Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica

Volumen 24

Número Number 2 Septiembre 2003

Artículo:

Fabricación y caracterización eléctrica de microelectrodos de silicio para registro de señales nerviosas

> Derechos reservados, Copyright © 2003: Sociedad Mexicana de Ingeniería Biomédica, AC

Otras secciones de este sitio:

- 🛷 Índice de este número
- 🛷 Más revistas
- 🗢 Búsqueda

Others sections in this web site:

Contents of this number
More journals
Search





REVISTA MEXICANA DE

Vol. XXIV, Núm. 2 Septiembre 2003 pp 126 - 134

Fabricación y caracterización eléctrica de microelectrodos de silicio para registro de señales nerviosas

Jorge Enrique Aragón Puerto* Wilfrido Calleja Arriaga*

* Instituto Nacional de Astrofísica Óptica y Electrónica.

Luis Enrique Erro No. 1, Sta. Ma. Tonantzintla, Puebla.

Correspondencia: Jorge Enrique Aragón Puerto Apdo. Postal 51 y 216, Puebla, Pue., México. Tel. 2-25-11-79 E-mail: jaragon@lycos.com

RESUMEN

El uso de microelectrodos para el registro extracelular de las señales bioeléctricas generadas en el interior de los tejidos excitables (neuronas), es una de las técnicas más importantes para el estudio del sistema nervioso central y periférico a nivel celular. Se ha demostrado que el uso de las técnicas de fabricación de circuitos integrados permite obtener microelectrodos planares (MEP's) con un alto grado de control en las dimensiones, geometría y distancia interelectrodos de las áreas de registro, así como un perfil de inserción afilado y paredes uniformes y libres de rugosidades.

En este reporte, se presentan las diversas etapas de caracterización eléctrica básica de los dispositivos fabricados, incluyendo la metodología, equipo utilizado, montaje experimental y propuesta de encapsulado de los microelectrodos.

Palabras clave:

Microelectrodos, micromaquinado de silicio, registro de señales neuronales.

ABSTRACT

The use of microelectrodes for the extracelular recording of the bioelectrical signals generated in the interior of the excitable tissue (neurons), is one of the most important techniques for the study of the peripheral and central nervous system at cellular level. It has been demonstrated that the use of the techniques of manufacture of integrated circuits permits to obtain planar microelectrodes (PME's) with a high degree of control in the recording area dimensions, geometry and interelectrodes spacings, as well as a sharpened insertion profile and uniform and roughen free walls.

In this report, are presented the various stages of basic electrical characterization of the manufactured devices, including the methodology, used equipment, experimental assembly and proposal of the microelectrodes packaging.

Key Words:

Microelectrodes, Silicon micromachining, Neural signals recordings.

INTRODUCCIÓN

Los micro-electrodos son micro-estructuras tridimensionales obtenidas mediante la aplicación de las técnicas de fabricación de circuitos integrados, la estructura está formada por un trampolín de silicio cuyo extremo posee un perfil y un bisel de inserción afilados, y está diseñada para poder ser insertada extracelularmente en un racimo nervioso¹.

Para definir las estructuras tridimensionales, se utiliza la técnica de micro-maquinado de silicio mono-cristalino mediante el grabado anisotrópico que involucra el uso de soluciones alcalinas de KOH al 30% en peso. El perfil de la punta es obtenido mediante una rigurosa selección de la geometría y los planos cristalográficos, a fin de tener una micro-estructura con un perfil afilado y paredes libres de rugosidades, cuya inserción produzca un daño mínimo al tejido biológico bajo estudio. La estructura se complementa con las áreas de registro y líneas de interconexión de titanio y una película protectora que se ha obtenido combinando capas múltiples de óxido de silicio y nitruro de silicio².

En el presente trabajo se hace una revisión al estado del arte de los micro-electrodos, se presentan los micro-electrodos fabricados y se reporta la caracterización eléctrica básica de los mismos.

ESTADO DEL ARTE DE LOS MICROELECTRODOS

En la actualidad, los micro-electrodos son una herramienta muy importante en las áreas de fisiología, y electroquímica. Tradicionalmente han sido utilizados para el estudio de los mecanismos de transporte de masa en los medios electrolíticos. Pero también han sido aplicados en el estudio y caracterización eléctrica de células y tejidos excitables, de hecho esta aplicación no debe asombrarnos, puesto que mucho del interés provocado por la electricidad, surge al ser ésta descubierta como fenómeno biológico³⁻⁵.

