



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE FÍSICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

LAURA MAÍSA SOUZA DOS SANTOS

FOTORESINAS BIOCOMPATÍVEIS PARA  
MICROFABRICAÇÃO DE ARCABOUÇOS CELULARES  
TRIDIMENSIONAIS

MACEIÓ, AL  
MARÇO DE 2021

**LAURA MAÍSA SOUZA DOS SANTOS**

**FOTORESINAS BIOCAMPATÍVEIS PARA  
MICROFABRICAÇÃO DE ARCABOUÇOS CELULARES  
TRIDIMENSIONAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Matéria Condensada do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Física, sob orientação do Prof. Dr. Eduardo Jorge da Silva Fonseca.

**MACEIÓ, AL  
MARÇO DE 2021**

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
Bibliotecária: Livia Silva dos Santos – CRB-4 – 1670

S237f Santos, Laura Máisa Souza dos.

Fotoresinas biocompatíveis para microfabricação de arcabouços celulares tridimensionais/ Laura Máisa Souza dos Santos. – 2021.  
105 f.:il.

Orientador: Eduardo Jorge da Silva Fonseca.

Dissertação (Mestrado em Física da Matéria) – Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Física. Programa de Pós-Graduação em Física. Maceió, 2021.

Bibliografia: f. 95-96

Apêndice: f. 101-105

1. Fotoresinas biocompatíveis. 2. Arcabouços celulares. 3. Nanopartículas.  
4. Absorção de dois fótons (P2F). I. Título.

CDU: 53



**Universidade Federal de Alagoas**  
**Instituto de Física**  
Programa de Pós Graduação em Física

BR 104 km 14. Campus A.C. Simões  
Cidade Universitária  
Tabuleiro dos Martins  
57072-970 Maceió - AL, Brasil  
FONE : (82) 3214-1423/FAX 3214-1645

**PARECER DA BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE**  
**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**“Fotoresinas Biocompatíveis para Microfabricação de Arcabouços Celulares**  
**Tridimensionais”**

**por**

**Laura Máisa Souza dos Santos**

A Banca Examinadora composta pelos professores Eduardo Jorge da Silva Fonseca (orientador e presidente da banca), do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas; Glauber Jose Ferreira Tomaz da Silva, do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas e Emiliano de Oliveira Barreto, do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, consideram a candidata aprovada com grau “A”.

Maceió, 12 de março de 2021.

Prof. Dr. Eduardo Jorge da Silva Fonseca

Prof. Dr. Glauber Jose Ferreira Tomaz da Silva

Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto



*Dedico este trabalho à minha mãe  
Maura José de Souza, ao meu pa-  
drasto Valdeir Souza Aguilár e aos  
meus irmãos Mayara Beatriz Souza  
dos Santos e Emanuel Henrique Souza  
dos Santos.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por todas as bênçãos em minha vida, por sempre está presente em meu caminhar, por renovar as minhas forças todos os dias a cada desafio na busca dos meus sonhos e por colocar em meu caminho pessoas que me ajudaram e acreditaram em mim. À minha mãe e meu padrasto, Maura e Valdeir, por todo amor, por acreditarem no meu potencial, pelo apoio e incentivo incondicional nos meus estudos e por terem investido na minha formação acadêmica. Vocês são a razão da minha dedicação e da realização deste sonho. Aos meus irmãos, Emanuel Henrique e Mayara Beatriz e ao meu cunhado Wesley, pelo carinho, amor e apoio de sempre. Ao meu namorado, Raphael pelo amor, apoio, paciência e compreensão nos meus momentos de ausência. A todos os meus familiares, aos amigos, agradeço o apoio e o carinho. Às minhas colegas Camila, Cibele e Elaine por me receberem tão bem em Maceió.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Eduardo Fonseca, minha eterna gratidão, pela confiança, pelo grande apoio, pelos ensinamentos e oportunidade de trabalhar nesta nova linha de pesquisa, muito interessante e ao mesmo tempo desafiadora, que me possibilita trabalhar em conjunto com grupos de pesquisa de outras áreas, assim como, por ele ter enorme compromisso com a ciência, envolvendo e incentivando todos ao seu redor. Ao meu colega de grupo Prof. Ms. Jonathas por ser um grande amigo e excelente pesquisador, por ter dedicado seu tempo em me ensinar à beleza da pesquisa em microfabricação a laser, por sempre está disposto a ajudar, pela paciência e por ele me motivar cada dia mais com sua sabedoria e experiência. Pretendo continuar aprendendo ainda mais com seus ensinamentos.

A Prof<sup>a</sup>. Dra Anielle e ao Prof. Dr. Noelio, por terem disponibilizado as nanopartículas utilizadas na síntese das fotoresinas. Agradeço pela confiança e colaboração. Ao Prof. Dr. Emiliano Barreto, por sua colaboração, pela confiança e por ter disponibilizado as células, e aos pesquisadores Liliane e Julianderson por dedicarem seu tempo em desenvolver os ensaios biológicos, ensinar os processos de preparação e cultura das células para as análises de AFM. Ao Prof. Dr. Carlos Jacinto do Grupo de Nano-Fotônica e Imagem por disponibilizar o acesso em seu laboratório para uso de equipamentos de medidas.

A colega de grupo Elaine, pela disponibilidade em realizar as medidas AFM em laboratório, sua ajuda foi muito importante no desenvolvido deste trabalho, ao José Carlos, pelo desenvolvimento de programas matemáticos para modelos 3D de arcabouços, e a técnica de laboratório Ana, por me ajudar nas medidas de MEV no laboratório. A todos os colegas do grupo de Óptica e Nanoscopia, por fazerem me sentir parte do grupo e pelo compromisso em desenvolver atividades de pesquisa.

A todos os professores do Departamento de Física da UNIR, em Rondônia, pelos conhecimentos e contribuições na minha formação durante a graduação, em especial, aos professores que foram meus orientadores do PIBIC, Prof. Dr. Quesle e Prof. Dr. Marco Polo, pela oportunidade e incentivo em desenvolver pesquisa científica. A todos os professores do Instituto de Física da UFAL, pelos ensinamentos importantes em minha formação acadêmica. Agradeço também a todos os técnicos e demais funcionários do Instituto. A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para minha formação e na realização deste projeto. Ao CNPq pelo suporte financeiro, sem o qual não seria possível a realização desta pesquisa.

*“Pois o Senhor é quem dá sabedoria; de sua boca procedem o conhecimento  
e o discernimento.”*

**Provérbios 2:6**

## RESUMO

A técnica aditiva de Polimerização via Absorção de dois Fótons (P2F) tornou-se um excelente método de microfabricação dentre os muitos processos existentes, por permitir a construção de microestruturas tridimensionais com elevada resolução espacial da ordem submicrométrica, com alta complexidade geométrica e com utilização mínima do material fotossensível. Esta poderosa ferramenta tem atraído o interesse de diversas áreas da ciência, incluindo a área da engenharia de tecidos com aplicação na confecção de arcabouços tridimensionais para cultura celular. Estes microambientes são projetados para mimetizar ambientes *in vivo* e expressar suas características mais importantes possibilitando o estudo do comportamento celular e o tratamento de doenças com teste de fármacos. As resinas fotossensíveis são a matéria prima para construção dos arcabouços e, embora exista uma ampla disponibilidade destes materiais para estudos biológicos, há uma grande preocupação em tornar as fotoresinas compostos biocompatíveis e com reduzida citotoxicidade. Neste trabalho, foi investigado o impacto da incorporação de nanopartículas (NPs) semicondutoras de CdSe/CdS e dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) em fotoresinas à base de Pentaerythritol Triacrylate (PETA) e Irgacure 369, pelo uso de diferentes técnicas experimentais, como espectroscopia de absorção óptica e espectroscopia de fluorescência. Também foram avaliados nestas fotoresinas, o grau de conversão (GC) pela espectroscopia Raman, os parâmetros de escrita, a citotoxicidade pelo método de exclusão do azul de tripan e as propriedades biomecânicas das células ósseas pelo Microscópio de Força Atômica (AFM). Os resultados obtidos demonstraram que não houve alteração no pico da banda de absorção das fotoresinas com adição das NPs, portanto, as características fotossensíveis são preservadas sendo aptas ao processo de P2F. Pelos espectros de fluorescência ( $\lambda_{Exc} = 400$  nm), foi constatado que conforme aumenta a concentração de TiO<sub>2</sub> na fotoresina, há o aumento da fotoluminescência com um alargamento da banda. Enquanto, a incorporação de CdSe/CdS reduz a fotoluminescência das amostras. Os valores do GC das fotoresinas incorporadas com CdSe/CdS e TiO<sub>2</sub> foram reduzidos de 21% para 19,5% e 17,1%, respectivamente. Este dado mostra que as NPs atuam como agentes inibidores nos processos de polimerização. Todas as fotoresinas incorporadas com NPs demonstraram biocompatibilidade aceitável. Em destaque, a amostra com TiO<sub>2</sub> manifestou baixa citotoxicidade e alta taxa de proliferação celular que se manteve superior ao grupo controle durante 48 h. Foram determinados os parâmetros de escrita adequados que elevaram a resolução das microestruturas até valores submicrométricos. Em seguida, arcabouços tipo microgroove, em diferentes geometrias, foram fabricados e demonstraram excelentes condições estruturais com arquitetura compatível ao desenho 3D projetado no software *nFab*, sem encolhimento ou deformações das paredes. Em relação às propriedades biomecânicas, os osteoblastos humanos da linhagem MG-63 em contato direto do arcabouço na geometria circular exibiram o módulo de Young significativamente maior com aumento de 93% em sua rigidez quando comparado as células semeadas sobre o arcabouço retangular. Estes resultados foram atribuídos à reorganização do citoesqueleto das células ósseas influenciado pela geometria e topografia curva do microambiente celular que oferece um maior estímulo na resposta biomecânica das células.

**Palavras-chave:** Fotoresina Biocompatível. Nanopartículas. Arcabouços celulares. Microscopia de Força Atômica. Polimerização via Absorção de dois fótons.

## ABSTRACT

The additive technique by Two-Photon Polymerization (P2F) has become an excellent microfabrication method among the many existing processes, as it allows the construction of three-dimensional microstructures with high spatial submicrometer resolution, with high geometric complexity and minimal use of photosensitive material. This powerful tool has attracted the interest of several areas of the science, including the area of tissue engineering with application in the manufacture of three-dimensional scaffold for cell culture. These microenvironments are designed to mimic environments in vivo and express their most important characteristics, enabling the study of the cellular behavior and the treatment of diseases with drug testing. Photosensitive resins are the raw material for the construction of scaffolds and, although there is a wide availability of these materials for biological studies, there is a great concern in making photoresist compounds biocompatible and with reduced cytotoxicity. In this work, the influence of the incorporation of semiconductor nanoparticles (NPs) of CdSe/CdS and titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) in photoresist based on Pentaerythritol Triacrylate (PETA) and Irgacure 369, by the use of different experimental techniques such as optical absorption spectroscopy and fluorescence spectroscopy. The degree of conversion (DC) by Raman spectroscopy, writing parameters, cytotoxicity by trypan blue exclusion method, and biomechanical properties of bone cells by Atomic Force Microscope (AFM) were also evaluated in these photoresists. The results obtained showed that there were no change in the peak of the absorption band of photoresist with the addition of NPs, therefore, the photosensitive characteristics are preserved, being suitable for the P2F process. From the fluorescence spectra ( $\lambda_{Exc} = 400$  nm), it was found that as the concentration of TiO<sub>2</sub> in the photoresist increases, there was an increase in photoluminescence with a broadening of the band. Meanwhile, the incorporation of CdSe/CdS reduces the photoluminescence of the samples. The DC values of photoresists incorporated with CdSe/CdS and TiO<sub>2</sub> were reduced from 21% to 19.5% and 17.1%, respectively. This data shows that NPs act as inhibitory agents in polymerization processes. All photoresists incorporated with NPs demonstrated acceptable biocompatibility. Notably, the sample with TiO<sub>2</sub> showed low cytotoxicity and a high cell proliferation rate, which remained higher than the control group for 48 h. Appropriate writing parameters that raised the resolution of microstructures to sub-micrometric values were determined. Then, microgroove type scaffolds, in different geometries, were manufactured and demonstrated excellent structural conditions with an architecture compatible with the 3D design projected in *n*Fab software, without shrinkage or deformation of the walls. Regarding biomechanical properties, human osteoblasts of the MG-63 lineage in direct contact with the framework in the circular geometry exhibited a significantly higher Young's modulus with a 93% increase in its stiffness when compared to cells seeded on the rectangular scaffold. These results were attributed to the reorganization of the bone cell cytoskeleton influenced by the geometry and curved topography of the cellular microenvironment, which offers a greater stimulus in the biomechanical response of the cells.

**Keywords:** Biocompatible photoresist. Nanoparticles. cellular scaffolds. Atomic Force Microscopy. Two-Photon Polymerization.

---

# Sumário

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
	Referências	4
<b>2</b>	<b>ABSORÇÃO DE DOIS FÓTONS (A2F) – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA, CONTEXTO HISTÓRICO E APLICAÇÕES</b>	<b>6</b>
2.1	CONTEXTO HISTÓRICO . . . . .	6
2.2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA . . . . .	7
2.2.1	Processo de absorção de dois fótons . . . . .	9
2.3	APLICAÇÕES . . . . .	14
2.3.1	Armazenamento óptico de dados . . . . .	14
2.3.2	Terapia fotodinâmica . . . . .	15
2.3.3	Microscopia multifotônica . . . . .	15
2.3.4	Microfabricação por P2F . . . . .	17
	Referências	18
<b>3</b>	<b>MICROFABRICAÇÃO VIA POLIMERIZAÇÃO POR ABSORÇÃO DE DOIS FÓTONS</b>	<b>22</b>
3.1	CONTEXTO HISTÓRICO . . . . .	22
3.2	POLIMERIZAÇÃO POR ABSORÇÃO DE DOIS FÓTONS (P2F) . . . . .	24
3.2.1	Tipos de resinas . . . . .	27
3.2.2	Grau de conversão . . . . .	28
3.3	RESINAS POLIMÉRICAS . . . . .	30
3.3.1	Monômero . . . . .	30
3.3.2	Fotoiniciador . . . . .	32
3.4	APARATO EXPERIMENTAL . . . . .	33
3.4.1	Compressão temporal: Laser de pulso ultracurto . . . . .	35
3.4.2	Compressão espacial: Limite de resolução do voxel . . . . .	35
3.4.3	Feixe gaussiano . . . . .	36
3.4.4	Objetivas de microscópio . . . . .	40
3.4.5	Distribuição espacial da propagação do feixe gaussiano pela lente objetiva . . . . .	43
3.4.6	Estágio de translação . . . . .	45
3.4.7	Sistema de imageamento em tempo real . . . . .	46
3.5	PROGRAMAÇÃO PARA CONFECÇÃO DAS MICROESTRUTURAS . . . . .	47
3.6	METODOLOGIA DA MICROFABRICAÇÃO . . . . .	48
	Referências	50

---

<b>4</b>	<b>MICROFABRICAÇÃO DE ARCABOUÇOS CELULARES TRIDIMENSIONAIS</b>	<b>54</b>
4.1	FOTORESINA BIOCAMPATÍVEL . . . . .	54
4.1.1	Pontos Quânticos Semicondutores Ultra-pequenos (USPQs) de CdSe/CdS	55
4.1.2	Dióxido de titânio (TiO <sub>2</sub> ) . . . . .	56
4.1.3	Síntese da fotoresina com incorporação das NPs . . . . .	57
4.2	CARACTERIZAÇÃO DAS FOTORESINAS . . . . .	61
4.2.1	Espectro de fluorescência . . . . .	61
4.2.2	Espectro de absorção óptica . . . . .	66
4.2.3	Espectroscopia Raman . . . . .	67
4.2.4	Investigação da influência dos parâmetros de escrita . . . . .	70
4.3	ENSAIOS BIOLÓGICOS . . . . .	74
4.3.1	Avaliação da viabilidade celular . . . . .	74
4.4	DESIGN E FABRICAÇÃO DE ARCABOUÇOS CELULARES . . . . .	79
4.5	CULTURA CELULAR TRIDIMENSIONAL . . . . .	86
4.5.1	Investigação do Módulo de Young das células Osteoblastos MG-63 via AFM . . . . .	90
	<b>Referências</b>	<b>95</b>
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS</b>	<b>99</b>
<b>A</b>	<b>APÊNDICE: Processos ópticos não lineares de terceira ordem</b>	<b>101</b>
A.0.1	Geração de terceiro harmônico . . . . .	101
A.0.2	Geração de soma e diferença de frequências . . . . .	103

---

## Lista de Figuras

2.1	Primeira comprovação experimental de A2F demonstrada pela emissão de fluorescência do cristal de $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{+2}$ sob incidência de luz vermelha 694,3 nm. . . . .	7
2.2	Ilustração do processo de (a) absorção linear e A2F no caso (b) degenerado (fótons têm mesma energia) e (c) não degenerado (fótons têm energias diferentes). Níveis virtuais são representados por linhas tracejadas e níveis reais por linhas preenchidas. . . . .	10
2.3	Ilustração do feixe de alta potência ao incidir no material de largura $d$ . . . . .	12
2.4	(a) Distribuição da densidade de fótons pela trajetória de lasers pulsados de femtossegundos. (b) Comparação da compressão temporal de fótons em lasers contínuos e pulsados. . . . .	13
2.5	Comparação do sinal de fluorescência de uma amostra com fluoresceína excitada por A1F e A2F. (c) Intensidade integrada associada à probabilidade de ocorrer A1F permanece sempre contínua ao longo do eixo óptico. (d) A intensidade ao quadrado integrada é maior no ponto focal, conseqüentemente, a probabilidade de A2F possui maior ocorrência nessa região. . . . .	14
2.6	Diferença entre o método CLSM e TPLSM. . . . .	16
3.1	Imagens MEV da microestrutura em formato espiral construída por microfabricação via P2F após processo de remoção de resíduos não solidificados. . . . .	23
3.2	Microestruturas fabricadas via P2F. (a) microvasos com poros, (b) modulador de luz, (c) arcabouço celular, (d) microagulhas para entrega de medicamentos e (e) microestrutura complexa. . . . .	23
3.3	Interação da radiação com a matéria, onde o feixe laser é focalizado na resina pela lente objetiva. . . . .	24
3.4	Esquema representativo do processo de reação fotoquímica da P2F, é destacado (a) quebra de ligação do FI, (b) obtenção do radical livre; (c) ligação entre o radical livre e a molécula do monômero, seguido pela quebra da ligação dupla $\text{C}=\text{C}$ e (d) formação dos centros ativos. . . . .	25
3.5	Microestruturas obtidas de acordo com a intensidade do feixe gaussiano. (a) Para intensidades acima do limiar de polimerização ocorrem microexplosões, (b) intensidades próximas do limiar se obtém estruturas rígidas com boa qualidade e (c) muito abaixo não ocorre polimerização. . . . .	27
3.6	Esquema ilustra a diferença básica entre as resinas (a) positiva e (b) negativa no processo de exposição à luz UV. . . . .	28
3.7	Típico espectro Raman da resina polimérica não polimerizada (curva em vermelho) e polimerizada (curva em preto) por UV. . . . .	29
3.8	Estrutura molecular do (a) monômero triacrilato PETA em 2D e (b) em 3D; (c) monômero diacrilato PEGda; (d) grupo Carbonila e (e) Vinil. . . . .	31
3.9	(a) Estrutura molecular e (b) espectro UV-Visible do IRG 369 puro dissolvido em álcool isopropílico. . . . .	32
3.10	Estrutura molecular do (a) IRG 2959 e (c) IRG 819. Espectro de absorção do FI (b) IRG 2959 e (d) IRG 819 obtido pelo espectrofotômetro UV-VIS-NIR (espectrômetro UV-3600, Shimadzu). . . . .	33
3.11	Configuração experimental para fabricação de microestruturas tridimensionais via P2F. . . . .	34
3.12	Processo de formação de uma microestrutura a partir de vários voxel sobrepostos, onde $dx$ e $dz$ representam o diâmetro e altura do voxel, respectivamente. . . . .	35
3.13	Representação da intersecção do voxel conforme a metodologia de escrita, $\Delta X$ e $\Delta Z$ são as distâncias de dois voxel nas direções $x$ e $z$ , respectivamente. . . . .	36



---

3.14	(a) Representação da distribuição espacial de intensidade de um feixe gaussiano simétrico em três dimensões. (b) Representação da densidade espacial de um feixe gaussiano simétrico em duas dimensões, onde a intensidade diminui do branco ao preto. Consideram-se os seguintes parâmetros: $W_0 = 2$ mm, $\lambda = 632,8$ nm, $z = 0$ e $z_R = 19,85$ m. (c) Representação das frentes de ondas planas de um feixe Gaussiano, reproduzida no software Mathmod versão 8.0, geradas pelas seguintes equações: $z = 0, z = 1, z = 2$ e $z = 3$ . . . .	37
3.15	Largura do feixe gaussiano $W(z)$ como função da distância $z$ ao longo do feixe (em vermelho). Onde são destacados os parâmetros, como: raio mínima da cintura do feixe $W_0$ ; intervalo de Rayleigh $z_R$ e espalhamento angular ou ângulo de divergência $\theta$ . . . .	38
3.16	Intensidade normalizada do feixe de luz $I_{gaussiano}(r, z)/I_0$ como função da distância radial $r$ em diferentes distâncias axiais, dada por: (a) $z = 0$ ; (b) $z = z_R$ ; (c) $z = 2z_R$ . . . .	38
3.17	Lentes objetivas com diferentes aberturas numéricas para $n = 1$ : (a) $\theta = 15^\circ$ e $NA = 0,25$ ; (b) $\theta = 24,8^\circ$ e $NA = 0,42$ ; (c) $\theta = 72,1^\circ$ e $NA = 0,95$ . . . . .	40
3.18	Geometria de um feixe luz incidindo sobre uma lente. . . . .	41
3.19	Comparação entre o voxel formado de acordo com a lente objetiva, (a) para $NA = 0,25$ e (b) $NA = 0,65$ . Quanto maior à abertura numérica melhor o poder de resolução, porém menor será w.d. . . . .	42
3.20	Feixe gaussiano transmitido através de uma lente objetiva de microscópio com abertura angular $\theta$ . . . . .	43
3.21	Ilustração da distribuição espacial do feixe gaussiano ao interagir com a lente objetiva de microscópio: (a) Configuração sem aproximação; (b) é feito a aproximação de que $z' \approx f$ . . . . .	44
3.22	Estágio de translação do sistema de microfabricação. . . . .	46
3.23	Interface gráfica do software <i>nFab</i> usado para microfabricação por escrita direta a laser. . . . .	48
3.24	Etapas principais da microfabricação por escrita direta a laser. . . . .	48
3.25	Representação dos voxel de acordo com a distância do eixo $z$ . . . . .	49
4.1	(a) Ilustração representativa das NPs de CdSe/CdS. . . . .	55
4.2	Imagem via HRTEM de NPs de TiO <sub>2</sub> . É mostrado no quadro da esquerda aglomerados de NPs em diferentes formatos devido à mistura das fases e as franjas da rede. . . . .	56
4.3	Componentes necessários para síntese das fotoreinas (a) PETA, FI e NPs de CdSe/CdS e TiO <sub>2</sub> . (b) Volumes de resinas polimerizados por luz UV. . . . .	57
4.4	Ilustração da síntese das fotoreinas incorporadas com CdSe/CdS: (1) colocado etanol na solução aquosa, (2) centrifugado para obter o <i>pellet</i> , (3) despejou PETA com FI e (4) agitação no mixer. . . . .	58
4.5	Ilustração do processo de síntese das fotoreinas incorporadas com TiO <sub>2</sub> : (1) solvatação do IRG 369, NPs e etanol, (2) colocado PETA e (3) agitação contínua. . . . .	59
4.6	Posicionamento da resina no sistema experimental. . . . .	60
4.7	Exemplos de resinas polimerizadas por UV. Legendas: A3, A6 e A9 possuem 0,25%, 0,5% e 1,5% em massa de CdSe/CdS adicionada a PETA: 0,5%FI IGR 369, respectivamente. . . . .	61
4.8	Espectro de fluorescência das resinas fotossensíveis constituída de FI IRG 369 dissolvido em PETA (P.2.0 e P.0.5) variado $\lambda_{Exc}$ de 350 a 400 nm durante (a-b) 15 min e (c-d) 8-10 h no UV. . . . .	62
4.9	Espectro de fluorescência das resinas fotossensíveis constituída de IRG 369 dissolvido em PETA (P.2.0 e P.0.5) variado $\lambda_{Exc}$ de 410 a 490 nm durante (a-b) 15 min e (c-d) 8-10 h no UV. . . . .	63
4.10	Espectro de fluorescência das resinas fotossensíveis constituída de fotoiniciador (IRG 369) dissolvido em PETA (P.2.0 e P.0.5) variado $\lambda_{Exc}$ de 550 a 590 nm durante (a-b) 15 minutos e (c-d) 8-10 horas no UV. . . . .	64

4.11	Microtubo com células endotélias (indicadas pelas setas amarelas) foram marcadas com corante celular emitindo na faixa do azul. Imagem de (a) microscópio óptico e (b) microscopia de fluorescência. Barra de escala = 50 $\mu\text{m}$ . . . . .	65
4.12	Espectro de fluorescência das fotoresinas constituídas de IRG 369 dissolvido em PETA (P.2.0 e P.0.5) com adição dos QDs (A1) e do $\text{TiO}_2$ (T1 e T3) variado $\lambda_{Exc}$ em (a) 350, (b) 400 e (c) 450 nm. Fluorescência das amostras (d) P.0.5 e (e) A1 excitadas em 400 nm. . . . .	66
4.13	Espectro de absorção pelo UV-Vis do FI (0.5% de IRG 369) dissolvido em PETA na presença de (a) QDs CdSe/CdS e (b) $\text{TiO}_2$ . . . . .	67
4.14	Espectros Raman de fotoresinas com diferentes concentrações de NPs CdSe/CdS e $\text{TiO}_2$ em volumes (a) não polimerizados e (b) polimerizados por UV. São destacados os picos dos modos vibracionais de interesse. . . . .	68
4.15	Grau de conversão dos filmes de resinas em função da concentração de NPs CdSe/CdS e $\text{TiO}_2$ (% massa de NPs em relação à PETA). . . . .	69
4.16	A potência mínima em função do tempo de exposição para resinas. . . . .	70
4.17	Resultado experimental dos (a) voxel na lâmina com $P = 30 \text{ mW}$ e $t_{exp} = 10 \text{ ms}$ em diferentes posições no eixo $z$ e (b) Ilustração do esquema experimental. . . . .	71
4.18	Exemplos de uma má fixação dos voxel que formavam as microestruturas. . . . .	72
4.19	(a) Largura de linha fabricadas na resina P.0.5 e (b) para diferentes $P = 3\text{--}30 \text{ mW}$ e $V = 100\text{--}200 \mu\text{m/s}$ . . . . .	72
4.20	(a) Gráfico da altura de linhas fabricadas em diferentes velocidade. A Potência é fixada em 10 mW. (b) Caracterização das alturas das linhas por MEV. . . . .	73
4.21	Largura de linha fabricadas na resina A1 para $P$ variando entre 20 a 160 mW e $V = 100\mu\text{m/s}$ . . . . .	74
4.22	Placas de 96 poços com fotoresinas polimerizadas após o processo de lavagem com álcool etílico e tratamento com água destilada. . . . .	75
4.23	Efeito das amostras de fotoresina sobre a viabilidade dos osteoblastos MG-63 por 24, 48 e 72 h. As barras representam a contagem de células viáveis após cada tempo de exposição. A linha pontilhada representa a quantidade de células no início do experimento (0h). . . . .	77
4.24	Ensaio biológico das células Osteoblastos (indicada pela seta em amarelo) semeadas após 48 h em amostras contendo 2% de IRG 369 (P.2 e P.2 ( $\text{H}_2\text{O}$ )), 0,5% de IRG 369 (P.0.5, A1 e T1) e poliestireno (CTL). Barra de escala = 10 $\mu\text{m}$ . . . . .	78
4.25	Esquema representa direção e sentido da trajetória do laser focalizado na resina para confeccionar uma camada formada por (a) linhas paralelas e (b) espiral. . . . .	82
4.26	(A) Ilustração dos micro-grooves feitos em cima da superfície do substrato (resina), <b>a</b> : largura da coluna, <b>b</b> : largura do groove, <b>c</b> : altura da coluna; (B) Visto da seção transversal no plano $zx$ . . . . .	82
4.27	(A) e (C) Criação do modelo sólido por meio de uma ferramenta de design 3D. (B) e (D) Visualização do arquivo de vetorização com as configurações para execução da escrita. . . . .	83
4.28	Imagens de microscópio óptico do filme T1 com microestruturas (barra de escala = 50 $\mu\text{m}$ ). . . . .	85
4.29	Imagens MEV do Filme T1 com microestruturas Microgroove. . . . .	86
4.30	Imagens de microscópio óptico das células MG-63 (indicado pelas setas em amarelo) após 72 h no meio de cultura. (a) MGR e (c) MGC com (b: 20 $\mu\text{m}$ ); (b) MGR e (d) MGC com (b: 10 $\mu\text{m}$ ). Barra de escala = 50 $\mu\text{m}$ . . . . .	87
4.31	Imagens ópticas de células MG-63 (seta em amarelo) fixadas após 72 h de cultura em (a) arcabouço MGR, (b) arcabouço MGC (b: 20 $\mu\text{m}$ ), (c) Filme T1 e (d) Filme PI59. Barra de escala = 40 $\mu\text{m}$ . . . . .	88

