

## Matrizes de Microeletrodos para Medidas eletrofisiológicas

Nathalia Peixoto, Henrique Peres, F. Javier Ramirez-Fernandez

Grupo de Sensores Integráveis e Microsistemas (SIM), Lab. Microeletrônica,  
Depto. de Sistemas Eletrônicos, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo Brasil  
Fax (0XX11)818 5585  
<http://sim.lme.usp.br>  
[nathalia@lme.usp.br](mailto:nathalia@lme.usp.br), [hperes@lme.usp.br](mailto:hperes@lme.usp.br), [javier@sim.lme.usp.br](mailto:javier@sim.lme.usp.br)

**Resumo** - Neste artigo apresentamos a fabricação de matrizes de microeletrodos destinadas à aquisição de sinais eletrofisiológicos e estimulação elétrica *in vitro* e sua caracterização elétrica em solução. Em particular, mostra-se aqui um método de eletroplatinação simultâneo à medida de impedância para eletrodos metálicos. São discutidas questões relevantes para a fabricação e caracterização de microeletrodos, com especial atenção à platina negra, utilizada aqui como material de interface entre o eletrólito e o ouro. A impedância obtida está na ordem de 50kΩ. Faz-se ainda uma comparação entre medidas de impedância feitas com sinais de 100Hz a 100kHz em solução salina fisiológica e meio de Leibovitz, em que são obtidos valores da ordem de 2,5 vezes maiores que em NaCl. Para estimulação elétrica a viabilidade dos microeletrodos também é demonstrada, através da aplicação de trens de pulsos bifásicos em solução e para estímulo de células neurais de gânglios parietais do caracol *Helix aspersa*, que por sua vez são mantidos em cultura sobre as estruturas fabricadas.

**Palavras-chave:** microeletrodos, eletroplatinação, instrumentação virtual, cultura celular.

**Abstract** - We present here the fabrication of microelectrode arrays for *in vitro* electrophysiological acquisition and electrical stimulation, and their electrical characterization in solution. In particular, an electroplatinization method is described, in which one may simultaneously measure impedance for metal electrodes. Questions regarding microelectrode fabrication and characterization are also discussed, with special attention to platinum black, which is used as interface material between electrolyte solution and gold. Obtained impedance is in the range of 50kΩ. A comparison between impedance measurements performed from 100Hz to 100kHz is presented in physiological saline as well as in culture medium (Leibovitz). In this medium one obtains 2.5 times bigger values compared to NaCl. Microelectrode viability for electrical stimulation is also shown through the application of biphasic pulse trains in solution by means of electrode pairs. Stimuli are exemplified on parietal ganglia from *Helix aspersa*, which are maintained in culture over the fabricated structures.

**Key-words:** microelectrodes, electroplatinization, virtual instrumentation, cell culture.

### Introdução

Estruturas com microeletrodos que viabilizam medidas eletrofisiológicas extracelulares usuais como potenciais de ação e potenciais de campo têm sido fabricadas há mais de três décadas [1]. Tais estruturas operacionalizam aquisições simultâneas em vários canais a partir de tecidos neurais [2] ou sistemas em cultura compostos de conjuntos de células [3]. Mais ainda, suas vantagens sobre eletrodos tradicionais de vidro ou tungstênio incluem a possibilidade de miniaturização do ferramental necessário para medidas elétricas [4], a garantia da repetibilidade nas medidas feitas com a mesma estrutura [5] e a disponibilidade de dezenas ou até centenas de eletrodos em um mesmo substrato.

Em contrapartida, diferentemente das técnicas de laboratório aplicadas na fabricação de eletrodos Wolfram ou de vidro, o seu processo de fabricação é, além de mais custoso, mais delicado, na medida em que requer o projeto de máscaras com geometrias micrométricas, a obtenção de materiais isolantes adequados e

biocompatíveis, a caracterização de todos os eletrodos de uma matriz a serem disponibilizados para medidas, e a garantia de robustez mecânica. Como eletrodos de vidro tradicionais são usualmente descartados após um experimento agudo, sua caracterização não é crítica como no caso de matrizes, projetadas para utilização também em experimentos crônicos com períodos acima de 15 dias [6].

