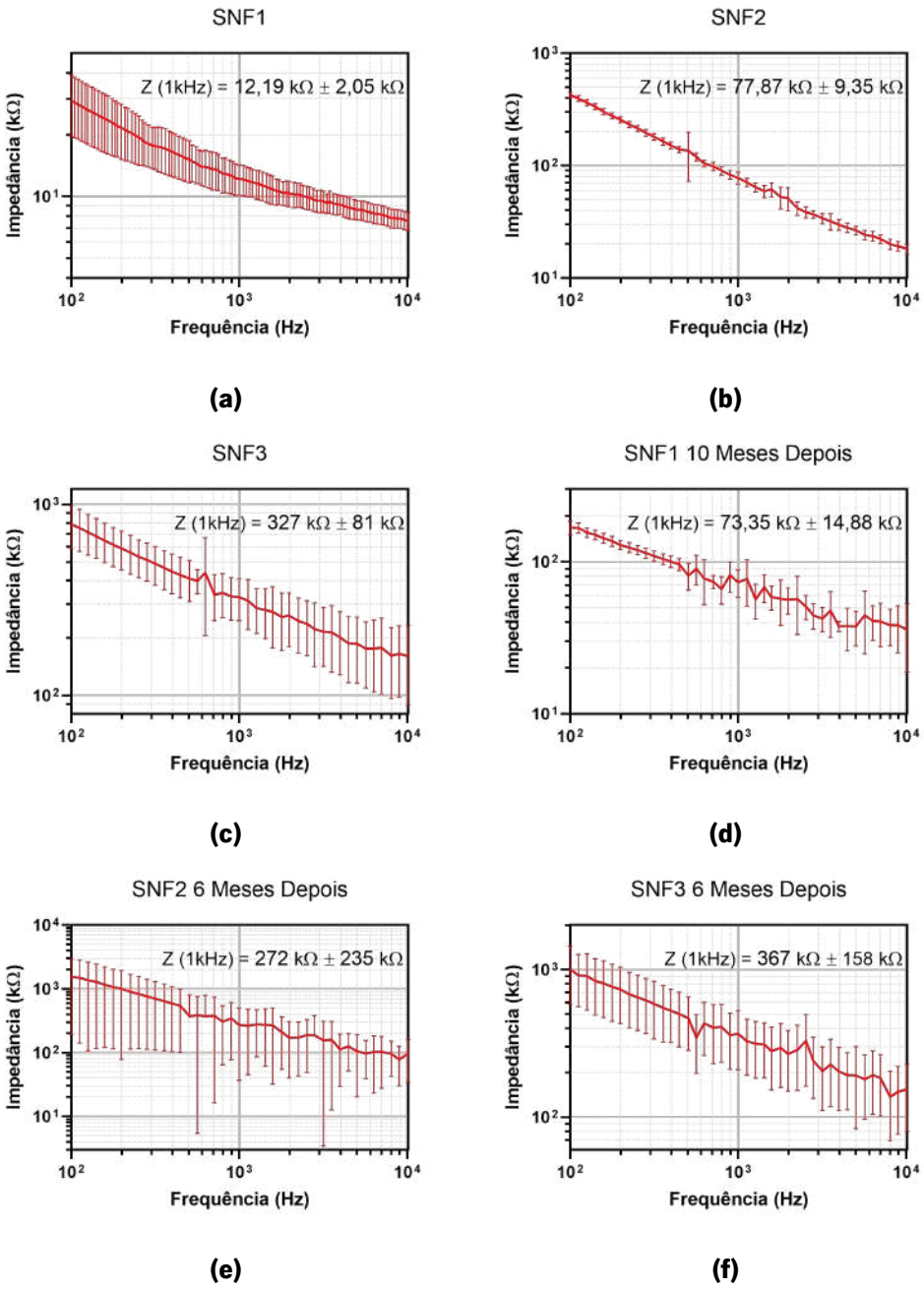
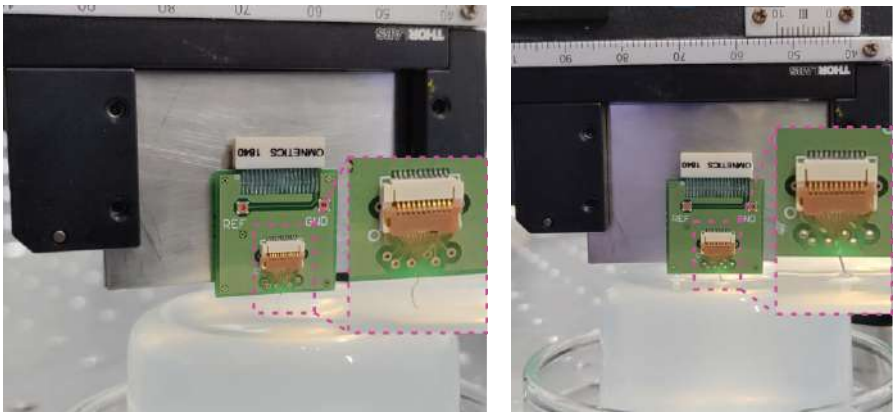


Figura 5.12: Diagramas de Bode dos resultados EIS dos microelétrodos, acedidos através da PCB desenvolvida, de três sondas neuronais flexíveis distintas: (a) Valores de impedância dos microelétrodos da SNF1; (b) Valores de impedância dos microelétrodos da SNF2; (c) Valores de impedância dos microelétrodos da SNF3; (d) Valores de impedância dos microelétrodos da SNF1 dez meses depois do fabrico; (e) Valores de impedância dos microelétrodos da SNF2 seis meses depois do fabrico; (f) Valores de impedância dos microelétrodos da SNF3 seis meses depois do fabrico.

5.4 Validação da Sonda Neuronal Flexível com Integração de Microelétrodos de Pt Depositada por Pulverização Catódica por Magnetrão DC

Após o fabrico da sonda neuronal flexível, foram efetuados testes de inserção num fantoma cerebral ($0{,}6\,\%$ gel de agarose [190, 191]) para verificar a sua flexibilidade e capacidade de inserção da haste com e sem revestimento biocompatível e biodegradável PEG. O revestimento da haste da sonda neuronal flexível foi conseguido através da sua imersão durante alguns segundos em PEG líquido, sendo de seguida aguardada a solidificação do PEG à temperatura ambiente. A sonda neuronal flexível foi acoplada à PCB desenvolvida e posicionada perpendicularmente ao fantoma cerebral por um manipulador de três eixos. De seguida, foi aplicado um movimento descendente constante até ser atingida a superfície do fantoma cerebral. Como se pode verificar na figura 5.13 (a), quando a haste da sonda neuronal flexível não é revestida com PEG, esta não é capaz de perfurar a superfície, sofrendo uma curvatura até o movimento descendente cessar. Quando de seguida se aplica um movimento ascendente, a haste da sonda neuronal flexível retorna à sua posição inicial. Após o primeiro teste, a haste da sonda neuronal flexível foi revestida com PEG e o mesmo procedimento de inserção foi aplicado. Conforme demonstrado na figura 5.13 (b), quando a haste da sonda neuronal flexível entra em contacto com a superfície do fantoma cerebral, esta é perfurada, sendo os microelétrodos inseridos e o PEG parcialmente dissolvido, comprovando assim a eficácia do revestimento PEG.



(a) **(b)**

Figura 5.13: Testes de inserção da sonda neuronal flexível num fantoma cerebral ($0{,}6\,\%$ gel de agarose): (a) Haste sem revestimento biocompatível e biodegradável PEG; (b) Haste com revestimento biocompatível e biodegradável PEG.

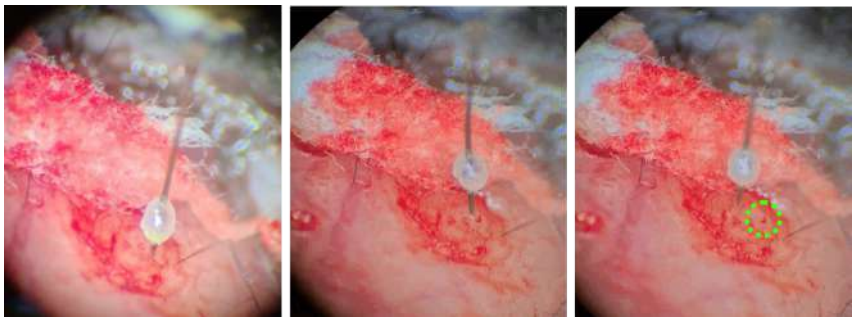
Após a validação da inserção da sonda neuronal flexível num fantoma cerebral, foram preparadas duas sondas neuronais flexíveis *dummy* para a realização de testes de inserção *in vivo* cerebral (figura 5.14 (a)). Como primeira abordagem optou-se pelo revestimento biocompatível e biodegradável PEG da haste da sonda neuronal flexível (figura 5.14 (b)) e como segunda abordagem a utilização de uma guia de inserção de fibra ótica, com um diâmetro aproximado de 400 µm (figura 5.14 (c)).



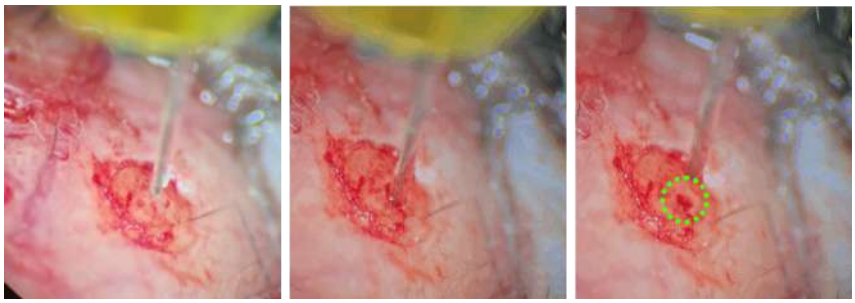
(a) **(b)** **(c)**

Figura 5.14: Sondas neuronais flexíveis *dummy* usadas em testes *in vivo* de inserção cerebral num rato através de diferentes abordagens: (a) Visão geral de duas sondas neuronais flexíveis *dummy* usadas em testes de inserção *in vivo*; (b) Haste da sonda neuronal flexível com revestimento biocompatível e biodegradável PEG; (c) Fibra ótica ($\varnothing \approx 400$ µm) como guia de inserção.

Todos os testes de validação *in vivo* das sondas neuronais flexíveis, que irão agora ser descritos, foram realizados nas instalações do Instituto de Investigação em Ciências da Vida e Saúde (ICVS) e por profissionais devidamente certificados. Com as duas sondas neuronais flexíveis *dummy* preparadas, procedeu-se aos testes *in vivo* de inserção cerebral num rato anestesiado, após a realização de uma craniotomia e remoção das meninges. Como se pode observar na figura 5.15, ambas as abordagens foram bem sucedidas, sendo de destacar as diferenças na pegada de inserção da sonda neuronal flexível *dummy* com revestimento biocompatível e biodegradável PEG (figura 5.15 (a)) e da sonda neuronal flexível com guia de fibra ótica (figura 5.15 (b)). Através destes resultados, verificou-se o êxito na inserção da sonda neuronal flexível com revestimento biocompatível e biodegradável PEG e a sua aptidão na criação de uma pegada de inserção cerebral menor que uma sonda neuronal flexível com guia de fibra ótica. Contudo, devido à flexibilidade da sonda neuronal flexível com revestimento biocompatível e biodegradável PEG, optou-se pela utilização da sonda neuronal flexível com guia de fibra ótica nos subsequentes testes *in vivo*, garantindo assim uma inserção numa região mais profunda e nas coordenadas cerebrais desejadas.



(a)

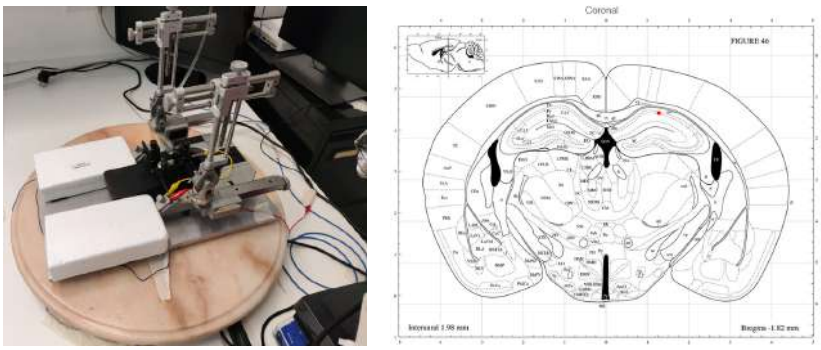


(b)

Figura 5.15: Testes *in vivo* de inserção cerebral num rato anestesiado através de diferentes abordagens e destaque da pegada de inserção: (a) Inserção da sonda neuronal flexível com revestimento biocompatível e biodegradável PEG e respetiva pegada de inserção; (b) Inserção da sonda neuronal flexível com guia de fibra ótica e respetiva pegada de inserção.

Para avaliar a funcionalidade dos microelétrodos de Pt, foram realizados registos eletrofisiológicos extracelulares *in vivo* num rato anestesiado com sevoflurano (concentração de $2\,\%$), com recurso a três sondas neuronais flexíveis com guia de fibra ótica (SNF1, SNF2 e SNF3). Estes registos foram efetuados com recurso a um *setup* de eletrofisiologia (figura 5.16 (a)), onde o conjunto SNF–PCB–*channel headstage recording* foi conetado a um sistema de aquisição *Open Ephys* e os microelétrodos inseridos na região CA1 do hipocampo: AP $= -1{,}8$ mm; ML $= \pm 1{,}3$ mm; e DV $= -1{,}4$ mm [192] (figura 5.16 (b)), após a realização de uma craniotomia e remoção das meninges.

Com todas as preparações finalizadas, as sondas neuronais flexíveis foram inseridas na localização previamente descrita, sendo a atividade extracelular registada pelo sistema *Open Ephys* durante 10 min com uma amostragem de 30 kHz. Foram efetuadas gravações de atividade extracelular individuais para cada sonda neuronal flexível (SNF1, SNF2 e SNF3). Após a finalização de cada gravação, a atividade extracelular foi filtrada através da aplicação de um filtro passa-banda *Butterworth* (300 Hz–3000 Hz), sendo os potenciais de ação detetados utilizando um limite de amplitude de pelo menos $3{,}5$ vezes o desvio padrão do ruído de fundo. Devido à localização dos microelétrodos em relação aos neurónios, a



(a) (b)

Figura 5.16: *Setup* de eletrofisiologia e região do registo de atividade extracelular: (a) *Setup* de eletrofisiologia utilizado no registo de atividade extracelular; (b) Vista coronal do cérebro de um rato, sendo o localização do registo da atividade extracelular destacada com um ponto vermelho (figura reproduzida de [192]).

amplitude e forma da onda dos potenciais de ação registados pode variar [2, 193, 194], explicando assim os diferentes formatos de potenciais de ação registados pela SNF3, demonstrados na figura 5.17.

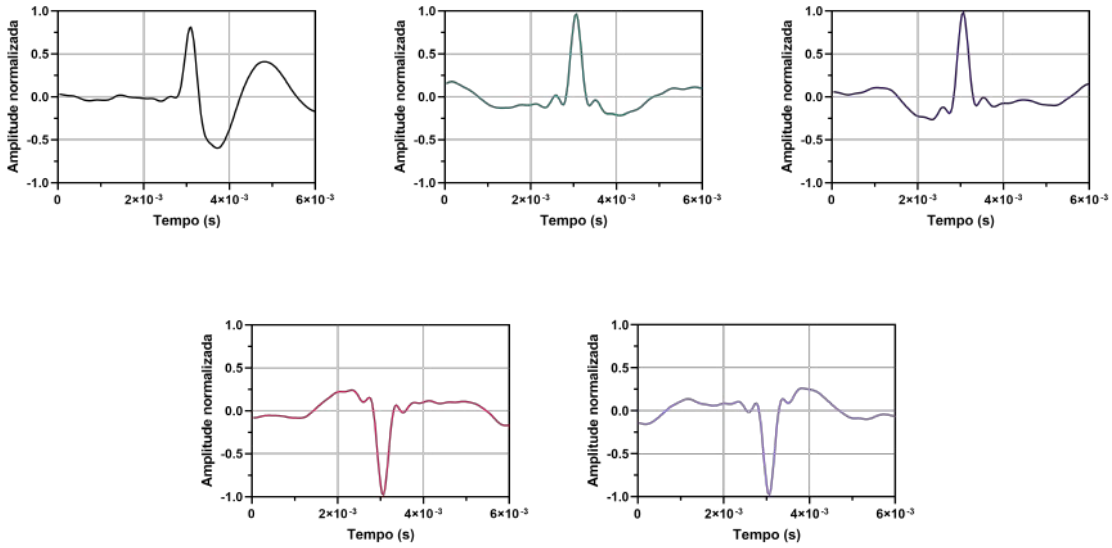


Figura 5.17: Diferentes formatos de potenciais de ação registados pela SNF3.

Foram também realizadas deteções de LFPs, resultantes da atividade de múltiplos neurónios, através da aplicação de um filtro passa-baixo *Butterworth* (300 Hz) à atividade extracelular registada. A quantificação da atividade LFP foi realizada através de uma representação gráfica da densidade espetral de potência (PSD). Na figura 5.18 podem ser observadas as baixas frequências que compõem os sinais LFPs registados com a SNF2 e a SNF3, sendo o seu comportamento correspondente à lei de potência

de LFPs $1/f^n$, conforme a literatura [193, 195]. Para a confirmação destes resultados, foram também registados LFPs numa sonda neuronal rígida comercial *ASSY–37 Fb Probe* (H2) da *Cambridge NeuroTech* [196] em dois dias diferentes. É de salientar a influência significativa do harmónico fundamental da rede (50 Hz) e do 5° harmónico (250 Hz).