---

4.32	(a) Razão de alongamento e (b) área celular média relativa. Morfologia dos osteoblastos MG-63 cultivados por 3 dias em diferentes superfícies, ampliação de 50x. Amostra (c) MGR e (d) MGC (b: 20 $\mu\text{m}$ ), (e) Filme T1 e (f) Filme PI59. . . . .	89
4.33	Módulo de Young de osteoblastos MG-63 cultivados após 3 dias no grupo (a) Filme T1, MGR e MGC e (b) Filme T1 e Filme PI59. O módulo de Young médio é dado pela linha horizontal dentro de cada caixa. . . . .	93
A.1	Ilustração da (a) geração de terceiro harmônico. (b) Descrição do diagrama de níveis virtuais de energia (linhas pontilhadas representam níveis virtuais e linha preenchida nível real). . . . .	102
A.2	Ilustração da propagação de um feixe de luz (a) no meio não linear que possui $n_2 > 0$ com efeito de autofocalização; (b) comportamento da lente convergente de espessura D. . . . .	103
A.3	Esquema ilustra três ondas na entrada de um meio caracterizado por $\chi^{(3)} > 0$ , que dão origem ao (a) processo de geração de soma de frequência; (b) Diagrama de níveis de energia. . . . .	105
A.4	(a) Esquema do processo de geração de diferença de frequência; (b) Diagrama de níveis de energia. Níveis virtuais são representados por linhas tracejadas e níveis reais por linhas preenchidas. . . . .	105

---

## Lista de Abreviaturas e Siglas

A1F	Absorção de um Fóton
A2F	Absorção de dois Fótons
ALP	Fosfatase Alcalina
CLSM	Confocal Laser-Scanning Microscopy
Col-1	Colágeno tipo 1
CS-USQDs	Core-Shell Ultrasmall Quantum Dots
ELA	Esclerose Lateral Amiotrófica
FI	Fotoiniciador
GC	Grau ou taxa de Conversão
HRTEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão de Alta Resolução
IR	Infravermelho
IRG	Irgacure
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MGC	Micro-Grooves Circular
MGR	Micro-Grooves Retangular
NPs	Nanopartículas
OC	Osteocalcina
P2F	Polimerização por Absorção de Dois Fótons
PEG-DA	Poly(ethylene glycol) Diacrylate
PETA	Pentaerythritol Triacrylate
PMMA	Poly(methylmethacrylate)
TPLSM	Two-Photon Laser-Scanning Microscopy
UV	Ultravioleta
w.d	Distância de trabalho

# 1 INTRODUÇÃO

A criação do laser permitiu o surgimento de inúmeras linhas de pesquisas que envolvem as noções básicas da óptica não linear, uma vez que, a maioria dos fenômenos físicos não lineares somente foram possíveis de serem reproduzidos experimentalmente com utilização de fontes com altas intensidades. Neste regime é constatada a mudança das propriedades ópticas dos materiais que passam a ter dependência com a intensidade da fonte luminosa.

Anos após a invenção do primeiro laser, os primeiros fenômenos ópticos não lineares observados foram a geração de segundo harmônico por Franken et al. [1] e a comprovação experimental do efeito de absorção de dois fótons (A2F) por Kaiser e Garrett [2] proposto teoricamente por Maria Göppert-Mayer [3]. Com a modernização dos lasers, diversos outros fenômenos foram descobertos e estudados. Desta forma, houve um crescente avanço neste campo de pesquisa com aplicações em áreas como fotônica, mas também na microscopia de fluorescência, armazenamento óptico, terapia fotodinâmica e microfabricação [4-8], associados ao processo de absorção multifotônica, que é à base teórica de várias aplicações.

A microfabricação por escrita direta a laser ao explorar os fundamentos dos processos ópticos não lineares, em particular, por meio do processo de A2F, permite que a polimerização da resina fotossensível seja restrita apenas em torno do volume focal do laser. Como resultado se obtém um elemento de volume polimerizado com tamanho micrométrico ou até mesmo nanométrico, conhecido por voxel [9]. Esta configuração é obtida porque a taxa de ocorrência da A2F depende diretamente com o quadrado da intensidade, sendo assim, somente no ponto focal a intensidade é elevada o suficiente para gerar tal fenômeno. Portanto, a técnica de Polimerização por Absorção de dois Fótons (P2F) permite ser utilizada com sucesso na confecção de diversas estruturas em escala micrométrica e submicrométricas.

Na engenharia de tecido, a cultura de células ósseas no interior de microestruturas tridimensionais elaboradas pela técnica de microfabricação via P2F se tornou uma estratégia eficiente em estabelecer métodos e rotas adequados para promover a regeneração de tecidos ósseos danificados, visto que, o arcabouço tem como papel fundamental proporcionar as células um suporte tridimensional sintético temporário que permita sua proliferação e diferenciação até o crescimento do novo tecido ósseo [10].

Portanto, este método de fabricação versátil admite projetar arcabouços celulares com geometrias específicas, com diferentes tamanhos e formatos de poros que imitam o ambiente *in vivo* das células ósseas, sendo assim, capazes de contribuir em uma resposta celular aprimorada relacionado à adesão, morfologia e proliferação celular.

Uma das exigências para alcançar a regeneração do tecido ósseo e garantir um desenvolvimento promissor da cultura celular tridimensional, é que a resina fotossensível utilizada na construção do arcabouço seja biocompatível [11]. Os principais componentes que constituem uma resina fotossensível é basicamente um fotoiniciador (FI) que inicia a reação química de polimerização e um monômero que fornece as propriedades mecânicas ao arcabouço.

Estudos demonstraram que em altas concentrações de 3% e 2% do FI Irgacure 369, a fotoresina se torna citotóxica, como consequência, causa diminuição da viabilidade celular [12]. Embora o FI seja essencial e indispensável no processo de P2F, na literatura, são encontrados diversos outros componentes acrescentados na síntese das fotoresinas, tais como, fotoiniciadores solúveis em água, compostos biológicos e nanopartículas (NPs) [13-16], a fim de minimizar os efeitos nocivos do FI em elevada concentração, proporcionar propriedades ópticas e características biológicas específicas.

Neste contexto, Pontos Quânticos Semicondutores Ultra-pequenos (USPQs) de CdSe/CdS apresentam boa biocompatibilidade que leva a um desempenho mecânico aprimorado [17] e mantém uma controlada citocompatibilidade *in vitro* [18]. Da mesma forma, o dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) além de exercer excelente biocompatibilidade, também confere melhor proliferação celular, adesão e propriedades antibacterianas com alta aplicabilidade em células ósseas por induzir a osseointegração de implantes [19] [20].

Nessa circunstância, com finalidade de melhorar a biocompatibilidade do material e diminuir a toxicidade, foi realizado a preparação de uma fotoresina à base do monômero PETA e apenas 0,5% do FI Irgacure 369 com incorporação das NPs de CdSe/CdS e  $\text{TiO}_2$ .

Neste estudo será proposto sintetizar fotoresinas com incorporação de NPs e caracterizá-las por meio das técnicas de espectroscopia de absorção óptica, espectroscopia de fluorescência e espectroscopia Raman. Investigar os parâmetros adequados de escrita direta a laser nas fotoresinas. Avaliar a citotoxicidade das fotoresinas em contato direto com células osteoblastos humanos da linhagem MG-63.

Na sequência, construir arcabouços do tipo groove, em duas diferentes geometrias (retangular e circular), que mimetizam ambientes naturais do tecido ósseo. Desta forma, buscar entender como as características físico-químicas do microambiente alteram as propriedades mecânicas das células MG-63 cultivadas sobre estes arcabouços em comparação as células cultivadas em um filme liso feito da fotoresina, que serão analisadas através de medidas do Módulo de Young pelo Microscópio de Força Atômica (AFM).

Embora na literatura já se tenha conhecimento no que diz respeito à morfologia, diferenciação e taxa de proliferação das células osteoblastos MG-63 semeadas no interior de arcabouço tipo groove [21], porém ainda não é claro nestes estudos a influência destas

---

interações células-groove nas propriedades biomecânicas das células ósseas e necessita ser mais bem compreendido.

É notável que, a investigação das interações das células ósseas em arcabouço micro-groove é essencial na engenharia de tecidos, posto que, este estudo visa possíveis aplicações na adequação da geometria e topografia de implantes ortopédicos e dentários [22], mas também, na cultura de células ósseas no interior dos arcabouços para desenvolvimento de enxertos ósseos implantados *in vivo* [23], sendo ainda um grande desafio na engenharia de tecidos [24].

É importante destacar que a técnica de microfabricação por escrita a laser via P2F é uma recente linha de pesquisa na Universidade Federal de Alagoas (UFAL), sendo apenas o segundo laboratório na América Latina a desenvolver atividades neste campo de pesquisa. Logo, por se tratar da primeira dissertação desenvolvida nesta área na UFAL com um projeto de pesquisa inovador tanto nas técnicas utilizadas quanto nos objetivos propostos, este trabalho será estruturado com o máximo de detalhes pertinentes da técnica, já que, os estudos e resultados alcançados servirão de referência para os próximos estudantes, a fim de garantir a consolidação desta linha de pesquisa no PPGF.

Este trabalho está organizado da seguinte maneira: no capítulo 2 é apresentada a trajetória do surgimento da óptica não linear e descritos alguns conceitos fundamentais com ênfase nos processos de A2F e suas diversas aplicações tecnológicas. No capítulo 3 foi descrito detalhadamente o sistema experimental utilizado na microfabricação via P2F e sua perspectiva histórica. Além disso, buscou-se compreender como o feixe gaussiano ao se propagar por lentes objetivas alteram a geométrica do ponto focal, posto que, a ocorrência da absorção não linear possui dependência especial. Em seguida, foram abordadas as noções básicas da metodologia de microfabricação, explicado o processo de fotopolimerização por radicais livres e definido a quantidade grau de conversão.

No capítulo 4, é descrito a etapa de síntese das fotoresinas incorporadas com NPs utilizadas para construção dos arcabouços microgrooves por meio da técnica de microfabricação por escrita direta a laser via P2F. Ainda neste capítulo, as fotoresinas foram caracterizadas usando vários métodos de espectroscopias e para avaliar o efeito citotóxico das fotoresinas, foram submetidas ao método de exclusão do azul tripan durante 72 h de cultura. Posteriormente, a rigidez das células sob influência do arcabouço e do filme foi investigada via AFM. Por fim, no capítulo 5 serão apresentadas as considerações finais deste projeto de pesquisa e as perspectivas de futuros trabalhos.

## Referências

- [1] FRANKEN, P. A. et al. Generation of Optical Harmonics. **Phys. Rev. Lett.**. v. 7, n. 4, p, 118-119, 1961.
- [2] KAISER, W.; GARRETT, C. G. B. Two-photon excitation in  $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{+2}$ . **Phys. Rev. Lett.**. v. 7, n. 6, p. 229-231, 1961.
- [3] GÖPPERT-MAYER, M. Elementary processes with two quantum transitions. **Ann. Phys.**. v. 18, n. 8, p. 466-479, 2009.
- [4] GONÇALVES, P. J. et al. Effects of pH on the ultrafast transient absorption of iron (III) meso-tetrakis (4-N-methyl-pyridiniumyl) porphyrin ( $\text{Fe}_{3+}$ TMPyP) molecular complexes. **J. Photochem. & Photobio, A: Chem.** v. 408, 2021.
- [5] SAHU, P., MAZUMDER, N. Advances in adaptive optics-based two-photon fluorescence microscopy for brain imaging. **Lasers Med Sci.** v. 35, n. 2, p. 317–328, 2020.
- [6] CHIZARI, S. et al. Simultaneous printing and deformation of microsystems via two-photon lithography and holographic optical tweezers. **Materials Horizons.** v. 6, p. 350-355, 2019.
- [7] FERREIRA, P. H. D. et al. Transparent glass-ceramic waveguides made by femtosecond laser writing. **Optics & Laser Technology.** v. 136, 2020.
- [8] HU, Zhi-Yong et al. Long focusing range and self-healing Bessel vortex beam generator. **Optics Letters.** v. 45, n. 9, p. 2580-2583, 2020.
- [9] PIQUÉ, A. **Laser-based microadditive manufacturing technologies.** Elsevier. Ed. 2, p. 1–23, 2020.
- [10] LEE, Jin Woo. 3D Nanoprinting Technologies for Tissue Engineering Applications. **J. Nanomater.** v. 2015, p. 1-14, 2015.
- [11] STA AGUEDA, J. et al. 3D printing of biomedically relevant polymer materials and biocompatibility. **MRS Commun.** v. 26, p. 1-16, 2021.
- [12] OVSIANIKOV, A. et al. Three-dimensional laser micro- and nano-structuring of acrylated poly(ethylene glycol) materials and evaluation of their cytotoxicity for tissue engineering applications. **Acta Biomater.** v. 7, p. 967–974, 2011.
- [13] TOMAL, W. et al. Water-Soluble Photoinitiators in Biomedical Applications. **Polymers.** v. 12, n. 5, p. 1-30, 2020.
- [14] MARINO, A. et al. Two-Photon Lithography of 3D Nanocomposite Piezoelectric Scaffolds for Cell Stimulation. **ACS Appl. Mater. Interfaces.** v. 7, n. 46, p. 25574–25579, 2015.
- [15] PAUN, I. et al. 3D Biomimetic Magnetic Structures for Static Magnetic Field Stimulation of Osteogenesis. **Int. J. Mol. Sci.** v. 19, n. 2, p. 1-18, 2018.
- [16] PAUN, I. et al. 3D Superparamagnetic Scaffolds for Bone Mineralization under Static Magnetic Field Stimulation. **Materials.** v. 12, n. 17, p. 1-20, 2019.



- 
- [17] PENG, Ying, et al. 3D Photoluminescent Nanostructures Containing Quantum Dots Fabricated by Two-Photon Polymerization: Influence of Quantum Dots on the Spatial Resolution of Laser Writing. **Advanced Materials Technologies**. v. 4, n. 2, p. 1-10, 2018.
- [18] BASTOS, Victor A. F. **Avaliação da toxicidade de quantum dots de tamanhos mágicos de cdse/cds do tipo core shell no modelo animal C. elegans**. 2016, 72 p. Dissertação (mestrado em genética e bioquímica) - Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal De Uberlândia, Uberlândia, 2016.
- [19] TOVANI, C. B. et al. Characterization of the in Vitro Osteogenic Response to Sub-micron (TiO<sub>2</sub>) Particles of Varying Structure and Crystallinity. **ACS Omega**. v. 5, n. 27, p. 16491–16501, 2020.
- [20] ANWAR, A. et al. Novel synthesis and antimicrobial studies of nanoscale titania particles. **Ceram. Int.** v. 44, p. 21170-21175, 2018.
- [21] SUN, L. et al. Controlling Growth and Osteogenic Differentiation of Osteoblasts on Microgrooved Polystyrene Surfaces. **PLOS ONE**. v. 11, n. 8, 2016.
- [22] GUI, N., et al. Osteoblast Responses to Titanium-Coated Subcellular Scaled Microgrooves. **ACS Applied Bio Materials**. v. 2, n. 6, p. 2405-2413, 2019.
- [23] KIM, H. W. Fabrication of strontium-substituted hydroxyapatite scaffolds using 3D printing for enhanced bone regeneration. **J. Mater. Sci.** v. 56, p. 1673–1684, 2021.
- [24] RASOULIANBOROUJENI, M. et al. Development of 3D printed PLGA/TiO<sub>2</sub> nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering applications. **Mater. Sci. Eng. C**. v. 96, p. 105-114, 2019.

## 2 ABSORÇÃO DE DOIS FÓTONS (A2F) – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA, CONTEXTO HISTÓRICO E APLICAÇÕES

Neste capítulo será discutido as bases teóricas que são relevantes para compreensão do fenômeno de A2F, os parâmetros físicos mais importantes e como a óptica não linear explica o surgimento deste efeito pela interação entre a luz e a matéria. Além disso, serão discutidas também algumas aplicações que utilizam estes processos ópticos não lineares como base teórica, as quais estão compreendidas na biologia, na óptica, na fotônica e em outras inúmeras áreas que atuam de forma interdisciplinar.

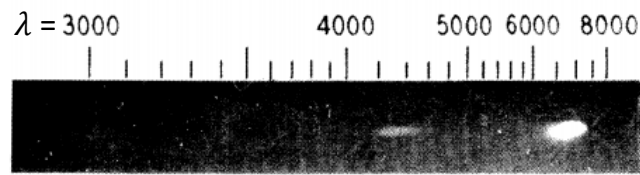
### 2.1 CONTEXTO HISTÓRICO

Diante do contexto histórico, a teoria do fenômeno de A2F foi conhecida em âmbito científico a partir dos estudos da física teórica Maria Göppert-Mayer, apresentados em sua tese de doutorado na *Göttingen University* em 1931 [1], ano em que a mesma propõe que um átomo ou uma molécula após interagir com uma fonte de luz de alta intensidade provoca a transição eletrônica de um nível de baixa energia para um nível de alta através da absorção simultânea de dois fótons. Deste modo, de acordo com os princípios da teoria quântica, Mayer obteve a probabilidade de ocorrer à transição eletrônica por A2F.

No entanto, somente após 30 anos mediante o desenvolvimento do primeiro laser óptico em 1960 por Theodore Maiman [2] possibilitou a verificação experimental, posto que para prosseguir com o aparato experimental fosse preciso de uma fonte intensa de radiação eletromagnética monocromática, em razão da probabilidade de ocorrência da transição eletrônica ser numericamente pequena [3].

Diante disso, em 1961 Kaiser e Garrett realizaram a comprovação experimental deste fenômeno não linear usando um laser pulsado de rubi com comprimento de onda centrado em 694,3 nm focalizado em um cristal de fluoreto de cálcio dopado com íon európio ( $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{+2}$ ) com 1 mm de espessura. Ao iluminar a amostra obtiveram o sinal de fluorescência por A2F caracterizada em torno de 425 nm [4], como registrado na figura 2.1. Isso indica que o campo incidente promove a transição de um elétron inicialmente no estado fundamental (nível real) para o estado intermediário (nível virtual) pela absorção de um fóton e, quase simultaneamente, ao absorver um segundo fóton permite o elétron alcançar um estado de energia superior (nível real) como resultado induz a fluorescência do material.

Figura 2.1: Primeira comprovação experimental de A2F demonstrada pela emissão de fluorescência do cristal de  $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{+2}$  sob incidência de luz vermelha 694,3 nm.



Fonte: Kaiser, Garrett [4].

Observa-se que foi feita uma comparação entre a luz do laser que foi incidida no material na região de  $\lambda = 694,3$  nm e do sinal de fluorescência do cristal por A2F na região com comprimento de onda na faixa de 425 nm com emissão de luz azul, desta maneira, forneceram uma confirmação prática do conceito de absorção simultânea de dois fótons, que até então era apenas teórica.

Além disso, para homenagear Göppert-Mayer por sua descoberta inovadora, as iniciais de seu nome foram destinadas para representar a unidade da grandeza seção de choque de A2F do material medida em 1 Goeppert-Mayer (GM) equivalente a  $1 \times 10^{-50} \text{ cm}^4 \cdot \text{s} \cdot \text{molécula}^{-1}$  [5].

Atualmente estes resultados a respeito da A2F são utilizados como bases teóricas para investigações científicas em inúmeras aplicações, bem como: na microscopia não linear [6], microscopia biológica [3], armazenamento óptico tridimensional de dados [7], microfabricação litográfica [8], terapia fotodinâmica [9] e terapia fotodinâmica antimicrobiana no campo da ortodontia [10] [11], dentre outras.

## 2.2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A partir dos processos físicos da interação da luz do laser no regime de altas intensidades com a matéria, foram observados os efeitos de absorção de dois fótons, assim como outros fenômenos, que são regidos pelos princípios da óptica não linear. Considera-se que, os átomos ou as moléculas de um meio específico sejam tratados como materiais dielétricos, isotrópicos e uniformes que serão submetidos à radiação eletromagnética [12]. Os dielétricos possuem características específicas, pois as cargas elétricas que constituem o material têm cargas ligadas fortemente aos átomos. Os materiais são considerados isotrópicos quando suas propriedades, tal como a susceptibilidade, não se alteram com a mudança de direções permanecendo constantes [13].

Primeiramente considere que se obtém uma resposta linear deste material interagindo com o campo elétrico aplicado, onde se admite intensidades que não sejam muito intensas. Em resposta ao campo elétrico, é causada uma distorção na configuração das cargas dos átomos no dielétrico e surge um momento de dipolo por unidade de volume ou

também chamado polarização induzida  $\tilde{P}(t)$ , a qual dependente do tempo e é paralela ao campo elétrico  $\tilde{E}(t)$ , ou seja, depende linearmente com a intensidade do campo elétrico aplicado e pode ser descrita pela expressão:

$$\tilde{P}(t) = \varepsilon_0 \chi^{(1)} \tilde{E}(t), \quad (1)$$

em que  $\chi^{(1)}$  é uma constante de suscetibilidade elétrica linear do meio que está relacionada a estrutura microscópica da substância trabalhada e  $\varepsilon_0$  representa a permissividade elétrica do vácuo, sendo que, para simplificar a notação tanto a polarização como o campo aplicado, dados por  $\tilde{P}(t)$  e  $\tilde{E}(t)$ , são tratados como grandezas escalares e descartamos a natureza tensorial de  $\chi$  na equação (1) e nas demais. É usado  $\tilde{A}$  para representar uma quantidade  $A$  qualquer que varia rapidamente no tempo. Na equação (1) é considerado que  $\tilde{P}(t)$  somente depende do valor instantâneo da força do campo elétrico.

Os meios que se comportam pelas propriedades físicas descritas são conhecidos por meios dielétricos lineares. Considerando os efeitos da polarização em ordens macroscópicas, em um grupo de moléculas de determinados materiais dielétricos, quando colocados na presença de um campo elétrico  $E(t)$ , acontece que as cargas dentro do átomo serão influenciadas por este campo, de modo que, as cargas elétricas de cada molécula terão seus momentos de dipolos induzidos alinhados pelas forças atribuídas pelo campo elétrico [14].

Em princípio, pode-se generalizar a equação (1) para descrever a resposta não linear em materiais na presença de campos eletromagnéticos extremamente altos com amplitudes numericamente próximos da intensidade do campo interatômico que liga os elétrons ao sistema, o qual pode ser calculado pela relação:  $E_{at} = \frac{e}{4\pi\varepsilon_0(a_0)^2}$ , em que tais parâmetros são:  $-e$  é a carga elétrica do elétron e  $a_0$  é o raio de Bohr do átomo de hidrogênio. Desta forma, resulta em um campo elétrico da ordem de  $E_{at} = 5,14 \times 10^{11}$  V/m [15]. Por consequência, as cargas elétricas contidas no material são perturbadas pela fonte de luz muito intensa que gera efeitos ópticos não lineares que obedecem à seguinte relação [16]:

$$\begin{aligned} \tilde{P}(t) &= \varepsilon_0 [\chi^{(1)} \tilde{E}(t) + \chi^{(2)} \tilde{E}^2(t) + \chi^{(3)} \tilde{E}^3(t) + \dots] \\ \tilde{P}(t) &= \tilde{P}^1(t) + \tilde{P}^2(t) + \tilde{P}^3(t) + \dots \end{aligned} \quad (2)$$

onde  $\chi^{(2)}$  e  $\chi^{(3)}$  são chamadas de susceptibilidades ópticas não lineares de segunda ordem e terceira ordem, respectivamente. Nota-se que, nesta situação, a polarização correspondente é uma série de potências do campo elétrico, onde na equação (1) havia somente o termo inicial. Nas equações (1) e (2) é assumido que a resposta do meio será instantânea, este é o tratamento mais simples e sugere que ao aplicar o campo no material instantaneamente surge a polarização.

Vale ressaltar que, estas grandezas físicas de interações ópticas não lineares de segunda ( $\tilde{P}^2(t)$ ) e terceira ordem ( $\tilde{P}^3(t)$ ) se diferem entre si e descrevem vários processos ópticos não lineares dependendo do tipo de material que está sendo trabalhado.

Na prática, é visto que a susceptibilidade de segunda ordem somente acontece em materiais caracterizados por serem não centrossimétricos, que são aqueles meios que não possuem simetria de inversão, exemplo disso, são os cristais de Niobato de lítio ( $\text{LiNbO}_3$ ), de Sulfeto de cádmio ( $\text{CdS}$ ), de Nitrato de lítio ( $\text{LiIO}_3$ ), de Quartz, dentre outros. Estes meios são responsáveis por desencadear o processo de retificação óptica [14], [17], geração de segundo harmônico [18], como resultado deste efeito, o segundo termo da equação (2) torna-se proporcional ao quadrado da intensidade do campo aplicado [15].

Note-se que, do ponto de vista histórico, o desenvolvido do primeiro laser foi um marco para o surgimento da óptica não linear, isso porque um ano após este acontecimento, além da comprovação da A2F por Kaiser e Garrett, foi descoberto em 1961 por Franken e colaboradores [19] outro fenômeno não linear conhecido por geração de segundo harmônico. Neste experimento realizado foi usado um cristal de quartz, onde foi possível obter a emissão de luz ultravioleta (UV) com  $\lambda = 347,2$  nm a partir da incidência de um feixe laser de rubi operando em 694,2 nm por meio do cristal de quartz.

Por outro lado, a susceptibilidade de terceira ordem independe das características de simetria do material, de modo que, pode ocorrer tanto em meios não centrossimétricos (assimétricos) como em meios com um centro de simetria, chamados centrossimétricos ou também conhecidos por terem uma “simetria de inversão”. Tal interação provoca fenômenos baseados no efeito Kerr óptico ou autofocalização [20] em que o índice de refração é dependente da intensidade da luz no material, A2F [3], geração de terceiro harmônico e geração de soma e diferença de frequências. Os materiais como sólido, líquidos e gases amorfos são exemplos de meios centrossimétricos.