Na adaptação dos materiais para uso como microeletrodos coloca-se em relevância a questão das propriedades elétricas dos metais a serem utilizados quando imersos em solução. A impedância de um microeletrodo metálico é, em grande parte, devida à interface entre o metal e o eletrólito. Seguindo o modelamento proposto por Geddes [7], pode-se estimar a magnitude da impedância ( $Z$ , em Ω) em função da frequência ( $f$ , em Hz) através da seguinte equação (1):

$$Z = \frac{\sqrt{2}}{2\pi (10^{-14} \text{ Ks}) f^{(1-\alpha)}} \quad (1)$$

onde  $s$  é a área do eletrodo [ $\mu\text{m}^2$ ],  $\alpha$  o coeficiente de capacitância *versus* frequência, e  $K$  o coeficiente capacitância/ $\text{cm}^2$  para a interface eletrodo-eletrólito.

Adotando o metal como platina negra e a solução salina fisiológica (NaCl 0,9%), pode-se estimar o seguinte:  $\alpha=0,366$  e  $K=4950$ . Assim, obtém-se, para eletrodos de diversas áreas, a sua variação de impedância em função da frequência, como exemplificado nas curvas da figura 1. Para efeito de comparação, no caso de eletrodos de ouro, utilizando-se a mesma fórmula e adaptando-se os coeficientes, a impedância é da ordem de cem vezes maior do que para a platina negra. No caso da platina, com o aumento da área e da frequência observa-se a queda na impedância. Sendo assim, para que se obtenha uma impedância da ordem de  $100\text{k}\Omega$ , a área do eletrodo deve ser acima de  $400\mu\text{m}^2$ .

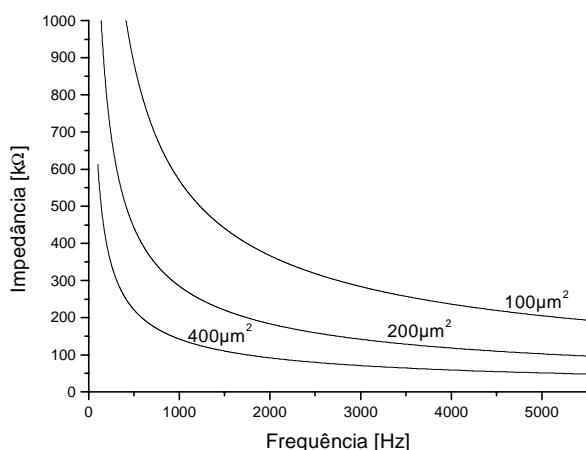


Figura 1 - Curvas da variação de impedância em função da área para microeletrodos de platina negra, imersos em NaCl 0,9%.

A medida de impedância realizada pela passagem de corrente aplicada pelo próprio equipamento de medida (pré-amplificador ou amplificador) através do eletrodo imerso em solução torna-se inviável no caso de muitos eletrodos. Sendo assim, é necessário o desenvolvimento de métodos automatizados de medida, adotando-se o mesmo princípio geral [8] de uma corrente aplicada e a medida da queda de potencial sobre um resistor de referência.

Neste trabalho aborda-se tanto o processo de deposição de platina negra sobre eletrodos fabricados em ouro como a sua caracterização em solução com o objetivo de aquisição e estímulo elétrico. As condições de contorno a serem consideradas para que um eletrodo possa ser otimizado visando o estímulo através da passagem de corrente são menos rigorosas do que para a aquisição, tratam da sua capacidade de troca de carga com o meio biológico (CDC). Portanto, sabendo-se que as aplicações a que se destinam as estruturas aqui apresentadas são extracelulares, pode-se admitir que a otimização das condições dos microeletrodos para a aquisição implicam a sua viabilidade para estimulação.