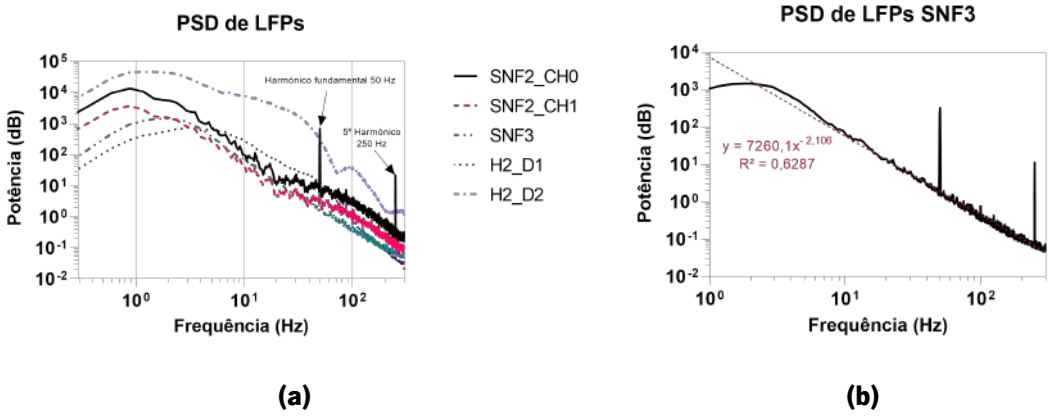


Figura 5.18: Representação PSD de LFPs registados por diferentes sondas neuronais: (a) PSD de LFPs registados pelas SNF fabricadas e por uma sonda neuronal rígida comercial *ASSY–37 Fb Probe* (H2) da *Cambridge NeuroTech*; (b) PSD de LFPs registados pela SNF3.

5.5 Caraterização dos Filmes-Finos que Compõem a Guia de Onda

Conforme descrito na secção 3.1, foram obtidos experimentalmente os n dos filmes-finos de TiO_2 e SiO_2 que compõem o núcleo e encapsulamento da guia de onda, respetivamente. Para a obtenção dos valores de n, recorreu-se a amostras de Si colocadas na câmara de deposição durante o processo de fabrico da guia de onda durante o seu processo de fabrico, onde foram depositados os filmes-finos de TiO_2 e SiO_2, simultaneamente. Foi utilizada a técnica de SE, com recurso ao elipsómetro espetroscópico *alpha–SE* da *J.A. Woollam Co.* [197]. Os n foram obtidos para o espetro visível, sendo a gama analisada de 381 nm–893 nm com os θ_i de 65°, 70° e 75°. Para a obtenção do n do TiO_2 foi aplicado o modelo *Tauc-Lorentz*, segundo a sua forma geral:

$$\varepsilon_{2TL}(E) = \begin{cases} \frac{AE_0C(E-E_g)^2}{\left(E^2-E_0^2\right)^2+C^2E^2} \cdot \frac{1}{E}, & E > E_g \\ 0, & E \leq E_g \end{cases} \tag{5.1}$$

em que ε_2 representa a parte imaginária da função dielétrica, o subscrito TL indica que o modelo baseia-se na densidade de estados comum de *Tauc* e no oscilador de *Lorentz*, E representa a energia de fotão, A representa a amplitude da transição, C representa o parâmetro de dispersão, E_0 representa a energia de pico de transição e E_g representa o *band gap* ótico. Os quatro parâmetros de ajuste A, C, E_0 e E_g são todos representados em unidades de energia (eV) [198]. Com o ajuste destes parâmetros no *software* do elipsómetro, foi possível extrair um $n(470\,\text{nm}) = 2{,}6$ do TiO_2 (figura 5.19 (a)) e outras caraterísticas do filme-fino, como a sua espessura e rugosidade. Para a obtenção do n do SiO_2 foi aplicado o modelo *Sellmeier*, segundo a sua forma geral:

$$n\,(\lambda)^2 = \varepsilon_\infty + \frac{A_{UV}\,\lambda^2}{\lambda^2 - \lambda_{UV}^2} + \frac{A_{IR}\,\lambda^2}{\lambda^2 - \lambda_{IR}^2} \tag{5.2}$$

em que n representa o índice de refração do material num dado valor de comprimento de onda λ, ε_∞ representa o desvio de baixa frequência, A_{UV} e A_{IV} representam a amplitude dos pólos UV e IV, por fim, λ_{UV} e λ_{IV} representam as posições dos pólos UV e IV [199]. Ajustando estes parâmetros no *software* do elipsómetro, foi possível obter um $n(470\,\text{nm}) = 1{,}45$ do SiO_2 (figura 5.19 (b)) e outras propriedades do filme-fino, como a sua espessura e rugosidade.

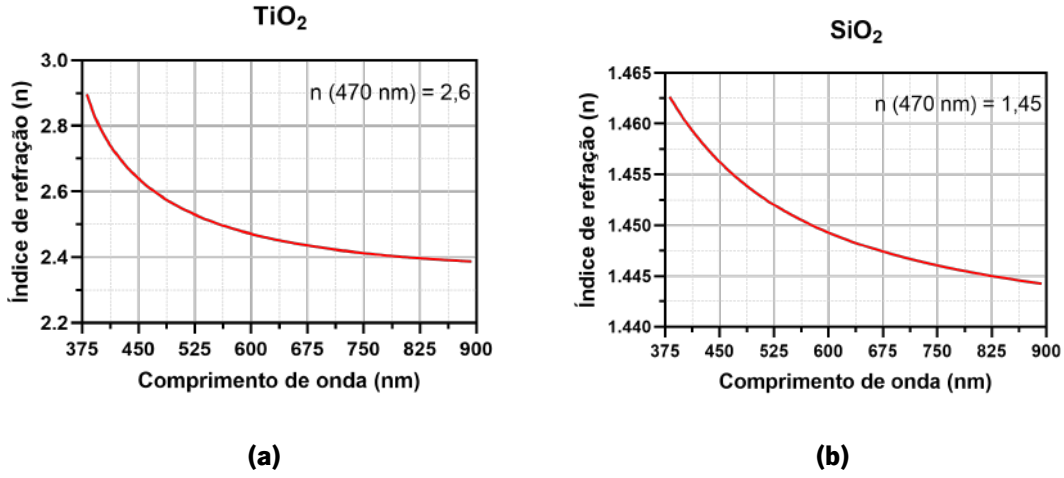


Figura 5.19: Curvas de índice de refração em função do comprimento de onda dos filmes-finos de TiO_2 e SiO_2: (a) n do TiO_2 fabricado com recurso a pulverização catódica por magnetrão RF; (b) n do SiO_2 fabricado com recurso a PEALD.

Para a confirmação do crescimento de SiO_2 com recurso a PEALD e a sua composição química, foi realizada uma análise XPS do filme-fino de SiO_2 na amostra de Si. Esta análise foi efetuada através do equipamento *ESCALAB 250Xi* da *Thermo Fisher Scientific*, equipado com uma fonte de raios-X monocromática de radiação Al Kα (hv = $1486{,}68$ eV), operando a 220 W, $14{,}6$ kV e com um tamanho de ponto de

$650\,\mu m$ [200]. A figura 5.20 ilustra o espetro XPS do filme-fino de SiO_2 fabricado com recurso a PEALD. A razão estequiométrica entre o silício e o oxigénio (Si:O) foi estimada como sendo próxima de 27:58, com base no cálculo das áreas dos picos XPS de Si 2p e O 1s. Este valor aproxima-se bastante do valor esperado de 1:2. A presença do pico de Si 2p a ≈ 103 eV confirmou a formação de SiO_2 [201].

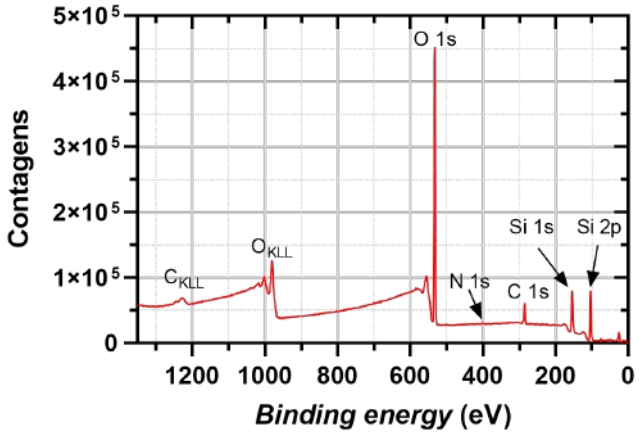


Figura 5.20: Espetro XPS do filme-fino de SiO_2 fabricado com recurso a PEALD.

Devido à impossibilidade de fabrico da *grating* de transmissão de acoplamento para a inserção da luz na guia de onda, não foi possível determinar experimentalmente o valor da atenuação ótica do conjunto *grating* de transmissão de acoplamento – guia de onda – *grating* de transmissão de desacoplamento.

5.6 Estudo de SiN como Material do Núcleo da Guia de Onda

Nos últimos anos, o SiN tem despertado grande interesse como material de núcleo para guias de onda nas regiões espetrais próximas do IV e do visível [202–204]. Devido a este interesse, decidiu-se realizar um estudo de como a otimização de diversos parâmetros durante a deposição de filmes-finos de SiN afetam a variação do seu n. Recorrendo a técnicas PVD disponíveis no laboratório, foram depositados múltiplos filmes-finos de SiN para a obtenção de um n próximo ao n do Si_3N_4 estequiométrico.

O SiN apresenta um n relativamente elevado (≈ 2), permitindo o confinamento da luz no núcleo da guia de onda. Os filmes-finos de SiN são geralmente obtidos através de técnicas CVD, como a deposição química de vapores em baixa pressão (LPCVD) ou a PECVD [205, 206]. Contudo, para processos que exigem baixas temperaturas (como em dispositivos baseados em polímeros) e uma baixa concentração de hidrogénio (H) nos filmes-finos, a PVD de SiN é amplamente preferida. Para tal, podem ser utilizadas técnicas como a pulverização catódica reativa [207–209], pulverização catódica com feixe duplo de iões (DIBS) [210, 211] e deposição assistida por iões (IAD) [212–214].

A pulverização catódica reativa RF de filmes-finos de SiN é habitualmente realizada com um alvo de Si e um plasma de azoto–árgon. Diversos estudos demonstraram que é possível ajustar o n do SiN ao modificar diferentes parâmetros de deposição. Verificou-se que o n do SiN aumenta com o incremento da potência de pulverização catódica, o aquecimento do substrato durante o processo de deposição, uma maior proporção de azoto em relação ao árgon e uma pressão de pulverização mais baixa [209, 215–217].

Os filmes-finos de SiN foram depositados a partir de um alvo de Si, utilizando a técnica de pulverização catódica reativa RF. Inicialmente, como teste, os filmes-finos de SiN foram depositados num substrato de Si com três diferentes potências de pulverização catódica (100 W, 150 W e 200 W), mantendo uma razão de azoto para árgon de 13:7 e uma pressão de 6×10^{-3} mbar durante o processo. A taxa de deposição medida variou entre $0{,}4$ Å s^{-1} e 1 Å s^{-1}. Em seguida, com o objetivo de melhorar o n, foram depositados filmes-finos de SiN em substratos de Si utilizando potências de pulverização catódicas entre 180 W e 300 W. A deposição foi realizada com uma razão de azoto para árgon de 16:4, sob uma pressão de 6×10^{-3} mbar, e aplicou-se um arrefecimento controlado do substrato em atmosfera rica em azoto após a pulverização, mantendo um fluxo constante de 16 sccm de azoto até que as amostras atingissem os 25 °C. A taxa de deposição variou entre $0{,}7$ Å s^{-1} e $0{,}9$ Å s^{-1}. A tabela 5.1 apresenta um resumo de todas as deposições de filmes-finos de SiN realizadas.

Tabela 5.1: Parâmetros de deposição de filmes-finos de SiN por pulverização catódica reativa RF.

Potência (W)	Razão azoto–árgon	Pressão (mbar)	Taxa de deposição (Å s^{-1})	Arrefecimento do substrato em atmosfera rica em azoto
100	13:3	6×10^{-3}	0,4	Não
150			0,6	
200			1	
180	16:4	6×10^{-3}	0,7	Sim
200			0,8	
230			0,8	
250			0,8	
300			0,9	

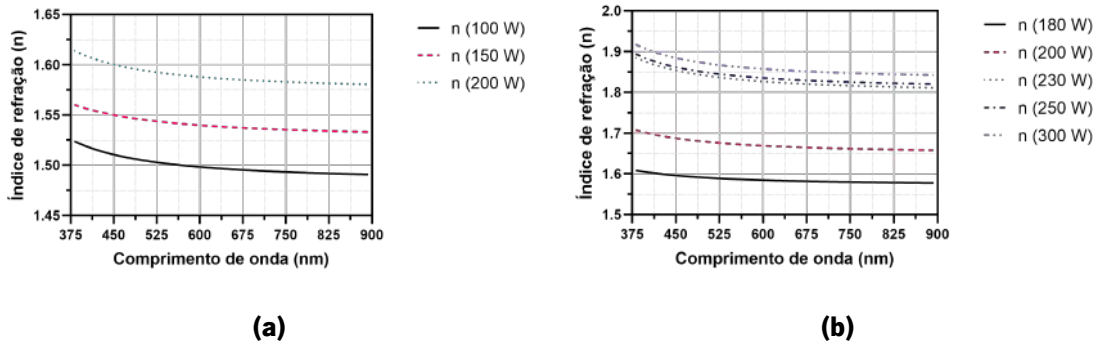
Foi utilizada a técnica de SE, com recurso ao elipsómetro espetroscópico *alpha–SE* da *J.A. Woollam Co.* [197]. Os n foram obtidos para o espetro visível, sendo a gama analisada de 381 nm–893 nm com os θ_i de $65°$, $70°$ e $75°$. Para a obtenção do n do SiN foi aplicado o modelo *Tauc-Lorentz*, segundo a equação 5.1.

Na figura 5.21, estão apresentadas as curvas do n para todos os filmes-finos de SiN depositados, em função do λ, considerando diferentes potências de pulverização catódica, proporções de azoto–árgon

e amostras com ou sem arrefecimento do substrato em atmosfera rica em azoto após a deposição. A tabela 5.2 resume os restantes parâmetros ajustados para todas as amostras, incluindo espessura, rugosidade e o respetivo erro quadrático médio (MSE) do processo de ajuste. Conforme mostrado na figura 5.21, o aumento da potência de pulverização catódica resultou num aumento do n do SiN, conforme indicado na literatura [215]. No entanto, esse aumento foi mais pronunciado na figura 5.21 (b) em comparação com a figura 5.21 (a), presumivelmente devido à maior proporção de azoto–árgon durante a deposição e ao efeito do arrefecimento do substrato em atmosfera rica em azoto após o processo. Estas modificações podem ter levado à formação de filmes-finos com maior compactação, resultando numa maior resistência à oxidação após a deposição [209]. Por outro lado, os n mais baixos observados na figura 5.21 (a) podem ser atribuídos a filmes-finos com menor compactação, onde o Si apresenta uma maior tendência para se ligar ao oxigénio do que ao azoto. Alguns átomos de Si podem ter reagido com oxigénio, possivelmente proveniente da parede interna da câmara de deposição, gás residual ou de pequenas fugas de gás durante o processo [214]. Assim, a 400 nm, o n mais elevado obtido para o SiN foi de cerca de $1{,}906$, com uma potência de pulverização catódica de 300 W, uma razão azoto–árgon de 16:4 e um substrato arrefecido em atmosfera rica em azoto após a deposição. Este valor aproxima-se do n do Si_3N_4 estequiométrico de $2{,}073$ a 400 nm [214]. Adicionalmente, a literatura referente à otimização do n de SiN depositado por pulverização catódica reativa RF indica que este pode variar entre aproximadamente $1{,}6$ e $2{,}7$ a $\approx$400 nm, dependendo dos parâmetros de deposição utilizados para os filmes-finos [215, 217]. Também se menciona que, em filmes-finos de SiNx depositados por PECVD com um teor de H inferior a 5 %, o n pode variar entre $1{,}859$ e $2{,}01$ a 630 nm, conforme o aumento da temperatura do substrato, da potência do plasma e do fluxo de precursores, e entre $2{,}15$ e $2{,}31$ a 632 nm, em função da espessura do filme-fino [204].

Tabela 5.2: Parâmetros de ajuste no *software* do elipsómetro *alpha–SE* dos filmes-finos de SiN depositados.

Potência (W)	Espessura ajustada (nm)	Rugosidade ajustada (nm)	MSE	Arrefecimento do substrato em atmosfera rica em azoto
100	$350{,}930 \pm 0{,}208$	$3{,}760 \pm 0{,}375$	10,903	
150	$408{,}800 \pm 0{,}271$	$6{,}370 \pm 0{,}461$	14,896	Não
200	$208{,}460 \pm 0{,}192$	$0{,}000 \pm 0{,}518$	9,697	
180	$243{,}180 \pm 0{,}534$	$2{,}490 \pm 0{,}795$	10,331	
200	$236{,}270 \pm 0{,}583$	$5{,}410 \pm 0{,}791$	18,133	
230	$223{,}370 \pm 0{,}229$	$1{,}970 \pm 0{,}245$	9,893	Sim
250	$223{,}690 \pm 0{,}192$	$0{,}840 \pm 0{,}198$	8,305	
300	$219{,}820 \pm 0{,}181$	$1{,}480 \pm 0{,}184$	8,030	



(a) **(b)**

Figura 5.21: Curvas do índice de refração em função do comprimento de onda obtidas em vários filmes-finos de SiN: (a) Potência de pulverização catódica entre 100 W e 200 W, razão azoto–árgon de 13:7 e sem arrefecimento do substrato em atmosfera rica em azoto após a deposição; (b) Potência de pulverização catódica entre 180 W e 300 W, razão azoto–árgon de 16:4 e com arrefecimento do substrato em atmosfera rica em azoto após a deposição.