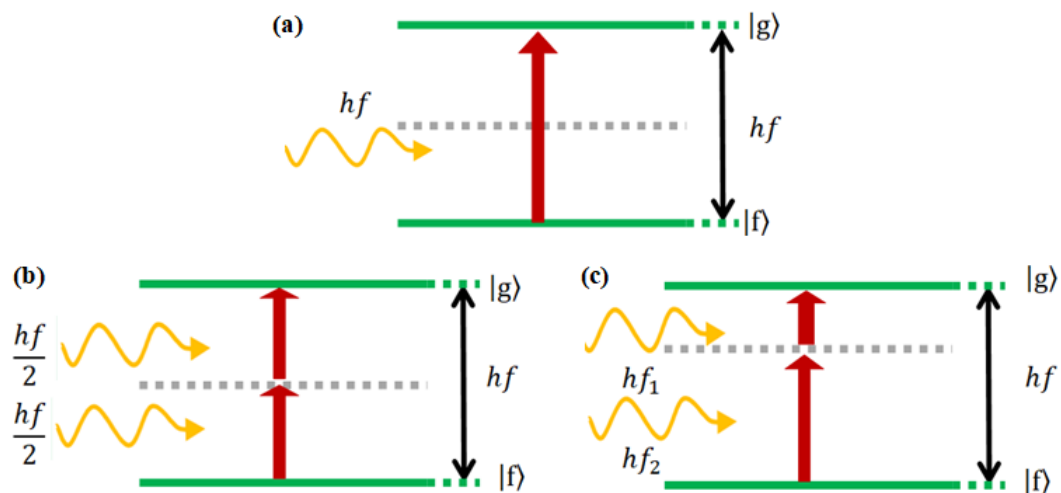
### 2.2.1 Processo de absorção de dois fótons

O processo de absorção multifotônica, classificado como um processo não paramétrico se inicia quando uma fonte de luz com alta intensidade incide na molécula, tal interação permite induzir uma transição eletrônica do estado de menor energia, isto é, o estado fundamental  $|f\rangle$  para o estado de maior energia como os estados excitados  $|g\rangle$  por meio da absorção simultânea de dois ou mais fótons [23].

Em geral, o fenômeno de A2F tem duas possibilidades para ser estabelecido, as quais são ilustradas na figura 2.2. Na primeira situação, figura 2.2(b) os fótons podem ter as mesmas frequências  $f$ , com  $E_1 = E_2$ , tal processo é conhecido por degenerado [24]. Já na segunda situação, figura 2.2(c) as frequências dos fótons são diferentes, dadas por  $f_1$  e  $f_2$ , tal configuração é chamado por não degenerado [25].

No entanto, é importante que a soma das energias dos fótons  $E_1 + E_2$ , recebida da fonte de excitação externa, seja equivalente à diferença de energia entre os estados eletrônicos do sistema, ou seja, devem estar em ressonância. Ao comparar o processo de absorção de um fóton (A1F) com a A2F, observa-se que a energia absorvida na transição eletrônica de um fóton, mostrado pelo diagrama de energia na figura 2.2(a), deve ser igual a soma das energias dos dois fótons absorvidos durante a transição eletrônica, sendo que, pelo processo degenerado de A2F cada fóton terá metade da energia necessária na absorção linear.

Figura 2.2: Ilustração do processo de (a) absorção linear e A2F no caso (b) degenerado (fótons têm mesma energia) e (c) não degenerado (fótons têm energias diferentes). Níveis virtuais são representados por linhas tracejadas e níveis reais por linhas preenchidas.



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota-se um ponto importante no processo de A2F, somente é possível acontecer devido ao surgimento de um nível intermediário virtual que se difere de um estado estacionário real do sistema, pois o mesmo fica durante um período de tempo muito curto, na ordem de femtossegundos (correspondente a  $10^{-15}$  s) e em seguida desaparece. Logo, especificamente para ocorrer um salto quântico, é necessário que os dois fótons estejam no estado real de mais alta energia antes do decaimento do estado intermediário virtual.

Deduz-se, portanto, que há um tempo limite para que o estado intermediário virtual permaneça, conhecido por tempo de vida ( $\Delta t$ ), que é criado por meio da absorção do primeiro fóton pelos processos de interação de radiação e matéria [26]. O tempo de vida do nível intermediário virtual é regido pelo princípio de incerteza de Heisenberg e obedece a seguinte relação:

$$\Delta E \Delta t \geq \frac{\hbar}{2} = \frac{h}{4\pi}. \quad (3)$$

Ou ainda isolando  $\Delta t$ , tem-se:

$$\Delta t \geq \frac{h}{4\pi\Delta E}, \quad (4)$$

em que  $\Delta E$  é a variação entre a energia do estado virtual e a energia estado real. Ao analisar a equação (4) para eventos em que a diferença entre a energia do estado virtual e a energia do estado real for pequena, segundo o princípio de incerteza de Heisenberg, diz que o tempo de vida do estado virtual deste sistema permanecerá por um período de tempo maior. Para se ter noção da duração do tempo de vida do estado virtual destinada para ocorrer a transição dos fótons, como exemplo, suponha que  $\Delta E = 1,55$  ev que equivale a um fóton com  $\lambda = 800$  nm, resulta em um tempo cerca de aproximadamente  $2,12 \times 10^{-16}$  s. Portanto, para garantir a ocorrência da A2F é necessário que os fótons estejam quase que simultaneamente no nível real [28].

Um aspecto fundamental do processo de A2F está relacionado à sua probabilidade ou taxa de ocorrência, que se torna mais provável para altas intensidades do campo elétrico, posto que, nestas condições o coeficiente de absorção do material  $\alpha(I)$  possui dependência com a intensidade da radiação incidente do laser, que é dada pela expressão [15]:

$$\alpha(I) = \beta I, \quad (5)$$

onde  $\beta$  é um coeficiente que descreve o processo de A2F e  $I$  é a intensidade do feixe de luz incidente. O coeficiente de absorção linear  $\alpha_0$  do material foi omitido na equação (5), pois é esperado que a fonte de excitação esteja fora do espectro de absorção linear do material, sendo assim, terá valor nulo. O coeficiente de A2F está diretamente relacionado com a parte imaginária da susceptibilidade de terceira ordem, dada por [30], [31]:

$$Im\chi^{(3)} = \frac{2n_0^2\epsilon_0c^2}{3\omega}\beta. \quad (6)$$

A resposta do material ao campo aplicado pode ainda ser expresso em termos de outra quantidade física, isto é, pela seção de choque de A2F que está relacionado ao coeficiente de A2F pela seguinte equação:  $\delta = \frac{\hbar\omega}{N_0}\beta$ , onde  $N_0$  é número de moléculas por  $\text{cm}^3$  [28]. A grandeza seção de choque de absorção é uma propriedade do material e pode ser interpretada como a área efetiva que provavelmente uma partícula (átomo) irá absorver a frequência do laser incidente [15].

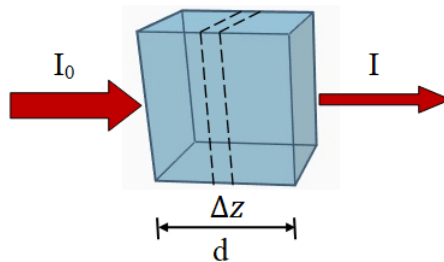
Com base na lei de Beer-Lambert se torna possível interpretar como se dá a variação da intensidade da luz no material cuja descrição estabelece que: A intensidade da luz incidente ao se propagar no interior de um meio não linear com espessura  $\Delta z$  diminui de

maneira exponencial, uma vez que, parte da luz será absorvida como ilustrado na figura 2.3, deste modo, tal lei pode ser obtida pela equação diferencial [32]:

$$\frac{dI}{dz} = -\alpha I, \quad (7)$$

em que  $dI$  é a derivada da intensidade de luz absorvida e  $dz$  representa a espessura do material no decorrer da coordenada  $z$ .

Figura 2.3: Ilustração do feixe de alta potência ao incidir no material de largura  $d$ .



Fonte: Adaptado de Lakowicz [32].

Ao resolver a equação anterior por integração, considerando as condições de contorno  $I_0 \neq 0$  e  $z_0 = 0$ , tem-se a lei de Beer-Lambert [33]:

$$I(z) = I_0 e^{-\alpha z}, \quad (8)$$

onde  $I_0$  refere-se à intensidade de luz incidente na entrada do material e  $z$  é o eixo de propagação da luz absorvida pelo meio. Ou ainda substituindo a equação (5) em (7):

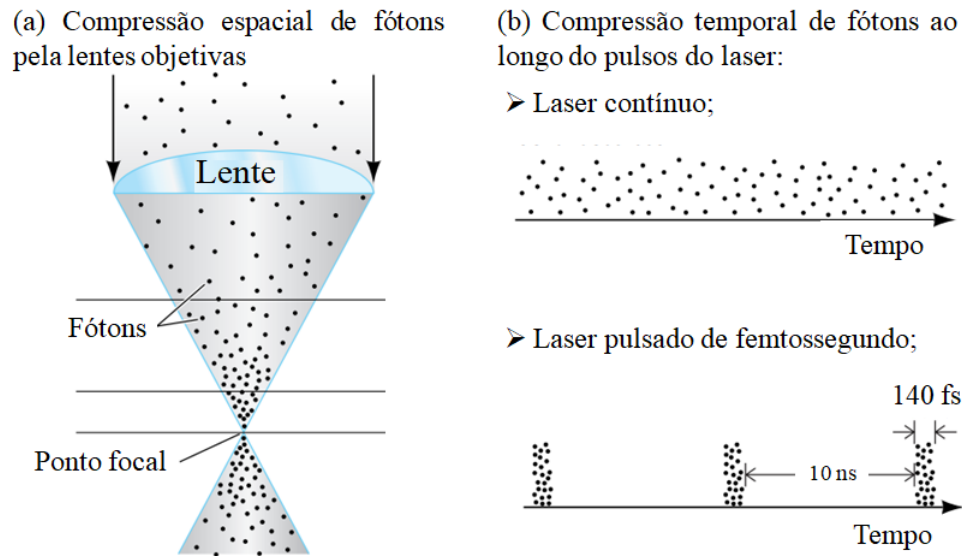
$$\frac{dI(z)}{dz} = -\beta I^2. \quad (9)$$

Este resultado estabelece que a probabilidade do meio absorver simultaneamente dois fótons será proporcional ao quadrado da intensidade da luz usada para excitação, esta relação não linear expressa na equação (9).

Especialmente, a densidade de fótons ao longo do eixo óptico de lasers pulsados de femtossegundo é maior no ponto focal e em regiões espaciais mais afastadas os fótons se tornam menos frequentes como ilustrado pela figura 2.4.



Figura 2.4: (a) Distribuição da densidade de fótons pela trajetória de lasers pulsados de femtossegundos. (b) Comparação da compressão temporal de fótons em lasers contínuos e pulsados.



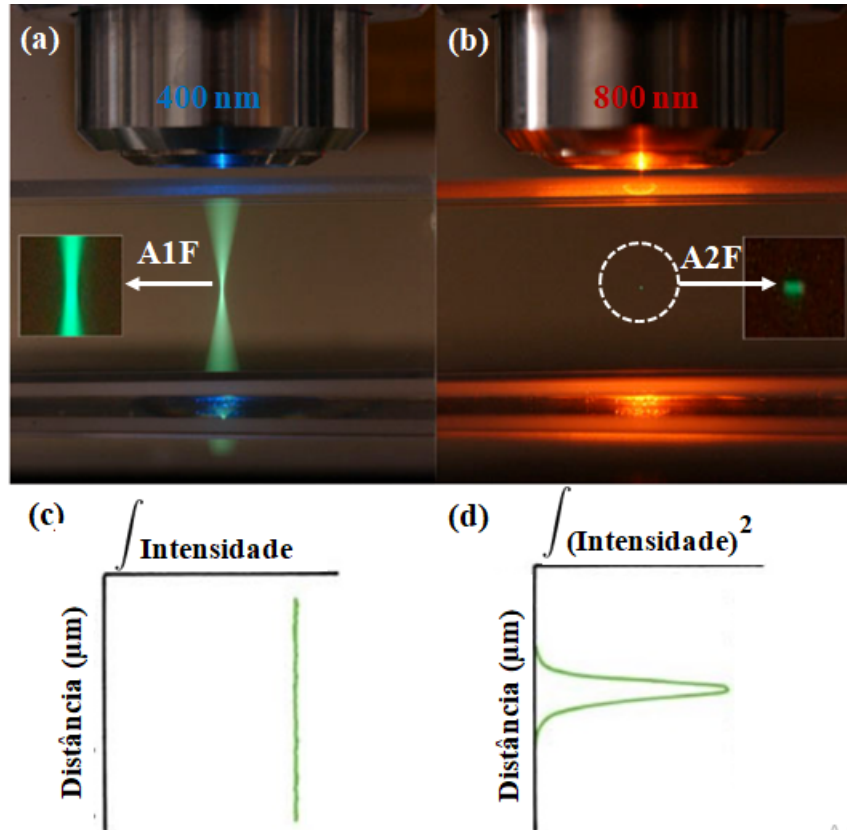
Fonte: Adaptado de Stutzmann, Parker [34].

Esta configuração espacial dos fótons está diretamente associada ao perfil transversal da intensidade do feixe gaussiano que é suficientemente alta na região central, e conseqüentemente, no plano focal possui a maior probabilidade de ocorrer a A2F, já em regiões mais distantes a probabilidade é reduzida.

Na figura 2.5(a) é observado o resultado experimental do sinal de fluorescência de uma solução à base de fluoresceína, onde é possível visualizar a trajetória dos perfis dos feixes gaussianos. Ao interagir com a fonte de luz na faixa do UV, em toda região fluorescente ocorre absorção por um fóton.

Por outro lado, na figura 2.5(b) observa-se que é possível induzir um fenômeno não linear de A2F, porém requer um laser de femtossegundos de alta intensidade com comprimento de onda na faixa do infravermelho (IR), . Como mostrado na ilustração, somente há fluorescência no volume focal da amostra, pois apenas nesta pequena região tem energia suficiente para o meio absorver simultaneamente dois fótons, que juntos possuem a energia da luz UV. Observa-se também que a absorção não linear melhora a resolução espacial do perfil do feixe gaussiano, de modo que, este tamanho é menor em comparação ao processo de A1F. Na figura 2.5(c), note que a integral da intensidade do feixe do laser é constante ao longo do eixo de propagação que está associado a probabilidade de A1F. Já na figura 2.5(d) a integral da intensidade ao quadrado do feixe do laser é maior no ponto focal, assim como, a probabilidade de A2F.

Figura 2.5: Comparação do sinal de fluorescência de uma amostra com fluoresceína excitada por A1F e A2F. (c) Intensidade integrada associada à probabilidade de ocorrer A1F permanece sempre contínua ao longo do eixo óptico. (d) A intensidade ao quadrado integrada é maior no ponto focal, consequentemente, a probabilidade de A2F possui maior ocorrência nessa região.



Fonte: Li, Fourkas. [35], Spectra... [36].

## 2.3 APLICAÇÕES

### 2.3.1 Armazenamento óptico de dados

A técnica de A2F possui propriedades que abrem caminhos para sua utilização em diversas áreas tecnológicas, exemplo disso, é o processo de gravação óptica de informações em filmes com determinadas espessuras. A partir da incidência do feixe laser, que opera em regime pulsado, ao percorrer uma abertura numérica é focalizado no volume do material e possibilita a gravação de informações através das alterações óptica causadas pela A2F [37].

O primeiro dispositivo de armazenamento óptico de informações em 3D foi realizado por Parthenopolous e Rentzepis [38] em 1989, por meio de um material polimérico dopado com corante fotocromico, sendo que, no dispositivo proposto seria possível armazenar por A2F uma maior densidade de dados em 3D, cerca de aproximadamente  $10^{12}$  bits/cm<sup>3</sup>, que supera a quantidade de informações armazenadas pela técnica anterior de armazenamento óptico bidimensional que se restringe a uma quantidade de apenas  $10^8$  bits/cm<sup>2</sup> [39]. Posteriormente, vários outros estudos foram introduzidos para facilitar a leitura das informações armazenadas pelos feixes infravermelho por A2F, além da utilização de ou-

tros materiais fotossensíveis, como por exemplo, o polímero poly(methylmethacrylate) (PMMA) incorporado com 2% de cromóforo chamado AF240 [7-benzothiazol-2-yl-9,9-diethylfluoren-2-yl)diphenylamine] [7], ou ainda dopado com outro fotocromóforo Disperse Red 13 (DR13) [40], em que os autores conseguiram registrar informações ao promover a birrefringência no material via absorção não linear.

### 2.3.2 Terapia fotodinâmica

A terapia fotodinâmica consiste em um procedimento utilizado como alternativa no tratamento de diversas doenças, as ações prestadas por esta técnica tem sido eficiente desde o tratamento de cânceres, no campo odontológico no combate de infecções até patologias dermatológicas [41], [42]. Esta terapia se baseia na interação de uma fonte de luz, com comprimento de onda apropriado, utilizada para excitação de substâncias fotoquímicas, que consiste em um fotossensibilizador não tóxico.

Portanto, no processo quando as moléculas presentes no fotossensibilizador excitadas pela luz entram em contato com as moléculas de oxigênio molecular  $O_2$  contidas no ambiente, elas serão ativadas e vão reagir quimicamente desempenhando propriedades específicas através da produção de substâncias fototóxicas no local da aplicação da substância, que são conhecidas por oxigênios reativos citotóxicos, os quais possuem capacidade de provocar a morte celular de micro-organismos patogênicos, mas também em células cancerosas [43].

Essa terapia tem uma resposta extremamente benéfica nos tratamentos, pela habilidade de causar danificação dos sistemas celulares patogênicos. O sucesso deste tratamento é possível devido à formação dos oxigênios reativos que se originam a partir da absorção dos fótons pelas moléculas do fotossensibilizante, por meio da A2F ocorre a transição eletrônica do estado fundamental de menor energia para um estado excitado de maior energia.

Deve ocorrer que as moléculas excitadas quando em contato com oxigênio no estado tripleto transferem partes de suas energias, como resultado o oxigênio no estado tripleto ficam altamente reativo e instável, retornando ao seu estado fundamental e por consequência desta reação proveniente da terapia fotodinâmica, se tem a formação do estado singlete [44], que é responsável por destruições irreparáveis nas células desejadas causadoras das doenças.

### 2.3.3 Microscopia multifotônica

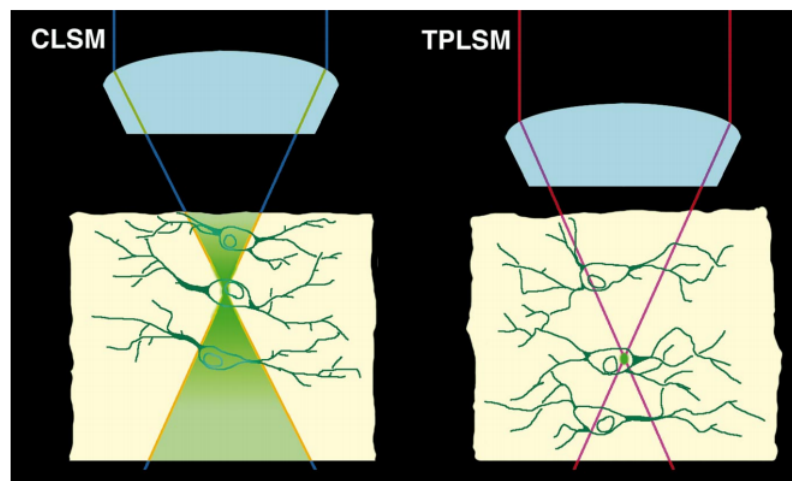
A microscopia multifotônica, teve origem em 1990 com as pesquisas de Webb e colaboradores [45], é um método promissor que permite ser aproveitada principalmente em aplicações biológicas, a qual é indispensável para análises de processos biológicos em

monitoramento de células fornecendo aspectos estruturais e funcionais.

Nesta técnica a amostra será excitada por meio da absorção simultânea de dois fótons com o comprimento de onda do laser próximo da faixa do IR, logo, se caso a amostra possuir absorção linear no ultravioleta, ela será transparente para a frequência de excitação usada, devido estas características o feixe laser possui capacidade de penetrar no tecido ao longo de uma maior profundidade sem causar enormes agressões físicas prejudiciais na região irradiada. Deste modo, além de apresentar mínima violação do organismo vivo, também são obtidos imagens das amostras biológicas nas regiões desejadas com maior resolução através da alta intensidade de fluorescência emitida por elas [46].

A microscopia multifotônica torna-se mais vantajosa em comparação ao método de microscopia confocal linear (Confocal Laser-Scanning Microscopy - CLSM) que ao invés de excitar o tecido via A2F utiliza a técnica de A1F. Portanto, na microscopia por A2F (Two-Photon Laser-Scanning Microscopy - TPLSM) a área do tecido submetido à excitação é mais restrita espacialmente interagindo somente no plano focal com a parte escolhida da amostra, este aspecto reduz a possibilidade de ocorrências de fotolesões ou fotodegradação, como é causada no caso do método CLSM em que o feixe laser na faixa do visível vai interagir por toda seção transversal tecidual, isto é, dentro e fora do ponto focal, mas também outra desvantagem do método CLSM é que possui limitações na profundidade de penetração [47], [48], como retratado na figura 2.6 esta diferença entre os dois métodos.

Figura 2.6: Diferença entre o método CLSM e TPLSM.



Fonte: Potter [49].

Na literatura são inúmeros os trabalhos realizados que utilizam microscopia de fluorescência de absorção por dois fótons, como exemplo, foram geradas imagens em três dimensões de neurônios com a finalidade de acompanhar o comportamento destes sistemas biológicos que são essenciais no estudo de doenças degenerativas, pois proporciona

---

compreender melhor os fatores causadores [50-53].

#### 2.3.4 Microfabricação por P2F

Dentre os muitos processos de escrita direta laser, a técnica aditiva de P2F atrai interesse especial por sua capacidade de estruturar um modelo 3D pela montagem do objeto proposto, camada sobre camada, com emprego mínimo e suficiente de material. A técnica baseia-se na interação não linear da radiação laser de pulsos ultracurtos ( $fs$ ) com resinas fotossensíveis, onde reações químicas altamente localizadas resultam na polimerização do material, chegando a resoluções de até 100 nm.

São encontrados inúmeros trabalhos baseado em microestruturação 3D via P2F nos últimos anos e ainda com grande perspectiva de crescimento, envolvendo pesquisas em diferentes campos, tais como na micro-eletrônica, micro-fluídica [54], nanofotônica [55], bioengenharia [56], dispositivos médicos [57], óptica não-linear, [58] sistemas de comunicação, entre outros [59-60]. Com particular interesse na área da bioengenharia, são desenvolvidos diversos arcabouços que variam quanto sua geometria, complexibilidade, composição química e funcionalidade, além da busca em sintetizar fotoresina biocompatível, biodegradável e com reduzida citotoxicidade [61]. Neste tópico a técnica de microfabricação via P2F foi abordada de maneira sucinta, porém no capítulo a seguir serão abordados em detalhes a metodologia, os avanços e suas aplicações.

## Referências

- [1] GÖPPERT-MAYER, M. Elementary processes with two quantum transitions. **Ann. Phys.** v. 18, n. 8, p. 466-479, 2009.
- [2] MAIMAN, T.H. Stimulated Optical Radiation in Ruby. **Nature**. V. 187, n. 4736, p. 493-494, 1960.
- [3] MASTERS, Barry R.; So, Peter T. C. **Handbook of Biomedical Nonlinear Optical Microscopy**. Ed. 1. New York: Oxford University Press, 2008.
- [4] KAISER, W.; GARRETT, C. G. B.. Two-photon excitation in CaF<sub>2</sub>:Eu<sup>2+</sup>. **Phys. Rev. Lett.** v. 7, n. 6, p. 229-231, 1961.
- [5] TANG, Ben Zhong, QIN, Anjun. **Aggregation-Induced Emission: Fundamentals**. v.1, ed. 1, Wiley, 2013.
- [6] SHEPPARD, Colin J. R. Multiphoton microscopy: a personal historical review, with some future predictions. **J. Biomed. Opt.** v. 25, n. 1, 2020.
- [7] PUDAVAR, Haridas E. et al. Three-dimensional optical data storage in a stacked compact disk format with two-photon writing and single photon readout. **Appl. Phys. Lett.** v. 74, n. 9, p. 1338-1340, 1999.
- [8] JHAVERI, S. J. et al. Direct three-dimensional microfabrication of hydrogels via two-photon lithography in aqueous solution. **Chem Mater**. v. 21, n. 10, 2003.
- [9] GRZYBOWSKI, Andrzej; PIETRZAK, Krzysztof. Maria Goeppert-Mayer (1906–1972): Two-photon effect on dermatology. **Clinics in Dermatology**. v. 31 n. 2, p. 221–225, 2013.
- [10] SPERANDIO, Felipe F.; Huang, Ying-Ying; Hamblin, Michael R.. Antimicrobial Photodynamic Therapy to Kill Gram-negative Bacteria. **Bentham Science Publishers**. v. 8, n. 2, p. 108-120.
- [11] KAMRAN, Muhammad A. Clinical, microbiological and immunological outcomes with photodynamic therapy as an adjunct to full-mouth scaling in patients undergoing fixed orthodontic treatment. **Photodiagnosis Photodyn. Ther.** v. 28, 2020.
- [12] JACKSON, J. D.. **Classical Electrodynamics**. ed. 3, Wiley, New York, 1998.
- [13] ZANGWILL, A. **Modern Electrodynamics**. ed. 1, Cambridge University Press, 2012.
- [14] SUTHERLAND, Richard L. **Handbook of Nonlinear Optics**. ed. 2, CRC Press, New York, 2003.
- [15] BOYD, R. W. **Nonlinear Optics**. ed. 3, Academic Press, New York, 2007.
- [16] SHEN, Y. R. **The Principles of Nonlinear Optics**. ed. 1, Wiley-Blackwell, 1984.
- [17] BASS, Michael; FRANKEN, P. A.; WARD, J. F. Optical Rectification. **Phys. Rev.** v. 138, p. A 534-A 542, 1965.
- [18] NALWA, Hari Singh, MIYATA, Seizo. **Nonlinear Optics of Organic Molecules and Polymers**. ed. 1. CRC Press, 1996.

- 
- [19] FRANKEN, P. A. et al. Generation of Optical Harmonics. **Phys. Rev. Lett.**. v. 7, n. 4, p, 118-119, 1961.
- [20] NEW, Geoffrey. **Introduction to Nonlinear Optics**. ed. 1, Cambridge University Press, 2011.
- [21] KUDRIASOV, V. et al. Influence of the nonlinear losses on the modifications induced by femtosecond filaments in fused silica. **Proceedings of SPIE**. v. 7132, 2008.
- [22] LENTES esféricas. Centro Educacional Evolução. Disponível em: <[http://grupoevolucao.com.br/livro/Fisica3/lentes\\_esféricas.html](http://grupoevolucao.com.br/livro/Fisica3/lentes_esféricas.html)>. Acesso em: 08 jul. 2020.
- [23] VAINOS, Nikolaos A. **Laser Growth and Processing of Photonic Devices**. ed.1, Woodhead Publishing, 2012.
- [24] MARK, James E. **Physical Properties of Polymers Handbook**. ed. 2, Springer, 2007.
- [25] NEWPORT. Three-Dimensional Microfabrication by Two-Photon Polymerization. **Newport Corporation**. 2008.
- [26] SVOZILÍK, J. ; PEŘINA, J. ; LEÓN-MONTIEL, R. J. Virtual-state spectroscopy with frequency-tailored intense entangled beams. **J. Opt. Soc. Am. B.**. v. 35, n. 2, p. 460-467, 2018.
- [27] SAKURAI, J.J.; NAPOLITANO, Jim. **Modern Quantum Mechanics**. ed. 2, New York, 1994.
- [28] CORRÊA, Daniel Souza. **Absorção de multi-fótons em polímeros e resinas poliméricas: espectroscopia não linear e microfabricação**. 2009. 174 p. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2009.
- [29] PRABHAKARAN, Prem. **Direct laser writing: What is Two-Photon Absorption?**, 2017. Disponível em: <<https://l3dw.com/what-is-two-photon-absorption/>>. Acesso em: 29 jan. 2020.
- [30] NALIN, Marcelo et al. Materiais vítreos e luz: parte 2. **Quim. Nova**. v. 39, n. 3, p. 340-351, 2016.
- [31] SHEIK-BAHAE, M. et al. Sensitive measurement of optical nonlinearities using a single beam. **IEEE J. Quantum Electronics**. v. 26, n. 4, p. 760-769, 1990.
- [32] LAKOWICZ, Joseph R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. ed.3, Springer, 2011.
- [33] NEETHLING, Pieter. **Determining non-linear optical properties using the Z-scan technique**. 2005. 85 p. Dissertação (Mater of science) - University of Stellenbosch, 2005.
- [34] STUTZMANN, G. E.; PARKER I. Dynamic multiphoton imaging: a live view from cells to systems. **Physiology (Bethesda)**. v. 20: p. 15-21, 2005.
- [35] LI, L.; FOURKAS, J. T. Multiphoton polymerization. **Materials Today**. v. 10, n. 6, p. 30-37, 2007.