En los inicios de la investigación fisiológica, diversos indicadores biológicos fueron utilizados para detectar la presencia de la electricidad, por ejemplo, la magnitud de una pila voltaica era probada mediante la fuerza de la reacción que ésta provocaba al ser aplicada a un músculo de rana. Sin embargo, estos indicadores biológicos eran poco precisos como métodos de medición y se requería de dispositivos especializados para comprender mejor los fenómenos bioeléctricos de los tejidos. Esta necesidad de contar con métodos de detección más precisos se ve estimulada por el interés por conocer la estructura y funcionamiento de los organismos vivos, puesto que las fuerzas y corrientes eléctricas son las responsables del funcionamiento de prácticamente todos los órganos del cuerpo.

Como resultado de un gran número de investigaciones sistemáticas, a lo largo de las últimas décadas se ha estandarizado el uso de diversos tipos de electrodos, y en la actualidad podemos identificar tres grupos principales de electrodos:

- Electrodos metálicos convencionales de dimensiones relativamente grandes (del orden de mm) con o sin recubrimiento dieléctrico.
- Micro-pipetas o micro-agujas de vidrio llenas de soluciones electrolíticas, iónicas o aleaciones metálicas.
- Micro-electrodos planares con sustrato de silicio, metal o polímero.

Sin embargo, cuando se intentan conducir experimentos donde se desea una alta selectividad de la naturaleza, tipo y cantidad de las señales a registrar, los electrodos metálicos y las micro-agujas de vidrio resultan inadecuados, puesto que no son capaces de discriminar entre el número y tipo de señales eléctricas que registran. Otro inconveniente es que debido a sus dimensiones, no es posible insertar un número grande de electrodos en espacios reducidos, por ejemplo, en el interior de un tejido o una célula. Aunado a lo anterior, poseen una alta probabilidad de fugas eléctricas en las cercanías de la punta (área de registro), y la hidratación del vidrio o el recubrimiento aislante pueden alterar la geometría de la punta, modificando el comportamiento y el potencial de la punta.

En contraste, los micro-electrodos planares con sustrato de silicio operan detectando los potenciales eléctricos generados en el tejido cerca de una fibra nerviosa activa, existen tres tipos de micro-electrodos de película delgada: El arreglo o matriz, la punta de prueba y el electrodo de regeneración. De los cuales, el interés de este trabajo está enfocado en los micro-electrodos de punta de prueba.

Los micro-electrodos de punta de prueba, típicamente consisten de uno o más trampolines de silicio, los cuales son insertados en el tejido bajo investigación, el registro y/o estimulación de las células se realiza a través de las áreas de registro colocadas en el trampolín⁷⁻⁸. La Figura 1 muestra un esquema de un micro-electrodo de prueba típico⁶.

En la actualidad los micro-electrodos constituyen una herramienta muy valiosa para el estudio de señales electroquímicas debido a las características únicas que exhiben principalmente debido a su tamaño extremadamente pequeño. Las ventajas de los micro-electrodos se listan a continuación:

- Tamaño pequeño, esta característica es muy útil para aplicaciones biomédicas.
- Comportamiento de estado cuasi-estático.
- La densidad de corriente faradaica



es grande y los hace ideales para aplicaciones analíticas.

 Una baja relación resistencia/área, lo cual nos proporciona un tiempo de respuesta rápido.

Los MEP's que hemos fabricado poseen las siguientes características:

- Micro-electrodo planar de tipo punta de prueba triple.
- Cada trampolín micromaquinado tiene dimensiones de: 1.7 μm de largo, 100 μm de ancho, 50 mm de espesor y ángulo de la punta de



Figura 1. Esquema de un micro-electrodo de tipo punta de prueba.

30°, lo cual reduce el riesgo de ruptura durante la inserción.