Com objetivo de verificar a composição química dos filmes-finos de SiN, as amostras foram revestidas com uma camada antiestática Au/paládio (Pd) para a obtenção de uma elevada condutividade elétrica. As análises EDS foram realizadas através do equipamento *Nova 200* da *FEI*, com um sistema integrado *Pegasus (EDS-EBSD)* da *EDAX* e uma tensão de aceleração de 10 kV [218]. Na amostra da figura 5.22 (a), a análise EDS identificou Si com uma percentagem atómica de $39{,}86$ %, azoto atómico (N) com $25{,}79$ % e oxigénio atómico (O) com $34{,}35$ %. Estes resultados foram obtidos com uma potência de pulverização catódica de 200 W, razão azoto–árgon de 13:7 e sem arrefecimento do substrato em atmosfera rica em azoto após a deposição. Na amostra da figura 5.22 (b), os valores obtidos de percentagem atómica foram de $53{,}77$ % para o Si, $30{,}47$ % para o N e $15{,}76$ % para o O. Estes resultados foram alcançados com uma potência de pulverização catódica de 300 W, uma relação azoto–árgon de 16:4 e arrefecimento do substrato em atmosfera rica em azoto após a deposição. Assim, conclui-se que uma maior potência de pulverização catódica, uma maior proporção de azoto em relação ao árgon durante a deposição e o arrefecimento do substrato em atmosfera rica em azoto após a deposição, contribuíram para a redução da oxidação do filme-fino, o que está em conformidade com a caraterização ótica, revelando n mais elevados nos filmes-finos de SiN.

A rugosidade superficial dos filmes-finos de SiN foi avaliada através do equipamento *Dimension Icon* da *Bruker*, com uma ponta *RTESPA-150* em modo de toco intermitente [219]. Como pode ser observado na figura 5.23, foi analisada uma área de 1 µm $\times$ 1 µm. A figura 5.23 (a) e a figura 5.23 (b) correspondem à análise da mesma amostra da figura 5.22 (a), tendo sido registada uma rugosidade média (R_a) de $1{,}29$ nm. Já a figura 5.23 (c) e a figura 5.23 (d) referem-se à análise da amostra da figura 5.22 (b),

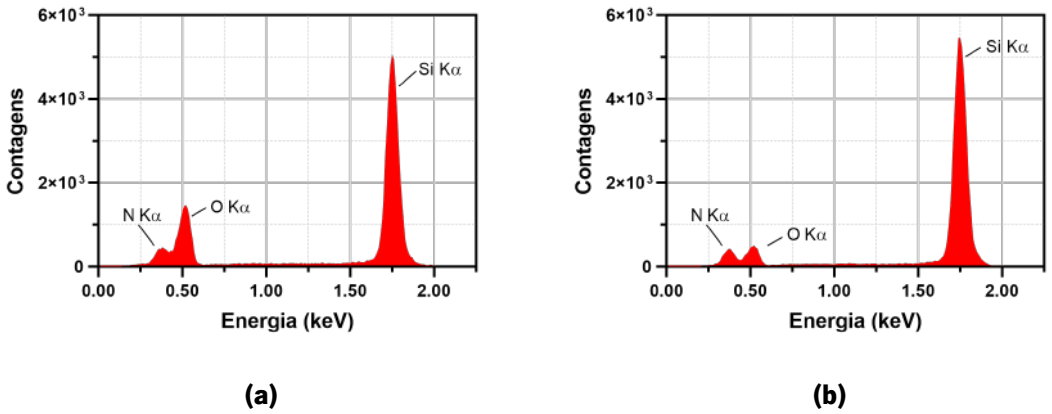


Figura 5.22: Espetro EDS de duas amostras distintas de filmes-finos de SiN: (a) Potência de pulverização catódica de 200 W, razão azoto–árgon de 13:7 e sem arrefecimento do substrato em atmosfera rica em azoto após a deposição; (b) Potência de pulverização catódica de 300 W, razão azoto–árgon de 16:4 e com arrefecimento do substrato em atmosfera rica em azoto após a deposição.

onde a R_a obtida foi de $1{,}55$ nm. O aumento de $0{,}26$ nm da R_a foi atribuído à presença de aglomerados maiores de SiN na amostra da figura 5.23 (c) e da figura 5.23 (d).

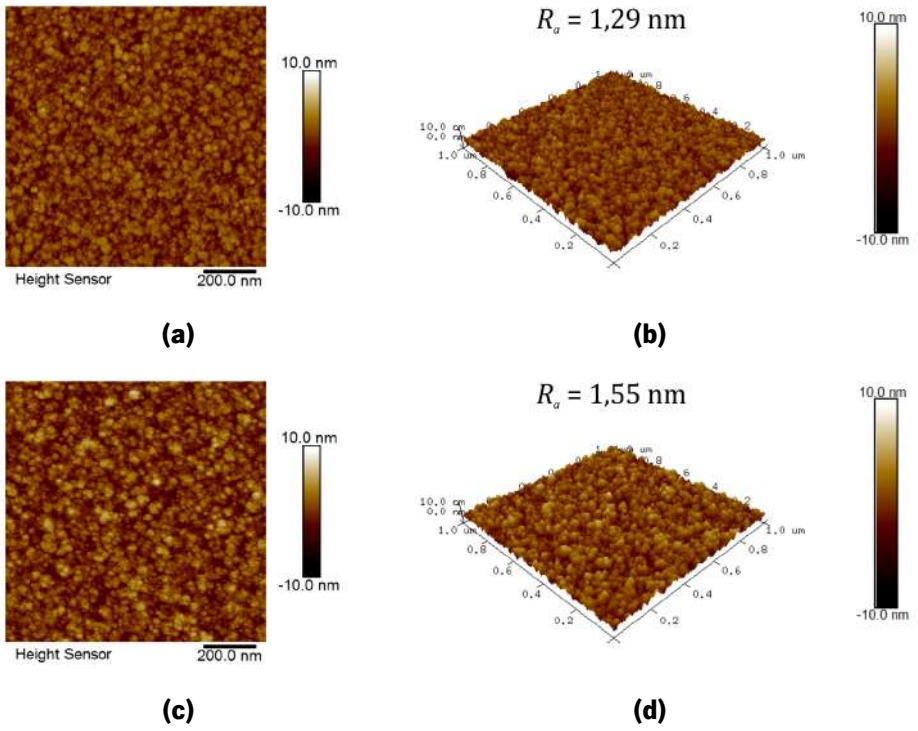


Figura 5.23: Topografia AFM de duas amostras distintas de filmes-finos de SiN: (a) Topografia 2D da mesma amostra da figura 5.22 (a); (b) Topografia 3D da mesma amostra da figura 5.22 (a); (c) Topografia 2D da mesma amostra da figura 5.22 (b); (d) Topografia 3D da mesma amostra da figura 5.22 (b).

Este estudo permitiu concluir que os filmes-finos de SiN, depositados com uma potência de pulverização catódica mais elevada (300 W), uma maior relação azoto–árgon (16:4) e com arrefecimento do substrato em atmosfera rica em azoto, apresentaram uma percentagem atómica de N superior, uma percentagem atómica de O inferior e uma R_a de $1{,}55$ nm. O n máximo alcançado para o SiN nessas condições foi de $1{,}906$ a 400 nm.

Capítulo 6

Conclusões e Trabalho Futuro

Este capítulo apresenta as principais conclusões obtidas com a realização desta tese de doutoramento. Para terminar, são apresentadas as principais perspetivas de trabalho futuro.

6.1 Conclusões

O foco do trabalho desenvolvido durante esta tese de doutoramento foi a implementação de uma sonda neuronal ultra-fina e flexível, com a padronização de microelétrodos de Pt num substrato de PI fotossensível. Além disso, foi estudada a viabilidade da implementação de uma guia de onda, direcionando a aplicação futura da sonda neuronal para estudos na área de optogenética.

Este trabalho apresentou um processo de fabrico para uma sonda neuronal flexível baseada em Pt eletrodepositada. Foi utilizada uma PI fotossensível curada a uma temperatura mais baixa durante o processo de encapsulamento da sonda neuronal flexível, de modo a minimizar a oxidação térmica dos microelétrodos de Ti. Foram realizados testes de recozimento em filmes metálicos depositados sobre PI, o que permitiu reduzir a temperatura de cura de $350\,^{\circ}$C para $250\,^{\circ}$C, sem que fossem observadas irregularidades significativas nas amostras metálicas recozidas a $250\,^{\circ}$C. Além disso, procedeu-se à eletrodeposição de Pt para revestir os microelétrodos da sonda neuronal flexível, inicialmente em Ti, realizada apenas após o processo de encapsulamento da sonda neuronal flexível. O desempenho a nível de impedância dos microelétrodos de Pt foi avaliado para demonstrar a viabilidade do processo de fabrico. A eletrodeposição de Pt reduziu a impedância dos microelétrodos a 1 kHz de aproximadamente $1{,}2\,\mathrm{M}\Omega$ para $350\,\mathrm{k}\Omega$.

Como segunda iteração da sonda neuronal flexível, foi desenvolvido um novo processo de fabrico

para uma sonda neuronal flexível com microelétrodos de Pt depositada por pulverização catódica por magnetrão DC. Estas sondas neuronais flexíveis apresentam uma haste com um comprimento de 6 mm, secção transversal de 130 µm $\times$ 9 µm, pistas com uma largura de 5 µm e um *pitch* de 10 µm e onze microelétrodos de Pt com uma área ativa de 9 µm $\times$ 9 µm, distribuídos pela ponta afilada com um comprimento de 112 µm e um ângulo de $60°$. Após o fabrico da sonda neuronal flexível e a sua libertação do substrato de Si, foi avaliado o desempenho a nível de impedância dos microelétrodos de Pt através do desenvolvimento de uma PCB com capacidade de acoplar uma sonda neuronal flexível e aceder aos seus microelétrodos. Para a caraterização eletroquímica, foram estudadas três sondas fabricadas (SNF1, SNF2 e SNF3). Estes microelétrodos de Pt apresentaram valores de impedância a 1 kHz de SNF1 = $12{,}19\,\text{k}\Omega \pm 2{,}05\,\text{k}\Omega$, SNF2 = $77{,}87\,\text{k}\Omega \pm 9{,}35\,\text{k}\Omega$ e SNF3 = $327\,\text{k}\Omega \pm 81\,\text{k}\Omega$. Com a degradação temporal, foram registados valores de impedância a 1 kHz de SNF1 = $73{,}35\,\text{k}\Omega \pm 14{,}88\,\text{k}\Omega$, SNF2 = $272\,\text{k}\Omega \pm 235\,\text{k}\Omega$ e SNF3 = $367\,\text{k}\Omega \pm 158\,\text{k}\Omega$. Comparativamente aos valores de impedância para microelétrodos de Pt com áreas ativas reduzidas ($2\,\text{M}\Omega$ a 1 kHz com um diâmetro de 10 µm [187]), foram fabricados microelétrodos de Pt com valores significativamente inferiores e na mesma gama para outros tipos de microelétrodos de pequenas dimensões, como os microelétrodos de Au [92], mesmo após degradação temporal.

Após a caraterização dos microelétrodos de Pt, procedeu-se à validação da sonda neuronal flexível através de testes de inserção num fantoma cerebral ($0{,}6$ % gel de agarose), onde se verificou a sua flexibilidade e capacidade de inserção da haste com e sem revestimento biocompatível e biodegradável PEG. Foram também realizados testes de inserção *in vivo* cerebral num rato anestesiado, através da validação positiva de duas abordagens. Como primeira abordagem optou-se pelo revestimento biocompatível e biodegradável PEG da haste da sonda neuronal flexível e como segunda abordagem a utilização de uma guia de inserção de fibra ótica. Como validação final da sonda neuronal flexível, foram realizadas gravações da atividade neuronal extracelular na região CA1 do hipocampo de um rato anestesiado. Com a gravação da atividade neuronal extracelular, foi possível registar potenciais de ação com amplitudes e formatos de onda variadas, devido à localização dos microelétrodos em relação aos neurónios [2, 193, 194]. Foi também possível registar atividade LFP, resultante da atividade de múltiplos neurónios, sendo o seu comportamento analisado através de uma representação PSD e verificado o cumprimento da lei de potência de LFPs $1/f^n$ [193, 195].

Simultaneamente ao fabrico da sonda neuronal flexível com integração de microelétrodos de Pt, foi fabricada uma guia de onda para futuramente ser integrada na sonda neuronal. Esta guia de onda foi projetada para transmitir luz com um λ de 470 nm, para utilização em aplicações optogenéticas

excitatórias da opsina ChR2. Os materiais usados no fabrico do núcleo e encapsulamento da guia de onda, foram o TiO_2 e o SiO_2, com índices de refração determinados experimentalmente de $2{,}6$ e de $1{,}45$, respetivamente. Esta guia de onda apresenta um comprimento de $5{,}04$ mm e uma secção transversal de $100{,}1$ µm $\times$ 600 nm. Foi padronizada também a geometria triangular de uma *grating* de transmissão de acoplamento e a geometria retangular de uma *grating* de transmissão de desacoplamento. Para a determinação das dimensões otimizadas das *grating* para o acoplamento e desacoplamento da luz com um λ de 470 nm, foram realizadas simulações FEM e FDTD. Após estas simulações, foi obtida uma atenuação ótica do conjunto *grating* de transmissão de acoplamento – guia de onda – *grating* de transmissão de desacoplamento de $A(dB) = 10{,}58$ dB. Este resultado foi obtido para as dimensões otimizadas da *grating* de transmissão de acoplamento de $\Lambda = 650$ nm e um *duty-cycle* $= 63$ % e para as dimensões otimizadas da *grating* de transmissão de desacoplamento de $\Lambda = 800$ nm e um *duty-cycle* $= 64$ %. Devido à especificação técnica de tamanho mínimo de estruturas (1 µm) do equipamento DWL *µ-MLA Tabletop Maskless Aligner* da *Heidelberg Instruments* [138] que foi usado para os processos fotolitográficos, não foi possível fabricar ambas as *gratings* com as suas dimensões otimizadas. Para contornar este requisito, seria necessário a utilização de um equipamento EBL, que não se encontra disponível nas instalações do MNFab.

Por fim, foi realizado um estudo sobre SiN como material alternativo ao TiO_2 para a criação do núcleo da guia de onda n. Esta possibilidade deveu-se ao seu n relativamente elevado ($\approx$2) e ao seu grande interesse no fabrico de guias de onda nas regiões espetrais próximas do IV e do visível [202–204]. Este estudo permitiu concluir que os filmes-finos de SiN, depositados através de pulverização catódica reativa RF com uma potência de pulverização catódica de 300 W, uma relação azoto–árgon (16:4) e com arrefecimento do substrato em atmosfera rica em azoto, apresentaram uma percentagem atómica de N de $30{,}47$ %, uma percentagem atómica de O de $15{,}76$ % e uma R_a de $1{,}55$ nm. O n máximo alcançado para o SiN nessas condições foi de $1{,}906$ a 400 nm. Enquanto que os filmes-finos de SiN, depositados através de pulverização catódica reativa RF com uma potência de pulverização catódica de 200 W, uma relação azoto–árgon (13:7) e sem arrefecimento do substrato em atmosfera rica em azoto, apresentaram uma percentagem atómica de N de $25{,}79$ %, uma percentagem atómica de O de $34{,}5$ % e uma R_a de $1{,}29$ nm. O n máximo alcançado para o SiN nessas condições foi de $1{,}609$ a 400 nm.

6.2 Trabalho Futuro

Após o trabalho realizado nesta tese de doutoramento, recomendam-se várias etapas futuras. Estas incluem modificações nos materiais dos microelétrodos, a continuidade na otimização das simulações FDTD, a adição de novos componentes óticos à guia de onda e, por último, a preparação de um artigo científico, que já se encontra em desenvolvimento, abrangendo todo o processo de fabrico, caraterização eletroquímica e validação *in vivo* da sonda neuronal flexível.

A primeira sugestão seria o fabrico de microelétrodos em Au dado que este material oferece menor resistividade ($2{,}192\,\mu\Omega\,\text{cm}$ [168]) em comparação com a Pt, o que contribui para a melhoria dos valores de impedância dos novos microelétrodos, assegurando uma transmissão mais eficiente da atividade neuronal, reduzindo as perdas de sinal e o ruído [92, 98, 100, 102, 103], apesar da oxidação do Au ao longo do tempo e do preço mais elevado em relação à Pt. Para melhorar ainda mais o desempenho dos microelétrodos, poder-se-ia revestir os microelétrodos de Au com Ptb através de eletrodeposição [98]. Este revestimento permite aumentar a CSC e reduzir a impedância dos microelétrodos, graças ao aumento da área ativa, resultante da maior rugosidade da sua superfície. Estas melhorias possibilitam a obtenção de registos eletrofisiológicos com uma elevada SNR, aprimorando a qualidade dos registos de atividade extracelular.

No que diz respeito à guia de onda, propõe-se uma melhoria contínua das simulações FDTD, através de uma otimização 3D, com o objetivo de determinar o parâmetro x para a posição ideal da fibra ótica acoplada ao *grating* de transmissão de acoplamento, aumentando assim a eficiência de acoplamento do dispositivo. Sugere-se também a otimização do parâmetro h_e em ambas as *gratings* de transmissão de acoplamento e desacoplamento, permitindo um incremento adicional na eficiência de acoplamento. Adicionalmente, recomenda-se a fabricação de um refletor de *Bragg* distribuído (DBR) de TiO_2/SiO_2 [220, 221], posicionado entre o substrato e o revestimento inferior da guia de onda [222, 223]. A inclusão deste novo componente ótico permitirá melhorar a eficiência de acoplamento na guia de onda, graças às reflexões geradas pelo DBR de TiO_2/SiO_2.

Por último, propõe-se a possibilidade de expandir este processo de fabrico para a criação de um dispositivo integrado que combine microelétrodos e uma guia de onda, permitindo a sua validação *in vivo* em aplicações optogenéticas excitatórias da opsina ChR2 [81, 86].

Bibliografia

[1] Charles Watson, Matthew Kirkcaldie, and George Paxinos. *The Brain*. Elsevier, 1st edition, 2010. ISBN 9780123738899. doi: 10.1016/C2009-0-01579-7. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/C20090015797.

[2] Bruce P. Bean. The action potential in mammalian central neurons. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(6):451–465, jun 2007. ISSN 1471-003X. doi: 10.1038/nrn2148. URL https://www.nature.com/articles/nrn2148.

[3] OpenStax. 35.2 How Neurons Communicate - Biology, 2024. [Online]. Available: https://openstax.org/books/biology/pages/35-2-how-neurons-communicate, last accessed on 2024-05-06.