## Metodologia

### Fabricação de estruturas

Estruturas contendo 100 microeletrodos dispostos de forma quadrada ( $10 \times 10$ ) foram fabricadas seguindo a seqüência de processamento descrita anteriormente em [9]. Os eletrodos são quadrados de  $20\mu\text{m}$  de lado. A figura a seguir (2) mostra esquematicamente as camadas da estrutura final. Duas camadas de passivação são utilizadas para garantia de estabilidade mecânica e resistência à solução fisiológica. Inicialmente tem-se como metal de interface o ouro, em que se delimitam *pads* de contato com  $300\mu\text{m}$  de lado. Os microeletrodos são definidos na área central da estrutura, abrangendo no total  $1\text{mm}^2$ . A figura 3 mostra um exemplo da matriz fabricada, com os cem eletrodos de ouro. A estrutura completa é fabricada sobre substratos de vidro e silício, ocupando aproximadamente  $4\text{cm}^2$  de área.

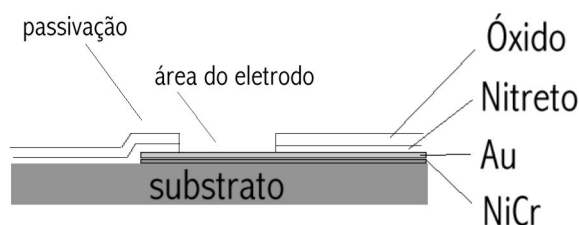


Figura 2 - Esquema de camadas metálicas e passivação duplex da estrutura fabricada.

### Eletroplatinação

Após a abertura dos contatos nas camadas passivadoras, procede-se à eletrodeposição de platina negra, utilizando-se ácido hexacloroplatínico e uma densidade de corrente de  $100$  a  $500\text{mA}/\text{cm}^2$ . A corrente é controlada através de um resistor em série com o eletrodo, que varia de  $1\text{M}\Omega$  a  $10\text{M}\Omega$ .

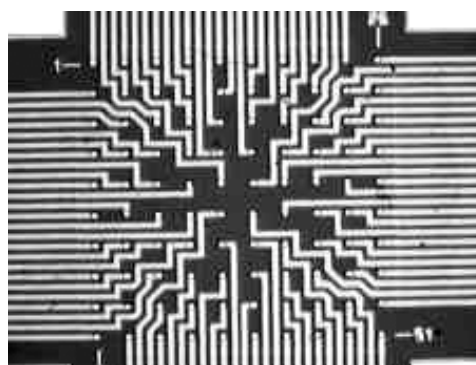


Figura 3 - Área central da matriz de microeletrodos fabricada ( $1\text{mm}^2$ ), com espaçamento de  $120\mu\text{m}$  entre eletrodos adjacentes.

Utilizando-se um gerador de funções (HP33120A) controlado por GPIB e uma placa de aquisição de dados (PCMCIA AI-16E4 Nat.Inst.) conectados a um *laptop* foi implementado em LabView 5.1 (National Instruments) um programa para controle do tempo e corrente de platinização, além da medida

simultânea da impedância ( $Z$ ) ao longo do tempo, como descrito a seguir.

#### Caracterização

Durante a eletroplatinização, feita individualmente, a impedância de cada microeletrodo é monitorada, com a finalidade principal de identificar trilhas cortadas (contatos em aberto) ou falhas na passivação ou metalização (trilhas em curto circuito). No primeiro caso, a impedância medida é acima de  $500\text{k}\Omega$ . No segundo, o valor é abaixo de  $5\text{k}\Omega$ . Além disso, a variação da impedância ao longo do tempo indica o estado da platinização sobre aquele eletrodo determinado, e assim a sua confiabilidade para as medidas eletrofisiológicas posteriores pode ser estimada.

A impedância é medida aplicando-se uma excitação senoidal de  $1\text{kHz}$ , com  $100\text{mV}$  de amplitude, e fazendo-se a medida diferencial sobre um resistor de referência ( $100\text{k}\Omega$ ). Caso  $Z$  seja menor que  $50\text{k}\Omega$  considera-se a platinização satisfatória. Muitas vezes  $Z$  varia nos primeiros minutos após a aplicação da corrente. Neste caso, se  $Z$  volta a valores acima de  $50\text{k}\Omega$ , faz-se uma segunda eletroplatinização. A seleção de microeletrodos é feita manualmente através de microposicionadores. A impedância final obtida varia de  $10$  a  $60\text{k}\Omega$ .