- El ángulo del bisel con respecto al sustrato <100> de 48.19° (100<221), lo cual le confiere un aspecto de cuña afilada.
- Son adecuados para aplicar la técnica de inserción intra-fascicular y extra-celular.
- Método de registro monofásico o bifásico.
- Por las dimensiones del área de registro del orden de 16 µm se considera que es un microelectrodo hemiesférico puntual de dimensionalidad cero.
- Por su forma circular, cada área de registro es un micro-disco de 16 µm de diámetro.
- Las áreas de registro se encuentran incrustadas en el material dieléctrico, lo cual aumenta el volumen dieléctrico relativo entre las líneas de interconexión y las áreas de registro reduciendo la capacitancia entre electrodos.
- La distancia entre áreas de registro es de 1 mm, lo cual asegura una mínima interferencia eléctrica por traslape.
- En su fabricación se han elegido materiales biocompatibles para reducir el riesgo de rechazo.

CÁLCULOS PRELIMINARES

A fin de tener una idea clara de los valores típicos de las micro-puntas diseñadas, se procedió a efectuar algunos cálculos preliminares concernientes a los valores de resistencia y capacitancia de las áreas de registro.

La capacitancia del área de registro se obtiene mediante la ecuación 1, que involucra el valor de la capacitancia Helmholtz de la interfaz metal-electrólito⁹:

$$Ce \quad {}_{0 r}A/d1 \tag{1}$$

Ce 8.85 exp 23 (10)(10 exp 6)² / *d*1 78.18 pF a 39.31 pF.

Donde:

 ε_0 = Permitividad del vacío

(8.85 exp⁻¹² F/m),

- ϵ_1 = Permitividad relativa del sistema (10),
- d1 = Ancho de la capa de Helmholtz (valor de radio iónico de 2 a 4Å),

A = área del sitio de registro.

La impedancia del electrodo se obtiene con:

$$|Ze| = \frac{1}{Ce} = 2M$$
 a 4 M (2)

Que es el rango de impedancia típica esperado para los electrodos fabricados. Sin embargo, estos cálculos son una primera aproximación porque omiten muchos efectos de segundo orden, variaciones de proceso en cuanto al espesor de películas, diferencias de diámetro de las áreas de registro, etc. Por lo que no son un valor riguroso que se deba encontrar en nuestros dispositivos. Típicamente un buen microelectrodo planar de registro debe tener una impedancia mayor a 1 M Ω y menor a 10 M Ω^9 .

RESULTADOS DE LA FABRICACIÓN DE MEP'S.

A partir del proceso de fabricación desarrollado previamente², se obtuvo un lote de micro-puntas de silicio. En la fotográfica de las Figuras 2 a 5, se muestran las fotografías obtenidas con un microscopio electrónico de barrido (SEM).

La Figura 2, muestra una micro-punta triple del lote fabricado, la Figura 3 muestra el bisel de inserción afilado, mientras las Figuras 4 y 5 son acercamientos del extremo afilado y del área de registro respectivamente.

Las áreas de registro mostradas tienen un diámetro de 16 Om, y éste es el valor considerado en los cálculos de la sección anterior.

MONTAJE Y ENCAPSULADO

Existen varias alternativas para realizar el montaje y/o encapsulado de las micro-puntas fabricadas,

CIEA

Figura 2. Fotografía SEM de una micropunta triple.

en una etapa previa de caracterización se implementó la opción mostrada en la Figura 6.

La micropunta es pegada al borde de un encapsulado tipo DIP-8, y la salida de cada área de registro es alambrada a una terminal del encapsulado DIP. Como alternativa a este sistema de encapsulado que resulta ser bastante complicado, se ha optado por utilizar vidrios como medio de soporte. El procedimiento de preparación es muy sencillo y hace uso de algunos recursos del laboratorio de microelectrónica:

Paso 1. Se preparan vidrios de 26 mm x 40 mm obtenidos cortando a esta medida vidrios porta-objetos de tamaño estándar.

Paso 2. Se efectúa limpieza y desengrasado de los vidrios mediante la aplicación sucesiva de tricloroetileno (TCE), acetona y piraña $(H_2SO_4: H_2O_2)$, los vidrios se enjuagan con agua desionizada (DI) y se secan en la centrífuga.

Paso 3. Se evapora 1 µm de aluminio de alta pureza (99.999%) a los vidrios.