[4] H.U. Wittchen, F. Jacobi, J. Rehm, A. Gustavsson, M. Svensson, B. Jönsson, J. Olesen, C. Allgulander, J. Alonso, C. Faravelli, L. Fratiglioni, P. Jennum, R. Lieb, A. Maercker, J. van Os, M. Preisig, L. Salvador-Carulla, R. Simon, and H.-C. Steinhausen. The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. *European Neuropsychopharmacology*, 21 (9):655–679, sep 2011. ISSN 0924977X. doi: 10.1016/j.euroneuro.2011.07.018. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924977X11001726.

[5] Monica Di Luca, David Nutt, Wolfgang Oertel, Patrice Boyer, Joke Jaarsma, Frederic Destrebecq, Giovanni Esposito, and Vinciane Quoidbach. Towards earlier diagnosis and treatment of disorders of the brain. *Bulletin of the World Health Organization*, 96(5):298–298A, may 2018. ISSN 0042-9686. doi: 10.2471/BLT.17.206599. URL https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5985426/pdf/BLT.17.206599.pdf/.

[6] Alberto Raggi and Matilde Leonardi. Burden of brain disorders in Europe in 2017 and comparison with other non-communicable disease groups. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*,

91(1):104–105, jan 2020. ISSN 0022-3050. doi: 10.1136/jnnp-2019-320466. URL https://jnnp.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jnnp-2019-320466.

[7] Oliver Riedel. Burden and epidemiology of neuropsychiatric disorders. *Public Health Forum*, 24 (2):121–123, jun 2016. ISSN 1876-4851. doi: 10.1515/pubhef-2016-0025. URL https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/pubhef-2016-0025/html.

[8] WHO. Mental disorders, 2022. [Online]. Available: http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mental-disorders, last accessed on 2024-03-13.

[9] Benjamin Franklin. LIX. An account of the effects of electricity in paralytic cases. In a letter to John Pringle, M. D. F. R. S. from Benjamin Franklin, Esq; F. R. S. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 50:481–483, dec 1757. ISSN 0261-0523. doi: 10.1098/rstl.1757.0060. URL https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstl.1757.0060.

[10] A. L. HODGKIN and A. F. HUXLEY. Action Potentials Recorded from Inside a Nerve Fibre. *Nature*, 144(3651):710–711, oct 1939. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/144710a0. URL https://www.nature.com/articles/144710a0.

[11] A. L. Hodgkin and A. F. Huxley. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of Physiology*, 117(4):500–544, aug 1952. ISSN 0022-3751. doi: 10.1113/jphysiol.1952.sp004764. URL https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1113/jphysiol.1952.sp004764.

[12] Mohamad HajjHassan, Vamsy Chodavarapu, and Sam Musallam. NeuroMEMS: Neural Probe Microtechnologies. *Sensors*, 8(10):6704–6726, oct 2008. ISSN 1424-8220. doi: 10.3390/s8106704. URL http://www.mdpi.com/1424-8220/8/10/6704.

[13] Felix Strumwasser. Long-Term Recording from Single Neurons in Brain of Unrestrained Mammals. *Science*, 127(3296):469–470, feb 1958. ISSN 0036-8075. doi: 10.1126/science.127.3296.469. URL https://www.science.org/doi/10.1126/science.127.3296.469.

[14] Miguel A. L. Nicolelis. *Methods for Neural Ensemble Recordings*. CRC Press, Boca Raton, 2nd edition, dec 2007. ISBN 9780429124051. doi: 10.1201/9781420006414. URL https://www.taylorfrancis.com/books/9781420006414.

[15] Kensall D. Wise, James B. Angell, and Arnold Starr. An Integrated-Circuit Approach to Extracellular Microelectrodes. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, BME-17(3):238–247, jul 1970.

ISSN 0018-9294. doi: 10.1109/TBME.1970.4502738. URL http://ieeexplore.ieee.org/document/4502738/.

[16] K. Najafi, K.D. Wise, and T. Mochizuki. A high-yield IC-compatible multichannel recording array. *IEEE Transactions on Electron Devices*, 32(7):1206–1211, jul 1985. ISSN 0018-9383. doi: 10.1109/T-ED.1985.22102. URL http://ieeexplore.ieee.org/document/1484848/.

[17] K.D. Wise, A.M. Sodagar, Ying Yao, M.N. Gulari, G.E. Perlin, and Khalil Najafi. Microelectrodes, Microelectronics, and Implantable Neural Microsystems. *Proceedings of the IEEE*, 96(7):1184–1202, jul 2008. ISSN 0018-9219. doi: 10.1109/JPROC.2008.922564. URL http://ieeexplore.ieee.org/document/4545308/.

[18] P.K. Campbell, K.E. Jones, R.J. Huber, K.W. Horch, and R.A. Normann. A silicon-based, three-dimensional neural interface: manufacturing processes for an intracortical electrode array. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 38(8):758–768, 1991. ISSN 00189294. doi: 10.1109/10.83588. URL http://ieeexplore.ieee.org/document/83588/.

[19] Arunkumar N. Badi, Thomas R. Kertesz, Richard K. Gurgel, Clough Shelton, and Richard A. Normann. Development of a Novel Eighth-Nerve Intraneural Auditory Neuroprosthesis. *The Laryngoscope*, 113(5):833–842, may 2003. ISSN 0023-852X. doi: 10.1097/00005537-200305000-00012. URL https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1097/00005537-200305000-00012.

[20] Alim Louis Benabid. Deep brain stimulation for Parkinson's disease. *Current Opinion in Neurobiology*, 13(6):696–706, dec 2003. ISSN 09594388. doi: 10.1016/j.conb.2003.11.001. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959438803001739.

[21] Edward S Boyden, Feng Zhang, Ernst Bamberg, Georg Nagel, and Karl Deisseroth. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nature Neuroscience*, 8(9):1263–1268, sep 2005. ISSN 1097-6256. doi: 10.1038/nn1525. URL https://www.nature.com/articles/nn1525.

[22] Karl Deisseroth, Guoping Feng, Ania K. Majewska, Gero Miesenböck, Alice Ting, and Mark J. Schnitzer. Next-Generation Optical Technologies for Illuminating Genetically Targeted Brain Circuits. *The Journal of Neuroscience*, 26(41):10380–10386, oct 2006. ISSN 0270-6474. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3863-06.2006. URL https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.3863-06.2006.

[23] Karl Deisseroth. Optogenetics. *Nature Methods*, 8(1):26–29, jan 2011. ISSN 1548-7091. doi: 10.1038/nmeth.f.324. URL https://www.nature.com/articles/nmeth.f.324.

[24] Fan Wu, Eran Stark, Pei-Cheng Ku, Kensall D. Wise, György Buzsáki, and Euisik Yoon. Monolithically Integrated μLEDs on Silicon Neural Probes for High-Resolution Optogenetic Studies in Behaving Animals. *Neuron*, 88(6):1136–1148, dec 2015. ISSN 08966273. doi: 10.1016/j.neuron.2015.10.032. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627315009265.

[25] Ofer Yizhar, Lief E. Fenno, Thomas J. Davidson, Murtaza Mogri, and Karl Deisseroth. Optogenetics in Neural Systems. *Neuron*, 71(1):9–34, jul 2011. ISSN 08966273. doi: 10.1016/j.neuron.2011.06.004. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627311005046.

[26] Xue Han and Edward S. Boyden. Multiple-Color Optical Activation, Silencing, and Desynchronization of Neural Activity, with Single-Spike Temporal Resolution. *PLoS ONE*, 2(3):e299, mar 2007. ISSN 1932-6203. doi: 10.1371/journal.pone.0000299. URL https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0000299.

[27] Zhonghan Zhou, Xuesheng Wang, Xunhua Li, and Limin Liao. A bibliometric profile of optogenetics: quantitative and qualitative analyses. *Frontiers in Neuroscience*, 17, jun 2023. ISSN 1662-453X. doi: 10.3389/fnins.2023.1221316. URL https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2023.1221316/full.

[28] Lizzie Buchen. Neuroscience: Illuminating the brain. *Nature*, 465(7294):26–28, may 2010. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/465026a. URL https://www.nature.com/articles/465026a.

[29] S B Goncalves, J. F. Ribeiro, A. F. Silva, R. M. Costa, and J. H. Correia. Design and manufacturing challenges of optogenetic neural interfaces: a review. *Journal of Neural Engineering*, 14(4):041001, aug 2017. ISSN 1741-2560. doi: 10.1088/1741-2552/aa7004. URL https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1741-2552/aa7004.

[30] Sara Pimenta, José P Pereira, Nuno M Gomes, João F Ribeiro, Manuel F Silva, Sandra B Goncalves, Graca Minas, and José H Correia. High-selectivity neural probe based on a Fabry–Perot optical filter and a CMOS silicon photodiodes array at visible wavelengths. *Journal of Biomedical Optics*,

23(10):1, oct 2018. ISSN 1083-3668. doi: 10.1117/1.JBO.23.10.105004. URL https://www.spiedigitallibrary.org/journals/journal-of-biomedical-optics/volume-23/issue-10/105004/High-selectivity-neural-probe-based-on-a-FabryPerot-optical-filter/10.1117/1.JBO.23.10.105004.full.

[31] Namsun Chou, Hyogeun Shin, Kanghwan Kim, Uikyu Chae, Minsu Jang, Ui-Jin Jeong, Kyeong-Seob Hwang, Bumjun Yi, Seung Eun Lee, Jiwan Woo, Yakdol Cho, Changhyuk Lee, Bradley J. Baker, Soo-Jin Oh, Min-Ho Nam, Nakwon Choi, and Il-Joo Cho. A Multimodal Multi-Shank Fluorescence Neural Probe for Cell-Type-Specific Electrophysiology in Multiple Regions across a Neural Circuit. *Advanced Science*, 9(2):1–17, jan 2022. ISSN 2198-3844. doi: 10.1002/advs.202103564. URL https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/advs.202103564.

[32] Sofian N. Obaid, Nathaniel Quirion, Jade Dominique Torres Balansag, Nicolas Daza, Xinyu Shi, Zhiyuan Chen, and Luyao Lu. Design and Fabrication of a Flexible Opto-Electric Biointerface for Multimodal Optical Fluorescence and Electrical Recording. *ACS Applied Electronic Materials*, 5(3): 1688–1696, mar 2023. ISSN 2637-6113. doi: 10.1021/acsaelm.2c01732. URL https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsaelm.2c01732.

[33] M. Schwaerzle, K. Seidl, U. T. Schwarz, O. Paul, and P. Ruther. Ultracompact optrode with integrated laser diode chips and SU-8 waveguides for optogenetic applications. In *2013 IEEE 26th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS)*, pages 1029–1032. IEEE, jan 2013. ISBN 978-1-4673-5654-1. doi: 10.1109/MEMSYS.2013.6474424. URL https://ieeexplore.ieee.org/document/6474424/.

[34] S. Goncalves, José Palha, Helena Fernandes, Márcio Souto, Sara Pimenta, Tao Dong, Zhaochu Yang, João Ribeiro, and José Correia. LED Optrode with Integrated Temperature Sensing for Optogenetics. *Micromachines*, 9(9):473, sep 2018. ISSN 2072-666X. doi: 10.3390/mi9090473. URL http://www.mdpi.com/2072-666X/9/9/473.

[35] Nir Grossman, Vincent Poher, Matthew S. Grubb, Gordon T. Kennedy, Konstantin Nikolic, Brian McGovern, Rolando Berlinguer Palmini, Zheng Gong, Emmanuel M. Drakakis, Mark A A Neil, Martin D. Dawson, Juan Burrone, and Patrick Degenaar. Multi-site optical excitation using ChR2 and micro-LED array. *Journal of Neural Engineering*, 7(1):016004, feb 2010. ISSN 1741-2560. doi: 10.1088/1741-2560/7/1/016004. URL https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1741-2560/7/1/016004.

[36] Keita Tamura, Yohei Ohashi, Tadashi Tsubota, Daigo Takeuchi, Toshiyuki Hirabayashi, Masae Yaguchi, Makoto Matsuyama, Takeru Sekine, and Yasushi Miyashita. A glass-coated tungsten microelectrode enclosing optical fibers for optogenetic exploration in primate deep brain structures. *Journal of Neuroscience Methods*, 211(1):49–57, oct 2012. ISSN 01650270. doi: 10.1016/j.jneumeth.2012.08.004. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165027012002932.

[37] Il-Joo Cho, Hyoung Won Baac, and Euisik Yoon. A 16-site neural probe integrated with a waveguide for optical stimulation. In *2010 IEEE 23rd International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS)*, pages 995–998. IEEE, jan 2010. ISBN 978-1-4244-5761-8. doi: 10.1109/MEMSYS.2010.5442376. URL http://ieeexplore.ieee.org/document/5442376/.

[38] Jiahui Luo, Ning Xue, and Jiamin Chen. A Review: Research Progress of Neural Probes for Brain Research and Brain–Computer Interface. *Biosensors*, 12(12):1167, dec 2022. ISSN 2079-6374. doi: 10.3390/bios12121167. URL https://www.mdpi.com/2079-6374/12/12/1167.

[39] Huiqing Zhao, Ruping Liu, Huiling Zhang, Peng Cao, Zilong Liu, and Ye Li. Research Progress on the Flexibility of an Implantable Neural Microelectrode. *Micromachines*, 13(3):386, feb 2022. ISSN 2072-666X. doi: 10.3390/mi13030386. URL https://www.mdpi.com/2072-666X/13/3/386.

[40] Ximiao Wen, Bo Wang, Shan Huang, Tingyi “Leo” Liu, Meng-Shiue Lee, Pei-Shan Chung, Yu Ting Chow, I-Wen Huang, Harold G Monbouquette, Nigel T Maidment, and Pei-Yu Chiou. Flexible, multifunctional neural probe with liquid metal enabled, ultra-large tunable stiffness for deep-brain chemical sensing and agent delivery. *Biosensors and Bioelectronics*, 131:37–45, apr 2019. ISSN 09565663. doi: 10.1016/j.bios.2019.01.060. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566319300910.

[41] Clement Cointe, Adrian Laborde, Lionel G Nowak, Dina N Arvanitis, David Bourrier, Christian Bergaud, and Ali Maziz. Scalable batch fabrication of ultrathin flexible neural probes using a bioresorbable silk layer. *Microsystems & Nanoengineering*, 8(1):21, feb 2022. ISSN 2055-7434. doi: 10.1038/s41378-022-00353-7. URL https://www.nature.com/articles/s41378-022-00353-7.

[42] Darin D Dougherty. Deep Brain Stimulation. *Psychiatric Clinics of North America*, 41(3):385–394,

sep 2018. ISSN 0193953X. doi: 10.1016/j.psc.2018.04.004. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0193953X18311006.

[43] Frédéric Chapelle, Lucie Manciet, Bruno Pereira, Anna Sontheimer, Jérôme Coste, Youssef El Ouadih, Ruxandra Cimpeanu, Dimitri Gouot, Yuri Lapusta, Béatrice Claise, Valérie Sautou, Yassine Bouattour, Ana Marques, Adrien Wohrer, and Jean-Jacques Lemaire. Early Deformation of Deep Brain Stimulation Electrodes Following Surgical Implantation: Intracranial, Brain, and Electrode Mechanics. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, jun 2021. ISSN 2296-4185. doi: 10.3389/fbioe.2021.657875. URL https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2021.657875/full.

[44] Linze Li, Changqing Jiang, and Luming Li. Hierarchical platinum–iridium neural electrodes structured by femtosecond laser for superwicking interface and superior charge storage capacity. *Bio-Design and Manufacturing*, 5(1):163–173, jan 2022. ISSN 2096-5524. doi: 10.1007/s42242-021-00160-5. URL https://link.springer.com/10.1007/s42242-021-00160-5.

[45] Moslem Mohammadi, Ali Zolfagharian, Mahdi Bodaghi, Yong Xiang, and Abbas Z Kouzani. 4D printing of soft orthoses for tremor suppression. *Bio-Design and Manufacturing*, 5(4):786–807, oct 2022. ISSN 2096-5524. doi: 10.1007/s42242-022-00199-y. URL https://link.springer.com/10.1007/s42242-022-00199-y.

[46] Aziliz Lecomte, Emeline Descamps, and Christian Bergaud. A review on mechanical considerations for chronically-implanted neural probes. *Journal of Neural Engineering*, 15(3):031001, jun 2018. ISSN 1741-2560. doi: 10.1088/1741-2552/aa8b4f. URL https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1741-2552/aa8b4f.

[47] Ahuva Weltman, James Yoo, and Ellis Meng. Flexible, Penetrating Brain Probes Enabled by Advances in Polymer Microfabrication. *Micromachines*, 7(10):180, oct 2016. ISSN 2072-666X. doi: 10.3390/mi7100180. URL http://www.mdpi.com/2072-666X/7/10/180.

[48] Heui Chang Lee, Fredrik Ejserholm, Janak Gaire, Seth Currlin, Jens Schouenborg, Lars Wallman, Martin Bengtsson, Kinam Park, and Kevin J Otto. Histological evaluation of flexible neural implants; flexibility limit for reducing the tissue response? *Journal of Neural Engineering*, 14(3):036026, jun 2017. ISSN 1741-2560. doi: 10.1088/1741-2552/aa68f0. URL https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1741-2552/aa68f0.

[49] Ferruccio Pisanello. Implantable micro and nanophotonic devices: toward a new generation of neural interfaces. *Microelectronic Engineering*, 215:110979, jul 2019. ISSN 01679317. doi: 10.1016/j.mee.2019.110979. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167931719301327.

[50] Markus Westerhausen, Tanja Martin, Michael Metzger, Felix Blendinger, Monika Fleischer, Boris Hofmann, and Volker Bucher. Passivated electrode side walls by atomic layer deposition on flexible polyimide based samples. *Microelectronic Engineering*, 227:111315, apr 2020. ISSN 01679317. doi: 10.1016/j.mee.2020.111315. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167931720301039.

[51] Zabir Ahmed, Jay W Reddy, Mohammad H Malekoshoaraie, Vahid Hassanzade, Ibrahim Kimukin, Vishal Jain, and Maysamreza Chamanzar. Flexible optoelectric neural interfaces. *Current Opinion in Biotechnology*, 72:121–130, dec 2021. ISSN 09581669. doi: 10.1016/j.copbio.2021.11.001. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166921002159.