A segunda monitoração de  $Z$  é realizada após a platinização, utilizando-se para isso a solução fisiológica ( $\text{NaCl}$  a  $0,9\%$ ). Depois de uma hora em solução, para estabilização da bicamada iônica, a mesma medida é feita e obtém-se assim um quadro comparativo entre a  $Z$  inicial e  $Z$  em solução (situação estável).

#### Protótipo

Procede-se então à montagem do protótipo, através da colagem de um cilindro de vidro ( $1\text{cm}$  de diâmetro) sobre a matriz. Mais uma vez, testes de medida de  $Z$  são realizados, em períodos superiores a  $15$  dias. Finalmente o protótipo em placa de circuito impresso é montado, fazendo-se a ligação dos  $100$  pontos de contato da matriz à placa, como mostra a figura 4.

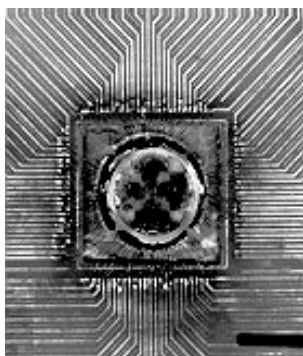


Figura 4 - Vista superior da matriz soldada à placa de circuito impresso com trilhas para acesso aos eletrodos.

Barra de calibração (canto inferior direito):  $1\text{cm}$ .  
Preparação experimental

A dissecação do gânglio parietal de *Helix aspersa* Müll. é feita conforme descrevem Tiwari e Woodruff [10]. A manutenção em cultura é realizada sobre o substrato fabricado, como mostra a figura 5. Meio de Leibovitz modificado com antibióticos (streptomomicina e penicilina) é utilizado como meio de cultura.

Após dois dias em cultura verifica-se a aderência das células dorsais do gânglio sobre a matriz, e procede-se então à estimulação elétrica. Trens de pulso bifásicos bipolares [11] são aplicados através de eletrodos escolhidos e por outros dois eletrodos faz-se a aquisição de sinal. A aquisição é feita por meio de um sistema de aquisição montado com placas DAQ (16E4) e SCXI (1303, ambas National Instruments). O software é implementado em LabView 5.1 (Nat. Inst.) e controla tanto a aquisição de sinal quando a estimulação elétrica. Podem ser estimulados até dois canais simultaneamente, e a aquisição de sinal pode ser feita em até  $32$  canais, devido à multiplexagem na placa SCXI. Sinais adquiridos são gravados on line, e alternativamente se pode filtrá-los durante a aquisição. Entretanto, neste artigo, todos os resultados apresentados se referem a dados adquiridos sem qualquer tipo de pré-processamento de sinal.

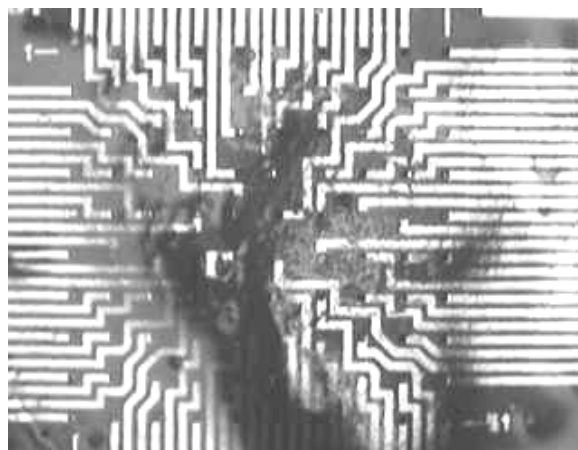


Figura 5 - Gânglio parietal de *Helix aspersa* posicionado sobre o lado direito da matriz de microeletrodos (área dos eletrodos:  $1\text{mm}^2$ ).