Paso 4. Se aplica foto-resina positiva y se endurece en horno de convección a 85°C durante 17 minutos.

Paso 5. Se transfiere el patrón geométrico y se revela la foto-resina.

Paso 6. El endurecimiento de foto-resina se finaliza con un periodo de 25 minutos a 105°C.

Paso 7. Se definen los patrones con una solución grabante de aluminio a 45°C por 8 minutos.

Paso 8. Se remueve la foto-resina mediante lavado con acetona y enjuague con agua DI.

Paso 9. Las micropuntas se montan en el vidrio utilizando un pegamento de contacto.

Paso 10. Se alambra de cada pad de la micropunta a la pista correspondiente del vidrio de montaje.



Figura 3. Fotografía SEM del bisel de la micropunta.

Paso 11. Se procede a encapsular el área de pads, alambres de interconexión y las pistas del vidrio con foto-resina positiva aplicada con gotero, la aplicación debe ser cuidadosa, puesto que la resina en exceso puede tapar las áreas de registro. La foto-resina es endurecida en horno de convección a 75°C durante 1 hora.

Los resultados obtenidos se observan en la Figura 7.

El encapsulado mostrado pese a ser también una implementación totalmente artesanal posee varias ventajas:

- 1. Es muy sencillo.
- 2. Económico.
- 3. Funcional.



Figura 4. Fotografía SEM del extremo afilado de la micropunta.



Figura 5. Fotografía SEM que muestra en detalle el área de registro.

 Fácil de reproducir con alto grado de repetitividad.

CARACTERIZACIÓN ELÉCTRICA DE MEP'S

Los microelectrodos convencionales (agujas metálicas afiladas y tubos de vidrio) han sido usados a lo largo de las décadas pasadas y su metodología de experimentación es bien conocida⁹. Típicamente para micro-electrodos no planares



Figura 6. Montaje de la micropunta usando un encapsulado tipo DIP.



Figura 7. La figura muestra el montaje para la micropunta triple a base de patrones de aluminio transferidos en vidrio.



Figura 8. Montaje para la caracterización de microelectrodos no planares⁹.

se utiliza el siguiente montaje de la Figura 8, para determinar la impedancia del circuito.

En el montaje anterior, una señal proveniente de un generador de funciones es inyectada al



Figura 9. Montaje para medición de las señales generadas en un nervio *in vitro*.



Figura 10. Esquema del montaje usado para la caracterización I-V.



Figura 11. Montaje para pruebas I-V, con placa de pruebas.

medio salino a través de un alambre de oro, la señal es recogida por el electrodo bajo prueba y registrada en un osciloscopio.

Este montaje es similar al usado para aplicaciones de medición de tejidos *in vitro*¹⁰. La Figura 9 ilustra esta técnica.

Nuevamente tenemos como medio iónico conductor, una solución salina en la cual se ha colocado un electrodo de referencia, el tejido bajo estudio (i.e. un nervio diseccionado de un ejemplar), es colocado en la solución salina con el microelectrodo insertado. La señal recogida es acondicionada en una etapa amplificadora y luego es registrada en un osciloscopio.

CARACTERIZACIÓN ELÉCTRICA EN DC

La técnica convencional para caracterizar la impedancia típica de los microelectrodos, consiste en:



Figura 12. Curva I-V de una micropunta con impedancia de 4.54 M Ω .



Figura 13. Diagrama esquemático que muestra el montaje para determinar la impedancia de acoplamiento entre los canales de las micropuntas.

- Como fuente de excitación se usa un generador de señales ajustado para proporcionar una señal de una frecuencia de 1 Khz.
- Entre la señal del generador y la entrada del osciloscopio se coloca una resistencia de 330 KΩ, la escala de voltaje del osciloscopio se ajusta para que muestre una lectura a plena escala y se marca el punto de ajuste.
- 3. El sistema es calibrado utilizando resistencias con valores de 1 M Ω , 3.3 M Ω y 10 M Ω , y se procede a marcar las escalas en el oscilos-copio.
- 4. Los electrodos se prueban sumergiéndolos en el medio salino, y la lectura del osciloscopio debe corresponder a un valor entre 1 M Ω y 10 M Ω . La lectura no debe caer por abajo del valor de 1 M Ω a menos que el aislamiento del dispositivo este dañado.