- 
- [36] SPECTRA-Physics. Advantages of Two-Photon Excited Fluorescence Microscopy (TPM). **AZoOptics**, 2017. Disponível em: <<https://www.azooptics.com/Article.aspx?ArticleID=951>>. Acesso em: 04 set. 2020.
- [37] BURR, G. W. Three-dimensional optical storage. Nano- and Micro-Optics for Information Systems. **Proc. SPIE**. v. 5225, p. 78-92, 2003.
- [38] PARTHENOPOULOS, D. A., RENTZEPIS, P. M. Three-Dimensional Optical Storage Memory. **Science**, v.245, n. 4920, p. 843–845, 1989.
- [39] STRICKLER, James H.; WEBB, Watt W. Three-dimensional optical data storage in refractive media by two-photon point excitation. **Opt. Lett.**. v. 16, n. 22, p. 1780-1782, 1991.
- [40] MENDONÇA, C. R. et al. Two-photon induced anisotropy in PMMA film doped with Disperse Red 13. **Optics Communications**. v. 273, n. 2, p. 435-440, 2007.
- [41] ISSA, M.; MANELA-AZULAY, Mônica. Photodynamic therapy: A review of the literature and image documentation. **An Bras Dermatol**. v. 85, n. 4, p. 501-511, 2010.
- [42] SILVA, Vânia C. R. et al. Photodynamic therapy for treatment of oral mucositis: Pilot study with pediatric patients undergoing chemotherapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 21, p. 115-120, 2018.
- [43] GALLARDO-VILLAGRÁN, Manue, et al.. Photosensitizers Used in the Photodynamic Therapy of Rheumatoid Arthritis. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 20, n. 13, p. 1-21, 2019.
- [44] SILVA, Ângelo R. A. **Estudos fotofísicos, fotoquímicos e fotobiológicos de complexos de ftalocianina de cloro-alumínio e indocianina verde em lipossomas**. 2010. 66 p. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2010.
- [45] DENK, W., et al. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. **Science**, v. 248, n. 4951, p. 73–76, 1990.
- [46] SAHU, P., MAZUMDER, N. Advances in adaptive optics-based two-photon fluorescence microscopy for brain imaging. **Lasers Med Sci.** v. 35, n. 2, p. 317–328, 2020.
- [47] DUFOUR, P. Microscopie à deux photons pour l'imagerie cellulaire fonctionnelle: avantages et enjeux ou un photon c'est bien...mais deux c'est mieux! [Two-photon laser scanning fluorescence microscopy for functional cellular imaging: Advantages and challenges or One photon is good... but two is better!]. **Med. Sci. (Paris)**. v. 22, n. 10, p. 837–844. 2006.
- [48] DENK, Winfried, PISTON, David W., WEBB, Watt W. **Handbook of Biological Confocal Microscopy: Multi-photon molecular excitation in laser-scanning microscopy**. Springer US: ed. 3, p. 445-458, 2006.
- [49] POTTER, S. M. Vital imaging: two photons are better than one. **Curr Biol**. v. 6, n. 12, p. 1595-1598, 1996.



- 
- [50] BOTCHERBY, Edward J. et al. Aberration-free three-dimensional multiphoton imaging of neuronal activity at kHz rates. **PNAS**. v. 109, n. 8, p. 2919-24, 2012.
- [51] LILLIS, Kyle P. et al. Two-photon imaging of spatially extended neuronal network dynamics with high temporal resolution. **J. neuroscience methods**. v. 172, n. 2, p. 178-184, 2008.
- [52] RUBART, M. Two-photon microscopy of cells and tissue. **Circ Res**. v. 95, n.12, p. 1154–1166, 2004.
- [53] SHI, Lingyan; RODRÍGUEZ-CONTRERAS, Adrián; ALFANO, Robert R. Gaussian beam in two-photon fluorescence imaging of rat brain microvessel. **J. Biomedical Optics**. v. 19, n. 12, p. 126006-5, 2014.
- [54] KIMURA, N. et al. **Microfabrication and microfluidic devices for drug delivery**. Microfluidics for Pharmaceutical Applications. Elsevier. p. 123–136, 2019.
- [55] GISSIBLL, Timo et al. Two-photon direct laser writing of ultracompact multi-lens objectives. **Nature Photonics**. v. 10, n. 8, p.554-560, 2016.
- [56] NGUYEN, Alexander K.; Narayan, Roger J. Two-photon polymerization for biological applications. **Materials Today**. v. 20, n. 6, p.314-322, 2017.
- [57] ZHANG, H. et al. Microfabricated Drug Delivery Devices: Design, Fabrication, and Applications. **Advanced Functional Materials**. v. 27, n. 45, p. 1-31, 2017.
- [58] OLIVEIRA, J. M. et al. Generating a superposition of high order Bessel beams via two-photon polymerized diffractive optical microelement. **Optics & Laser Technology**. v. 119, p.1-5, 2019.
- [59] HU, Zhi-Yong et al. Long focusing range and self-healing Bessel vortex beam generator. **Optics Letters**. v. 45, n. 9, p. 2580-2583, 2020.
- [60] CHIZARI, S. et al. Simultaneous printing and deformation of microsystems via two-photon lithography and holographic optical tweezers. **Materials Horizons**. v. 6, p. 350-355, 2019.
- [61] LIAO, C. A material odyssey for 3D nano/microstructures: two photon polymerization based nanolithography in bioapplications. **Applied Materials Today**. v. 19, p. 1-24, 2020.

### 3 MICROFABRICAÇÃO VIA POLIMERIZAÇÃO POR ABSORÇÃO DE DOIS FÓTONS

Neste capítulo, será descrito em detalhes os aspectos fundamentais que constituem a técnica de microfabricação via P2F. Em seguida, será explicado o processo de fotopolimerização, os materiais utilizados, os dispositivos ópticos necessários para a investigação, o entendimento e domínio destas informações que são essenciais para o aprimoramento desta importante técnica.

#### 3.1 CONTEXTO HISTÓRICO

De modo geral, a microfabricação mostrou-se capaz de atuar de maneira interdisciplinar e relacionar diversas áreas científicas, que refletem na criação de subáreas como, por exemplo, microtecnologia, microfluídica, microeletrônica, dentre outras [1].

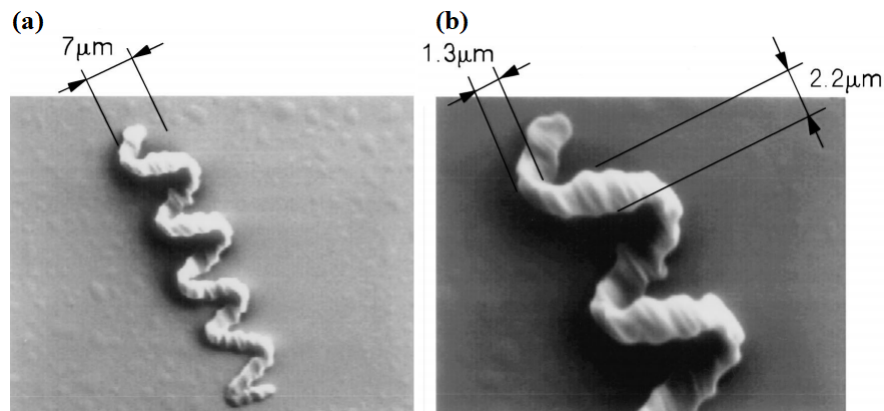
Em especial, a subárea da microfluídica que teve início a partir dos trabalhos de Terry e colaboradores publicados no ano de 1979 em que apresentaram o desenvolvimento do primeiro microdispositivo, que consistia em um microsistema de Cromatografia Gasosa (CG) fabricado em um substrato de silício [2], [3]. Conforme os avanços tecnológicos, atualmente são desenvolvidos diferentes dispositivos microfluídicos com a finalidade de analisar células vivas para compreensão de doenças raras como a Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) [4].

Existem várias técnicas que utilizam o método de escrita direta a laser para microfabricação, entre elas destaca-se a técnica de P2F. Diante do contexto histórico, a primeira microestrutura tridimensional construída através da técnica de microfabricação por escrita direta a laser via P2F foi realizada em 1997 pelo pesquisador japonês Satoshi Kawata e colaboradores [5]. Neste artigo, os autores fabricaram uma microestrutura em formato espiral com um diâmetro de  $7 \mu\text{m}$ , resolução espacial na direção lateral era de  $1,3 \mu\text{m}$  e na direção longitudinal era  $2,2 \mu\text{m}$  que correspondem aproximadamente ao diâmetro e a altura do voxel formado, respectivamente como mostrado na figura 3.1, caracterizada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

A resina fotopolimerizável usada (SCR-500 da Japan Synthetic Rubber Company, Ltd.) era composta por um fotoiniciador e dois monômeros, sendo o acrilato de uretano e oligômeros de acrilato de uretano. A partir deste primeiro trabalho outros pesquisadores apostaram no potencial desta técnica e desenvolveram várias outras microestruturas com complexibilidade superior, mas também aplicáveis desde a física até a biologia.

Para exemplificar, na figura 3.2, são apresentados vários exemplos desta técnica,

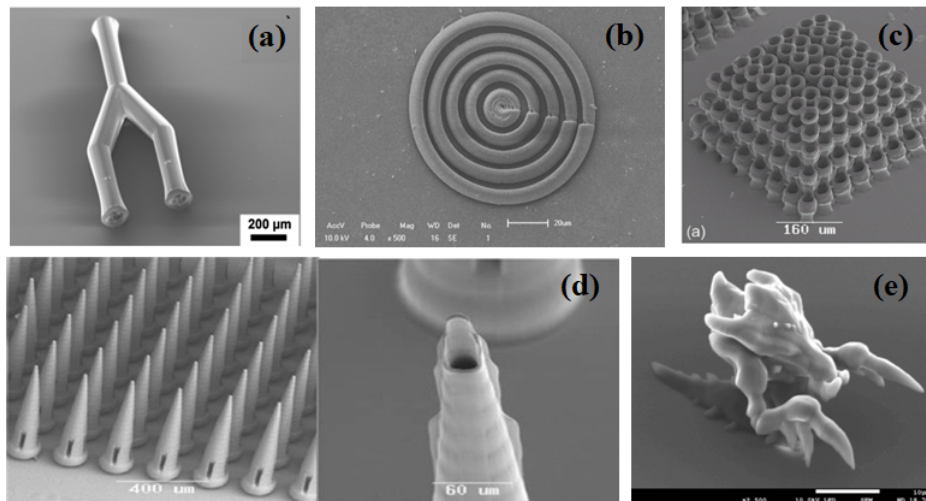
Figura 3.1: Imagens MEV da microestrutura em formato espiral construída por microfabricação via P2F após processo de remoção de resíduos não solidificados.



Fonte: Maruo et al. [5].

tais como, a construção de moduladores de luz [6], microvasos com poros e microestruturas tridimensionais para cultura celular de tecidos biológicos [7], [8], microagulhas para o transporte adequado de medicamentos [9], [10], [11], microdispositivos [12], além de sensores microfluídico integrados [13], guias de ondas de luz [14], [15], dentre várias outras microestruturas.

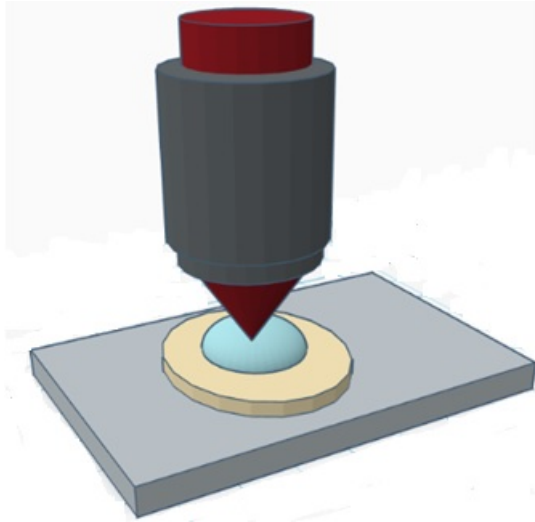
Figura 3.2: Microestruturas fabricadas via P2F. (a) microvasos com poros, (b) modulador de luz, (c) arcabouço celular, (d) microagulhas para entrega de medicamentos e (e) microestrutura complexa.



Fonte: Bieda et al. [16]; Oliveira et al. [6]; Ovsianikov et al. [7]; Ostendorf et al. [9]; Balčiūnas et al. [12].

O processo de microfabricação via P2F consiste basicamente em focalizar o feixe de luz, que opera em regime pulsado na ordem de femtossegundos, através de uma lente objetiva de microscópio que tem a capacidade de direcioná-lo até a resina polimérica, característica devido aos componentes presentes utilizados em sua síntese. A figura a seguir mostra em detalhes esta configuração experimental.

Figura 3.3: Interação da radiação com a matéria, onde o feixe laser é focalizado na resina pela lente objetiva.



Fonte: Elaborada pela autora.

Embora a resina seja sensível ao ultravioleta (UV), na microfabricação tendo em visto como objetivo fabricar estruturas da ordem de micrômetros, não é vantajoso utilizar comprimentos de onda na região da absorção linear do material, pois a probabilidade de ocorrer A1F é mais elevada e ocorre ao longo de todo o eixo de propagação do feixe laser pela amostra fotossensível [17], por isso, uma região enorme da resina será polimerizada uniformemente, sendo impossível confeccionar microestruturas bem definidas e com alta resolução.

Todavia, devido aos processos de absorção multifotônica ser seletiva espacialmente, assim como na A2F, tal fenômeno passou a ser estudado como uma opção para induzir propriedades ópticas não lineares em compostos poliméricos. Por este motivado, é necessário promover um fenômeno não linear de absorção por dois fótons que devido à probabilidade de A2F ser diretamente proporcional ao quadrado da intensidade da luz, vai restringir a absorção não linear do material somente ao volume focal. Assim, dando origem ao menor elemento de volume polimerizado que permite atribuir formas às microestruturas. Um cuidado importante no processo de fabricação das estruturas é que para haver somente A2F é preciso que a fonte de excitação tenha o comprimento de onda distante da região de absorção linear das moléculas do fotoiniciador e do monômero.

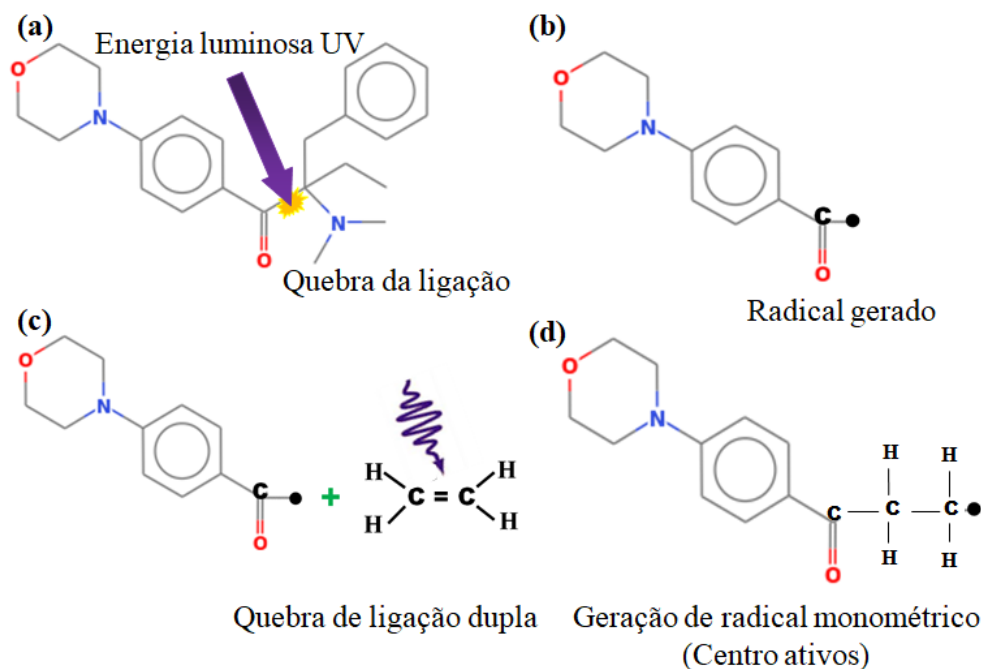
### 3.2 POLIMERIZAÇÃO POR ABSORÇÃO DE DOIS FÓTONS (P2F)

Amplas são as técnicas empregadas nos processos de microfabricação, dentre elas, se destaca a técnica de P2F através da formação de radicais livres. Esta metodologia de

fotopolimerização por radicais livres permite a construção de microestruturas complexas polimerizadas de maneira eficiente, a partir da interação da radiação eletromagnética com substâncias específicas formadas por monômeros e fotoiniciadores.

O processo de fotopolimerização por radicais livres usado na microfabricação via P2F é constituído de três etapas, conhecidas por: iniciação, propagação e terminação, representadas pela figura 3.4. Na primeira etapa, o monômero e fotoiniciador são expostos à energia luminosa, durante esta interação, no material ocorrem reações químicas que permitem a quebra de ligações das moléculas do fotoiniciador, os quais absorvem a luz e formam os radicais livres. Na etapa subsequente, os radicais livres atuam nos monômeros, e como consequência, as ligações duplas entre carbono nas moléculas dos monômeros são rompidas e se conectam com as ligações em aberto dos radicais livres. Estas novas estruturas moleculares formadas são denominadas de centros ativos [18].

Figura 3.4: Esquema representativo do processo de reação fotoquímica da P2F, é destacado (a) quebra de ligação do FI, (b) obtenção do radical livre; (c) ligação entre o radical livre e a molécula do monômero, seguido pela quebra da ligação dupla C=C e (d) formação dos centros ativos.



Fonte: Adaptado de Tomazio [19].

Em seguida, na etapa de propagação como o nome sugere, consiste no desenvolvimento e do aumento do tamanho da cadeia polimérica por meio de ligações entre os centros ativos com outros monômeros, já que, na resina possui maiores quantidades de moléculas de monômeros do que de fotoiniciadores.

A última etapa é o processo de terminação, na ausência dos agentes (monômeros), os centros ativos reagem com outros centros ativos finalizando o crescimento da cadeia

molecular. A taxa de formação dos radicais livres sob interação com a luz depende essencialmente da porcentagem de concentração do fotoiniciador adicionado ao material e de sua eficiência em absorver o comprimento de onda para que ocorra com êxito a polimerização da resina. Após as reações químicas, no caso de resinas negativas, elas se tornam sólidas, como será discutido na seção a seguir.

Pode-se notar experimentalmente que, em geral, a região superficial da resina apresenta uma camada que dificilmente será polimerizada. Este aspecto se deve a reação do oxigênio, disperso em maior concentração na atmosfera, com os radicais livres formados a partir da excitação eletrônica das moléculas do fotoiniciador. As interações de ambos componentes impedem a formação dos centros ativos e causa uma nítida diminuição na eficiência da fotopolimerização, resultando na formação de cadeias poliméricas mal estruturadas.

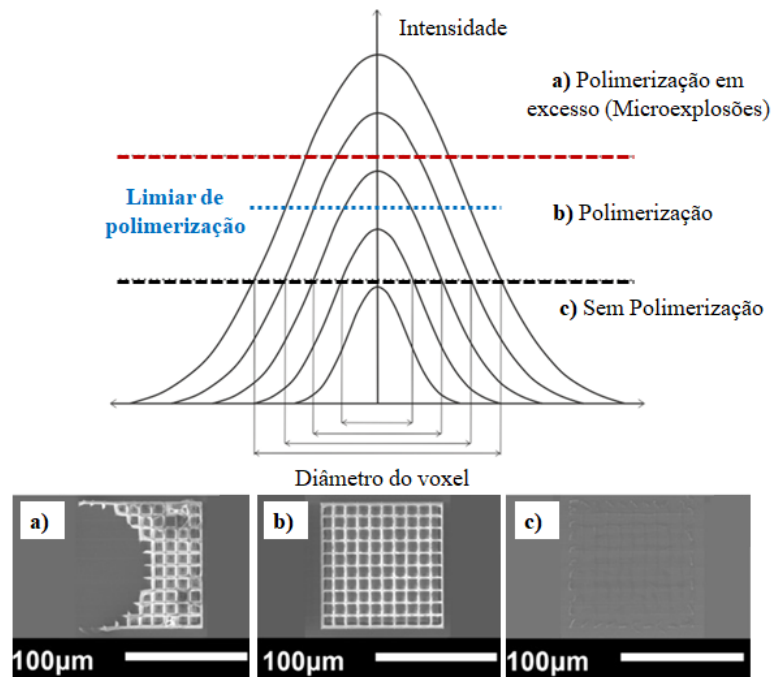
A redução da taxa de conversão polimérica na interface ar-amostra acontece devido às reações das moléculas  $O_2$  contidas no ambiente com os radicais livres formando um radical peróxido, por isso, torna-se importante o conhecimento de sua influência, pois resulta na inibição do processo pelo oxigênio [20], [21].

Contudo, diante da metodologia de fotopolimerização se tem conhecimento da existência de um limiar de polimerização (linha pontilhada em azul na figura 3.5), definido como sendo a potência mínima capaz de polimerizar um elemento de volume, onde para as intensidades do feixe gaussiano inferiores ao limiar de polimerização não ocorrerá polimerização do material como desejado.

Esta informação é útil para confecções de microestruturas tridimensionais englobadas em um determinado volume da resina, no entanto, se torna desvantajosa para fabricação de filmes finos em duas dimensões devido o efeito do oxigênio [22], [23], [17].

Na prática, o limiar de polimerização revela que a intensidade de excitação fornecida ao material no processo de escrita é extremamente relevante, porque reflete na qualidade e nas propriedades mecânicas das microestruturas fabricadas, assim como, outros parâmetros também influenciam, a saber, velocidade de escrita, tempo de exposição, entre outros. Diante disso, o limiar de polimerização diz quais intensidades do laser realmente são necessárias para acontecer a fotopolimerização, como mostrado pela figura 3.5.

Figura 3.5: Microestruturas obtidas de acordo com a intensidade do feixe gaussiano. (a) Para intensidades acima do limiar de polimerização ocorrem microexplosões, (b) intensidades próximas do limiar se obtêm estruturas rígidas com boa qualidade e (c) muito abaixo não ocorre polimerização.



Fonte: Adaptado de Lawrence et al., [24] e Bieda et al., [16].

Na situação da figura 3.5(a), se fornecida uma elevada intensidade da fonte luminosa, (região acima da linha tracejada em vermelho), vai causar danos na microestrutura fabricada e conseqüentemente, se observa microexplosões nas paredes da resina polimerizada [16]. No segundo caso, em 3.5(b) é possível obter estruturas adequadas ajustando a intensidade próxima ao limiar de polimerização (representada pela linha tracejada azul). Na última situação, mostrada pela figura 3.5(c), para intensidades da fonte luminosa muito abaixo do limiar de polimerização (representada pela linha tracejada em preto), devido à baixa energia e conseqüentemente baixa potência, não se inicia as reações químicas de fotopolimerização e a estrutura mal polimerizada apresenta as paredes instáveis, rompidas e pouco visíveis.

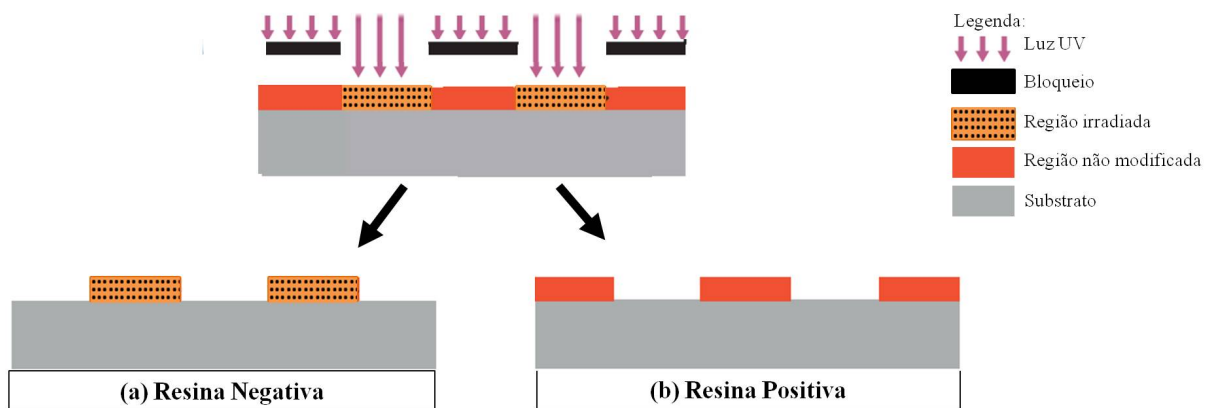
### 3.2.1 Tipos de resinas

Encontram-se comercialmente dois tipos de resinas destinadas para construção de microestruturas, as quais podem ser classificadas como positivas ou negativas e se diferem por suas características físicas e químicas. Nas resinas positivas, em geral são sólidas e quando suas regiões são colocadas na presença da radiação ultravioleta ocorrem reações fotoquímicas que permite o composto perder sua resistência e enfraquecer ocorrendo a ruptura das suas ligações da cadeia principal do polímero [25]. Este tipo de resinas são

utilizadas, por exemplo, no método de fotolitografia geralmente com uso de moldes.

Em contraste, as resinas negativas têm propriedades inversas das resinas positivas, pois inicialmente a resina negativa consiste em uma solução líquida viscosa, conforme as regiões do material são submetidas à radiação da luz no comprimento de onda do UV se tornam sólidas por meio das ligações da cadeia molecular. Elas são geralmente utilizadas em processo de escrita direta a laser por P2F. A figura 3.6 apresenta um esquema ilustrativo que demonstra as diferenças dos dois tipos de resinas [9].

Figura 3.6: Esquema ilustra a diferença básica entre as resinas (a) positiva e (b) negativa no processo de exposição à luz UV.



Fonte: Elaborado pela autora.

### 3.2.2 Grau de conversão

A fim de mensurar a capacidade que a fotoresina possui para desempenhar o processo de fotopolimerização com eficiência, é investigada a taxa ou grau de conversão ( $GC$ ) polimérico. Basicamente, é entendido como o índice percentual capaz de indicar quanto do material foi realmente utilizado na etapa de polimerização, isto é, a porcentagem de monômeros iniciais convertidos em cadeias poliméricas, por isso é de suma importância utilizar um excelente fotoiniciador para que o grau de conversão seja elevado.

Durante o processo de radicalização uma enorme quantidade de monômeros, que não participaram da etapa seguinte de propagação dos centros ativos, ficam contidos na resina, como também fotoiniciadores não reagidos, tais resíduos obtidos são inevitáveis, pois raramente a fotopolimerização é realizada por completo.

A taxa de conversão polimérica varia de acordo com o tipo da resina, já que depende das propriedades dos monômeros e dos fotoiniciadores usados em sua síntese, mas também depende dos parâmetros utilizados no processo de polimerização. Geralmente na literatura, são encontrados alguns valores do grau de conversão ditos aceitáveis que estão compreendidos na faixa de 20% até 90% [26].