#### Resultados

A caracterização das matrizes de microeletrodos fabricadas é realizada por (a) avaliação visual através de microscópio óptico, (b) perfilometria, (c) medida de impedância e (d) capacidade de estímulo elétrico e medida em solução e em cultura.

A avaliação visual (a) indica trilhas cortadas, eletrodos passivados e falhas na eletrodeposição. Na figura 6 pode-se observar um conjunto de eletrodos em que quatro já contêm platina (área escura nos quatro microeletrodos à esquerda) e outros não (eletrodos claros). A primeira trilha à direita está interrompida, o que exclui este eletrodo do processo de eletroplatinização.

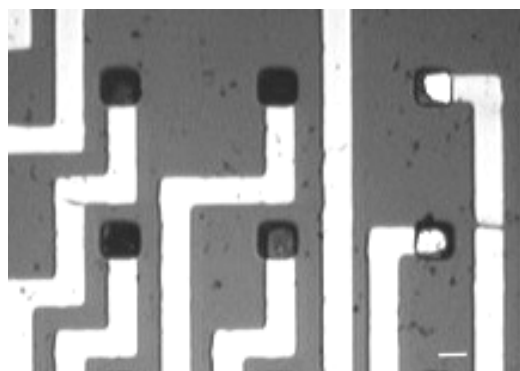


Figura 6 - Avaliação visual do estado das trilhas, passivação e platinização (no microscópio óptico).  
Barra de calibração: 20 $\mu$ m

A perfilometria é feita em 1% dos eletrodos considerados viáveis, e a partir dela se pode concluir sobre a altura e qualidade da platina negra depositada. A figura 7 apresenta uma curva com três regiões, sendo que a região compreendida entre 20 e 40 $\mu$ m se refere ao lado do eletrodo, e nas duas extremidades tem-se a passivação (camada duplex, conforme mencionado acima). Neste caso, a altura obtida foi de aproximadamente 1500Å.

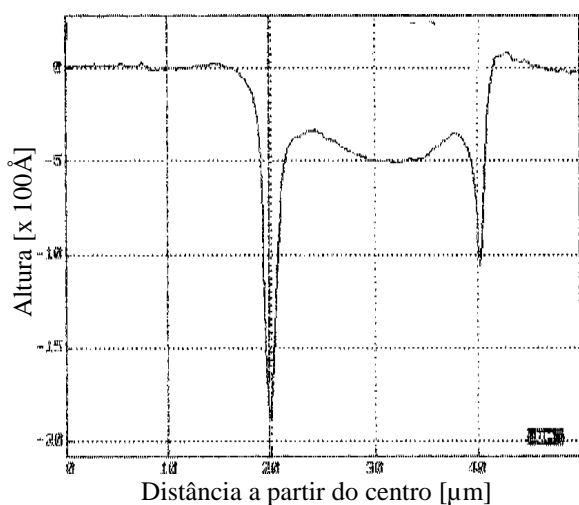


Figura 7 - Perfilometria em um eletrodo de 20 $\mu$ m de lado. Região central: Pt negra. Laterais: camada duplex.

Ao contrário da perfilometria, a medida de impedância ( $Z$ ) é realizada em 100% dos eletrodos preparados, e é considerada a principal forma de avaliação do estado da amostra. A figura 8 a seguir mostra o efeito de duas platinizações consecutivas sobre a  $Z$  de um mesmo eletrodo.

O comportamento elétrico ao longo do tempo não é homogêneo em todas as amostras durante a platinização, ou seja, há casos em que  $Z$  varia na forma mostrada na figura 9, e ainda eletrodos para os quais não se atinge a estabilidade na impedância medida. Neste último caso o eletrodo não é considerado viável.