[52] Brianna Thielen and Ellis Meng. A comparison of insertion methods for surgical placement of penetrating neural interfaces. *Journal of Neural Engineering*, 18(4):041003, aug 2021. ISSN 1741-2560. doi: 10.1088/1741-2552/abf6f2. URL https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1741-2552/abf6f2.

[53] Jonathan Rivnay, Huiliang Wang, Lief Fenno, Karl Deisseroth, and George G Malliaras. Next-generation probes, particles, and proteins for neural interfacing. *Science Advances*, 3(6), jun 2017. ISSN 2375-2548. doi: 10.1126/sciadv.1601649. URL https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.1601649.

[54] Hongyu Chen and Ying Fang. Recent developments in implantable neural probe technologies. *MRS Bulletin*, 48(5):484–494, may 2023. ISSN 0883-7694. doi: 10.1557/s43577-023-00535-2. URL https://link.springer.com/10.1557/s43577-023-00535-2.

[55] Nicholas A. Steinmetz, Cagatay Aydin, Anna Lebedeva, Michael Okun, Marius Pachitariu, Marius Bauza, Maxime Beau, Jai Bhagat, Claudia Böhm, Martijn Broux, Susu Chen, Jennifer Colonell, Richard J. Gardner, Bill Karsh, Fabian Kloosterman, Dimitar Kostadinov, Carolina Mora-Lopez, John O'Callaghan, Junchol Park, Jan Putzeys, Britton Sauerbrei, Rik J. J. van Daal, Abraham Z. Vollan, Shiwei Wang, Marleen Welkenhuysen, Zhiwen Ye, Joshua T. Dudman, Barundeb Dutta, Adam W. Hantman, Kenneth D. Harris, Albert K. Lee, Edvard I. Moser, John O'Keefe, Alfonso

Renart, Karel Svoboda, Michael Häusser, Sebastian Haesler, Matteo Carandini, and Timothy D. Harris. Neuropixels 2.0: A miniaturized high-density probe for stable, long-term brain recordings. *Science*, 372(6539), apr 2021. ISSN 0036-8075. doi: 10.1126/science.abf4588. URL https://www.science.org/doi/10.1126/science.abf4588.

[56] Kanghwan Kim, Mihály Vöröslakos, John P. Seymour, Kensall D. Wise, György Buzsáki, and Euisik Yoon. Artifact-free and high-temporal-resolution in vivo opto-electrophysiology with microLED optoelectrodes. *Nature Communications*, 11(1):2063, apr 2020. ISSN 2041-1723. doi: 10.1038/s41467-020-15769-w. URL https://www.nature.com/articles/s41467-020-15769-w.

[57] Hyogeun Shin, Yoojin Son, Uikyu Chae, Jeongyeon Kim, Nakwon Choi, Hyunjoo J. Lee, Jiwan Woo, Yakdol Cho, Soo Hyun Yang, C. Justin Lee, and Il-Joo Cho. Multifunctional multi-shank neural probe for investigating and modulating long-range neural circuits in vivo. *Nature Communications*, 10(1):3777, aug 2019. ISSN 2041-1723. doi: 10.1038/s41467-019-11628-5. URL https://www.nature.com/articles/s41467-019-11628-5.

[58] Geon Hwee Kim, Kanghyun Kim, Eunji Lee, Taechang An, WooSeok Choi, Geunbae Lim, and Jung Hwal Shin. Recent Progress on Microelectrodes in Neural Interfaces. *Materials*, 11(10): 1995, oct 2018. ISSN 1996-1944. doi: 10.3390/ma11101995. URL https://www.mdpi.com/1996-1944/11/10/1995.

[59] Kenneth D Harris, Rodrigo Quian Quiroga, Jeremy Freeman, and Spencer L Smith. Improving data quality in neuronal population recordings. *Nature Neuroscience*, 19(9):1165–1174, sep 2016. ISSN 1097-6256. doi: 10.1038/nn.4365. URL https://www.nature.com/articles/nn.4365.

[60] Abdulmalik Obaid, Mina-Elraheb Hanna, Yu-Wei Wu, Mihaly Kollo, Romeo Racz, Matthew R. Angle, Jan Müller, Nora Brackbill, William Wray, Felix Franke, E. J. Chichilnisky, Andreas Hierlemann, Jun B. Ding, Andreas T. Schaefer, and Nicholas A. Melosh. Massively parallel microwire arrays integrated with CMOS chips for neural recording. *Science Advances*, 6(12), mar 2020. ISSN 2375-2548. doi: 10.1126/sciadv.aay2789. URL https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.aay2789.

[61] Bogdan C. Raducanu, Refet F. Yazicioglu, Carolina M. Lopez, Marco Ballini, Jan Putzeys, Shiwei Wang, Alexandru Andrei, Marleen Welkenhuysen, Nick van Helleputte, Silke Musa, Robert Puers, Fabian Kloosterman, Chris van Hoof, and Srinjoy Mitra. Time multiplexed active neural probe

with 678 parallel recording sites. In *2016 46th European Solid-State Device Research Conference (ESSDERC)*, pages 385–388. IEEE, sep 2016. ISBN 978-1-5090-2969-3. doi: 10.1109/ESSDERC.2016.7599667. URL http://ieeexplore.ieee.org/document/7599667/.

[62] Bogdan C. Raducanu, Refet F. Yazicioglu, Carolina M. Lopez, Marco Ballini, Jan Putzeys, Shiwei Wang, Alexandru Andrei, Veronique Rochus, Marleen Welkenhuysen, Nick van Helleputte, Silke Musa, Robert Puers, Fabian Kloosterman, Chris van Hoof, Richárd Fiáth, István Ulbert, and Srinjoy Mitra. Time Multiplexed Active Neural Probe with 1356 Parallel Recording Sites. *Sensors*, 17(10): 2388, oct 2017. ISSN 1424-8220. doi: 10.3390/s17102388. URL https://www.mdpi.com/1424-8220/17/10/2388.

[63] Richárd Fiáth, Bogdan Cristian Raducanu, Silke Musa, Alexandru Andrei, Carolina Mora Lopez, Chris van Hoof, Patrick Ruther, Arno Aarts, Domonkos Horváth, and István Ulbert. A silicon-based neural probe with densely-packed low-impedance titanium nitride microelectrodes for ultrahigh-resolution in vivo recordings. *Biosensors and Bioelectronics*, 106:86–92, may 2018. ISSN 09565663. doi: 10.1016/j.bios.2018.01.060. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566318300708.

[64] Richárd Fiáth, Domokos Meszéna, Zoltán Somogyvári, Mihály Boda, Péter Barthó, Patrick Ruther, and István Ulbert. Recording site placement on planar silicon-based probes affects signal quality in acute neuronal recordings. *Scientific Reports*, 11(1):2028, jan 2021. ISSN 2045-2322. doi: 10.1038/s41598-021-81127-5. URL https://www.nature.com/articles/s41598-021-81127-5.

[65] Csaba Horváth, Lili Fanni Tóth, István Ulbert, and Richárd Fiáth. Dataset of cortical activity recorded with high spatial resolution from anesthetized rats. *Scientific Data*, 8(1):180, jul 2021. ISSN 2052-4463. doi: 10.1038/s41597-021-00970-3. URL https://www.nature.com/articles/s41597-021-00970-3.

[66] James J. Jun, Nicholas A. Steinmetz, Joshua H. Siegle, Daniel J. Denman, Marius Bauza, Brian Barbarits, Albert K. Lee, Costas A. Anastassiou, Alexandru Andrei, Çağatay Aydın, Mladen Barbic, Timothy J. Blanche, Vincent Bonin, João Couto, Barundeb Dutta, Sergey L. Gratiy, Diego A. Gutnisky, Michael Häusser, Bill Karsh, Peter Ledochowitsch, Carolina Mora Lopez, Catalin Mitelut, Silke Musa, Michael Okun, Marius Pachitariu, Jan Putzeys, P. Dylan Rich, Cyrille Rossant, Wei-lung Sun, Karel Svoboda, Matteo Carandini, Kenneth D. Harris, Christof Koch, John O'Keefe, and

Timothy D. Harris. Fully integrated silicon probes for high-density recording of neural activity. *Nature*, 551(7679):232–236, nov 2017. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/nature24636. URL https://www.nature.com/articles/nature24636.

[67] Angelique C. Paulk, Yoav Kfir, Arjun R. Khanna, Martina L. Mustroph, Eric M. Trautmann, Dan J. Soper, Sergey D. Stavisky, Marleen Welkenhuysen, Barundeb Dutta, Krishna V. Shenoy, Leigh R. Hochberg, R. Mark Richardson, Ziv M. Williams, and Sydney S. Cash. Large-scale neural recordings with single neuron resolution using Neuropixels probes in human cortex. *Nature Neuroscience*, 25(2):252–263, feb 2022. ISSN 1097-6256. doi: 10.1038/s41593-021-00997-0. URL https://www.nature.com/articles/s41593-021-00997-0.

[68] Jason E. Chung, Kristin K. Sellers, Matthew K. Leonard, Laura Gwilliams, Duo Xu, Maximilian E. Dougherty, Viktor Kharazia, Sean L. Metzger, Marleen Welkenhuysen, Barundeb Dutta, and Edward F. Chang. High-density single-unit human cortical recordings using the Neuropixels probe. *Neuron*, 110(15):2409–2421.e3, aug 2022. ISSN 08966273. doi: 10.1016/j.neuron.2022.05.007. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627322004482.

[69] Matthew K. Leonard, Laura Gwilliams, Kristin K. Sellers, Jason E. Chung, Duo Xu, Gavin Mischler, Nima Mesgarani, Marleen Welkenhuysen, Barundeb Dutta, and Edward F. Chang. Large-scale single-neuron speech sound encoding across the depth of human cortex. *Nature*, dec 2023. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/s41586-023-06839-2. URL https://www.nature.com/articles/s41586-023-06839-2.

[70] Gian Nicola Angotzi, Fabio Boi, Aziliz Lecomte, Ermanno Miele, Mario Malerba, Stefano Zucca, Antonino Casile, and Luca Berdondini. SiNAPS: An implantable active pixel sensor CMOS-probe for simultaneous large-scale neural recordings. *Biosensors and Bioelectronics*, 126:355–364, feb 2019. ISSN 09565663. doi: 10.1016/j.bios.2018.10.032. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566318308273.

[71] J. F. Ribeiro, F. Boi, A. Lecomte, G. N. Angotzi, and L. Berdondini. Bioelectrodes for high-channel count and small form factor CMOS neural probes. In *2021 10th International IEEE/EMBS Conference on Neural Engineering (NER)*, pages 388–391. IEEE, may 2021. ISBN 978-1-7281-4337-8. doi: 10.1109/NER49283.2021.9441160. URL https://ieeexplore.ieee.org/document/9441160/.

[72] Fabio Boi, Andrea Locarno, Joao F. Ribeiro, Raffaella Tonini, Gian Nicola Angotzi, and Luca Berdondini. Coupling SiNAPS High-density Neural Recording CMOS-Probes with Optogenetic Light Stimulation. In *2021 IEEE Biomedical Circuits and Systems Conference (BioCAS)*, pages 1–4. IEEE, oct 2021. ISBN 978-1-7281-7204-0. doi: 10.1109/BioCAS49922.2021.9645041. URL https://ieeexplore.ieee.org/document/9645041/.

[73] J.F. Ribeiro, G. Angotzi, A. Perna, M. Vincenzi, G. Orban, F. Boi, and L. Berdondini. Channels, Layout and Size Scalability of Implantable CMOS-Based Multielectrode Array Probes. In *2022 International Electron Devices Meeting (IEDM)*, pages 29.6.1–29.6.4. IEEE, dec 2022. ISBN 978-1-6654-8959-1. doi: 10.1109/IEDM45625.2022.10019384. URL https://ieeexplore.ieee.org/document/10019384/.

[74] Alberto Perna, João F. Ribeiro, Gabor Orban, Matteo Vincenzi, Fabio Boi, Gian N. Angotzi, and Luca Berdondini. Impact of Tip Size and Shape on the Insertion Force of Implantable CMOS Neural Probes. In *2023 11th International IEEE/EMBS Conference on Neural Engineering (NER)*, pages 1–4. IEEE, apr 2023. ISBN 978-1-6654-6292-1. doi: 10.1109/NER52421.2023.10123886. URL https://ieeexplore.ieee.org/document/10123886/.

[75] Vittorino Lanzio, Melanie West, Alexander Koshelev, Gregory Telian, Paolo Micheletti, Raquel Lambert, Scott Dhuey, Hillel Adesnik, and Simone Sassolini. High-density electrical and optical probes for neural readout and light focusing in deep brain tissue. *Journal of Micro/Nanolithography, MEMS, and MOEMS*, 17(02):1, jun 2018. ISSN 1932-5150. doi: 10.1117/1.JMM.17.2.025503. URL https://www.spiedigitallibrary.org/journals/journal-of-micro-nanolithography-mems-and-moems/volume-17/issue-02/025503/High-density-electrical-and-optical-probes-for-neural-readout-and/10.1117/1.JMM.17.2.025503.full.

[76] Zeinab Ramezani, Kyung Jin Seo, and Hui Fang. Hybrid electrical and optical neural interfaces. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 31(4):044002, apr 2021. ISSN 0960-1317. doi: 10.1088/1361-6439/abeb30. URL https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1361-6439/abeb30.

[77] Jae Hee Lee, Sinjeong Lee, Daesoo Kim, and Keon Jae Lee. Implantable Micro-Light-Emitting Diode (μLED)-based optogenetic interfaces toward human applications. *Advanced Drug Delivery*

Reviews, 187:114399, aug 2022. ISSN 0169409X. doi: 10.1016/j.addr.2022.114399. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X22002897.

[78] Eran Stark, Tibor Koos, and György Buzsáki. Diode probes for spatiotemporal optical control of multiple neurons in freely moving animals. *Journal of Neurophysiology*, 108(1):349–363, jul 2012. ISSN 0022-3077. doi: 10.1152/jn.00153.2012. URL https://www.physiology.org/doi/10.1152/jn.00153.2012.

[79] Joana P. Neto, Pedro Baião, Gonçalo Lopes, João Frazão, Joana Nogueira, Elvira Fortunato, Pedro Barquinha, and Adam R. Kampff. Does Impedance Matter When Recording Spikes With Polytrodes? *Frontiers in Neuroscience*, 12, oct 2018. ISSN 1662-453X. doi: 10.3389/fnins.2018.00715. URL https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2018.00715/full.

[80] V Lanzio, M Lorenzon, S Dhuey, C F Pirri, A Lamberti, and S Cabrini. Scalable nanophotonic neural probes for multicolor and on-demand light delivery in brain tissue. *Nanotechnology*, 32 (26):265201, jun 2021. ISSN 0957-4484. doi: 10.1088/1361-6528/abef2a. URL https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1361-6528/abef2a.

[81] Adriaan J. Taal, Ilke Uguz, Sabina Hillebrandt, Chang-Ki Moon, Victoria Andino-Pavlovsky, Jaebin Choi, Changmin Keum, Karl Deisseroth, Malte C. Gather, and Kenneth L. Shepard. Optogenetic stimulation probes with single-neuron resolution based on organic LEDs monolithically integrated on CMOS. *Nature Electronics*, 6(9):669–679, aug 2023. ISSN 2520-1131. doi: 10.1038/s41928-023-01013-y. URL https://www.nature.com/articles/s41928-023-01013-y.

[82] Cui-Tao Lu, Ying-Zheng Zhao, Ho Lun Wong, Jun Cai, Lei Peng, and Xin-Qiao Tian. Current approaches to enhance CNS delivery of drugs across the brain barriers. *International Journal of Nanomedicine*, page 2241, may 2014. ISSN 1178-2013. doi: 10.2147/IJN.S61288. URL http://www.dovepress.com/current-approaches-to-enhance-cns-delivery-of-drugs-across-the-brain-b-peer-reviewed-article-IJN.

[83] Xiaowei Dong. Current Strategies for Brain Drug Delivery. *Theranostics*, 8(6):1481–1493, 2018. ISSN 1838-7640. doi: 10.7150/thno.21254. URL http://www.thno.org/v08p1481.htm.

[84] Liang Ma, Yuting Li, Yutong Wu, Mengfei Yu, Abdellah Aazmi, Lei Gao, Qian Xue, Yichen Luo, Hongzhao Zhou, Bin Zhang, and Huayong Yang. 3D bioprinted hyaluronic acid-based cell-laden scaffold for brain microenvironment simulation. *Bio-Design and Manufacturing*, 3(3):164–174,

sep 2020. ISSN 2096-5524. doi: 10.1007/s42242-020-00076-6. URL https://link.springer.com/10.1007/s42242-020-00076-6.

[85] Jai Thakor, Samad Ahadian, Ali Niakan, Ethan Banton, Fatemeh Nasrollahi, Mohammad M Hasani-Sadrabadi, and Ali Khademhosseini. Engineered hydrogels for brain tumor culture and therapy. *Bio-Design and Manufacturing*, 3(3):203–226, sep 2020. ISSN 2096-5524. doi: 10.1007/s42242-020-00084-6. URL https://link.springer.com/10.1007/s42242-020-00084-6.

[86] Kirti Sharma, Zoë Jäckel, Artur Schneider, Oliver Paul, Ilka Diester, and Patrick Ruther. Multifunctional optrode for opsin delivery, optical stimulation, and electrophysiological recordings in freely moving rats. *Journal of Neural Engineering*, 18(6):066013, dec 2021. ISSN 1741-2560. doi: 10.1088/1741-2552/ac3206. URL https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1741-2552/ac3206.

[87] Xin Mu, Fu-Der Chen, Ka My Dang, Michael G. K. Brunk, Jianfeng Li, Hannes Wahn, Andrei Stalmashonak, Peisheng Ding, Xianshu Luo, Hongyao Chua, Guo-Qiang Lo, Joyce K. S. Poon, and Wesley D. Sacher. Implantable photonic neural probes with 3D-printed microfluidics and applications to uncaging. *Frontiers in Neuroscience*, 17, jul 2023. ISSN 1662-453X. doi: 10.3389/fnins.2023.1213265. URL https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2023.1213265/full.