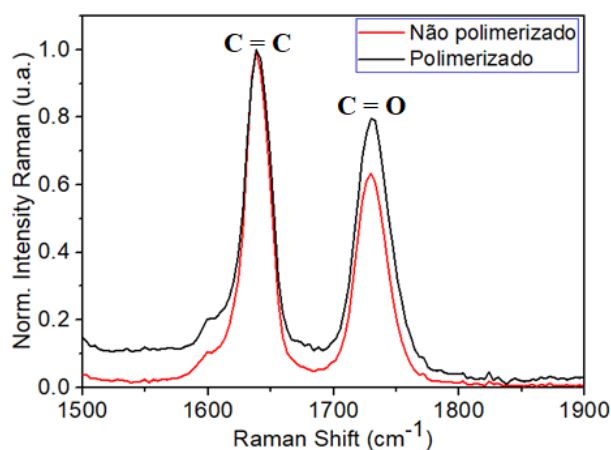


Este parâmetro quantitativo pode ser obtido através de diversos métodos diferentes, como por exemplo, por medida de fotocalorimetria, espectroscopia Raman, Espectroscopia por Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), dentre outros meio de caracterização [20].

O tipo de caracterização empregado neste estudo é o método de espectroscopia Raman pela comparação de dois picos específicos do espectro Raman que influenciam e participam quimicamente do processo de radicalização da cadeia polimérica. Como discutido no início desta seção 3.2, é proposto que em resinas ainda líquidas, seus monômeros apresentam ligações duplas entre carbonos ( $C = C$ ) com pico característico em  $1640\text{ cm}^{-1}$  (vinil) e somente através da formação dos polímeros estas ligações são quebradas se transformando em ligações simples intermoleculares entre carbonos ( $C - C$ ), de modo que, após as reações químicas ocorridas no material espera-se que este pico em  $1640\text{ cm}^{-1}$  ( $C = C$ ) tenha uma redução de sua intensidade devido ao resultado da formação dos polímeros.

O segundo pico avaliado corresponde às ligações com modos vibracionais de  $C = O$  (grupo carbonila) centrados em  $1730\text{ cm}^{-1}$ , porém, estes picos não variam de maneira significativa na etapa de fotopolimerização [27]. Portanto, ao serem feitas as medidas do espectro Raman da resina não polimerizada (Líquida) e comparado ao espectro Raman da amostra após a etapa de polimerização (Sólida), é obtido um gráfico semelhante à figura 3.7.

Figura 3.7: Típico espectro Raman da resina polimérica não polimerizada (curva em vermelho) e polimerizada (curva em preto) por UV.



Fonte: Elaborado pela autora.

Note-se que as curvas do gráfico foram normalizadas tendo como referência o pico em  $1640\text{ cm}^{-1}$ , por isso que sua intensidade permanece a mesma e, conseqüentemente, a intensidade do pico  $1730\text{ cm}^{-1}$  vai aumentar após a polimerização, na figura 3.7 esta observação é confirmada.

Ao considerar as razões das intensidades dos picos das ligações dos compostos (C = C) e (C = O), possibilita calcular a porcentagem do  $GC$  correspondente, dada pela equação:

$$GC = \left( 1 - \frac{P_{1640}^{pol}/P_{1730}^{pol}}{P_{1640}^{unpol}/P_{1730}^{unpol}} \right) \times 100\%, \quad (10)$$

onde  $P_{1640}^{unpol}$  e  $P_{1730}^{unpol}$  referem-se às intensidades dos picos  $1640 \text{ cm}^{-1}$  e  $1730 \text{ cm}^{-1}$  antes da polimerização da resina, respectivamente e  $P_{1640}^{pol}$  e  $P_{1730}^{pol}$  são as intensidades dos picos  $1640 \text{ cm}^{-1}$  e  $1730 \text{ cm}^{-1}$  após a polimerização, respectivamente. Em resumo, há uma diminuição da altura relativa do pico (C = C) quando comparado ao pico (C = O), que ao permanecer inalterado é usado como referência na realização dos cálculos. A equação (10) permite avaliar a eficiência dos compostos presentes na resina polimérica.

### 3.3 RESINAS POLIMÉRICAS

São diversos os tipos de fotoiniciadores e de monômeros disponíveis, diante disso, permite criar várias resinas poliméricas experimentais, as quais se diferem pelo desempenho de suas propriedades, tais como: compatibilidade com solventes, resistência, adesão e até mesmo a biocompatibilidade com materiais biológicos [20]. Além disso, na manipulação da resina, é permitido acrescentar mais de um monômero, como também, outros tipos de componentes, como por exemplo, dopantes, corantes, nanopartículas, com objetivo de aumentar a funcionalidade do composto e melhorar a qualidade mecânica da microestrutura fabricada almejando futuras aplicações.

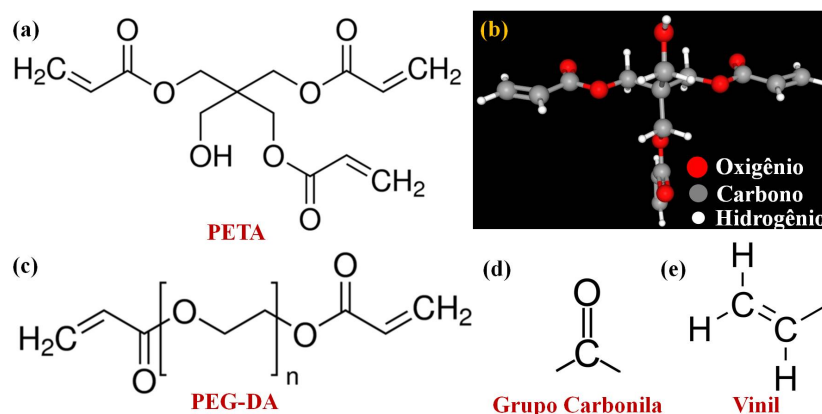
A resina polimérica utilizada na construção das microestruturas tridimensionais via P2F estudadas neste projeto é classificada como do tipo negativa e foi preparada por meio da combinação de dois componentes principais, monômero triacrilato e fotoiniciador. Serão descritos nos dois seguintes tópicos 3.3.1 e 3.3.2 estes materiais mencionados, além de outros componentes que comumente são procurados para uso nesta linha de pesquisa.

#### 3.3.1 Monômero

Os monômeros acrilatos apresentam em suas fórmulas químicas compostos contendo grupo carbonila e vinil, figura 3.8. A Pentaerythritol Triacrylate (PETA,  $C_{14}H_{18}O_7$ ) ou também nomeado ([2-(hydroxymethyl)-3-prop-2-enoyloxy-2-(prop-2-enoyloxymethyl)propyl]prop-2-enoate) é um monômero triacrilato, porque possui no total três grupos de acrilatos um em cada extremidade, como representado na figura 3.8(a), que na presença da molécula do fotoiniciador são capazes de reagirem durante a fotopolimerização [28]. Este

composto foi utilizado na manipulação da resina preparada neste trabalho, ele consiste em um líquido viscoso, transparente e insolúvel em água, levemente solúvel em acetona e etanol. Possui peso molecular de 298.29 g/mol e sua fórmula molecular é dada por:  $(\text{H}_2\text{C}=\text{CHCO}_2\text{CH}_2)_3\text{CCH}_2\text{OH}$  [29].

Figura 3.8: Estrutura molecular do (a) monômero triacrilato PETA em 2D e (b) em 3D; (c) monômero diacrilato PEGda; (d) grupo Carbonila e (e) Vinil.



Fonte: ChemSpider [29], Sigma-Aldrich, [30].

Os monômeros são indispensáveis para confecção das microestruturas, já que, na presença dos radicais livres e dos centros ativos, eles têm como função principal se agrupam e formam uma rede complexa que é conhecida por polímero. Todavia, estes monômeros não conseguem substituir a função dos fotoiniciadores, pois sozinhos não promovem a polimerização quando expostos ao laser, logo os fotoiniciadores são componentes cruciais.

Por outro lado, este componente tem várias vantagens, sendo usado principalmente por sua propriedade de gerar estruturas poliméricas muito mais rígidas e resistentes ao solvente, que resulta no aumento da dureza do polímero reduzindo o encolhimento das paredes das microestruturas polimerizadas após a lavagem [29], procedimento necessário para retirada de resíduos de substâncias que não foram polimerizadas no final do processo de escrita.

Outro reagente muito conhecido e utilizado por pesquisadores nesta linha de pesquisa é o PEG-DA (Poly(ethylene glycol) Diacrylate), um monômero diacrilato, pois consiste em dois pares de acrilatos, um em cada extremidade de sua estrutura molecular como mostrado na figura 3.8(c), frequentemente adotado na preparação de hidrogéis sintéticos [31]. Os hidrogéis sintéticos são biomateriais formados por polímeros com grande afinidade com moléculas de água e maior solubilidade, além de serem biocompatíveis, mais macios, flexíveis e menos agressivos ao meio biológico [32].

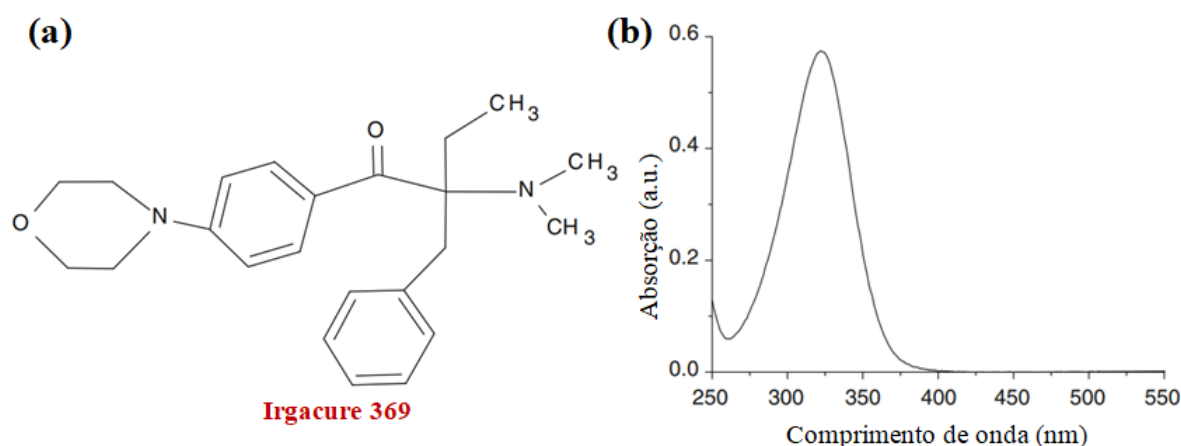
### 3.3.2 Fotoiniciador

O fotoiniciador Irgacure 369 (2-Benzyl-2-dimethylamino-1-(4-morpholin-ophenyl)-butanone-1) ou também IRG 369 foi utilizado neste trabalho para formulação da resina, mostrado na figura 3.9, é uma substância em pó com peso molecular de 366.5 g/mol e apresenta solubilidade em acetona, hexanediol diacrylate (HDDA), dentre outros. Suas moléculas são capazes de absorver energia proveniente da fonte de excitação na faixa do UV, promover absorção por dois fótons e gerar os radicais livres que corresponde ao princípio do processo de fotopolimerização.

Sua aplicabilidade é ampla, já que, este material permite ser incorporado com outros fotoiniciadores, como Irgacure 184 e Irgacure 651, na formação de tintas e verniz, ou ainda na construção de microestruturas de diversos tipos. A concentração de massa (% massa) do fotoiniciador é determinada com relação a massa do monômero, sendo frequentemente utilizado de 0,5% até 5%, dependendo da finalidade de sua aplicação [33].

É mostrado o espectro de absorção UV-Visível do fotoiniciador puro dissolvido em álcool isopropílico pela figura 3.9(b), ele exibiu uma ampla banda de absorção centrada em torno de 325 nm e tem mostrado ser eficiente no processo de polimerização na geração de radicais livres para P2F usando lasers de femtossegundos na faixa do IR.

Figura 3.9: (a) Estrutura molecular e (b) espectro UV-Visible do IRG 369 puro dissolvido em álcool isopropílico.

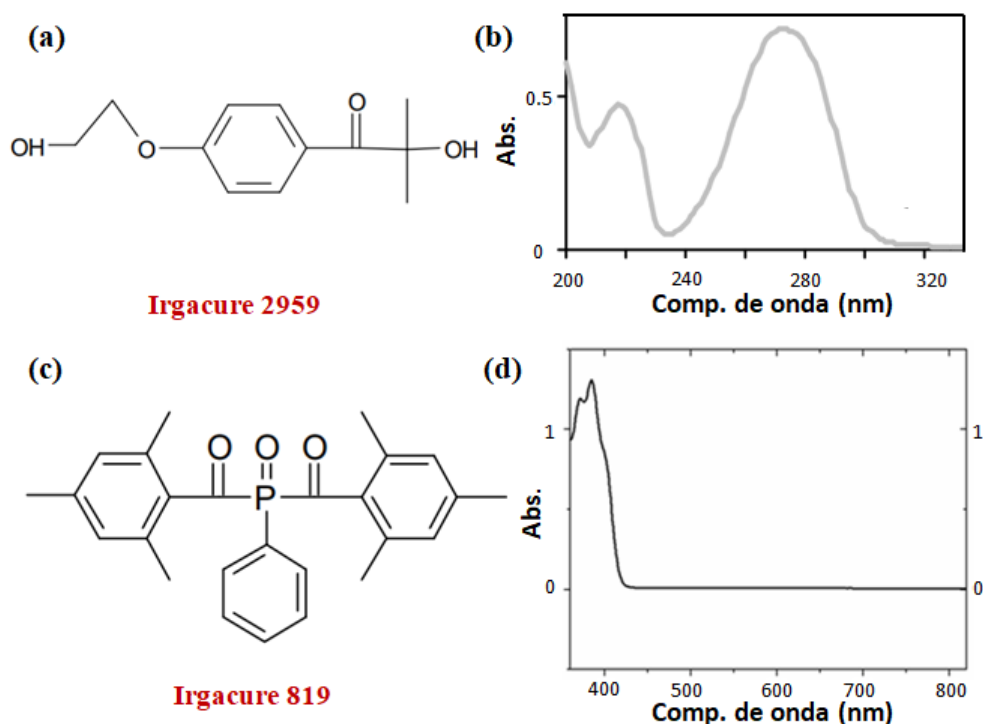


Fonte: Ciba [33], Oubaha [34].

Existem também um grupo de fotoiniciadores caracterizados por serem solúveis em água e muito utilizados na síntese de hidrogéis, como por exemplo, Irgacure 2959 ou IRG 2959 (usado neste trabalho) (1-[4-(2-Hydroxyethoxy)-phenyl]-2-hydroxy-2-methyl-1-propane-1-one) é um composto em pó na cor branca com pico de absorção linear centrado em 276 nm, possui peso molecular de 224.3 g/mol e apresenta também solubilidade em

etanol, mostrado na figura 3.10 (a) e (b).

Figura 3.10: Estrutura molecular do (a) IRG 2959 e (c) IRG 819. Espectro de absorção do FI (b) IRG 2959 e (d) IRG 819 obtido pelo espectrofotômetro UV-VIS-NIR (espectrômetro UV-3600, Shimadzu).



Fonte: Ciba [33], Scarpa [32].

O fotoiniciador Irgacure 819 (Bis(2,4,6-trimethylbenzoyl)-phenylphosphineoxide) é uma substância líquida com cor amarelo claro tem peso molecular de 418.5 g/mol e é solúvel em acetona, hexanediol diacrylate (HDDA), dentre outros. É comum sua utilização em processo não linear de A2F, devido ao seu pico de absorção em torno de 350 - 390 nm como é notado pelo espectro de absorção pelo UV-Vis da figura 3.10(d), podendo ser usado laser de pulsos ultracurtos centrados em 780 nm para desencadear o fenômeno desejado.

### 3.4 APARATO EXPERIMENTAL

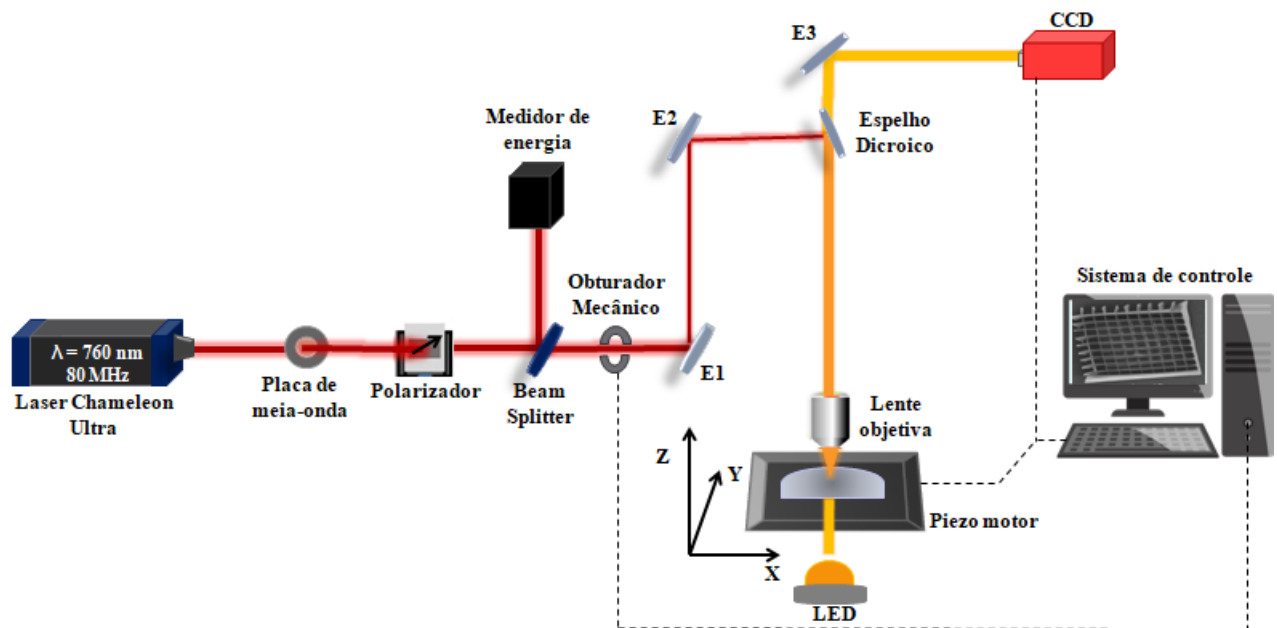
Para construção das microestruturas tridimensionais via P2F utiliza-se um aparato experimental ( $\mu$ Fab Workstation-NEWPORT), como ilustrado na figura 3.11, é configurado por um laser de femtossegundos que é acoplado a uma lente objetiva de microscópio (série M, NEWPORT), o qual admite focalizar a luz no interior da resina.

O feixe do laser antes de chegar à amostra, incide sobre um sistema que regula a exposição da intensidade de energia, composto por uma placa de meia onda (HWP), polarizador (GLP), beam splitter (BS), o qual separa uma parte da potência e o obturador

mecânico (Shutter), que controla a velocidade de interação e o tempo de escrita na amostra (abrindo e fechando o Shutter), de modo que, é usado um software no computador para controlar estes dispositivos.

Em seguida, a luz percorre um par de espelhos e é direcionada até chegar ao espelho dicróico, que tem como função permitir a passagem da luz no comprimento de onda do espectro visível até a câmera CCD e a outra parte na faixa do infravermelho é refletida para a lente objetiva de microscópio que focaliza o feixe de excitação em uma pequena região da amostra.

Figura 3.11: Configuração experimental para fabricação de microestruturas tridimensionais via P2F.



Fonte: Elaborada pela autora.

A resina fica posicionada em uma base plana que se movimenta nas coordenadas  $x$ ,  $y$  e  $z$ , função desempenhada pelo dispositivo piezo motor que controla com precisão a posição e a velocidade durante a escrita. Como também, antes de iniciar a escrita a laser, o sistema  $\mu$ Fab permite ajustar o foco do laser movendo a resina ao longo do eixo  $z$  por meio do estágio de translação conectado em um translador em escala micrométrica, que pode ser feito de forma manual ou também pelo software no computador para melhor precisão, enquanto que o laser é mantido fixo [35].

Uma pequena gota da amostra é depositada em um substrato, em geral pode ser uma lamínula ou lâmina de vidro, em seguida, é iluminada pela câmera CCD localizada na parte superior da amostra e por um LED vermelho na parte inferior, os quais são necessários para acompanhar em tempo real o passo a passo de escrita a laser visualizados pelo software no monitor do computador que controla todos os dispositivos e é possível inserir os parâmetros de escrita.

### 3.4.1 Compressão temporal: Laser de pulso ultracurto

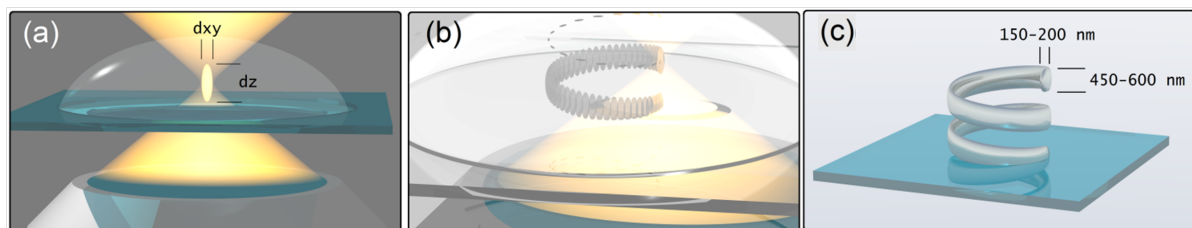
O sistema experimental montado é alimentado pelo laser com pulsos ultracurtos modelo Chameleon Ultra-COHERENT que produz pulsos com duração em torno de 140 fs a uma taxa de repetição da ordem de 80 MHz, com uma ampla faixa de comprimento de onda sintonizável desde 690 nm até 1020 nm, sendo que, neste trabalho foi utilizado o comprimento de onda fixado em 760 nm na faixa do IR para escrita das microestruturas tridimensionais [36], [37].

### 3.4.2 Compressão espacial: Limite de resolução do voxel

Na microfabricação se busca construir microestruturas cada vez menores com alta resolução espacial da escala submicrométrica, para tal êxito, é essencial ter a noção das dimensões e geometria do voxel formado para determinada potência (associada à energia do feixe laser) e abertura numérica utilizada (relacionada à lente objetiva).

Os voxel são os menores volumes que podem ser polimerizados em cada pulso de interação luz-resina durante a etapa de construção das estruturas planejadas, como mostrado pela figura 3.12. Ao analisar as propriedades mecânicas dos voxel, eles são volumes rígidos e insolúveis ao solvente específico utilizado na etapa de lavagem das microestruturas.

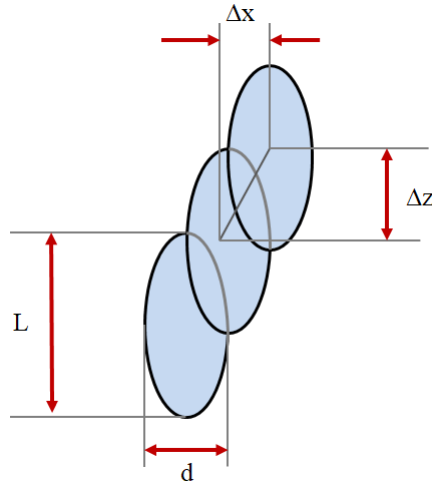
Figura 3.12: Processo de formação de uma microestrutura a partir de vários voxel sobrepostos, onde  $d_{xy}$  e  $dz$  representam o diâmetro e altura do voxel, respectivamente.



Fonte: Varapnickas; Malinauskas [38].

Conforme a metodologia de confecção das microestruturas tridimensionais, à medida que o estágio de translação, no qual a resina está depositada, se desloca no plano  $xy$  e na direção do eixo  $z$  sob a parte inferior do laser, vários voxel são formados, um sobre o outro, os quais se conectam e originam as camadas e as paredes da microestrutura, em resumo, tal método consiste na superposição de inúmeros voxel nos três eixos. Claramente, como ilustrado na figura 3.13, a distância de separação entre dois voxel ( $\Delta X, \Delta Y, \Delta Z$ ) deve ser menor que a altura  $L$  e o diâmetro  $d$  do voxel. Desta maneira, todos os voxel vão se intersectar e as paredes não irão sedimentar durante o processo de lavagem.

Figura 3.13: Representação da intersecção do voxel conforme a metodologia de escrita,  $\Delta X$  e  $\Delta Z$  são as distâncias de dois voxel nas direções  $x$  e  $z$ , respectivamente.



Fonte: Adaptado de Zhou et al. [39].

Para obter a informação das dimensões e geometria do voxel formado é importante compreender primeiramente, a distribuição espacial e as propriedades físicas e geométricas da luz de um laser com perfil gaussiano incidindo através de uma lente circular de uma objetiva de microscópio. Neste contexto, serão apresentados os parâmetros que caracterizam um feixe laser e as propriedades das lentes objetivas de microscópio, por fim, é apresentado o estudo da interferência destes dois componentes que se fazem presentes na técnica de microfabricação.

### 3.4.3 Feixe gaussiano

A compreensão distribuição espacial do perfil do feixe gaussiano é um aspecto essencial para aplicação da técnica de microfabricação por escrita direta a laser. A intensidade de um feixe de luz em coordenadas cilíndricas é representada por:

$$I_{gaussiano}(r, z) = I_0 \left[ \frac{W_0}{W(z)} \right]^2 \exp \left[ \frac{-2r^2}{W(z)^2} \right], \quad (11)$$

em que  $I_0$  é intensidade de luz de pico no centro do feixe em  $z = 0$ ,  $W_0$  é o raio da cintura mínima de um feixe gaussiano,  $W(z)$  é o raio do feixe de Gauss a uma distância axial  $z$  do centro,  $z$  é a distância propagada do plano em que a frente de onda é plana e  $r$  é o raio transversal. É útil expressar a intensidade em termos da potência transportada pelo feixe de luz, pois é um parâmetro de grande influência na largura do voxel. A potência é dada pela integral  $\int_0^{2\pi} \int_0^\infty I_{gaussiano}(r, z) r dr d\theta$ , que resulta em:

$$P = \frac{I_0}{2} (\pi W_0^2), \quad (12)$$

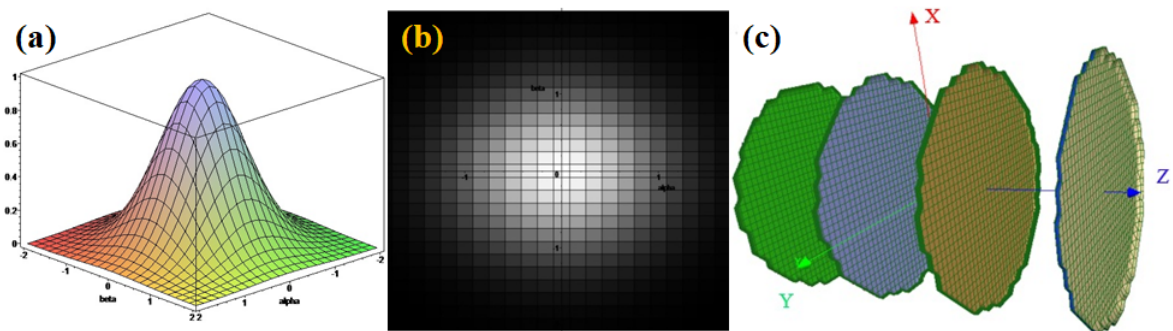


Para escrever a intensidade em termos da potência, basta substituir a equação (12) em (11) para reescrever da seguinte forma:

$$I_{gaussiano}(r, z) = \frac{2P}{\pi W(z)^2} \exp \left[ \frac{-2r^2}{W(z)^2} \right], \quad (13)$$

A partir destas equações é possível simular a intensidade de um feixe gaussiano simétrico que se propaga na direção  $z$ , por meio de um software computacional pelo sistema algébrico computacional Maple. A figura 3.14(a) reproduz a distribuição espacial de um feixe gaussiano simétrico (sem astigmatismo) que possui uma distribuição de energia que decresce à medida que o eixo  $z$  se distancia do ponto central  $z = 0$ .