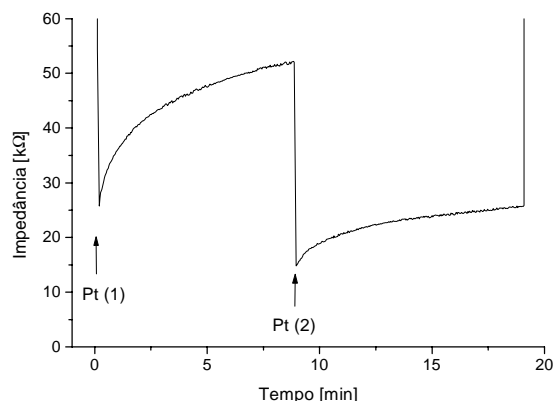


Figura 8 - Eletrodeposição de platina negra.  
Taxa de amostragem: 0,2Hz,  $\Delta t_{plat}=1$ seg.

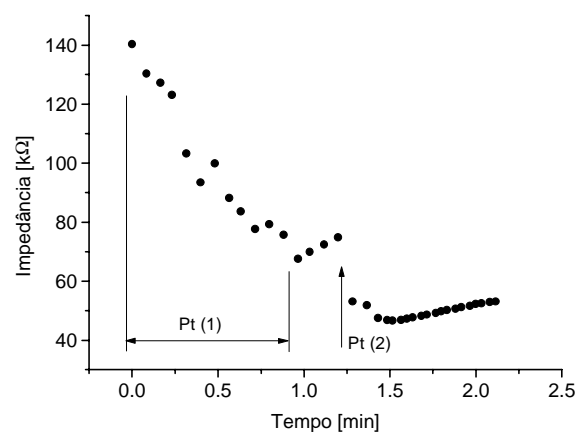


Figura 9 - Eletrodeposição de platina negra sobre microeletrodo de 20 $\mu$ m de lado. Variação da impedância medida ao longo do tempo.

Quanto menor a densidade de corrente durante a eletrodeposição, mais lenta é a queda na amplitude da impedância medida. Além disso, também inversamente proporcional à densidade de corrente é a rugosidade do metal depositado. Portanto, como a maior área superficial é obtida com maiores densidades de corrente, utiliza-se aqui 500mA/cm<sup>2</sup>. Ao contrário do que alguns autores conjecturam [7], não foi observada qualquer redução do tempo de vida dos eletrodos com o aumento da corrente. Mais ainda, os valores obtidos para  $Z$  são menores do que os previstos pela Equação (1).  $Z$  pode variar de 10 a 100k $\Omega$ , dependendo das condições de platinização e da estrutura escolhida. Por exemplo, para os eletrodos de uma mesma amostra obteve-se média de 40 $\pm$ 5 k $\Omega$  (n=80).

Deve-se observar que os valores apresentados são válidos apenas para este tipo de metal, e apenas em solução salina. A impedância conforme medida aqui aumenta se a solução usada é o meio de Leibovitz (L-15), por exemplo. Através de uma varredura em frequência de 100Hz a 100kHz pode-se notar a diferença entre as respostas nestas duas soluções. Em média os valores de impedância em L-15 são 2,42 $\pm$ 0,06 (n=51) vezes maiores do que em NaCl.

A figura 10 apresenta um exemplo de estímulo aplicado ao meio de Leibovitz e medido entre dois eletrodos localizado fora da área de aderência celular (por exemplo, à esquerda da figura 5). Durante a estimulação, aplicam-se pulsos quadrados bifásicos de 1, 5 ou 10ms, com 10 a 100ms de intervalo entre pulsos, com amplitudes de 10 a 100mV. O estímulo é feito em trens compostos de até 10 pulsos, com frequência de 0,1 a 1Hz. A amplitude dos pulsos é aumentada progressivamente a partir de 1mV. A partir de 40mV, onde se estima uma corrente total extracelular de no máximo 400nA<sup>1</sup>, são medidas respostas celulares de diversas células em conjunto, como é apresentado na figura 11.