[88] Eve McGlynn, Vahid Nabaei, Elisa Ren, Gabriel Galeote-Checa, Rupam Das, Giulia Curia, and Hadi Heidari. The Future of Neuroscience: Flexible and Wireless Implantable Neural Electronics. *Advanced Science*, 8(10):2002693, may 2021. ISSN 2198-3844. doi: 10.1002/advs.202002693. URL https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/advs.202002693.

[89] Xuechun Wang, Ahuva Weltman Hirschberg, Huijing Xu, Zachary Slingsby-Smith, Aziliz Lecomte, Kee Scholten, Dong Song, and Ellis Meng. A Parylene Neural Probe Array for Multi-Region Deep Brain Recordings. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 29(4):499–513, aug 2020. ISSN 1057-7157. doi: 10.1109/JMEMS.2020.3000235. URL https://ieeexplore.ieee.org/document/9122439/.

[90] Mi Kyung Kim, Jia Chee Leong, Yehhyun Jo, Geon Kook, and Hyunjoo J. Lee. Multimodal Neural Probes with Small Form Factor Based on Dual-Side Fabrication. *Advanced Materials Technologies*, 8(2), jan 2023. ISSN 2365-709X. doi: 10.1002/admt.202200692. URL https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/admt.202200692.

[91] Jay W Reddy, Ibrahim Kimukin, Luke T Stewart, Zabir Ahmed, Alison L Barth, Elias Towe, and Maysamreza Chamanzar. High Density, Double-Sided, Flexible Optoelectronic Neural Probes With Embedded μLEDs. *Frontiers in Neuroscience*, 13, aug 2019. ISSN 1662-453X. doi: 10.3389/fnins.2019.00745. URL https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2019.00745/full.

[92] Sara Pimenta, José A. Rodrigues, Francisca Machado, João F. Ribeiro, Marino J. Maciel, Oleksandr Bondarchuk, Patricia Monteiro, João Gaspar, José H. Correia, and Luis Jacinto. Double-Layer Flexible Neural Probe With Closely Spaced Electrodes for High-Density in vivo Brain Recordings. *Frontiers in Neuroscience*, 15, jun 2021. ISSN 1662-453X. doi: 10.3389/fnins.2021.663174. URL https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2021.663174/full.

[93] F Pothof, L Bonini, M Lanzilotto, A Livi, L Fogassi, G A Orban, O Paul, and P Ruther. Chronic neural probe for simultaneous recording of single-unit, multi-unit, and local field potential activity from multiple brain sites. *Journal of Neural Engineering*, 13(4):046006, aug 2016. ISSN 1741-2560. doi: 10.1088/1741-2560/13/4/046006. URL https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1741-2560/13/4/046006.

[94] Maria Vomero, Francesca Ciarpella, Elena Zucchini, Matthias Kirsch, Luciano Fadiga, Thomas Stieglitz, and Maria Asplund. On the longevity of flexible neural interfaces: Establishing biostability of polyimide-based intracortical implants. *Biomaterials*, 281:121372, feb 2022. ISSN 01429612. doi: 10.1016/j.biomaterials.2022.121372. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961222000114.

[95] P.J. Rousche, D.S. Pellinen, D.P. Pivin, J.C. Williams, R.J. Vetter, and D.R. Kipke. Flexible polyimide-based intracortical electrode arrays with bioactive capability. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 48(3):361–371, mar 2001. ISSN 0018-9294. doi: 10.1109/10.914800. URL https://ieeexplore.ieee.org/document/914800/.

[96] Shoji Takeuchi, Takafumi Suzuki, Kunihiko Mabuchi, and Hiroyuki Fujita. 3D flexible multichannel neural probe array. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 14(1):104–107, jan 2004. ISSN 0960-1317. doi: 10.1088/0960-1317/14/1/014. URL https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0960-1317/14/1/014.

[97] Zhuolin Xiang, Shih-Cheng Yen, Ning Xue, Tao Sun, Wei Mong Tsang, Songsong Zhang, Lun-De

Liao, Nitish V Thakor, and Chengkuo Lee. Ultra-thin flexible polyimide neural probe embedded in a dissolvable maltose-coated microneedle. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 24(6):065015, jun 2014. ISSN 0960-1317. doi: 10.1088/0960-1317/24/6/065015. URL https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0960-1317/24/6/065015.

[98] Zhejun Guo, Fang Wang, Longchun Wang, Kejun Tu, Chunpeng Jiang, Ye Xi, Wen Hong, Qingda Xu, Xiaolin Wang, Bin Yang, Bomin Sun, Zude Lin, and Jingquan Liu. A flexible neural implant with ultrathin substrate for low-invasive brain–computer interface applications. *Microsystems & Nanoengineering*, 8(1):133, dec 2022. ISSN 2055-7434. doi: 10.1038/s41378-022-00464-1. URL https://www.nature.com/articles/s41378-022-00464-1.

[99] V Castagnola, E Descamps, A Lecestre, L Dahan, J Remaud, L.G. Nowak, and C Bergaud. Parylene-based flexible neural probes with PEDOT coated surface for brain stimulation and recording. *Biosensors and Bioelectronics*, 67:450–457, may 2015. ISSN 09565663. doi: 10.1016/j.bios.2014.09.004. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566314006836.

[100] Zhiguo Zhao, Eric Kim, Hao Luo, Jinsheng Zhang, and Yong Xu. Flexible deep brain neural probes based on a parylene tube structure. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 28(1): 015012, jan 2018. ISSN 0960-1317. doi: 10.1088/1361-6439/aa9d61. URL https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1361-6439/aa9d61.

[101] Ane Altuna, Liset Menendez de la Prida, Elisa Bellistri, Gemma Gabriel, Anton Guimerá, Javier Berganzo, Rosa Villa, and Luis J Fernández. SU-8 based microprobes with integrated planar electrodes for enhanced neural depth recording. *Biosensors and Bioelectronics*, 37(1):1–5, aug 2012. ISSN 09565663. doi: 10.1016/j.bios.2012.03.039. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566312002096.

[102] Mahsa Lotfi Marchoubeh, Samuel J. Cobb, Miguel Abrego Tello, Mengjia Hu, Andrea Jaquins-Gerstl, Elaine M. Robbins, Julie V. Macpherson, Adrian C. Michael, and Ingrid Fritsch. Miniaturized probe on polymer SU-8 with array of individually addressable microelectrodes for electrochemical analysis in neural and other biological tissues. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413(27): 6777–6791, nov 2021. ISSN 1618-2642. doi: 10.1007/s00216-021-03327-2. URL https://link.springer.com/10.1007/s00216-021-03327-2.

[103] Gary Kwok Ki Chik, Na Xiao, Xudong Ji, Anderson Chun On Tsang, Gilberto Ka Kit Leung, Shiming

Zhang, Chung Tin, and Paddy Kwok Leung Chan. Flexible Multichannel Neural Probe Developed by Electropolymerization for Localized Stimulation and Sensing. *Advanced Materials Technologies*, 7(8), aug 2022. ISSN 2365-709X. doi: 10.1002/admt.202200143. URL https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/admt.202200143.

[104] Jonathan T.W. Kuo, Brian J Kim, Seth A Hara, Curtis D Lee, Christian A Gutierrez, Tuan Q Hoang, and Ellis Meng. Novel flexible Parylene neural probe with 3D sheath structure for enhancing tissue integration. *Lab Chip*, 13(4):554–561, 2013. ISSN 1473-0197. doi: 10.1039/C2LC40935F. URL https://xlink.rsc.org/?DOI=C2LC40935F.

[105] Kyounghwan Na, Zachariah J. Sperry, Jiaao Lu, Mihaly Vöröslakos, Saman S. Parizi, Tim M. Bruns, Euisik Yoon, and John P. Seymour. Novel diamond shuttle to deliver flexible neural probe with reduced tissue compression. *Microsystems & Nanoengineering*, 6(1):37, jun 2020. ISSN 2055-7434. doi: 10.1038/s41378-020-0149-z. URL https://www.nature.com/articles/s41378-020-0149-z.

[106] Ye Tian, Cunkai Zhou, Kuikui Zhang, Huiran Yang, Zhaohan Chen, Yifei Ye, Zhitao Zhou, Xiaolin Wei, Tiger H. Tao, and Liuyang Sun. Self-Stretchable Christmas-Tree-Shaped Ultraflexible Neural Probes†. *IEEJ Transactions on Electrical and Electronic Engineering*, 19(5):814–818, may 2024. ISSN 1931-4973. doi: 10.1002/tee.24057. URL https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/tee.24057.

[107] Jason E. Chung, Hannah R. Joo, Jiang Lan Fan, Daniel F. Liu, Alex H. Barnett, Supin Chen, Charlotte Geaghan-Breiner, Mattias P. Karlsson, Magnus Karlsson, Kye Y. Lee, Hexin Liang, Jeremy F. Magland, Jeanine A. Pebbles, Angela C. Tooker, Leslie F. Greengard, Vanessa M. Tolosa, and Loren M. Frank. High-Density, Long-Lasting, and Multi-region Electrophysiological Recordings Using Polymer Electrode Arrays. *Neuron*, 101(1):21–31.e5, jan 2019. ISSN 08966273. doi: 10.1016/j.neuron.2018.11.002. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627318309930.

[108] Lan Luan, Xiaoling Wei, Zhengtuo Zhao, Jennifer J. Siegel, Ojas Potnis, Catherine A. Tuppen, Shengqing Lin, Shams Kazmi, Robert A. Fowler, Stewart Holloway, Andrew K. Dunn, Raymond A. Chitwood, and Chong Xie. Ultraflexible nanoelectronic probes form reliable, glial scar–free neural integration. *Science Advances*, 3(2):1–10, feb 2017. ISSN 2375-2548. doi: 10.1126/sciadv.1601966. URL https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.1601966.

[109] Xiaoling Wei, Lan Luan, Zhengtuo Zhao, Xue Li, Hanlin Zhu, Ojas Potnis, and Chong Xie. Nanofabricated Ultraflexible Electrode Arrays for High-Density Intracortical Recording. *Advanced Science*, 5(6), jun 2018. ISSN 2198-3844. doi: 10.1002/advs.201700625. URL https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/advs.201700625.

[110] Youngbin Tchoe, Andrew M. Bourhis, Daniel R. Cleary, Brittany Stedelin, Jihwan Lee, Karen J. Tonsfeldt, Erik C. Brown, Dominic A. Siler, Angelique C. Paulk, Jimmy C. Yang, Hongseok Oh, Yun Goo Ro, Keundong Lee, Samantha M. Russman, Mehran Ganji, Ian Galton, Sharona Ben-Haim, Ahmed M. Raslan, and Shadi A. Dayeh. Human brain mapping with multithousand-channel PtNRGrids resolves spatiotemporal dynamics. *Science Translational Medicine*, 14(628), jan 2022. ISSN 1946-6234. doi: 10.1126/scitranslmed.abj1441. URL https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.abj1441.

[111] Jia Liu, Tian-Ming Fu, Zengguang Cheng, Guosong Hong, Tao Zhou, Lihua Jin, Madhavi Duvvuri, Zhe Jiang, Peter Kruskal, Chong Xie, Zhigang Suo, Ying Fang, and Charles M. Lieber. Syringe-injectable electronics. *Nature Nanotechnology*, 10(7):629–636, jul 2015. ISSN 1748-3387. doi: 10.1038/nnano.2015.115. URL https://www.nature.com/articles/nnano.2015.115.

[112] Guosong Hong, Tian-Ming Fu, Mu Qiao, Robert D. Viveros, Xiao Yang, Tao Zhou, Jung Min Lee, Hong-Gyu Park, Joshua R. Sanes, and Charles M. Lieber. A method for single-neuron chronic recording from the retina in awake mice. *Science*, 360(6396):1447–1451, jun 2018. ISSN 0036-8075. doi: 10.1126/science.aas9160. URL https://www.science.org/doi/10.1126/science.aas9160.

[113] Xiao Yang, Tao Zhou, Theodore J. Zwang, Guosong Hong, Yunlong Zhao, Robert D. Viveros, Tian-Ming Fu, Teng Gao, and Charles M. Lieber. Bioinspired neuron-like electronics. *Nature Materials*, 18(5):510–517, may 2019. ISSN 1476-1122. doi: 10.1038/s41563-019-0292-9. URL https://www.nature.com/articles/s41563-019-0292-9.

[114] Dae-Hyeong Kim, Jonathan Viventi, Jason J. Amsden, Jianliang Xiao, Leif Vigeland, Yun-Soung Kim, Justin A. Blanco, Bruce Panilaitis, Eric S. Frechette, Diego Contreras, David L. Kaplan, Fiorenzo G. Omenetto, Yonggang Huang, Keh-Chih Hwang, Mitchell R. Zakin, Brian Litt, and John A. Rogers. Dissolvable films of silk fibroin for ultrathin conformal bio-integrated electronics. *Nature Materials*,

9(6):511–517, jun 2010. ISSN 1476-1122. doi: 10.1038/nmat2745. URL https://www.nature.com/articles/nmat2745.

[115] Klas Tybrandt, Dion Khodagholy, Bernd Dielacher, Flurin Stauffer, Aline F. Renz, György Buzsáki, and János Vörös. High-Density Stretchable Electrode Grids for Chronic Neural Recording. *Advanced Materials*, 30(15), apr 2018. ISSN 0935-9648. doi: 10.1002/adma.201706520. URL https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/adma.201706520.

[116] Ruihua Dong, Lulu Wang, Chen Hang, Zhen Chen, Xiaoyan Liu, Leni Zhong, Jie Qi, Yuqing Huang, Shaoqin Liu, Liping Wang, Yi Lu, and Xingyu Jiang. Printed Stretchable Liquid Metal Electrode Arrays for In Vivo Neural Recording. *Small*, 17(14), apr 2021. ISSN 1613-6810. doi: 10.1002/smll.202006612. URL https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/smll.202006612.

[117] Yuxin Liu, Jinxing Li, Shang Song, Jiheong Kang, Yuchi Tsao, Shucheng Chen, Vittorio Mottini, Kelly McConnell, Wenhui Xu, Yu-Qing Zheng, Jeffrey B.-H. Tok, Paul M. George, and Zhenan Bao. Morphing electronics enable neuromodulation in growing tissue. *Nature Biotechnology*, 38(9): 1031–1036, sep 2020. ISSN 1087-0156. doi: 10.1038/s41587-020-0495-2. URL https://www.nature.com/articles/s41587-020-0495-2.

[118] Yuanwen Jiang, Zhitao Zhang, Yi-Xuan Wang, Deling Li, Charles-Théophile Coen, Ernie Hwaun, Gan Chen, Hung-Chin Wu, Donglai Zhong, Simiao Niu, Weichen Wang, Aref Saberi, Jian-Cheng Lai, Yilei Wu, Yang Wang, Artem A. Trotsyuk, Kang Yong Loh, Chien-Chung Shih, Wenhui Xu, Kui Liang, Kailiang Zhang, Yihong Bai, Gurupranav Gurusankar, Wenping Hu, Wang Jia, Zhen Cheng, Reinhold H. Dauskardt, Geoffrey C. Gurtner, Jeffrey B.-H. Tok, Karl Deisseroth, Ivan Soltesz, and Zhenan Bao. Topological supramolecular network enabled high-conductivity, stretchable organic bioelectronics. *Science*, 375(6587):1411–1417, mar 2022. ISSN 0036-8075. doi: 10.1126/science.abj7564. URL https://www.science.org/doi/10.1126/science.abj7564.

[119] Yuxin Liu, Jia Liu, Shucheng Chen, Ting Lei, Yeongin Kim, Simiao Niu, Huiliang Wang, Xiao Wang, Amir M. Foudeh, Jeffrey B.-H. Tok, and Zhenan Bao. Soft and elastic hydrogel-based microelectronics for localized low-voltage neuromodulation. *Nature Biomedical Engineering*, 3(1): 58–68, jan 2019. ISSN 2157-846X. doi: 10.1038/s41551-018-0335-6. URL https://www.nature.com/articles/s41551-018-0335-6.

[120] Choong Yeon Kim, Min Jeong Ku, Raza Qazi, Hong Jae Nam, Jong Woo Park, Kum Seok Nam, Shane Oh, Inho Kang, Jae-Hyung Jang, Wha Young Kim, Jeong-Hoon Kim, and Jae-Woong Jeong.

Soft subdermal implant capable of wireless battery charging and programmable controls for applications in optogenetics. *Nature Communications*, 12(1):535, jan 2021. ISSN 2041-1723. doi: 10.1038/s41467-020-20803-y. URL https://www.nature.com/articles/s41467-020-20803-y.

[121] ISO 14708–1:2014. Implants for surgery — Active implantable medical devices. Technical report, International Organization for Standardization, Geneva, 2014. URL https://www.iso.org/standard/52804.html.

[122] Lizhu Li, Lihui Lu, Yuqi Ren, Guo Tang, Yu Zhao, Xue Cai, Zhao Shi, He Ding, Changbo Liu, Dali Cheng, Yang Xie, Huachun Wang, Xin Fu, Lan Yin, Minmin Luo, and Xing Sheng. Colocalized, bidirectional optogenetic modulations in freely behaving mice with a wireless dual-color optoelectronic probe. *Nature Communications*, 13(1):839, feb 2022. ISSN 2041-1723. doi: 10.1038/s41467-022-28539-7. URL https://www.nature.com/articles/s41467-022-28539-7.

[123] K Kampasi, J Alameda, S Sahota, J Hernandez, S Patra, and R Haque. Design and microfabrication strategies for thin-film, flexible optical neural implant. In *2020 42nd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society (EMBC)*, pages 4314–4317. IEEE, jul 2020. ISBN 978-1-7281-1990-8. doi: 10.1109/EMBC44109.2020.9175440. URL https://ieeexplore.ieee.org/document/9175440/.

[124] Yu Zhou, Chi Gu, Jizhi Liang, Bohan Zhang, Huiran Yang, Zhitao Zhou, Meng Li, Liuyang Sun, Tiger H. Tao, and Xiaoling Wei. A silk-based self-adaptive flexible opto-electro neural probe. *Microsystems & Nanoengineering*, 8(1):118, nov 2022. ISSN 2055-7434. doi: 10.1038/s41378-022-00461-4. URL https://www.nature.com/articles/s41378-022-00461-4.