Esta técnica funciona bien, pero resulta ser bastante complicada e inexacta debido a que el valor de la señal obtenida con las resistencias fantasma se obtiene en forma gráfica y no numérica. Para la caracterización de las micropuntas hemos hecho uso de un analizador de parámetros de semiconductores marca Hewlett-Packard Modelo HP4156A, el cual de una manera directa nos da un archivo con el listado de los puntos de lectura, los cuales posteriormente son graficados con el programa Microcal Origin, y de esta manera obtenemos el valor directo de resistencia del dispositivo. En las Figuras 10 y 11 se muestra una de las micropuntas fabricadas colocadas en el soporte de vidrio.

Como medio iónico se ha elegido un suero conocido como solución Hartmann, este suero fisiológico tiene propiedades iónicas similares a los



Figura 14. Acoplamiento de señal del orden del 10% de la señal de entrada.



Figura 16. Micro-electrodo triple, lectura correspondiente a una impedancia de 1 M Ω .



Figura 15. Montaje para caracterización con una señal cuadrada.



Figura 17. Gráfica donde se muestra el retardo de la señal (24.4 nseg) para electrodos con 1 mm de distancia.

fluidos biológicos. La solución Hartmann está constituida de:

- Lactato de sodio 3.1 g/l,
- Cloruro de sodio 6 g/l,
- Cloruro de potasio 0.3 g/l,
- Cloruro de calcio 0.2 g/l

Usando el montaje mostrado en el esquema de la Figura 10, se aplica una señal rampa de 0 a 100 m Ω y se programan pasos de 1 mV, lo cual nos da 100 puntos de lectura por medición. La gráfica obtenida se muestra en la Figura 12.

La impedancia obtenida en este caso es de 4.54 M Ω , el cual concuerda con los resultados calculados previamente. A lo largo de esta etapa, se caracterizaron varias micro-puntas del lote fabricado encontrándose resultados consistentes y repetitivos en el rango de 1 hasta 6 M Ω .

DETERMINACIÓN DE LA RAZÓN DE ACOPLAMIENTO ENTRE DOS ELECTRODOS

Las líneas de interconexión de las micro-puntas llegan a exhibir un acoplamiento de la señal, el cual puede estimarse con ayuda del diagrama esquemático de la Figura 13.

Para este montaje hacemos uso del siguiente equipo:

- Generador de funciones marca Tektronix Modelo CFG253
- Osciloscopio digital marca Agilent Modelo 54622D.

En la Figura anterior, podemos observar que la salida del generador de funciones (100 mV a 1



Figura 18. Gráfica con el retardo de la señal (40.4 ns) entre las puntas con separación de 2 mm.

KHz) es conectada a una de las áreas de registro, mientras que la punta de prueba del osciloscopio se conecta a otro de los canales, ambos equipos comparten la línea de tierra. Las mediciones se llevan a cabo sin sumergir la micropunta en el medio salino de pruebas.

A lo largo de la secuencia experimental se han encontrado valores que van desde un 4% hasta un 10% de acoplamiento en el aire lo cual es cercano a lo reportado por otros investigadores⁹, un ejemplo de las mediciones obtenidas se muestra en la Figura 14.

CARACTERIZACIÓN DE SEÑALES PEQUEÑAS EN ESTADO DE REPOSO

En esta etapa de caracterización, se aplica una señal cuadrada de 100 mV con una frecuencia de 1 KHz. Para observar la respuesta del dispositivo en el medio iónico, usamos la implementación de la Figura 15.

El montaje es básicamente el mismo que el usado para determinar la señal de acoplamiento (Figura 13), pero en esta ocasión el microelectrodo es sumergido en el medio salino (solución Hartmann). El generador de señales se ajusta para producir una salida de 100 mV de pico a pico a 1 KHz. Los resultados se observan en la Figura 16.

El valor de la impedancia de las micro-puntas fabricadas se ha establecido mediante la medición de resistencia dinámica obtenida con la técnica I-V en el sistema SPA y se obtienen valores en el rango de 1 M Ω a 6 M Ω .