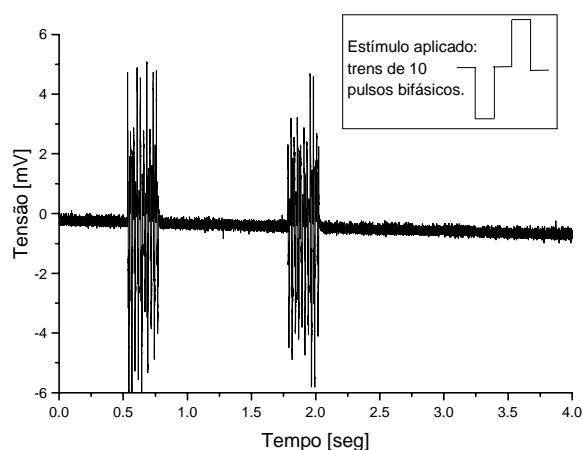


Figura 10 - Estímulo elétrico através da matriz de microeletrodos, sem gânglio sobre o substrato.  
Tx. amostragem:10kHz (sem filtro)

## Discussão e Conclusões

Conforme previsto no modelo equacionado por Geddes [7], quanto maior a área exposta do microeletrodo metálico, menor sua impedância para uma mesma frequência. A área exposta deve ser considerada maior do que a área do eletrodo planar de ouro, dado que a deposição de platina negra se faz sobre a superfície de 400 $\mu\text{m}^2$ , aumentando-a no eixo z. Portanto, desta forma explica-se a obtenção de menores valores de impedância do que os previstos. A escolha da platina negra foi feita baseando-se na sua capacidade de entrega de carga (CDC, de 75 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ ), além da apresentação de elevada área superficial na eletrodeposição (como mostrado na figura 7). Outras alternativas de materiais de interface seriam polímeros condutores ou nitreto de titânio.

As medidas apresentadas com estímulo elétrico foram feitas a partir de eletrodos da mesma matriz com a qual o estímulo foi entregue à solução. Estas medidas corroboram não só a viabilidade na aquisição como também a possibilidade de estímulo simultâneo através de outro par de eletrodos. Apesar de a amplitude dos artefatos gerados serem de 12mV nos exemplos

mostrados aqui, pela sua forma é possível identificar e separar os sinais de estímulos e respostas celulares.

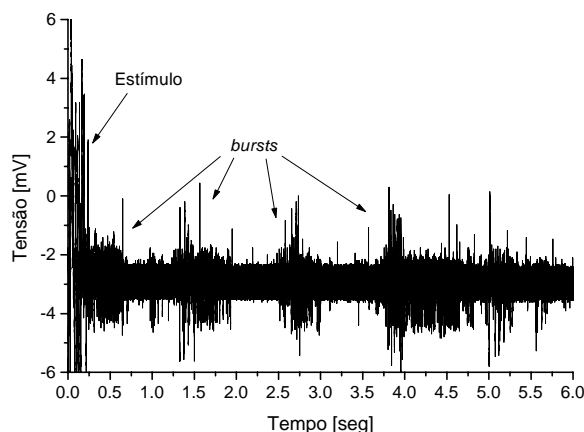


Figura 11 - Respostas celulares (neurônios dorsais do gânglio parietal) ao trem de pulso aplicado em t=0 seg em forma de salvas de potenciais de ação.  
(Aquisição: tx. amostr = 10kHz, sem filtro)

No artigo [12], Carter apresenta uma análise comparativa entre a interface metal-eletrólito para eletrodos de ouro, tanto em solução salina quanto em meio MEM (*minimum essential medium*) dissolvido em NaCl (0,9%). Os autores concluem que há uma variação significativa de impedância quando utilizam amplitudes de excitação (e conseqüentemente também na medida) acima de 50mV. Dois pontos básicos diferem as medidas feitas nesse texto das aqui apresentadas. O primeiro é a utilização de ouro como metal de interface. Como o ouro apresenta alta impedância quando utilizado para medidas eletrofisiológicas, raramente é aplicado em modelos experimentais. O segundo ponto é a comparação entre a solução salina e um meio de cultura diluído (no caso de Carter), o que produz novamente um meio iônico tão pouco carregado quanto o NaCl inicial. Apesar destas diferenças, como aqui utilizou-se 100mV de amplitude para a medida de impedância, a variação entre as duas soluções medidas (de 2,4 vezes) seria esperada adotando-se o modelo proposto por Carter.