[125] Luis J Fernández, Ane Altuna, Maria Tijero, Gemma Gabriel, Rosa Villa, Manuel J Rodríguez, Montse Batlle, Roman Vilares, Javier Berganzo, and F J Blanco. Study of functional viability of SU-8-based microneedles for neural applications. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 19 (2):025007, feb 2009. ISSN 0960-1317. doi: 10.1088/0960-1317/19/2/025007. URL https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0960-1317/19/2/025007.

[126] Raza Qazi, Adrian M. Gomez, Daniel C. Castro, Zhanan Zou, Joo Yong Sim, Yanyu Xiong, Jonas Abdo, Choong Yeon Kim, Avery Anderson, Frederik Lohner, Sang-Hyuk Byun, Byung Chul Lee, Kyung-In Jang, Jianliang Xiao, Michael R. Bruchas, and Jae-Woong Jeong. Wireless optofluidic brain probes for chronic neuropharmacology and photostimulation. *Nature Biomedical Engineering*, 3

(8):655–669, aug 2019. ISSN 2157-846X. doi: 10.1038/s41551-019-0432-1. URL https://www.nature.com/articles/s41551-019-0432-1.

[127] Yixin Wu, Mingzheng Wu, Abraham Vázquez-Guardado, Joohee Kim, Xin Zhang, Raudel Avila, Jin-Tae Kim, Yujun Deng, Yongjoon Yu, Sarah Melzer, Yun Bai, Hyoseo Yoon, Lingzi Meng, Yi Zhang, Hexia Guo, Liu Hong, Evangelos E. Kanatzidis, Chad R. Haney, Emily A. Waters, Anthony R. Banks, Ziying Hu, Ferrona Lie, Leonardo P. Chamorro, Bernardo L. Sabatini, Yonggang Huang, Yevgenia Kozorovitskiy, and John A. Rogers. Wireless multi-lateral optofluidic microsystems for real-time programmable optogenetics and photopharmacology. *Nature Communications*, 13(1):5571, sep 2022. ISSN 2041-1723. doi: 10.1038/s41467-022-32947-0. URL https://www.nature.com/articles/s41467-022-32947-0.

[128] Yeji Kim, Yunheum Lee, Jeongeun Yoo, Kum Seok Nam, Woojin Jeon, Seungmin Lee, and Seong-jun Park. Multifunctional and Flexible Neural Probe with Thermally Drawn Fibers for Bidirectional Synaptic Probing in the Brain. *ACS Nano*, 18(20):13277–13285, may 2024. ISSN 1936-0851. doi: 10.1021/acsnano.4c02578. URL https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.4c02578.

[129] Nabarun Saha, Giuseppe Brunetti, Mario Nicola Armenise, and Caterina Ciminelli. Tunable narrow band add-drop filter design based on apodized long period waveguide grating assisted co-directional coupler. *Optics Express*, 30(16):28632, aug 2022. ISSN 1094-4087. doi: 10.1364/OE.461876. URL https://opg.optica.org/abstract.cfm?URI=oe-30-16-28632.

[130] Abdelouadoud Mammeri, Yassine Bouachiba, Abderrahmane Bouabellou, Hacene Serrar, Khaled Laggoune, Ilyes Sekhri, Adel Taabouche, Badis Rahal, Mohamed Boulkra, and Hassene Nezzari. Optogeometric study of multimode TiO2 waveguide thin films elaborated by reactive magnetron sputtering. *Physica B: Condensed Matter*, 641:414059, sep 2022. ISSN 09214526. doi: 10.1016/j.physb.2022.414059. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921452622003714.

[131] J.A. Jurado-González, E.G. Lizárraga-Medina, J. Vazquez, O. Romo, J. López, O.E. Contreras-López, N. Nedev, H. Márquez, and H. Tiznado. TiO2-x films as a prospective material for slab waveguides prepared by atomic layer deposition. *Optics & Laser Technology*, 158:108880, feb 2023. ISSN 00303992. doi: 10.1016/j.optlastec.2022.108880. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S003039922201026X.

[132] I. Hegeman, M. Dijkstra, F. B. Segerink, W. Lee, and S. M. Garcia-Blanco. Development of low-loss TiO 2 waveguides. *Optics Express*, 28(5):5982, mar 2020. ISSN 1094-4087. doi: 10.1364/OE.380793. URL https://opg.optica.org/abstract.cfm?URI=oe-28-5-5982.

[133] Yuxi Fang, Changjing Bao, Zhi Wang, Bo Liu, Lin Zhang, Xu Han, Yuxuan He, Hao Huang, Yongxiong Ren, Zhongqi Pan, and Yang Yue. Three-Octave Supercontinuum Generation Using SiO2 Cladded Si3N4 Slot Waveguide With All-Normal Dispersion. *Journal of Lightwave Technology*, 38(13):3431–3438, jul 2020. ISSN 0733-8724. doi: 10.1109/JLT.2020.2985262. URL https://ieeexplore.ieee.org/document/9057373/.

[134] Qiancheng Zhao, Ryan O. Behunin, Peter T. Rakich, Nitesh Chauhan, Andrei Isichenko, Jiawei Wang, Chad Hoyt, Chad Fertig, Mu hong Lin, and Daniel J. Blumenthal. Low-loss low thermo-optic coefficient Ta2O5 on crystal quartz planar optical waveguides. *APL Photonics*, 5(11), nov 2020. ISSN 2378-0967. doi: 10.1063/5.0024743. URL https://pubs.aip.org/app/article/5/11/116103/123214/Low-loss-low-thermo-optic-coefficient-Ta2O5-on.

[135] Roithner LaserTechnik. ELC–470–34 Datasheet, 2024. [Online]. Available: http://www.roithner-laser.com/datasheets/led_chip/elc-470-34.pdf, last accessed on 2024-02-07.

[136] Eugene Hecht. *Optics*. Pearson Education, 5th edition, 2017. ISBN 9780133977226.

[137] David J. Lockwood and Lorenzo Pavesi, editors. *Silicon Photonics II*, volume 119 of *Topics in Applied Physics*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2011. ISBN 978-3-642-10505-0. doi: 10.1007/978-3-642-10506-7. URL https://link.springer.com/10.1007/978-3-642-10506-7.

[138] Heidelberg Instruments. μ-MLA Tabletop Maskless Aligner, 2024. [Online]. Available: https://heidelberg-instruments.com/product/%CE%BCmla/, last accessed on 2024-08-08.

[139] OXXIUS. L1C–532S, 2024. [Online]. Available: https://www.oxxius.com/products/advanced-features-for-lasers/, last accessed on 2024-02-07.

[140] Abdel Salam Hamdy Makhlouf and Ion Tiginyanu, editors. *Nanocoatings and ultra-thin films - Technologies and Applications*. Woodhead Publishing, 1st edition, 2011. ISBN 978-1-84569-812-6.

[141] Shekhar Bhansali and Abhay Vasudev, editors. *MEMS for Biomedical Applications*. Woodhead Publishing, 1st edition, 2012. ISBN 9780857091291.

[142] Tian-Wei Wang, Xian-Zi Dong, Feng Jin, Yuan-Yuan Zhao, Xiang-Yang Liu, Mei-Ling Zheng, and Xuan-Ming Duan. Consistent pattern printing of the gap structure in femtosecond laser DMD projection lithography. *Optics Express*, 30(20):36791, sep 2022. ISSN 1094-4087. doi: 10.1364/OE.471315. URL https://opg.optica.org/abstract.cfm?URI=oe-30-20-36791.

[143] Peter M. Martin, editor. *Handbook of Deposition Technologies for Films and Coatings*. Elsevier, 3rd edition, 2010. ISBN 978-0-8155-2031-3.

[144] Yuan Lin and Xin Chen, editors. *Advanced Nano Deposition Methods*. Wiley, 1st edition, nov 2016. ISBN 9783527340255. doi: 10.1002/9783527696406. URL https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9783527696406.

[145] Philipus N. Hishimone, Hiroki Nagai, and Mitsunobu Sato. Methods of Fabricating Thin Films for Energy Materials and Devices. In *Lithium-ion Batteries - Thin Film for Energy Materials and Devices*. IntechOpen, jul 2020. doi: 10.5772/intechopen.85912. URL https://www.intechopen.com/books/lithium-ion-batteries-thin-film-for-energy-materials-and-devices/methods-of-fabricating-thin-films-for-energy-materials-and-devices.

[146] Donald M. Mattox. *Handbook of Physical Vapor Deposition (PVD) Processing*. Elsevier, 2nd edition, 2010. ISBN 9780815520375. doi: 10.1016/C2009-0-18800-1. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/C20090188001.

[147] Klaus Wandelt, editor. *Encyclopedia of Interfacial Chemistry*. Elsevier, 1st edition, 2018. ISBN 978-0-12-809894-3.

[148] Yuliy D. Gamburg and Giovanni Zangari. *Theory and Practice of Metal Electrodeposition*. Springer New York, New York, NY, 2011. ISBN 978-1-4419-9668-8. doi: 10.1007/978-1-4419-9669-5. URL https://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-9669-5.

[149] Tommi Kääriäinen, David Cameron, Marja-Leena Kääriäinen, and Arthur Sherman. *Atomic Layer Deposition: Principles, Characteristics, and Nanotechnology Applications*. Wiley, 2nd edition, may 2013. ISBN 9781118062777. doi: 10.1002/9781118747407. URL https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118747407.

[150] H. B. Profijt, S. E. Potts, M. C. M. van de Sanden, and W. M. M. Kessels. Plasma-Assisted Atomic Layer Deposition: Basics, Opportunities, and Challenges. *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, 29(5), sep 2011. ISSN 0734-2101. doi: 10.1116/1.3609974. URL https://pubs.aip.org/jva/article/29/5/050801/244582/Plasma-Assisted-Atomic-Layer-Deposition-Basics.

[151] Sami Franssila and Lauri Sainiemi. Reactive Ion Etching (RIE). In *Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics*, pages 1772–1781. Springer US, Boston, MA, 2008. doi: 10.1007/978-0-387-48998-8_1344. URL http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-48998-8_1344.

[152] Regina Luttge. Basic Technologies for Microsystems. In *Microfabrication for Industrial Applications*, pages 13–54. Elsevier, 1st edition, 2011. doi: 10.1016/B978-0-8155-1582-1.00002-2. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780815515821000022.

[153] Photosensitive - Solvent Developable | Fujifilm [Portugal], 2024. [Online]. Available: https://www.fujifilm.com/pt/en/business/semiconductor-materials/polymides-and-pbos/photosensitive-solvent, last accessed on 2024-04-03.

[154] Catalin P. Constantin, Magdalena Aflori, Radu F. Damian, and Radu D. Rusu. Biocompatibility of Polyimides: A Mini-Review. *Materials*, 12(19):3166, sep 2019. ISSN 1996-1944. doi: 10.3390/ma12193166. URL https://www.mdpi.com/1996-1944/12/19/3166.

[155] Hirose Electric. FPC Connector FH29BW–22S–0.2SHW(05), 2024. [Online]. Available: https://eu.mouser.com/datasheet/2/185/HIRO_S_A0002386233_1-2549189.pdf, last accessed on 2024-08-19.

[156] Fujifilm. HTR-D2, 2024. [Online]. Available: https://www.fujifilm.com/us/en/business/semiconductor-materials/polymides-and-pbos/ancillaries, last accessed on 2024-08-19.

[157] Fujifilm. RER 600, 2024. [Online]. Available: https://www.fujifilm.com/us/en/business/semiconductor-materials/polymides-and-pbos/ancillaries, last accessed on 2024-08-19.

[158] John D. Yeager, Derrick J. Phillips, David M. Rector, and David F. Bahr. Characterization of flexible ECoG electrode arrays for chronic recording in awake rats. *Journal of Neuroscience Methods*,

173(2):279–285, aug 2008. ISSN 01650270. doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.06.024. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165027008003798.

[159] A.A. Taylor, M.J. Cordill, L. Bowles, J. Schalko, and G. Dehm. An elevated temperature study of a Ti adhesion layer on polyimide. *Thin Solid Films*, 531:354–361, mar 2013. ISSN 00406090. doi: 10.1016/j.tsf.2013.01.016. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004060901300117X.

[160] M.J. Cordill and A.A. Taylor. Thickness effect on the fracture and delamination of titanium films. *Thin Solid Films*, 589:209–214, aug 2015. ISSN 00406090. doi: 10.1016/j.tsf.2015.05.021. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040609015005556.

[161] MicroChemicals. Photoresist AZ nLOF 2070 Photoresists, 2024. [Online]. Available: https://www.microchemicals.com/AZ-NLOF-2070-Photoresist-0.25-l/1A20700250, last accessed on 2024-08-19.

[162] MicroChemicals. AZ 726 MIF Developer, 2024. [Online]. Available: https://www.microchemicals.com/AZ-726-MIF-Developer-5.00-l/1000726, last accessed on 2024-08-19.

[163] MicroChemicals. TechniStrip NI555, 2024. [Online]. Available: https://www.microchemicals.com/TechniStrip-NI555-5.00-l-MOS/TNI555M5, last accessed on 2024-08-19.

[164] Thomas Geninatti, Giacomo Bruno, Bernardo Barile, R. Lyle Hood, Marco Farina, Jeffrey Schmulen, Giancarlo Canavese, and Alessandro Grattoni. Impedance characterization, degradation, and in vitro biocompatibility for platinum electrodes on BioMEMS. *Biomedical Microdevices*, 17(1):24, feb 2015. ISSN 1387-2176. doi: 10.1007/s10544-014-9909-6. URL http://link.springer.com/10.1007/s10544-014-9909-6.

[165] Gamry Instruments. Reference 600, 2024. [Online]. Available: https://www.gamry.com/support-2/legacy-devices/reference-600-legacy/, last accessed on 2024-08-19.

[166] Dimiter Stoychev, Achilleas Papoutsis, Alexandra Kelaidopoulou, Georgios Kokkinidis, and Alexander Milchev. Electrodeposition of platinum on metallic and nonmetallic substrates — selection of experimental conditions. *Materials Chemistry and Physics*, 72(3):360–365, dec 2001. ISSN 02540584. doi: 10.1016/S0254-0584(01)00337-6. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0254058401003376.

[167] Gamry Instruments. Measuring the Impedance of Your Reference Electrode, 2024. [Online]. Available: https://www.gamry.com/application-notes/instrumentation/measuring-the-impedance-of-your-reference-electrode, last accessed on 2024-08-19.

[168] Cassidy Silbernagel, Ian Ashcroft, Phill Dickens, and Michael Galea. Electrical resistivity of additively manufactured AlSi10Mg for use in electric motors. *Additive Manufacturing*, 21:395–403, may 2018. ISSN 22148604. doi: 10.1016/j.addma.2018.03.027. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214860418300769.

[169] Transene. Silox Vapox III, 2024. [Online]. Available: https://transene.com/sio2/#silox, last accessed on 2024-08-19.

[170] MicroChemicals. AZ 4562, 2024. [Online]. Available: https://www.microchemicals.com/AZ-4562-Photoresist-0.25-l/1A45620250, last accessed on 2024-08-19.

[171] MicroChemicals. AZ 351 B Developer, 2024. [Online]. Available: https://www.microchemicals.com/AZ-351-B-Developer-5.00-l/1000351, last accessed on 2024-08-19.

[172] MicroChemicals. AZ 100 Remover, 2024. [Online]. Available: https://www.microchemicals.com/AZ-100-Remover-5.00-l/1000100, last accessed on 2024-08-19.

[173] Genni Testa, Yujian Huang, Luigi Zeni, Pasqualina M Sarro, and Romeo Bernini. Liquid Core ARROW Waveguides by Atomic Layer Deposition. *IEEE Photonics Technology Letters*, 22(9):616–618, may 2010. ISSN 1041-1135. doi: 10.1109/LPT.2010.2043352. URL http://ieeexplore.ieee.org/document/5419007/.

[174] Amit Khanna, Ananth Z Subramanian, Markus Häyrinen, Shankar Selvaraja, Peter Verheyen, Dries Van Thourhout, Seppo Honkanen, Harri Lipsanen, and Roel Baets. Impact of ALD grown passivation layers on silicon nitride based integrated optic devices for very-near-infrared wavelengths. *Optics Express*, 22(5):5684, mar 2014. ISSN 1094-4087. doi: 10.1364/OE.22.005684. URL https://opg.optica.org/oe/abstract.cfm?uri=oe-22-5-5684.

[175] SENTECH. SI PEALD, 2024. [Online]. Available: https://www.sentech.com/products/plasma-process-technology/atomic-layer-deposition-systems/peald-systems/, last accessed on 2024-08-19.

[176] SAMCO Inc. RIE–1C, 2024. [Online]. Available: https://www.samco.co.jp/en/products/etching/Compact_Etcher_RIE-1C.php, last accessed on 2024-08-19.

[177] J.W. Haus. *Fundamentals and Applications of Nanophotonics*. Elsevier, 1st edition, 2016. ISBN 9781782424642. doi: 10.1016/C2014-0-01442-6. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/C20140014426.

[178] Daniel Malacara. *Optical Shop Testing*. Wiley, 3rd edition, jun 2007. ISBN 9780471484042. doi: 10.1002/9780470135976. URL https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9780470135976.

[179] S. N. Jasperson and S. E. Schnatterly. An Improved Method for High Reflectivity Ellipsometry Based on a New Polarization Modulation Technique. *Review of Scientific Instruments*, 40(6):761–767, jun 1969. ISSN 0034-6748. doi: 10.1063/1.1684062. URL https://pubs.aip.org/rsi/article/40/6/761/304268/An-Improved-Method-for-High-Reflectivity.

[180] Mahmood Aliofkhazraei, Ali Nasar, Mircea Chipara, Nadhira Bensaada Laidani, and Jeff Th.M. De Hosson, editors. *Handbook of Modern Coating Technologies: Application and Development*. Elsevier, 1st edition, 2021. ISBN 9780444632371.