Figura 3.14: (a) Representação da distribuição espacial de intensidade de um feixe gaussiano simétrico em três dimensões. (b) Representação da densidade espacial de um feixe gaussiano simétrico em duas dimensões, onde a intensidade diminui do branco ao preto. Consideram-se os seguintes parâmetros:  $W_0 = 2$  mm,  $\lambda = 632,8$  nm,  $z = 0$  e  $z_R = 19,85$  m. (c) Representação das frentes de ondas planas de um feixe Gaussiano, reproduzida no software Mathmod versão 8.0, geradas pelas seguintes equações:  $z = 0, z = 1, z = 2$  e  $z = 3$ .

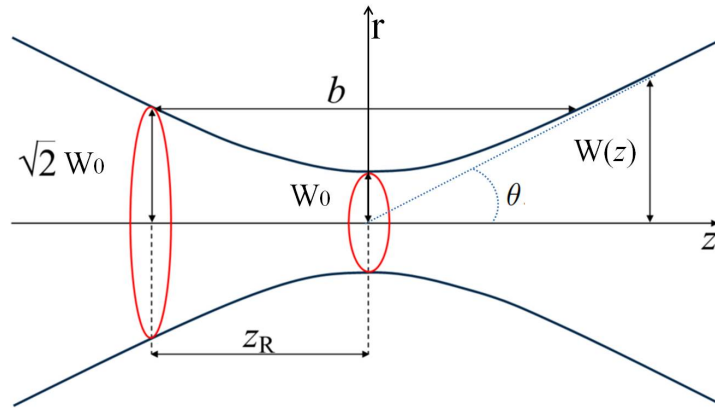


Fonte: Elaborado pela autora.

Por esta razão, nota-se na figura 3.14(b) que existe uma região mais intensa no centro, ressaltado pela cor branca, e nas partes das bordas a intensidade do feixe é menos intensa como mostrado em preto. Além disso, os feixes gaussianos são caracterizados por frentes de ondas planas como pode ser observado pela figura 3.14(c).

Os parâmetros de interesse que configuram o perfil espacial de um feixe gaussiano, apresentados pela equação (11), foram organizados na figura 3.15. Percebe-se que, ao longo da propagação do feixe gaussiano pelo espaço, sua intensidade não se mantém constante, isto porque a intensidade  $I_{gaussiano}(r, z)$  é definida em função das distâncias radiais  $r$  e axiais  $z$ . Portanto, haverá um momento em que o feixe irá convergir em uma área com o menor valor de raio, que corresponde ao raio da cintura mínima do feixe  $W_0$  e em seguida, a luz diverge formando um ângulo de espalhamento  $\theta$ , que é o mesmo ângulo de convergência.

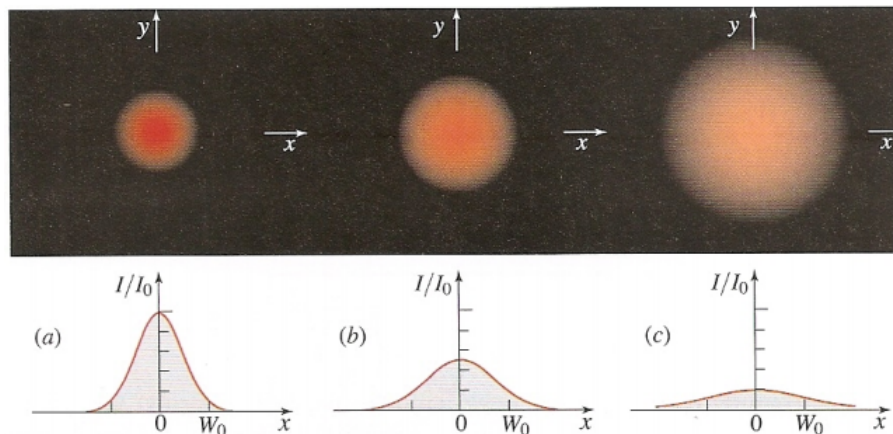
Figura 3.15: Largura do feixe gaussiano  $W(z)$  como função da distância  $z$  ao longo do feixe (em vermelho). Onde são destacados os parâmetros, como: raio mínima da cintura do feixe  $W_0$ ; intervalo de Rayleigh  $z_R$  e espalhamento angular ou ângulo de divergência  $\theta$ .



Fonte: Mroczkowska [40].

A distribuição de energia do feixe gaussiano em função da distância radial e uma determinada distância axial é mostrado na figura 3.16. Para interpreta-la fisicamente, considere que seja fixado o eixo óptico do feixe em  $r = 0$ , pela equação (11), é obtido apenas:  $I_{gaussiano}(r, z) = I_0 \left[ \frac{W_0}{W(z)} \right]^2 = \frac{I_0}{1+(z/z_R)^2}$ . A intensidade possui um pico com maior intensidade dado por  $I_{gaussiano}(r, z) = I_0$  em  $z = 0$  destacado na figura 3.16(a) e o aumento sucessivo da distância axial  $z$  representa menores intensidades, como retratado na figura 3.16(b) para  $z$  equivalente ao intervalo de Rayleigh  $z = z_R$  a intensidade será a metade da intensidade máxima  $I_0$ . Por último, em 3.16(c) é menor ainda no ponto  $z = 2z_R$ .

Figura 3.16: Intensidade normalizada do feixe de luz  $I_{gaussiano}(r, z)/I_0$  como função da distância radial  $r$  em diferentes distâncias axiais, dada por: (a)  $z = 0$ ; (b)  $z = z_R$ ; (c)  $z = 2z_R$ .



Fonte: Saleh [41].

O raio da cintura mínima do feixe gaussiano  $W_0$  e o espalhamento angular  $\theta$  são parâmetros inversamente proporcionais, regidos pela equação abaixo, a qual expressa que

para obter uma cintura do feixe menor é necessário que o feixe seja espalhado por um ângulo maior e vice-versa [41]:

$$W_0 = \frac{\lambda}{\pi\theta}, \quad (14)$$

em que  $\lambda$  é o comprimento de onda do laser. O raio do feixe gaussiano  $W(z)$  cresce progressivamente com  $z$ , sendo definido pela seguinte equação:

$$W(z)^2 = W_0^2 + \left(\frac{\lambda}{\pi W_0^2}\right)^2 z^2 \quad (15a)$$

$$W(z) = W_0 \left[1 + \left(\frac{\lambda z}{\pi W_0^2}\right)^2\right]^{1/2}. \quad (15b)$$

Ao colocar  $z = 0$  na equação (15b),  $W(z)$  assume o menor valor que corresponde ao raio da cintura mínima do feixe  $W_0$  e possui área circular de secção transversal dada por  $A_0 = \pi W_0^2$ . Quando  $z$  atinge o parâmetro  $z_R$  conhecido por intervalo de Rayleigh, corresponde à região no plano transversal que possui o dobro da área da cintura mínima do feixe, com  $W(z) = W(z_R) = \sqrt{2}W_0$  e conseqüentemente  $A_R = \pi W(z_R)^2 = 2A_0$ . Portanto, a partir da equação (15b), o termo entre colchetes deve ser 2 e é definido a expressão matemática que representa o comprimento do intervalo de Rayleigh, dado por:

$$z_R = \frac{\pi W_0^2}{\lambda}. \quad (16)$$

Reescrevendo o raio do feixe gaussiano  $W(z)$  em termos do intervalo de Rayleigh será:

$$W(z) = W_0 \left[1 + \left(\frac{z}{z_R}\right)^2\right]^{1/2} \quad (17)$$

O dobro da distância  $z_R$  indica à profundidade de foco, que correspondente à região paralela ao eixo  $z$ , que foi destacada por  $b$  na figura 3.15, delimitada pelo raio do feixe gaussiano dado por  $W(z_R) = \sqrt{2}W_0$  quando  $z = z_R$ , então:

$$2z_R = \frac{2\pi W_0^2}{\lambda}. \quad (18)$$

A profundidade de foco indica a distância em que o feixe permanece focalizado, alcançando seu melhor foco em  $z = 0$  com raio igual ao raio da cintura mínima do feixe. Se o feixe laser é focalizado em uma área muito pequena, a equação sugere que a profundidade

de foco terá sua distância reduzida também.

### 3.4.4 Objetivas de microscópio

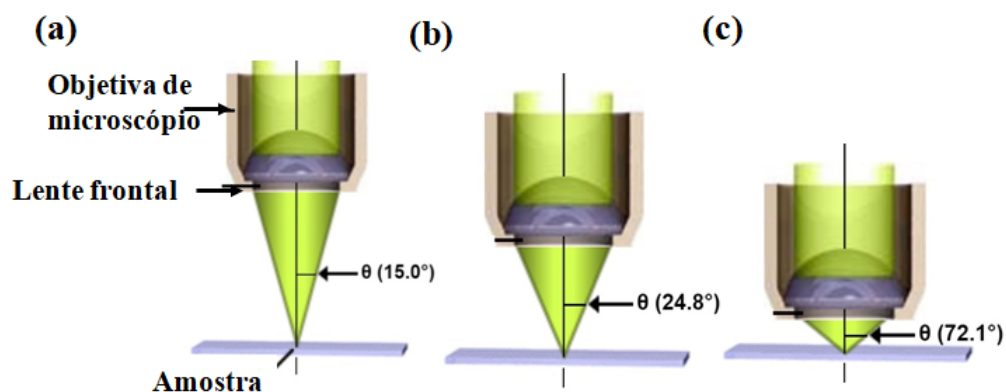
O conceito de abertura numérica, é definido por Abbe em 1873 [51], como o método de mensurar a capacidade que as lentes objetivas têm captar a luz, representada pela fórmula algébrica:

$$NA = n \sin \theta, \quad (19)$$

em que  $n$  é o índice de refração do meio entre a objetiva e lâmina de vidro por onde a luz se propaga até chegar na amostra (que pode ser no ar com  $n = 1$ , água com  $n = 1,33$ , óleo de imersão  $n = 1,51$ , entre outros) e  $\theta$  indica a metade da abertura angular da lente. É constatado, na figura 3.17, a relação entre a abertura numérica da lente objetiva e o ângulo de abertura, os quais são grandezas diretamente proporcionais.

Estes parâmetros influenciam diretamente nas dimensões do voxel formado, posto que, quando se busca fabricar microestruturas com maiores resoluções espaciais é indicado utilizar uma abertura numérica maior, pois o ângulo com que a luz incidente se propaga também será maior, demonstrando que mais luz foi capturada por ela.

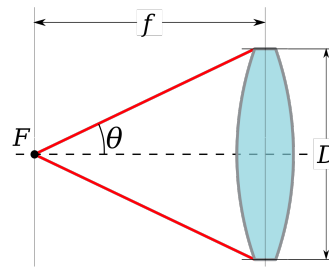
Figura 3.17: Lentes objetivas com diferentes aberturas numéricas para  $n = 1$ : (a)  $\theta = 15^\circ$  e  $NA = 0,25$ ; (b)  $\theta = 24,8^\circ$  e  $NA = 0,42$ ; (c)  $\theta = 72,1^\circ$  e  $NA = 0,95$ .



Fonte: Adaptado de Davidson [43].

Na figura 3.18 são representados os parâmetros que definem a trajetória do feixe de luz que sai da fonte localizada no ponto  $F$  e passa através da abertura de uma lente, em que  $f$  é a distância focal,  $\theta$  é a metade do ângulo máximo formado pelo cone de luz e  $D$  é o diâmetro da lente.

Figura 3.18: Geometria de um feixe luz incidindo sobre uma lente.



Fonte: Abertura... [44].

Pela geometria da trajetória do feixe de luz que incide na lente é possível reescrever a abertura numérica que aparece na definição de Abbe, partindo do pressuposto que  $\theta$  seja pequeno, tem-se que [45]:

$$NA = n \sin \theta = n \sin \left[ \tan^{-1} \left( \frac{D}{2f} \right) \right] \approx n \frac{D}{2f}. \quad (20)$$

Esta aproximação é obedecida para ângulos de até  $30^\circ$  graus, que corresponde a uma abertura numérica de  $NA = 0,5$ , já para ângulos superiores a equação (20) não retrata o valor exato.

Como exemplo desta discussão, pode-se considerar uma lente objetiva de microscópio (Olympus Plan N) com características de fábrica: magnificação de 20X, diâmetro de 6,1 mm e distância focal de 9 mm, considerando a aproximação feita na equação (20) para utilização no ar resulta em  $NA = 0,338$ , observa-se que é obtido um valor próximo do valor real de  $NA = 0,40$ .

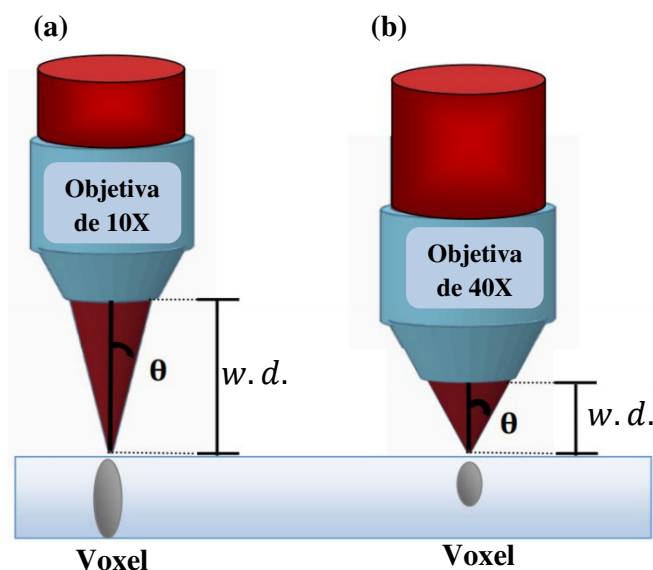
Por outro lado, uma outra lente objetiva de microscópio (Olympus Plan N) com parâmetros:  $n = 1$ , magnificação de 40X, diâmetro de 7,5 mm e distância focal de 4,5 mm, pela aproximação se tem como resultado uma  $NA = 0,833$ , que não condiz com o esperado sendo de  $NA = 0,65$  [46].

Ao analisar a equação (19), teoricamente utilizando o índice de refração do ar na interface lente-amostra, o maior valor de abertura numérica ( $NA = 1$ ) será atingido com ângulo de  $90^\circ$ , no entanto, na prática não é alcançado. Por isso, faz-se notório que o índice de refração  $n$  para meios diferentes do ar é um termo que colabora na obtenção de aberturas numéricas maiores que 1, sendo assim, uma forma de melhorar o poder de resolução da lente objetiva de microscópio é mudar o índice de refração do meio com a adição de óleos de imersão entre a lente frontal e a amostra, já que,  $n$  é diretamente proporcional a  $NA$ , resultando em aberturas numéricas superiores a 1. Portanto, são diversos os tipos de lentes objetivas que se diferem por seus parâmetros, como por exemplo, abertura numérica ( $NA$ ), magnificação e distância de trabalho.

A magnificação corresponde ao número de vezes que o tamanho da imagem pode superar o tamanho real do objeto. A abertura numérica é uma característica importante, porque determina o nível de eficiência da objetiva para promover melhor resolução das microestruturas. A distância de trabalho (work distance - w.d) é o espaço entre a lente frontal da objetiva e a superfície da lamínula de vidro. Na figura 3.19 são ilustradas as dimensões dos voxel de acordo com a abertura numérica escolhida para fabricação, assim como, as distâncias de trabalho.

O volume focal do feixe laser será menor para lentes objetivas com maior magnificação, como por exemplo, 40X e com grande abertura numérica ilustrado na figura 3.19(b), dando origem à microestrutura com melhor resolução transversal, devido ao voxel ter formato mais proporcionalmente simétrico e ocupando um menor volume polimerizado [20], no entanto, a distância de trabalho é mínima. Já no caso de objetivas com menor magnificação de 10X, permite uma maior distância de trabalho, onde são gerados voxel desproporcionais com maiores dimensões, com características elípticas (mais cumpridas) e menor resolução transversal [47] figura 3.19(a).

Figura 3.19: Comparação entre o voxel formado de acordo com a lente objetiva, (a) para  $NA = 0,25$  e (b)  $NA = 0,65$ . Quanto maior à abertura numérica melhor o poder de resolução, porém menor será w.d.



Fonte: Elaborado pela autora.

Vale ressaltar que existe também a opção de usar lentes objetivas de imersão em óleo com altos valores de abertura numérica que possibilita uma excelente resolução, utilizadas na construção de estruturas com linhas mais finas na escala de nanômetros [48], devido às menores dimensões do polímero formado com área de trabalho mínima, ampliação de 63X,  $NA = 1,40$  e distância de trabalho de 0,19 mm (conforme o modelo da marca Zeiss) [49].

Estes parâmetros são características fundamentais das lentes objetivas, pois re-

fletem na qualidade das microestruturas construídas e são utilizadas de acordo com a finalidade desejada para cada estrutura, são destacadas as informações de cinco diferentes lentes objetivas<sup>1</sup>, usadas no decorrer desta pesquisa, contidas na tabela a seguir:

Tabela 3.1: Diferentes aberturas numéricas das lentes objetivas utilizadas no decorrer do trabalho.

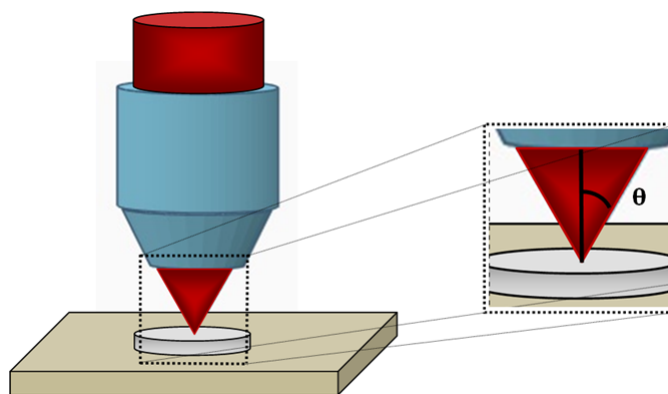
Abertura Numérica	Magnificação	Distância do trabalho (mm)
0,25	10X	5,5
0,40	20X	1,7
0,65	40X	0,6
1,40	63X	0,19
0,70	100X	6,50

Fonte: Elaborada pela autora.

### 3.4.5 Distribuição espacial da propagação do feixe gaussiano pela lente objetiva

As lentes objetivas de microscópio têm por objetivo fundamental focalizar o feixe laser no interior da amostra, como ilustrado na figura 3.20, além de promover a P2F para o desenvolvimento de microdispositivos com resoluções cada vez maiores, isso ocorre devido à possibilidade de alcançar um menor raio da cintura mínima do feixe  $W_0'$ , que é numericamente inferior ao raio da cintura mínima do feixe  $W_0$  original que incide na entrada da lente.

Figura 3.20: Feixe gaussiano transmitido através de uma lente objetiva de microscópio com abertura angular  $\theta$ .



Fonte: Elaborado pela autora.

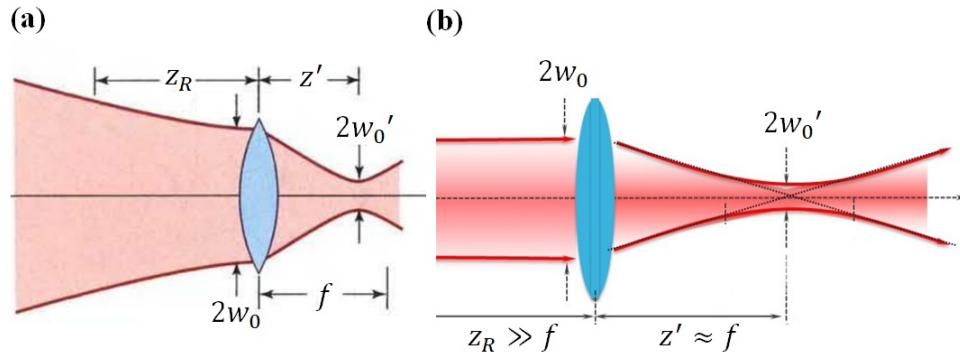
Quando um feixe gaussiano é transmitido através de um instrumento óptico seus efeitos são alterados para remodelar a geometria do feixe de luz, basicamente o raio da

<sup>1</sup>Em particular, a lente objetiva com  $NA = 0,70$  (100X, Zeiss) possui uma longa distância de trabalho que permite focalizar em regiões mais profundas da amostra sem que haja contato com a superfície do material. É excelente para fabricação de microestruturas com altura mínima  $\leq 4 \mu\text{m}$ .



cintura mínima do feixe e a profundidade de foco são modificados, no entanto, a natureza gaussiana é mantida. Ao posicionar uma lente objetiva de microscópio, que possui uma distância focal  $f$ , exatamente próximo à cintura mínima do feixe gaussiano em  $z = 0$ , ele será focalizado a uma distância  $z'$  e terá um novo valor de raio da cintura mínima do feixe representado por  $W_0'$  menor que o anterior, este esquema é mostrado na figura 3.21(a).

Figura 3.21: Ilustração da distribuição espacial do feixe gaussiano ao interagir com a lente objetiva de microscópio: (a) Configuração sem aproximação; (b) é feita a aproximação de que  $z' \approx f$ .



Fonte: Saleh [41]; Sánchez-López, et al. [50].

O novo raio da cintura mínima do feixe  $W_0'$  e a distância  $z'$  que é delimitada da lente até o novo raio da cintura é dada [41], respectivamente por:

$$W_0' = \frac{W_0}{\left[1 + \left(\frac{z_R}{f}\right)^2\right]^{1/2}} \quad (21a)$$

$$z' = \frac{f}{1 + \left(\frac{f}{z_R}\right)^2}. \quad (21b)$$

É feita a seguinte aproximação, se a profundidade de foco  $2z_R$  do feixe incidente na entrada da lente for muito maior que a distância focal, pelas equações anteriores, a nova cintura mínima do feixe será focalizada aproximadamente no plano focal da lente como ilustrado na figura 3.21(b), devido à característica do feixe de luz incidente nesta região ser quase colimado e apresentar frente de ondas planas. Portanto, pode-se aproximar  $W_0' \approx \frac{fW_0}{z_R}$  e em seguida, substituindo as equações (16) e (14) nesta mesma ordem, é obtida a expressão da equação (22a):

$$W_0' \approx \frac{\lambda f}{\pi W_0} = \theta f \quad (22a)$$

$$z' \approx f. \quad (22b)$$



Como o feixe de luz deve permear a lente, seu diâmetro  $D$  (definido na figura 3.18) precisa ser pelo menos  $2W_0$ , substituindo esta informação na equação (20) com  $n = 1$  e usando a equação (14), é dado a distância focal como  $\lambda/\pi NA$  que substituindo na (22a) permite relacionar a abertura numérica com o novo raio da cintura mínima do feixe gaussiano, dado por:

$$W_0' \approx \frac{\lambda}{\pi NA} \quad (23)$$

Conclui-se que, ao interpretar a expressão anterior, a  $NA$  é inversamente proporcional a  $W_0'$ , de modo que, quando aumentado o valor da abertura numérica melhor será o poder de focalização na amostra [51] com valores pequenos de raio da cintura mínima do feixe gaussiano, e conseqüentemente, maior será a resolução no plano transversal do objeto. Para lentes objetivas com menores aberturas numéricas mais baixo será seu poder de captar luz devido ao pequeno ângulo de abertura e menor será a resolução espacial.

Em aplicações com feixe gaussiano, como por exemplo, na área da microfabricação via escrita direta a laser, é de enorme interesse que a nova cintura mínima do feixe seja a menor possível e claramente como estudado, é útil usar uma lente para reduzir este parâmetro. Esta exigência é desejada porque a distribuição do perfil do feixe ao interagir com a lente será focalizado na resina e a distância axial e transversal do ponto focal determina o tamanho do voxel formado, que terá as dimensões regidas pelo novo raio da cintura mínima do feixe  $W_0'$  que corresponde aproximadamente ao seu diâmetro  $d$  e altura do voxel  $L$  é múltiplo de  $W_0'$ , porém o elemento de volume polimerizado pode ser menor que as dimensões da região focal da objetiva.

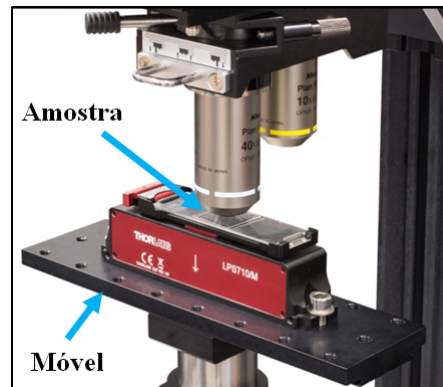
Em geral, é essencial esta investigação para que as linhas que formam as microestruturas tenham o mínimo de espaçamento entre elas e se conectarem, para isso é preciso ter uma noção das dimensões do voxel constituído. A partir destes estudos é provável prever a resolução do menor elemento de volume que constitui as microestruturas.

### 3.4.6 Estágio de translação

O sistema responsável por fazer o feixe laser percorrer trajetórias pré-determinadas polimerizando várias regiões da resina polimérica nas direções das coordenadas  $x$ ,  $y$  e  $z$  para construção de microestruturas tridimensionais são os chamados sistemas motorizados de translação, representado pela figura 3.22, os quais são estágios piezoelétricos que fornecem movimentos suaves, repetíveis e com grande precisão, podendo se deslocar em distâncias de poucos centímetros, mas com precisão micrométrica (sistema de movimento com resolução de  $0,05\mu m$ ) [52] [35].

Outros dispositivos importantes estão interligados ao funcionamento do sistema motorizado de translação durante a escrita. Exemplo disso, é o obturador mecânico, conforme o mecanismo de fechar o Shutter, ele impede que regiões desnecessárias sejam polimerizadas durante o movimento de fabricação [20], assim restringe a polimerização somente em volumes específicos pré-determinados no design 3D.

Figura 3.22: Estágio de translação do sistema de microfabricação.



Fonte: Adaptado de Thorlabs [53].

É vantajoso utilizar o sistema motorizado de translação no setup experimental para resinas com maior viscosidade. Porém, se a resina possui menor densidade, devido à cinética do mecanismo de escrita pela ação da inércia, as estruturas polimerizadas podem sedimentar exibindo defeitos, tais como, separação das linhas e apresentar curvas indesejadas em suas paredes [54]. Nesta situação, é aconselhável usar os espelhos galvanométricos que desempenham funções semelhantes dos estágios piezoelétricos, porém com modo de funcionamento distinto, pois eles direcionam a luz do laser pela amostra por meio do movimento de dois espelhos que refletem o feixe laser sem necessidade de mover a base de apoio em que está posicionada a resina [55], [19].

### 3.4.7 Sistema de imageamento em tempo real

Na maioria das aplicações da microfabricação envolvendo A2F é indispensável o uso de uma câmera CCD para confecção das microestruturas, que cumpre um importante papel no sistema experimental, pois tem por objetivo auxiliar nos ajustes dos parâmetros de escrita que são realizados devido ao poder de visualização dos detalhes nos procedimentos que envolvem a técnica.

Na prática, é possível distinguir os volumes polimerizados dos volumes não polimerizados devido à diferença do índice de refração de ambos os materiais. A câmera também permite localizar a posição das microestruturas, visualizar a resolução das paredes polimerizadas, observar possíveis defeitos nos microambientes, bem como, separação

de linhas, microexplosões devido a parâmetros escolhidos incorretamente, ondulações da amostra por causa do deslocamento do piezo motor, como também, a possibilidade de intervir imediatamente diante de ocorrências de erros, alterando os parâmetros de entrada como uma forma de segurança.

Todavia, para a CCD exercer estas funcionalidades é colocado um par de LEDs, um localizado na parte superior da câmera e outro na parte inferior do suporte onde está posicionada a amostra. A iluminação dos LEDs não altera a resina promovendo reações químicas de polimerização, visto que, seu comprimento de onda está localizado em 650 nm não sendo suficiente para ocorrer absorção linear.