MEDICIÓN DE LA VELOCIDAD DE PROPAGACIÓN DE LA SEÑAL ENTRE DOS ELECTRODOS

Las micropuntas tipo puente triple pueden ser utilizadas para el registro de la velocidad de conducción de neuronas, usando la técnica de medición bifásica¹¹.

Para ello, se utiliza el montaje anterior y se aplica la señal de 100 mVpp a 1 KHz, sin embargo para esta lectura sólo nos interesa ver la diferencia de tiempo existente entre ambas señales. La señal aplicada por el generador que está siendo monitoreada en el canal 1 del osciloscopio y la señal recogida en el segundo canal del osciloscopio.

La Figura 17, muestra la diferencia entre la señal de entrada y la señal de salida para los electrodos con separación de 1 mm, mientras la Figura 18, muestra el retardo para los electrodos con 2 mm de separación.

Los resultados de esta caracterización son consistentes y demuestran la factibilidad de uso de este tipo de electrodos para medir la velocidad de conducción de potenciales de acción en los axones de las neuronas, puesto que las velocidades obtenidas aquí son superiores a las que poseen las fibras nerviosas.

CONCLUSIONES

A lo largo de este comunicado se ha presentado la metodología y resultados obtenidos durante la caracterización eléctrica de las micropuntas fabricadas en el Laboratorio de Microelectrónica del Instituto.

La caracterización en DC utilizando el método I-V y el analizador de parámetros de semiconductores aporta resultados comparables a los obtenidos por otros grupos de investigadores que han fabricado dispositivos similares.

Así mismo, las mediciones de impedancia de acoplamiento y velocidad de propagación de la señal entre los electrodos, aportan valores adecuados para su utilización en el registro y monitoreo de señales en tejidos biológicos.

RECONOCIMIENTOS

Al CONACYT por el apoyo dado a este proyecto.

Al Departamento de Física de Estado Sólido del CINVESTAV y en especial a la M.C. Ana Berta Soto por las fotografías SEM. A los técnicos del laboratorio de Microelectrónica del INAOE.

BIBLIOGRAFÍA

- Najafi K, Wise KD. An Implantable Multielectrode Array with On-chip Signal Processing, IEEE Journal of Solid-State Circuits, SC-21, 1986: 6.
- Aragon J, Calleja W, Sandoval F. Micromachined siliconbased microelectrode using titanium metallization: A simplified fabrication process, Proc. Of the 12th European Conference on Solid State Transducers Eurosensors, Southampton, England, 13-16 Sept, 1998: 63.
- Madou MJ, Morrison SR. Chemical Sensing with Solid State Devices, Academic Press Inc, 1989.
- Najafi K, Ji J, Wise KD. Scaling Limitations of Silicon Multichannel Recording Probes, IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 1990; 37(1): 1-10.
- Edell DJ, Tai VV, McNeil VM, Clark LID, Factors Influencing the Biocompatibility of insertable Silicon Microshafts in Cerebral Cortex, IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 1992; 39(6): 635-643.
- Banks D, Ewins DJ, Balachandran W, Richards PR. Microengineered interfaces with the nervous system, Base de datos IEEE, CD-ROM 1996.
- Mastrototaro JJ, Massoud HZ, Pilkington TC, Ideker RE. Rigid and Flexible Thin-Film Multielectrode Arrays for Transmural Cardiac Recording, IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 1992; 39(3): 271-279.
- Najafi K, Wise KD, Mochizuki T. A High-Yield IC-Compatible Multichannel Recording Array, IEEE Transactions on Electron Devices, 1985: ED-32(7).
- Banks DJ. Modelling studies on peripheral nerve neural signal transduction using thin-film microelectrodes, Tesis de Doctorado, Universidad de Surrey, 1994.
- 10. Robinson DA. The electrical properties of metal microelectrodes, Proceedings of the IEEE, 1968; 56(6).
- 11. Ruch TC, Patton HD. Physiology and Biophysics. W.B. Saunders Company, 1965.
- Bement SL, Wise KD, Anderson DJ, Najafi K, Drake KL. Solid-State Electrodes for Multichannel Multiplexed Intracortical Neuronal recording, IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 1986; 33: 230-241.