Apesar de a medida de impedância em microeletrodos ser feita na frequência de 1kHz devido à faixa de frequências de interesse na eletrofisiologia tradicional, que varia de 100Hz a 3kHz, alguns testes de variação de frequência foram realizados entre 100Hz e 100kHz, e o comportamento previsto teoricamente foi verificado.

A partir das caracterizações feitas e da otimização no processo de eletrodeposição e medida de impedância é possível concluir que a grande maioria das estruturas fabricadas é viável para uso em medidas eletrofisiológicas, e conseqüentemente também para estimulação elétrica. Os sistemas biológicos em que se podem aplicar as matrizes de microeletrodos se restringem a modelos *in vitro* e sistemas em cultura (celulares ou tecidos), já que as condições para

<sup>1</sup> Admitindo-se Zelet.=50k $\Omega$ .

implantes *in vivo* implicam testes de longo prazo e caracterizações não consideradas neste artigo.

### Agradecimentos

Trabalho financiado pela FAPESP, proc. nr. 98/02911-9.

Agradecemos ao Centro de Componentes Semicondutores (CCS) da UNICAMP pela deposição de nitreto (ECR), e ao Grupo de Novos Materiais, LME/USP, pela deposição de óxido de silício (PECVD).

Agradecemos ainda a Rodrigo Oliveira Fernandez pelo desenvolvimento de software em LabView e apoio técnico.

### Referências

- [1] K. Wise, J.B. Angell, A. Starr, "An integrated circuit approach to extracellular microelectrodes", *IEEE Trans. Biom. Eng.*, vol. 17, pp. 238-247, 1975.
- [2] H. Oka et al., "A new planar multielectrode array for extracellular recording: application to hippocampal acute slice", *J. Neuroscience Methods*, vol. 93, pp. 61-67, 1999.
- [3] N. Peixoto, H. Peres, F.J. Ramirez-Fernandez, W. Leite, "Culturing neuronal cells on three-dimensional silicon microstructures". *Annals of the Ibersensor'98*, Havana University, Cuba, 1998.
- [4] T. Dalbasti, E. Kilinc, A. Erdem, M. Ozsoz, "Multielectrode array for simultaneous recording of glucose, oxygen and electrocorticography from cerebral cortex in experimental focal epilepsy", *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 13, pp. 881-888, 1998.
- [5] L.J. Breckenridge et al., "Advantages of using microfabricated extracellular electrodes for in vitro neuronal recording", *J. Neuroscience Research*, vol. 42, pp. 266-276, 1995.
- [6] A. Blau et al., "Characterization and optimization of microelectrode arrays for in vivo nerve signal recording and stimulation", *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 12, pp. 883-892, 1997.
- [7] L.A. Geddes, L.E. Baker, "*Principles of applied biomedical instrumentation*", New York: Wiley, 1989.
- [8] A.D. Robinson, "The electrical properties of metal microelectrodes", *Proc. of the IEEE*, vol. 56, pp. 1065-1071, 1968.
- [9] H. Peres, N. Peixoto, F.J. Ramirez-Fernandez, "Localized temperature control in silicon microstructures for neural culture", *ICMP'99*, Anais, p. 264-268, Campinas, SP, Brasil, 1999.
- [10] S.K. Tiwari, M.L. Woodruff, "Helix aspersa neurons maintain vigorous electrical activity when co-cultured with intact Helix aspersa ganglia", *Comp. Biochem. Physiol.*, vol. 101C, pp. 163-174, 1992.
- [11] N. Peixoto, et al., "Electrical stimulation of the rabbit retina with various pulse shapes", *European Journal of Neuroscience*, vol. 10, supp. 10, p. 355, 1998.
- [12] S.J. Carter et al., "Comparison of impedance at the microelectrode-saline and microelectrode-culture medium interface", *IEEE Trans. Biom. Eng.*, vol. 39, pp. 1123-1129, 1992.