[181] Aline Jolivet, Christophe Labbé, Cédric Frilay, Olivier Debieu, Philippe Marie, Bryan Horcholle, Franck Lemarié, Xavier Portier, Clara Grygiel, Sylvain Duprey, Wojciech Jadwisienczak, David Ingram, Mudit Upadhyay, Adrian David, Arnaud Fouchet, Ulrike Lüders, and Julien Cardin. Structural, optical, and electrical properties of TiO2 thin films deposited by ALD: Impact of the substrate, the deposited thickness and the deposition temperature. *Applied Surface Science*, 608: 155214, jan 2023. ISSN 01694332. doi: 10.1016/j.apsusc.2022.155214. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169433222027428.

[182] Alexandros Ch. Lazanas and Mamas I. Prodromidis. Electrochemical Impedance Spectroscopy—A Tutorial. *ACS Measurement Science Au*, 3(3):162–193, jun 2023. ISSN 2694-250X. doi: 10.1021/acsmeasuresciau.2c00070. URL https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsmeasuresciau.2c00070.

[183] Yingchao Zhang, Wenqiang Wang, Qi Fang, and Shengming Xu. Improved recovery of valuable metals from spent lithium-ion batteries by efficient reduction roasting and facile acid leaching. *Waste Management*, 102:847–855, feb 2020. ISSN 0956053X. doi: 10.1016/j.wasman.2019.11.045. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956053X1930741X.

[184] H. R. Verma. *Atomic and Nuclear Analytical Methods*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1st edition, 2006. ISBN 978-3-540-30277-3. doi: 10.1007/978-3-540-30279-7. URL http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-30279-7.

[185] Stuart F. Cogan. Neural Stimulation and Recording Electrodes. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 10(1):275–309, aug 2008. ISSN 1523-9829. doi: 10.1146/annurev.bioeng.10.061807.160518. URL https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.bioeng.10.061807.160518.

[186] M. Schneider, S. Schroth, J. Schilm, and A. Michaelis. Micro-EIS of anodic thin oxide films on titanium for capacitor applications. *Electrochimica Acta*, 54(9):2663–2671, mar 2009. ISSN 00134686. doi: 10.1016/j.electacta.2008.11.003. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0013468608012851.

[187] Bo Fan, Bernhard Wolfrum, and Jacob T Robinson. Impedance scaling for gold and platinum microelectrodes. *Journal of Neural Engineering*, 18(5):056025, oct 2021. ISSN 1741-2560. doi: 10.1088/1741-2552/ac20e5. URL https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1741-2552/ac20e5.

[188] Intan Technologies. RHD 32–Channel Recording Headstages, 2024. [Online]. Available: https://intantech.com/RHD_headstages.html?tabSelect=RHD32ch&yPos=0, last accessed on 2024-08-19.

[189] Omnetics. A79022–001, 2024. [Online]. Available: https://www.omnetics.com/product/a79022-001/, last accessed on 2024-08-19.

[190] Roland Pomfret, Gurwattan Miranpuri, and Karl Sillay. The Substitute Brain and the Potential of the Gel Model. *Annals of Neurosciences*, 20(3), jul 2013. ISSN 09727531. doi: 10.5214/ans.0972.7531.200309. URL http://annalsofneurosciences.org/journal/index.php/annal/article/view/514.

[191] Efraín Albor-Ramírez, Miguel Reyes-Alberto, Luis M. Vidal-Flores, Enoch Gutierrez-Herrera, and Miguel A. Padilla-Castañeda. Agarose Gel Characterization for the Fabrication of Brain Tissue Phantoms for Infrared Multispectral Vision Systems. *Gels*, 9(12):944, nov 2023. ISSN 2310-2861. doi: 10.3390/gels9120944. URL https://www.mdpi.com/2310-2861/9/12/944.

[192] Matt Gaidica. Mouse Brain Atlas, 2024. [Online]. Available: https://labs.gaidi.ca/mouse-brain-atlas/?ml=-1.3&ap=-1.8&dv=-1.4, last accessed on 2024-09-12.

[193] György Buzsáki, Costas A. Anastassiou, and Christof Koch. The origin of extracellular fields and currents — EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(6):407–420, jun 2012. ISSN 1471-003X. doi: 10.1038/nrn3241. URL https://www.nature.com/articles/nrn3241.

[194] Guosong Hong and Charles M. Lieber. Novel electrode technologies for neural recordings. *Nature Reviews Neuroscience*, 20(6):330–345, jun 2019. ISSN 1471-003X. doi: 10.1038/s41583-019-0140-6. URL https://www.nature.com/articles/s41583-019-0140-6.

[195] Claude Bédard and Alain Destexhe. Macroscopic Models of Local Field Potentials and the Apparent 1/f Noise in Brain Activity. *Biophysical Journal*, 96(7):2589–2603, apr 2009. ISSN 00063495. doi: 10.1016/j.bpj.2008.12.3951. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349509004147.

[196] Cambridge NeuroTech. ASSY–37 Fb Probe, 2024. [Online]. Available: https://www.cambridgeneurotech.com/assets/files/ASSY-37-Fb-map.pdf, last accessed on 2024-09-12.

[197] J.A. Woollam Co. alpha–SE Ellipsometer, 2024. [Online]. Available: https://www.qd-latam.com/_libs/dwns/707.pdf, last accessed on 2024-09-12.

[198] G. E. Jellison and F. A. Modine. Parameterization of the optical functions of amorphous materials in the interband region. *Applied Physics Letters*, 69(3):371–373, jul 1996. ISSN 0003-6951. doi: 10.1063/1.118064. URL https://pubs.aip.org/apl/article/69/3/371/1023110/Parameterization-of-the-optical-functions-of.

[199] Cody Cushman, Nicholas Smith, Massoud Kaykhaii, Nikolas Podraza, and Matthew Linford. An introduction to modeling in spectroscopic ellipsometry, focusing on models for transparent materials: The cauchy and sellmeier models. *Vacuum Technology & Coating*, 7(01), 2016.

[200] Thermo Fisher Scientific. ESCALAB 250Xi, 2024. [Online]. Available: https://www.jp.xpssimplified.com/escalab_250xi.php, last accessed on 2024-09-12.

[201] Fred A. Stevie and Carrie L. Donley. Introduction to x-ray photoelectron spectroscopy. *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, 38(6), dec 2020. ISSN 0734-2101. doi: 10.1116/6.0000412. URL https://pubs.aip.org/jva/article/38/6/063204/1024200/Introduction-to-x-ray-photoelectron-spectroscopy.

[202] Daniel J. Blumenthal, Rene Heideman, Douwe Geuzebroek, Arne Leinse, and Chris Roeloffzen. Silicon Nitride in Silicon Photonics. *Proceedings of the IEEE*, 106(12):2209–2231, dec 2018. ISSN 0018-9219. doi: 10.1109/JPROC.2018.2861576. URL https://ieeexplore.ieee.org/document/8472140/.

[203] Chao Xiang, Joel Guo, Warren Jin, Lue Wu, Jonathan Peters, Weiqiang Xie, Lin Chang, Boqiang Shen, Heming Wang, Qi-Fan Yang, David Kinghorn, Mario Paniccia, Kerry J. Vahala, Paul A. Morton, and John E. Bowers. High-performance lasers for fully integrated silicon nitride photonics. *Nature Communications*, 12(1):6650, nov 2021. ISSN 2041-1723. doi: 10.1038/s41467-021-26804-9. URL https://www.nature.com/articles/s41467-021-26804-9.

[204] Alain E. Kaloyeros, Youlin Pan, Jonathan Goff, and Barry Arkles. Review—Silicon Nitride and Silicon Nitride-Rich Thin Film Technologies: State-of-the-Art Processing Technologies, Properties, and Applications. *ECS Journal of Solid State Science and Technology*, 9(6):063006, jan 2020. ISSN 2162-8769. doi: 10.1149/2162-8777/aba447. URL https://iopscience.iop.org/article/10.1149/2162-8777/aba447.

[205] Stanisława Kluska, Maria Jurzecka-Szymacha, Natalia Nosidlak, Piotr Dulian, and Janusz Jaglarz. The Optical and Thermo-Optical Properties of Non-Stoichiometric Silicon Nitride Layers Obtained by the PECVD Method with Varying Levels of Nitrogen Content. *Materials*, 15(6):2260, mar 2022. ISSN 1996-1944. doi: 10.3390/ma15062260. URL https://www.mdpi.com/1996-1944/15/6/2260.

[206] Leonid Yu. Beliaev, Evgeniy Shkondin, Andrei V. Lavrinenko, and Osamu Takayama. Optical, structural and composition properties of silicon nitride films deposited by reactive radio-frequency sputtering, low pressure and plasma-enhanced chemical vapor deposition. *Thin Solid Films*, 763:139568, dec 2022. ISSN 00406090. doi: 10.1016/j.tsf.2022.139568. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040609022004710.

[207] Chia-Yueh Chou, Chia-Hua Lin, Wei-Hao Chen, Bao-Jhen Li, and Cheng-Yi Liu. High-dielectric-constant silicon nitride thin films fabricated by radio frequency sputtering in Ar and Ar/N2 gas

mixture. *Thin Solid Films*, 709:138198, sep 2020. ISSN 00406090. doi: 10.1016/j.tsf.2020.138198. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040609020304077.

[208] R Sanginés, N Abundiz-Cisneros, O Hernández Utrera, C Diliegros-Godines, and R Machorro-Mejía. Plasma emission spectroscopy and its relation to the refractive index of silicon nitride thin films deposited by reactive magnetron sputtering. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 51(9):095203, mar 2018. ISSN 0022-3727. doi: 10.1088/1361-6463/aaa8d4. URL https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1361-6463/aaa8d4.

[209] Gang Xu, Ping Jin, Masato Tazawa, and Kazuki Yoshimura. Optical investigation of silicon nitride thin films deposited by r.f. magnetron sputtering. *Thin Solid Films*, 425(1-2):196–202, feb 2003. ISSN 00406090. doi: 10.1016/S0040-6090(02)01089-1. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040609002010891.

[210] Jakub Lukeš, Vít Kanclíř, Jan Václavík, Radek Melich, Ulrike Fuchs, and Karel Žídek. Optically modified second harmonic generation in silicon oxynitride thin films via local layer heating. *Scientific Reports*, 13(1):8658, may 2023. ISSN 2045-2322. doi: 10.1038/s41598-023-35593-8. URL https://www.nature.com/articles/s41598-023-35593-8.

[211] Nirmal Kumar Das, Vít Kanclíř, Pavel Mokrý, and Karel Žídek. Bulk and interface second harmonic generation in the Si 3 N 4 thin films deposited via ion beam sputtering. *Journal of Optics*, 23 (2):024003, feb 2021. ISSN 2040-8978. doi: 10.1088/2040-8986/abe450. URL https://iopscience.iop.org/article/10.1088/2040-8986/abe450.

[212] Daoming You, Weihua Liu, Yu Jiang, Yingchun Cao, Wentao Guo, and Manqing Tan. Effect of ion assistance on silicon nitride films deposited by reactive magnetron sputtering. *Materials Science in Semiconductor Processing*, 157:107312, apr 2023. ISSN 13698001. doi: 10.1016/j.mssp.2023.107312. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369800123000057.

[213] Daoming You, Yu Jiang, Yali Zhao, Wentao Guo, and Manqing Tan. Widely tunable refractive index silicon nitride films deposited by ion-assisted pulsed DC reactive magnetron sputtering. *Optical Materials*, 136:113354, feb 2023. ISSN 09253467. doi: 10.1016/j.optmat.2022.113354. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925346722013933.

[214] Shih-Liang Ku and Cheng-Chung Lee. Optical and structural properties of silicon nitride thin films prepared by ion-assisted deposition. *Optical Materials*, 32(9):956–960, jul 2010. ISSN 09253467. doi: 10.1016/j.optmat.2010.01.032. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925346710000406.

[215] Daniela De Luca, Emiliano Di Gennaro, Davide De Maio, Carmine D'Alessandro, Antonio Caldarelli, Marilena Musto, Can Koral, Antonello Andreone, Rosalba Fittipaldi, Valentina Di Meo, Mario Iodice, and Roberto Russo. Tuning silicon nitride refractive index through radio-frequency sputtering power. *Thin Solid Films*, 737:138951, nov 2021. ISSN 00406090. doi: 10.1016/j.tsf.2021.138951. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004060902100434X.

[216] P. S. Nayar. Refractive index control of silicon nitride films prepared by radio-frequency reactive sputtering. *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, 20(6): 2137–2139, nov 2002. ISSN 0734-2101. doi: 10.1116/1.1513637. URL https://pubs.aip.org/jva/article/20/6/2137/243708/Refractive-index-control-of-silicon-nitride-films.

[217] M.A. Signore, A. Sytchkova, D. Dimaio, A. Cappello, and A. Rizzo. Deposition of silicon nitride thin films by RF magnetron sputtering: a material and growth process study. *Optical Materials*, 34(4):632–638, feb 2012. ISSN 09253467. doi: 10.1016/j.optmat.2011.09.012. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925346711004587.

[218] EDAX. Pegasus (EDS-EBSD), 2024. [Online]. Available: https://www.edax.com/products/integrated-technologies/pegasus, last accessed on 2024-09-12.

[219] Bruker. Dimension Icon, 2024. [Online]. Available: https://www.bruker.com/pt/products-and-solutions/microscopes/materials-afm/dimension-icon-afm.html, last accessed on 2024-09-12.

[220] Chii-Wann Lin, Kuo-Ping Chen, Chien-Nan Hsiao, Shiming Lin, and Chih-Kung Lee. Design and fabrication of an alternating dielectric multi-layer device for surface plasmon resonance sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 113(1):169–176, jan 2006. ISSN 09254005. doi: 10.1016/j.snb.2005.02.044. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925400505002273.

[221] A. Chiasera, C. Meroni, F. Scotognella, Y.G. Boucher, G. Galzerano, A. Lukowiak, D. Ristic, G. Speranza, S. Valligatla, S. Varas, L. Zur, M. Ivanda, G.C. Righini, S. Taccheo, R. Ramponi, and

M. Ferrari. Coherent emission from fully Er3+ doped monolithic 1-D dielectric microcavity fabricated by rf-sputtering. *Optical Materials*, 87:107–111, jan 2019. ISSN 09253467. doi: 10.1016/j.optmat.2018.04.057. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925346718302659.

[222] Jianxun Hong, Andrew M. Spring, Feng Qiu, and Shiyoshi Yokoyama. A high efficiency silicon nitride waveguide grating coupler with a multilayer bottom reflector. *Scientific Reports*, 9(1):12988, sep 2019. ISSN 2045-2322. doi: 10.1038/s41598-019-49324-5. URL https://www.nature.com/articles/s41598-019-49324-5.

[223] Siddharth Nambiar, Praveen Ranganath, Rakshitha Kallega, and Shankar Kumar Selvaraja. High efficiency DBR assisted grating chirp generators for silicon nitride fiber-chip coupling. *Scientific Reports*, 9(1):18821, dec 2019. ISSN 2045-2322. doi: 10.1038/s41598-019-55140-8. URL https://www.nature.com/articles/s41598-019-55140-8.

Parte II
Apêndices

Apêndice A

Publicações

- **Revistas científicas**

  - João R. Freitas, Sara Pimenta, Diogo J. Santos, Bruno Esteves, Nuno M. Gomes, and José H. Correia. Flexible Neural Probe Fabrication Enhanced with a Low-Temperature Cured Polyimide and Platinum Electrodeposition. *Sensors*, 22(24):9674, dec 2022. ISSN 1424-8220. doi: 10.3390/s22249674. URL https://www.mdpi.com/1424-8220/22/24/9674.

  - Sara Pimenta, João R. Freitas, and José H. Correia. Flexible neural probes: a review of the current advantages, drawbacks, and future demands. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 25(2):153–167, feb 2024. ISSN 1673-1581. doi: 10.1631/jzus.B2300337. URL https://link.springer.com/10.1631/jzus.B2300337.

  - João R. Freitas, Sara Pimenta, Vítor H. Rodrigues, Manuel F. Silva, and José H. Correia. Silicon nitride thin-films deposited by radiofrequency reactive sputtering: Refractive index optimization with substrate cooling in a nitrogen-rich atmosphere. *Optical Materials*, 149:115130, mar 2024. ISSN 09253467. doi: 10.1016/j.optmat.2024.115130. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925346724003136.

  - Florival M. Cunha, João R. Freitas, Sara Pimenta, Manuel F. Silva, and José H. Correia. Silicon dioxide atomic layer deposition at low temperature for PDMS microlenses coating. *Optical Materials*, 157:116167, nov 2024. ISSN 09253467. doi: 10.1016/j.optmat.2024.116167. URL https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925346724013508.

- **Conferências**

  - João R. Freitas, Rúben B. Freitas, Bruno Esteves, Diogo J. Santos, Marino J. Maciel, Sara Pimenta, José H. Correia. Flexible and reduced-size neural probe using a photosensitive polyimide. *Biolberoamerica 2022*, apr 2022. URL `https://hdl.handle.net/1822/89602`.

  - Vítor H. Rodrigues, João R. Freitas, Manuel F. Silva, José H. Correia. MEMS-based waveguide SiO2 fabricated by RIE process for optical sensing. *IBERSENSOR 2022*, sep 2022. URL `https://hdl.handle.net/1822/89646`.

  - João R. Freitas, Sara Pimenta, José H. Correia. Sonda ultra-fina e flexível para aquisição de atividade neuronal. *Ciência 2024*, jul 2024. URL `https://hdl.handle.net/1822/94380`.

  - F. M. Cunha, João R. Freitas, Sara Pimenta, M. F. Silva, J. H. Correia. PDMS microlenses coating with a SiO2 ultra-thin film deposited by atomic layer deposition. *RAFALD 2024*, nov 2024. URL `https://hdl.handle.net/1822/93729`.

`https://orcid.org/0000-0002-5179-3368`

Apêndice B

Declaração de Ética

Todos os procedimentos realizados nos estudos que envolveram animais foram de acordo com os Regulamentos Europeus (Diretiva da União Europeia 2010/63/EU). As instalações para animais e as pessoas envolvidas nos procedimentos com animais foram certificadas pela entidade reguladora portuguesa – Direção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV). Todos os protocolos seguiram as diretrizes do Instituto de Investigação em Ciências da Vida e Saúde, a Comissão Institucional de Cuidados e Utilização de Animais da Universidade do Minho e foram aprovados pela Comissão de Ética para a Investigação em Ciências da Vida e da Saúde (CEICVS).