### 3.5 PROGRAMAÇÃO PARA CONFECÇÃO DAS MICROESTRUTURAS

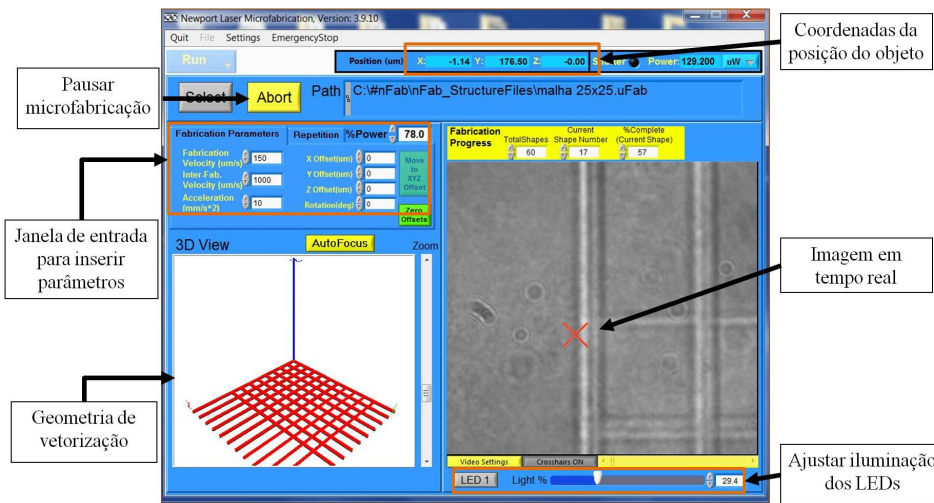
O comando de todos os processos de microfabricação de escrita a laser é realizado através do software identificado como *nFab*, desenvolvido pela empresa Newport, cuja função é estabelecer comunicação entre os equipamentos, bem como: sistema motorizado de translação, medidor de potência e obturador mecânico, os quais são componentes responsáveis respectivamente por, execução do movimento do sistema nos três eixos, ajuste da potência e do tempo de exposição.

O primeiro passo ao acessar o software é adicionar o arquivo com o design da microestrutura desejada, este documento é necessário para mostrar quais caminhos o feixe laser deve percorrer na construção da microestrutura, já que são diversos as direções e sentidos possíveis para obter um mesmo padrão. Este arquivo de vetorização pode ser desenvolvido pelo usuário no programa matemático MatLab, CAD (computer-aided design), 123D Design, ou em qualquer outra ferramenta de modelagem 3D e em seguida, deve converter o arquivo final no formato de leitura aceitável pelo software que consiste no .CVS para os pares de coordenadas de pontos ou .STL para desenhos 3D.

O *nFab* também oferece um recurso para criar o design da microestrutura no próprio software, visto na figura 3.23, as dimensões dos eixos são definidos pelo usuário, assim como, a distância entre cada linha no plano  $xy$ , sendo que, para obter um objeto tridimensional basta repetir várias camadas ao longo do eixo  $z$  que corresponde à altura da microestrutura.

Em seguida, através do software é possível ter acesso a imagem da superfície da resina pela câmera CCD, componente de extrema necessidade para conseguir focalizar o feixe laser na interface material-lamínula, para isso, pela janela de entrada do software deve ser escolhido em qual altura do eixo  $z$  o objeto será ancorado. Se necessário a iluminação dos dois LEDs podem ser ajustados e ainda determinar o posicionamento do objeto deslizando as barras nos eixos  $x$  e  $y$ , tudo através da janela de entrada.

Figura 3.23: Interface gráfica do software *nFab* usado para microfabricação por escrita direta a laser.



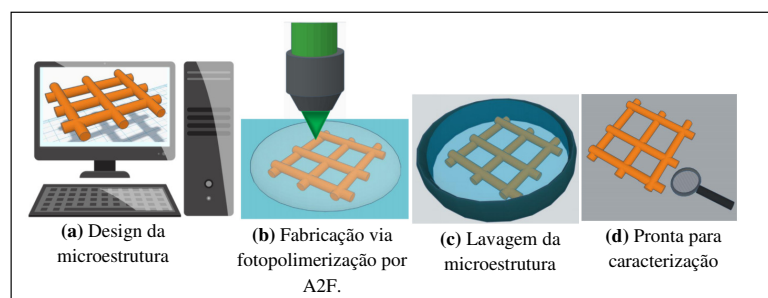
Fonte: Elaborado pela autora.

### 3.6 METODOLOGIA DA MICROFABRICAÇÃO

Os processos que compõem a microfabricação podem ser resumidos em quatro etapas principais, as quais foram representadas na figura 3.24: a primeira etapa é destinada a criação do design da microestrutura por meio de um programa matemático e escolhas dos parâmetros de escrita, tais como: a potência, a velocidade do laser e o tempo que o feixe irá incidir na resina durante o processo da escrita, que serão inseridos no software *nfab*, de modo que, o laser possui um enorme papel como ferramenta indispensável para confecção das microestruturas 3D.

No segundo passo, é realizado o processo de fotopolimerização que tornam a resina anteriormente líquida em um material sólido através do crescimento da cadeia molecular devido às fotoreações, posto que, podem ser construídas diversas repetições de uma mesma microestrutura em uma única gota de resina, pois as estruturas são de ordem micrométrica.

Figura 3.24: Etapas principais da microfabricação por escrita direta a laser.



Fonte: Adaptado de Rekstyte [54].

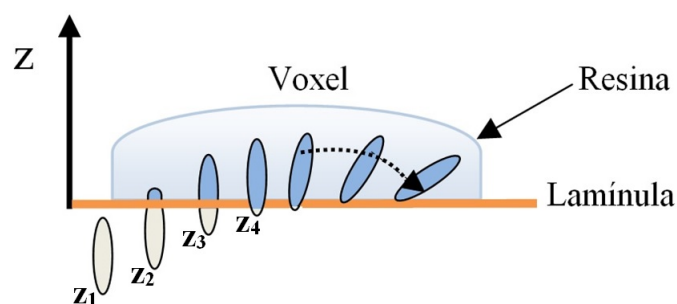
Por seguinte, em um ambiente na ausência de luz, a lamínula com as microestruturas

turas fixada na lâmina de microscópio é colocada imersa em um recipiente com etanol por 20 minutos fazendo pequenos movimentos e depois retirado cuidadosamente com a pipeta. O processo de lavagem é indispensável para o sucesso da técnica, porque o solvente tem a capacidade de dissolver os resíduos, já que, se não retirados completamente quando em contato com a luz visível serão polimerizados e irá danificar todo o trabalho de microfabricação a laser. Na última etapa as microestruturas estão prontas para procedimentos de caracterização e aplicações em geral.

Nota-se que é de suma importância no processo de microfabricação que a parte inferior da microestrutura esteja precisamente fixada no substrato para que na etapa de lavagem do material não polimerizado, a microestrutura não seja levada pelo solvente ou deformada.

Neste contexto, antes de iniciar a escrita é sempre necessário fazer testes para encontrar a posição adequada denominada por ponto zero ( $z_0$ ), que corresponde a altura no nível da lamínula sendo à posição em que os voxel irão se prender na superfície do vidro. Desta forma, para garantir excelentes microestruturas como desejado, é aconselhável iniciar a P2F ajustando o foco da lente objetiva na interface da superfície do substrato e a parte inferior da gota de resina, que pode ser localizada devido ao conjunto de iluminação e a câmera CCD que transmite imagens com alta resolução em tempo real [20]. Na figura 3.25 tem um esquema ilustrativo dos voxel em função do eixo vertical  $Z$ . Observa-se que, na posição  $z_1$  a resina não é polimerizada e nenhum voxel é fabricado, porque o material fotossensível não interage com o foco do feixe laser.

Figura 3.25: Representação dos voxel de acordo com a distância do eixo  $z$ .



Fonte: Baseado em Bieda [16].

À medida que o feixe é focalizado na região próxima da lamínula o voxel fica estável como mostrado na terceira posição dada pela altura  $z_3$ , onde aproximadamente a metade da altura do voxel  $L$  está presa no substrato, sendo essa a configuração ideal para iniciar a fabricação. No entanto, quando o laser é focalizado muito acima da lamínula a partir da altura  $z_4$ , o volume polimerizado fica instável, porque não há tanta adesão do voxel ao vidro, em seguida, cairá e ficará disperso no interior da resina podendo se mover.

## Referências

- [1] FRANSILLA, Sami. **Introduction to Microfabrication**. ed. 2, v.1, Wiley, 2010.
- [2] ZHANG, D; MEN, L; CHEN, Q. Microfabrication and applications of opto-microfluidic sensors. **Sensors** (Basel). v. 11, n. 5, p. 5360-5382, 2011.
- [3] TERRY, S. C.; JERMAN, J. H.; ANGELL, J. B.. A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer. **IEEE Trans. Electron Dev.**. v. 26, n. 12, p. 1880-1886, 1979.
- [4] MACHADO, C. B., et al. In Vitro Modelling of Nerve-Muscle Connectivity in a Compartmentalised Tissue Culture Device. **Adv Biosyst**. v. 3, n. 7, p. 18003071-180030714, 2019.
- [5] MARUO, Shoji; NAKAMURA, Osamu; KAWATA, Satoshi. Three-dimensional microfabrication with two-photon-absorbed photopolymerization. **Optics Letters**. v. 22, n. 2, p. 132-134, 1997.
- [6] OLIVEIRA, Jonathas M., JESUS-SILVA, Alcenisio J., FONSECA, Eduardo J. S.. Generating a superposition of high order Bessel beams via two-photon polymerized diffractive optical microelement. **Optics and Laser Technology**. v. 119, 2019.
- [7] OVSIANIKOV, A. et al. Three-dimensional laser micro- and nano-structuring of acrylated poly(ethylene glycol) materials and evaluation of their cytotoxicity for tissue engineering applications. **Acta Biomater**. v. 7, p. 967–974, 2011.
- [8] BIRCH, Mark A., et al. Microporous “Honeycomb” Films Support Enhanced Bone Formation In Vitro. **Tissue Engineering**. v. 19, n. 17, p. 2087-2096, 2013.
- [9] OSTENDORF, A.; CHICHKOV, B. N. Two-Photon Polymerization: A New Approach to Micromachining. **Photonics spectra**. 2006.
- [10] GITTARD, Shaun D. et al. Fabrication of polymer microneedles using a two-photon polymerization and micromolding process. **J. Diabetes Sci. Technol**. v. 3, n. 2, p. 304–311, 2009.
- [11] OVSIANIKOV, Aleksandr, et al. Two Photon Polymerization of Polymer–Ceramic Hybrid Materials for Transdermal Drug Delivery. **Int. J. Appl. Ceram. Tec**. v. 4, n. 1, p. 22-29, 2007.
- [12] BALCIUNAS, Evaldas, et al. Biocompatibility Investigation of Hybrid Organometallic Polymers for Sub-Micron 3D Printing via Laser Two-Photon Polymerisation. **Materials**. v. 12, n. 3932, p. 1-16, 2019.
- [13] TAYLOR, Anne M. et al. A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. **Nature methods**. v. 2, n. 8, p. 599-605, 2005.
- [14] PANUSA, Giulia, et al. Photoinitiator-free multi-photon fabrication of compact optical waveguides in polydimethylsiloxane. **Optical Materials Express**. v. 9, n. 1, p. 128-138, 2019.
- [15] RAMIREZ, Jhonattan C., et al. Low-loss modified SU-8 waveguides by direct laser writing at 405 nm. **Optical Materials Express**. v. 7, n. 7, p. 2651- 2659, 2017.

- 
- [16] BIEDA, Matthias; BOUCHARD, Felix; LASAGNI, Andrés F. Two-photon polymerization of a branched hollow fiber structure with predefined circular pores. **J. Photochem. Photobiol.** v. 319–320, p. 1-16, 2016.
- [17] NEWPORT. Three-Dimensional Microfabrication by Two-Photon Polymerization. **Newport Corporation.** 2008.
- [18] SIMA, F., et al. Processamento tridimensional de laser de femtossegundo para aplicações de laboratório em um chip. **Nanophotonics**, v. 7, n. 3, p. 613-634, 2018.
- [19] TOMAZIO, Nathália Beretta. **Fabricação de micro-ressonadores ópticos via fotopolimerização por absorção de dois fótons.** 2016. 104 p. Dissertação. (Mestre em Ciências), Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.
- [20] BALDACCHINI, Tommaso. **Three-Dimensional Microfabrication Using Two-Photon Polymerization: Fundamentals, Technology, and Applications.** ed. 1, Elsevier, 2016.
- [21] MARK, James E. **Physical Properties of Polymers Handbook.** ed. 2, Springer, 2007.
- [22] CRIPPA, Agnaldo. **Estudo do desempenho de filmes multicamadas em embalagens termoformadas.** 2006. 151 p. Dissertação (Mestre em Engenharia e Ciência dos Materiais), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- [23] ZANGIACOMI, Marco Henrique. **Polimerização via radical livre foto iniciada de sistemas multicomponentes para utilização em dispositivos oftálmicos: aspectos ópticos e mecânicos.** 2009. 116 p. Tese. (Doutor em Engenharia Química). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.
- [24] LAWRENCE, J.; POU, J.; LOW, D. K. Y.; TOYSERKANI, E. **Micro- and nano-parts generated by laser-based solid freeform fabrication.** ed. 1, CRC Press, New York: Washington, 2010.
- [25] MADOU, Marc J. **Fundamentals of microfabrication and nanotechnology.** ed. 3, v. 2, CRC Press, 2011.
- [26] LAFRATTA, C.N.; BALDACCHINI, T. Two-Photon Polymerization Metrology: Characterization Methods of Mechanisms and Microstructures. **Micromachines.** v. 8, n. 4, 2017.
- [27] BOING, Thaynara Faely, et al. Evaluation of the degree of conversion of a composite resin using different surface treatments before final curing. **Revista Dentística online.** n. 22, p. 9-14, 2011.
- [28] KACZMAREK, H. et al. Crosslinked blends of poly(lactic acid) and polyacrylates: AFM, DSC and XRD studies. **J. Polym. Res.** v. 20, n. 91, 2013.
- [29] CHEMSPIDER. Disponível em: <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.17977.html?rid=7a330ea8-3838-416b-9d0d-496fd9da46c1>>. Acesso em: 29 fev. 2020.
- [30] SIGMA-Aldrich. **Pentaerythritol triacrylate.** Disponível em: <[www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)>. Acesso em: 20 ago. 2020.

- 
- [31] TETSUKA, H.; SHIN, S. R. Materials and Technical Innovations in 3D Printing in Biomedical Applications. **J. Materials Chemistry B.**, 2020.
- [32] SCARPA, E. et al. Microfabrication of pH-responsive 3D hydrogel structures via two-photon polymerization of high-molecular-weight poly(ethylene glycol) diacrylates. **Sensors Actuators B: Chemical.** v. 279, p. 418-426, 2018.
- [33] CIBA Specialty Chemicals. Ciba IRGACURE 369 Photoinitiator. 2001. Disponível em: <<http://www.xtgchem.cn/upload/20110629045432.PDF>>. Acesso em: 29 fev. 2020.
- [34] OUBAHA, M. et al. Influence of hybrid organic-inorganic sol-gel matrices on the photophysics of amino-functionalized UV-sensitizers. **J. Materials Science.** v. 46, n. 2, p. 400-408, 2010.
- [35] KIONG, Tan Kok; SUNAN, Huang. **Modeling and Control of Precision.** ed. 1, CRC Press. New York, 2016.
- [36] COHERENT, Inc. **Chameleon-Ultra.** 2005. Disponível em: <[https://w2.uib.no/filearchive/chameleonultra\\_1.pdf](https://w2.uib.no/filearchive/chameleonultra_1.pdf)>. Acesso em: 02 fev. 2020.
- [37] COHERENT, Inc. **Chameleon Ultra and Chameleon Vision laser operator's manual.** Santa Clara, Califórnia, 2009.
- [38] VARAPNICKAS, Simonas; MALINAUSKAS, Mangirdas. Processes of Direct Laser Writing 3D Nano-Lithography. **Preprints.** v. 1, 2018.
- [39] ZHOU, Xiaoqin; HOU, Yihong; LIN, Jieqiong. A review on the processing accuracy of two-photon polymerization. **AIP Advances.** v. 5, p. 0307011-03070122, 2015.
- [40] MROCZKOWSKA, K. Adhesion and corrosion resistance of laser-oxidized titanium in potential biomedical application. **Surface and Coatings Technology.** V. 366, P. 179-189, 2019.
- [41] SALEH, B. E. A.; TEICH, M. **Fundamentals of photonics.** ed. 2, Wiley, Hoboken, NJ, 2007.
- [42] BAGNELL, C. Robert. **Light Microscopy: Chapter 7 Lenses.** ed.1, Microscopy Services Laboratory (MSL), 2012.
- [43] DAVIDSON, Michael W. **Numerical Aperture.** Disponível em: <<https://www.microscopyu.com/microscopy-basics/numerical-aperture>>. Acesso em: 10 de mai. 2020.
- [44] ABERTURA numérica. Disponível em: <<https://www.pngwing.com/pt/free-png-pdhgd>>. Acesso em: 10 de mai. 2020.
- [45] LEE, Kwang-Sup et al. Recent developments in the use of two-photon polymerization in precise 2D and 3D microfabrications. **Polym. Adv. Technol.** v. 17, p. 72-82, 2006.
- [46] ABRAMOWITZ, Mortimer; DAVIDSON, Michael W. **Numerical Aperture and Resolution.** Disponível em: <<https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/anatomy/numaperture/>>. Acesso em: 14 de mai. 2020.



- 
- [47] LAFRATTA, C. N. **Multiphoton fabrication**. *Angew. Chem. Int. Ed.* v. 46, n. 33, p. 6238-6258, 2007.
- [48] TSUTSUMI, Naoto; HIROTA, Junichi; KINASHI, Kenji; SAKAI, Wataru. Direct laser writing for micro-optical devices using a negative photoresist. **Opt. Express**, v. 25, p. 31539-31551, 2017.
- [49] THORLABS. **Olympus Oil Immersion Objectives**. Disponível em: <<https://www.thorlabs.com/thorproduct.cfm?partnumber=RMS100X-PFO>>. Acesso em: 27 jan. 2020.
- [50] SÁNCHEZ-López, María M. et Al. Gouy phase effects on propagation of pure and hybrid vector beams. **Opt. Express**. v. 27, p. 2374-2386, 2019.
- [51] BAGNELL, C. Robert. **Light Microscopy: Chapter 7 Lenses**. ed.1, Microscopy Services Laboratory (MSL), 2012.
- [52] NEWPORT. **Laser uFAB Microfabrication Workstation**. Disponível em: <[www.newport.com/f/microfabrication-workstation](http://www.newport.com/f/microfabrication-workstation)>. Acesso em: 05 fev. 2021.
- [53] THORLABS. **Amplified Piezo Stage for Microscope Slides**. Disponível em: <[https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup\\_id=11303](https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=11303)>. Acesso em: 27 nov. 2019.
- [54] REKSTYTE, Sima, et al. Fabrication of 3D Microstructured Scaffolds by Direct Laser Writing in Pre-Polymers and Their Performance in Cartilage Regeneration In Vitro and In Vivo. **Proc. of SPIE**. v. 10094, 2017.
- [55] OTUKA, Adriano José Galvani. **Fabricação de microestruturas com múltiplas dopagens via fotopolimerização por absorção de dois fótons**. 2012. 115 p. Dissertação. (Mestre em Ciências), Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

## 4 MICROFABRICAÇÃO DE ARCABOUÇOS CELULARES TRIDIMENSIONAIS

Esta seção tem por objetivo apresentar a metodologia de fabricação dos arcabouços celulares e sua importância em estudos biológicos. É descrito o protocolo de síntese adotado para confeccionar as fotoreinas biocompatíveis utilizadas nesta pesquisa, que foram caracterizadas por espectroscopia de absorção óptica, espectroscopia de fluorescência, espectroscopia Raman e microscópio eletrônico de varredura. Além disso, para as amostras preparadas são investigados múltiplos aspectos relacionados ao processo fotoquímico de polimerização, tais como: Potência mínima, resolução das linhas por meio dos parâmetros de escrita e grau de conversão. Por fim, serão retratados os resultados de viabilidade celular das fotoreinas analisada pelo método de exclusão do azul Tripán em células Osteoblastos MG-63, como também, as medidas do módulo de Young via AFM das células cultivadas em Filmes e arcabouços.

### 4.1 FOTORESINA BIOCAMPATÍVEL

A resina fotossensível utilizada, neste trabalho, consiste basicamente de um monômero acrilato multifuncional (PETA - Pentaerythritol Triacrylate) [1] e de um Fotoiniciador (FI) com absorção no UV (IRG 369). Estudos anteriores demonstraram a biocompatibilidade do IRG 369 em baixas concentrações [2], embora fosse verificado que em concentrações a partir de 3% torna-se citotóxico em meios biológicos, o que implica na redução da taxa de viabilidade celular [3].

Para aplicações destas resinas na cultura celular se torna um desafio, quando se busca obter um composto funcional com propriedades físico-químicas potencializadas e capazes de biomimetizar o ambiente natural do tecido biológico e com condições não nocivas às células. Nesta circunstância, uma estratégia seria sintetizar resinas funcionalizadas com nanopartículas (NPs) [4]. Ao combinar as vantagens positivas das NPs [5] [6] e o potencial dos microambientes 3D como os arcabouços, se tem um método promissor de promover e estimular o crescimento celular, permitindo o estudo de células específicas em um microambiente que mimetiza as condições reais dos sistemas celulares e suas características mais importantes, incluindo interações célula-célula e célula-matriz extracelular [7] [8], como também, nestas microestruturas permite explorar suas possíveis aplicações na engenharia de tecido.

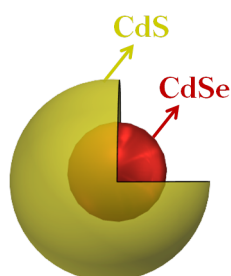
Portanto, para obter uma fotoreina biocompatível foi preparado resinas poliméricas à base do monômero PETA e 0,5% em massa de FI IRG 369 em relação à massa do monômero, de modo a manter uma baixa e controlada citotoxicidade do polímero. Além disso, incorporamos diferentes concentrações de NPs de dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) e quantum dots semicondutores ultra-pequenos de CdSe/CdS, que possuem comprovada

biocompatibilidade [6-8]. Estas NPs foram sintetizadas e disponibilizadas pela prof. Dr. Anielle Christine Almeida Silva e pelo Prof. Dr. Noelio Oliveira Dantas (IF/UFAL). Nas seções a seguir serão apresentadas as principais propriedades e vantagens de se utilizar as NPs.

#### 4.1.1 Pontos Quânticos Semicondutores Ultra-pequenos (USPQs) de CdSe/CdS

Os Pontos Quânticos Semicondutores Ultra-pequenos (USPQs) de Seleneto de Cádmio/Sulfeto de Cádmio (CdSe/CdS) ou do inglês Core-Shell Ultrasmall Quantum Dots (CS-USQDs) são extremamente pequenos, com tamanho do diâmetro chegando a medir cerca de 2 nm para o CdSe [12], com organização estrutural ilustrado pela figura 4.1.

Figura 4.1: (a) Ilustração representativa das NPs de CdSe/CdS.



Fonte: Adaptado de Silva [16].

As NPs de USQDs possuem propriedades físicas e químicas levemente aprimoradas em comparação aos quantum dots (QDs) convencionais utilizados com maior frequência [13], [14]. E se diferem conforme o modo de preparação e protocolo de síntese, que modificam suas características ópticas e se tornam relevantes ao serem empregadas em diversas aplicações biológicas [15]. No geral, as amostras de CdSe possuem uma larga banda de absorção com boa absorção na região do UV.

Os índices de toxicidade das NPs ocorrem devido à dispersão de íons  $\text{Cd}^{2+}$  presentes na superfície do Cádmio (Cd) que torna o material tóxico e pode causar danos às células [14-16], estudos encontrados na literatura revelam que o tamanho, assim como outros aspectos físicos, interfere na toxicidade das NPs contendo Cd [20].

Diante disso, este aprimoramento da nanoestrutura conforme a adição de 1-thioglycerol reflete também em sua toxicidade, pois um dos objetivos é diminuí-la através do processo de manipulação da NP, desta maneira, possibilita apresentar baixa toxicidade, pois a espessura da casca formada na síntese irá proteger o núcleo, desta forma permite conservar suas características e reduzir a possibilidade de ocorrer destruição parcial do núcleo, tornando os USQDs atóxicos e estáveis, sendo biocompatíveis em sistemas biológicos [5]. Estes aspectos notáveis os diferenciam dos QDs comuns.

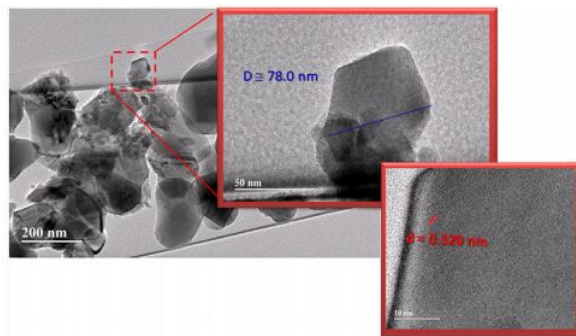
Dentre as aplicações destas NPs, se destaca inseri-las em células solares, sensores químicos e biológicos [16], como também componentes essenciais para incorporações de resinas poliméricas por suas propriedades fluorescentes [21], possível aumento da resolução das linhas polimerizadas [22] por P2F e excelente biocompatibilidade, evidentemente investigado e estabelecido neste trabalho de pesquisa.

#### 4.1.2 Dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ )

As NPs de dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ), ou também chamadas óxido de titânio (IV) ou titânia, correspondem à estruturas cristalinas [6] e semicondutoras pertencentes a família dos óxidos de metais de transição [23]. Na figura 4.2, é mostrada a morfologia da superfície do nanocristal que corresponde a uma mistura das fases rutilo(tetragonal)(64%)/brookite(ortorrômbico) revelada por imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão de Alta Resolução (HR-TEM).

É constatado que o  $\text{TiO}_2$  tem um tamanho médio de aproximadamente 78,0 nm e um espaçamento da rede  $d_{110}$  na fase rutilo de 0,320 nm após o processo de tratamento a 800 °C durante 1 h, também é possível notar que são encontrados aglomerados de NPs por causa da alta concentração de 1 mg/mL usada nas medidas e com NPs de vários formatos correspondentes as diferentes fases utilizadas na síntese [6].

Figura 4.2: Imagem via HRTEM de NPs de  $\text{TiO}_2$ . É mostrado no quadro da esquerda aglomerados de NPs em diferentes formatos devido à mistura das fases e as franjas da rede.



Fonte: Reis [6].

Em especial, o composto titânio tem sido amplamente utilizado em atividades biológicas, não somente por sua excelente biocompatibilidade e alta estabilidade química e térmica [24], como também devido suas propriedades antibacterianas e seu potencial na aceleração do processo de osseointegração. Outra vantagem está em suas propriedades mecânicas, posto que, apresenta boa resistência à corrosão [25].

Devido as várias vantagens das NPs de  $\text{TiO}_2$  acima mencionadas, seu uso tem sido constante nas áreas biológicas, algumas pesquisas relatam sua utilização com mais

freqüência em tecidos ósseos para desencadear a regeneração óssea e suprimir o crescimento bacteriano.

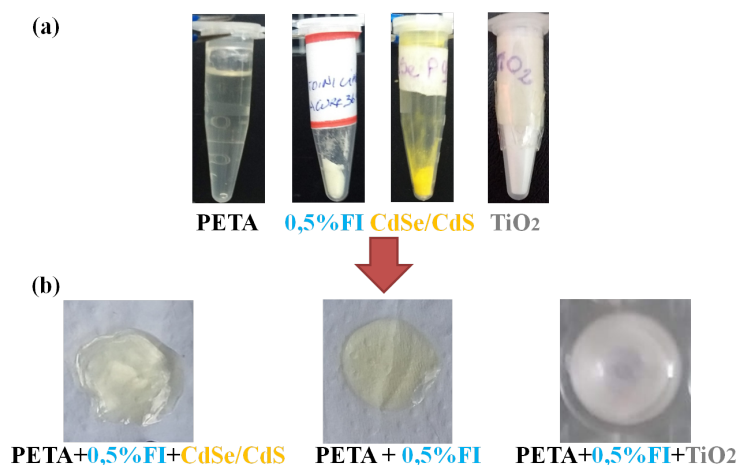
Em estudos anteriores, Vercellino et al. [26] mostrou um efeito positivo de superfícies nanoestruturas feitas de  $\text{TiO}_2$ , onde houve aumento da atividade fosfatase alcalina (alkaline phosphatase activity - ALP), produção de proteínas ósseas extracelulares e deposição de cálcio por células-tronco mesenquimais da medula óssea humana (hBMSCs) em meio osteogênico, quando comparado com as células em uma lamínula de vidro.

No estudo de Zhao et al. [25], foi comprovado que implantes de titânio com revestimentos microporosos de  $\text{TiO}_2$  dopado com magnésio ( $\text{Mg-TiO}_2$ ) por oxidação eletrolítica de plasma auxiliam na proliferação, na adesão e na diferenciação de células osteoblastos promovendo uma rápida osseointegração, mas também inibem o crescimento das bactérias identificadas como *Staphylococcus aureus*.

#### 4.1.3 Síntese da fotoresina com incorporação das NPs

Com estas informações, foram sintetizadas resinas do tipo negativas que resultam em um líquido viscoso. Em sua preparação são requeridos principalmente os seguintes materiais: FI IRG 369 em pó misturado com o monômero PETA em estado líquido. Na figura 4.3(a) são mostrados em eppendorf todos os compostos necessários na manipulação das resinas fotossensíveis.

Figura 4.3: Componentes necessários para síntese das fotoresinas (a) PETA, FI e NPs de CdSe/CdS e  $\text{TiO}_2$ . (b) Volumes de resinas polimerizados por luz UV.



Fonte: Elaborado pela autora.

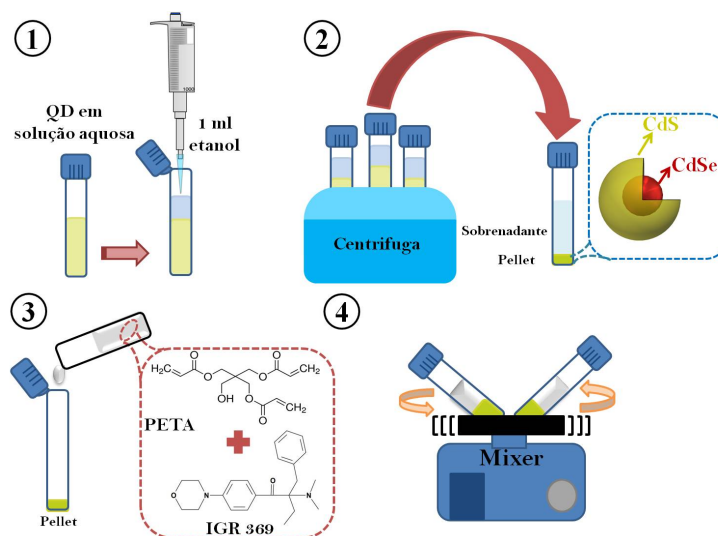
Todas as amostras apresentadas nesta seção foram preparadas no **Laboratório de Caracterização e Microscopia de Materiais** do Grupo de Óptica e Nanoscopia (GON) e no laboratório do Grupo de Nano-Fotônica e Imagens (GNFI) do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas (IF/UFAL).

As resinas foram obtidas da seguinte maneira, em dois tubos de ensaio foram despejados 10 ml do monômero PETA em cada um deles, por meio de uma balança (precisão 0,01 g) foi mensurado sua massa. Tomando como referência a massa do monômero, acrescentamos 2,0% e 0,5% em massa de FI. Devido ao material ser altamente fotopolimerizável quando exposto à luz visível ou a luz UV, quando manuseado foi sempre em ambiente sob lâmpada vermelha. Após o FI ser usado, a embalagem do produto permaneceu devidamente fechada para restringir a incidência de luz no material. Posteriormente, foram diluídas as concentrações do IRG 369 na PETA por agitação mecânica contínua através de um mixer para homogeneização das amostras misturadas lentamente durante aproximadamente 12 h à temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C).

Com o objetivo de tornar a resina biocompatível e melhorar sua aplicabilidade na fabricação de arcabouços celulares tridimensionais para o cultivo de células *in vitro*, foi utilizado uma baixa concentração do FI, apenas 0,5% em massa do IRG 369, e incorporado as NPs USQDs CdSe/CdS e TiO<sub>2</sub> para confecção de outras amostras.

Como ilustrado na figura 4.4, as NPs inicialmente estavam diluídas numa solução aquosa armazenadas em um eppendorf com uma concentração de 18 mg/ml, desta forma, a solução aquosa foi distribuída em turbos Falcon em novas concentrações com auxílio de uma micropipeta. Posteriormente, foi necessário centrifugar as amostras aquosas para selecionar somente as partículas de interesse. Portanto, nos tubos de ensaios, com ajuda da pipeta, foram adicionadas pequenas quantidades de álcool etílico aproximadamente 1 ml e colocadas para centrifugar durante 5-10 minutos com uma velocidade de giro de 5000 rotações por minuto (RPM).

Figura 4.4: Ilustração da síntese das fotoresinas incorporadas com CdSe/CdS: (1) colocado etanol na solução aquosa, (2) centrifugado para obter o *pellet*, (3) despejou PETA com FI e (4) agitação no mixer.



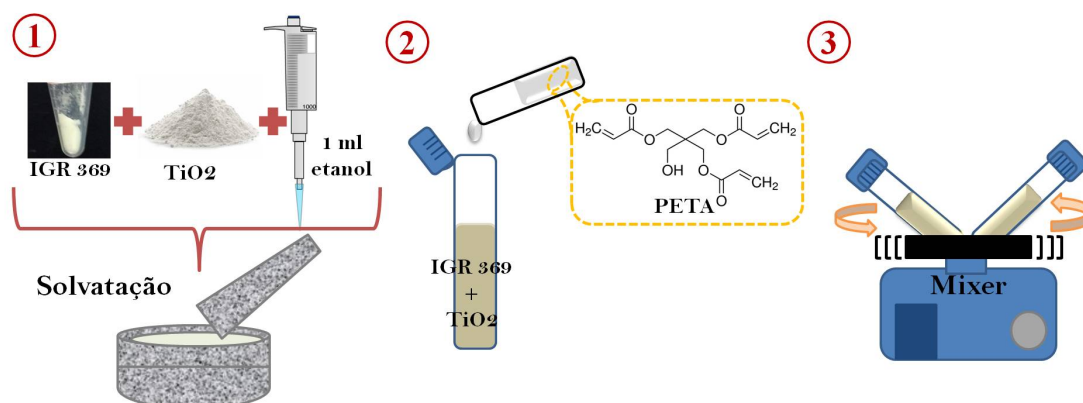
Fonte: Elaborado pela autora.

Após o processo, são obtidas duas fases da solução, o pellet que são as partículas maiores e mais densas, e o sobrenadante, que contém as partículas menores e menos densas. Com uma pipeta é retirado e descartado o sobrenadante e ao pellet foi adicionado 1 ml da resina. Por fim, são colocados no mixer por 24h até que a solução esteja totalmente homogênea.

A incorporação das NPs de  $\text{TiO}_2$  na resina ocorreu de maneira diferenciada, pois o composto IRG 369 e o  $\text{TiO}_2$  são insolúveis em água [27]. Quando realizado a mesma síntese de preparo como feito para as amostras com QDs, se obtém como resultado uma fotoresina não estável caracterizada por uma solução heterogênea, visto que, aglomerados de partículas de  $\text{TiO}_2$  ficam visivelmente dispersas no volume da fotoresina e com o passar das horas decanta. Logo, foi seguido a preparação de acordo com um protocolo adotado por Chang e colaboradores [28].

Nesta síntese, o  $\text{TiO}_2$  e o FI, ambos em pó, foram depositados no almofariz de ágata e dispersos em 1 ml de etanol. Em seguida, depois que o pó da NP e do FI foram diluídas, se iniciou a etapa de solvatação até evaporar o álcool. Portanto, é esperado na fase de solvatação que as forças de cisalhamento realizadas na pasta viscosa esbranquiçada, se torna um pó uniforme branco e as partículas do  $\text{TiO}_2$  e do FI se aderem e liguem. Por fim, em uma quantidade específica de PETA foi adicionado na mistura em pó resultante e colocada para agitação contínua no mixer por 12-24 h. Na figura 4.5 é mostrado a representação esquemática da produção das fotoresinas com adição dos  $\text{TiO}_2$ .

Figura 4.5: Ilustração do processo de síntese das fotoresinas incorporadas com  $\text{TiO}_2$ : (1) solvatação do IRG 369, NPs e etanol, (2) colocado PETA e (3) agitação contínua.



Fonte: Elaborado pela autora.

As concentrações de todos os componentes usados nas amostras das fotoresinas experimentais apresentadas nesta seção dos modos de preparo foram organizadas em um quadro da tabela 4.1 para melhor compreensão e nomeadas de acordo com seus componentes relevantes em abundância.

Tabela 4.1: Componentes predominantes que constituem as fotoresinas experimentais sintetizadas neste trabalho.

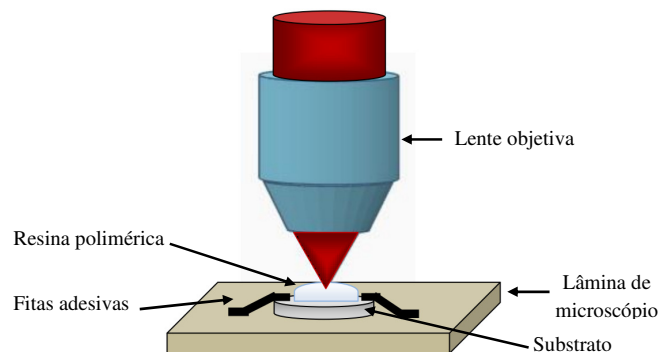
Amostras	Compostos principais da resina		Incorporação de componentes para desempenhar propriedades específicas de biocompatibilidade		
	PETA (g)	IRG 369 (%massa)	QDs CdSe/CdS (%massa)	TiO <sub>2</sub> (%massa)	Razão entre IRG369/NPs
P.2.0	12,12	2,0	-	-	(4:0)
P.0.5	12,12	0,5	-	-	(1:0)
A0.5	1,212	0,5	0,25	-	(1:0.5)
A1	1,212	0,5	0,5	-	(1:1)
A2	1,212	0,5	1,0	-	(1:2)
A3	1,212	0,5	1,5	-	(1:3)
T1	12,04	0,5	-	0,5	(1:1)
T3	12,04	0,5	-	1,5	(1:3)

Fonte: Elaborado pela autora.

Após o preparo da síntese, foi feita a limpeza das lâminas de microscópio e das lamínulas de vidro que serão usadas durante a caracterização e na escrita dos arca-bouços, as quais foram lavadas com acetona ou tetrahidrofurano e com água, em caso de resíduos. Em seguida, foram limpas com álcool isopropílico/acetona e colocadas no forno por 20 a 30 minutos na temperatura de 100 °C, este procedimento assegura que as superfícies estejam livres de partículas de poeira que possam impedir a adesão da resina polimérica nas lamínulas ou atrapalhar a visualização durante a microfabricação.

Posteriormente, uma pequena quantidade da resina é depositada sobre uma lamínula circular fina com diâmetro de 13 mm fixada com ajuda de fitas adesivas na superfície da lâmina de microscópio com dimensões 26X76 mm e espessura de 1,0 a 1,2 mm. Por fim, é posicionada no estágio de translação, configuração ilustrada na figura 4.6 e o próximo passo é iniciar a microfabricação.

Figura 4.6: Posicionamento da resina no sistema experimental.



Fonte: Elaborado pela autora.

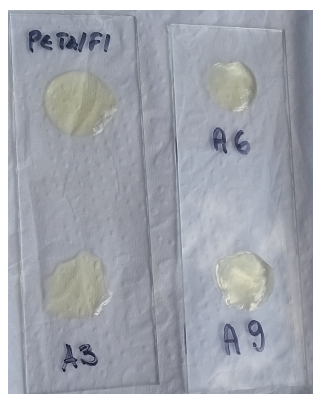


## 4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS FOTORESINAS

### 4.2.1 Espectro de fluorescência

Os espectros de fluorescência das fotoresinas foram obtidos por meio de um sistema (Horiba Fluorolog) de espectro fluorímetro, que utiliza uma lâmpada de xenônio como fonte de excitação. A preparação de cada amostra consistiu em depositar gotas do conteúdo sobre uma lâmina de vidro e levar na câmara com iluminação UV durante determinados minutos de exposição, de modo que, como resultado é obtido um volume uniformemente polimerizado, visto que, o material líquido viscoso transparente se torna solidificado e levemente amarelado como demonstrado na figura 4.7.

Figura 4.7: Exemplos de resinas polimerizadas por UV. Legendas: A3, A6 e A9 possuem 0,25%, 0,5% e 1,5% em massa de CdSe/CdS adicionada a PETA: 0.5%FI IGR 369, respectivamente.



Fonte: Elaborado pela autora.

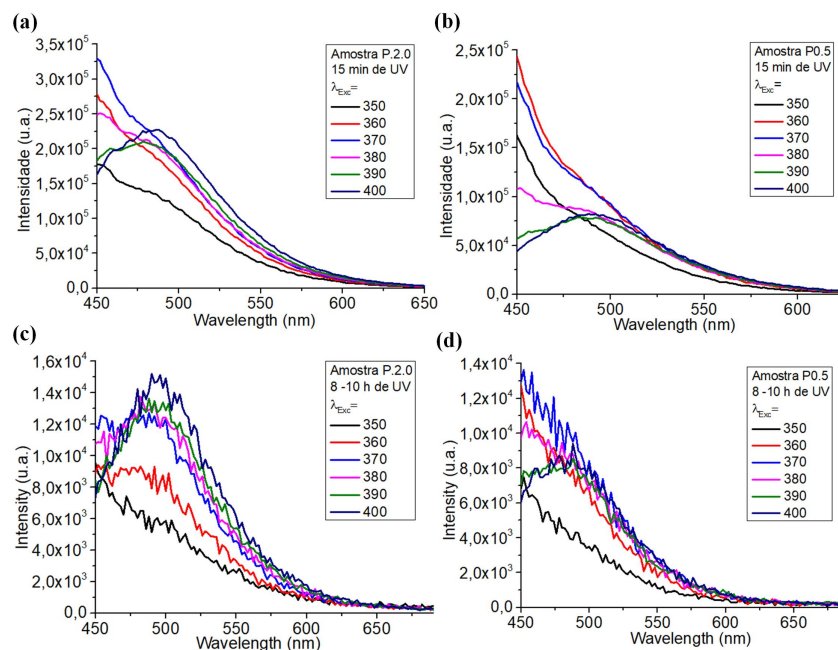
O conhecimento da banda de fluorescência das fotoresinas é bastante relevante quando no estudo, em especial, é necessário à visualização das interações célula-arcabouço, que geralmente pode ser feito através de microscopia de fluorescência. Neste caso, são utilizados dois ou mais corantes nas células que permitem evidenciar algumas estruturas específicas dentro das células, como por exemplo, os núcleos, as membranas celulares, organelas citoplasmáticas, dentre outras. Por essa razão, para garantir uma excelente imagem do comportamento das células em ambientes tridimensionais, é crucial que a fluorescência das microestruturas não seja superior à fluorescência dos marcadores utilizados nas células.

A investigação da fluorescência das fotoresinas em função do tempo de polimerização foi analisada para amostras constituídas do monômero PETA com concentrações de 2.0% e 0.5% de FI IRG 369. Seguindo o roteiro de preparação, as amostras foram divididas em dois grupos, o primeiro grupo permaneceu na câmara sob a luz UV por 15 minutos e o segundo grupo ficou de 8 a 10 horas. Após este tempo de polimerização, as lamínulas

foram lavadas com álcool etílico com cuidado para que as gotas não desgrudassem do vidro, por fim, foram realizadas as medidas variando o comprimento de onda de excitação ( $\lambda_{Exc}$ ) de 350 a 400 nm, de 410 a 490 nm e de 550 a 590 nm, como mostrados nas figuras 4.8 a 4.10, a fim de avaliar a luminescência das amostras próximas aos comprimentos de onda de emissão de marcadores frequentemente aplicados em imageamento celular.

Excitando as amostras P.2.0 e P.0.5 com  $\lambda_{Exc}$  de 350 a 400 nm, na região do violeta visível, as resinas apresentam forte emissão entre 450 a 500 nm na faixa do azul. Ao comparar as figuras 4.8(a) com 4.8(b), é constatado que a luminescência das resinas está efetivamente conectada com as concentrações do FI. Para amostras com porcentagens mais elevadas de IRG 369 foi notada uma intensa emissão de fluorescência, já quando em concentrações inferiores (quatro vezes menos) houve a diminuição dos picos no espectro para todas as excitações. Este padrão também é válido para maiores tempos de polimerização, pois nenhuma mudança neste padrão de fluorescência foi encontrada em permanências de 8-10 horas de polimerização, ver as figuras 4.8(c) e 4.8(d).

Figura 4.8: Espectro de fluorescência das resinas fotossensíveis constituída de FI IRG 369 dissolvido em PETA (P.2.0 e P.0.5) variado  $\lambda_{Exc}$  de 350 a 400 nm durante (a-b) 15 min e (c-d) 8-10 h no UV.



Fonte: Elaborado pela autora.

Como esperado, foi observado que a intensidade da fluorescência das resinas varia de acordo com o tempo de duração da etapa de polimerização. Na prática, quando se planeja aplicar resinas poliméricas em usos biológicos *in vitro*, esta informação é fundamental na escolha de um corante para coloração das células, atualmente já existe uma gama de corantes que variam entre comprimento de onda de excitação e emissão. Portanto, será investigada a fluorescência do material polimérico em ampla escala.

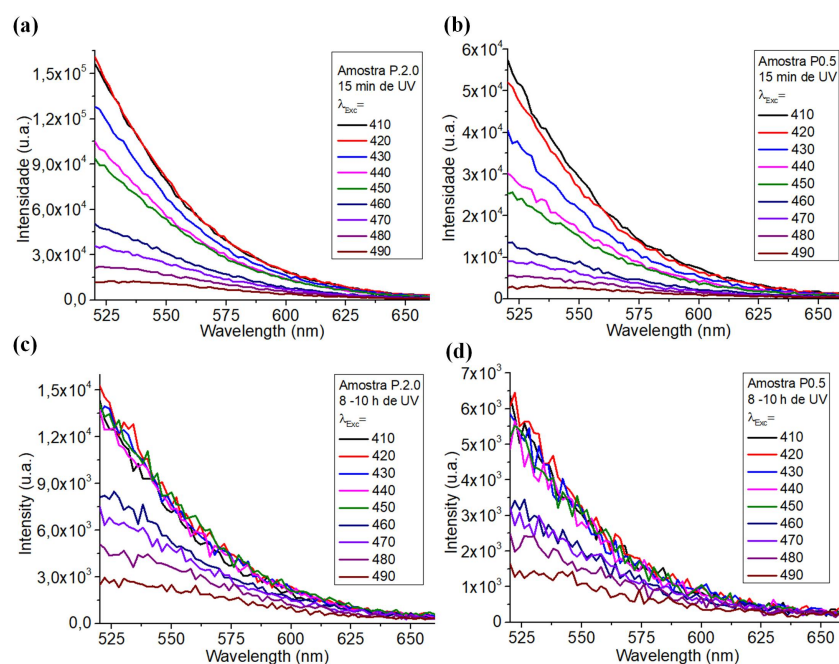
Um corante fluorescente frequentemente empregado em pesquisas nas áreas biológicas para estudos que envolvem monitoramento da morfologia celular é o DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), o qual exige que seja excitado perto da faixa do UV, isto é, entre 345 a no máximo 358 nm e possui uma emissão máxima de 455 a 461 nm na cor do azul [29].

Ao analisar o espectro de fluorescência das resinas fotossensíveis em  $\lambda_{Exc}=350$  nm próximo da faixa da excitação máxima do DAPI, verificou-se que as amostras P.0.5 e P.2.0, inicialmente para polimerização de 15 min no UV, têm intensa fluorescência quando excitadas no violeta visível com picos centrados ambos em 450 nm. Entretanto, ao prolongar o período de exposição no UV a fluorescência diminui aproximadamente 95% e 96% em comparação a intensidade anterior para as amostras P.2.0 e P.0.5, respectivamente.

Estes dados abrem possibilidades de desenvolver estratégias para inibir consideravelmente a intensa fluorescência das resinas, quando for necessário se utilizar marcadores de células que emitem exatamente na mesma banda de emissão, como é o caso do DAPI. Logo, uma primeira estratégia seria baixar as concentrações do FI para 0.5% e após a etapa de microfabricação dar um banho de UV nas microestruturas fabricadas por mais algumas horas (tempo mínimo de polimerização  $\geq 8$  h).

Nas figuras 4.9(a) até 4.9(d), são mostrados os espectros de fluorescência obtido para excitação na faixa do azul de 410 a 490 nm, é visto que as amostras emitem fortemente próximo ao verde em 520 nm.

Figura 4.9: Espectro de fluorescência das resinas fotossensíveis constituída de IRG 369 dissolvido em PETA (P.2.0 e P.0.5) variado  $\lambda_{Exc}$  de 410 a 490 nm durante (a-b) 15 min e (c-d) 8-10 h no UV.



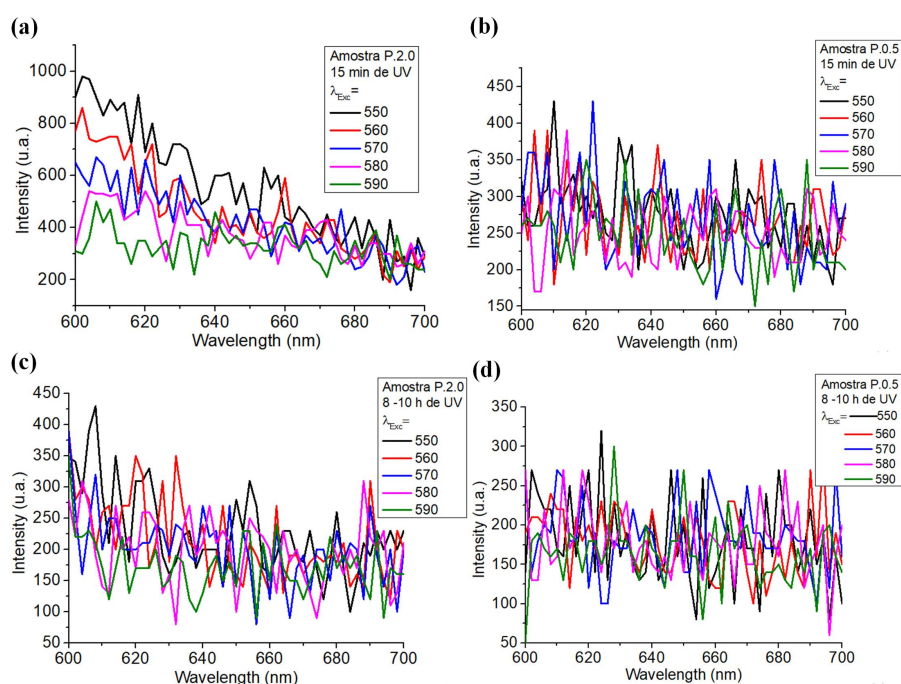
Fonte: Elaborado pela autora.

Comparando os perfis dos espectros de 15 min e 8-10 h por iluminação UV, claramente fica comprovado a diminuição da intensidade das curvas de fluorescência das amostras P.2.0 e P.0.5 em todas os comprimentos de excitação, conforme o aumento do tempo de polimerização. Em especial, as curvas geradas pela excitação em 490 nm, próxima a excitação do corante Green CMFDA (5-chloromethylfluorescein diacetate) da linha CellTracker™ com excitação e emissão máxima de 492 nm e 517 nm, revelam que houve uma diminuição da luminescência de 75% e 61% para as amostras P.2.0 e P.0.5, respectivamente.

Tais resultados apontam a possível aplicação do marcador Green CMFDA na visualização de células-alvo em atividades *in vitro* na presença das resinas, quando reduzido as concentrações do FI durante a etapa de síntese e com o aumentado do tempo de fotopolimerização.

Nas figuras 4.10(a) até 4.10(d), são mostrados as curvas de fluorescência para excitação na faixa do verde ao amarelo de 550 a 590 nm, é notável que as amostras não fluorescem no vermelho, sendo assim, corantes que emitem na região do vermelho, como por exemplo, Red CMTPX da linha CellTracker™ ( $\lambda_{Exc} = 577$  e  $\lambda_{Emi} = 602$  nm) podem ser usados juntamente com as resinas sem que haja problemas na visualização das células no interior dos arcaçouços. As curvas de fluorescência que já eram próximas de zero diminuíram ainda mais, conforme o aumentado do período de polimerização (8-10 horas).

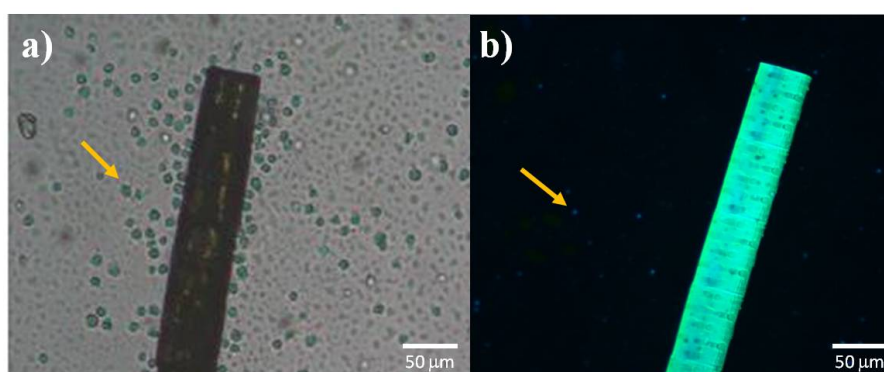
Figura 4.10: Espectro de fluorescência das resinas fotossensíveis constituída de fotoiniciador (IRG 369) dissolvido em PETA (P.2.0 e P.0.5) variado  $\lambda_{Exc}$  de 550 a 590 nm durante (a-b) 15 minutos e (c-d) 8-10 horas no UV.



Fonte: Elaborado pela autora.

Logo, o uso de marcadores celulares que emitem na região do vermelho são os mais adequados na presença de amostras que contém o FI IGR 369 e monômero PETA, porém seu custo pode ser menos atrativo em comparação aos marcadores que emitem na faixa do azul ao verde. Nesta faixa de emissão, os resultados mostraram que as concentrações do FI e o tempo de polimerização podem ser ajustados para minimizar a luminescência. Todavia, sem que haja estes ajustes nos espectros de fluorescência dificilmente as células conseguirão ser avaliadas no interior do arcabouço, como constatado na figura 4.11, a partir de uma resina de Poli-isopreno foi adicionado os compostos PETA e 2% de IRG 369. Foi usada na construção de um microtubo (60  $\mu\text{m}$  de diâmetro) por microfabricação via P2F e utilizado um marcador com emissão próxima ao azul, tanto as células endotélio da linhagem celular EA.hy926 (densidade celular:  $3 \times 10^5$ ), como também o microtubo apresentaram elevada fluorescência.

Figura 4.11: Microtubo com células endotélio (indicadas pelas setas amarelas) foram marcadas com corante celular emitindo na faixa do azul. Imagem de (a) microscópio óptico e (b) microscopia de fluorescência. Barra de escala = 50  $\mu\text{m}$



Fonte: Elaborada pela autora.

Investigou-se como a presença das NPs CdSe/CdS e TiO<sub>2</sub> nas fotoresinas sintetizadas que alteram suas propriedades ópticas. A caracterização destas amostras polimerizadas durante 30 min por iluminação UV foi realizada pela mesma técnica no espectro fluorímetro variando o comprimento de onda de excitação em 350, 400 e 450 nm, os resultados são descritos a seguir na figura 4.12.

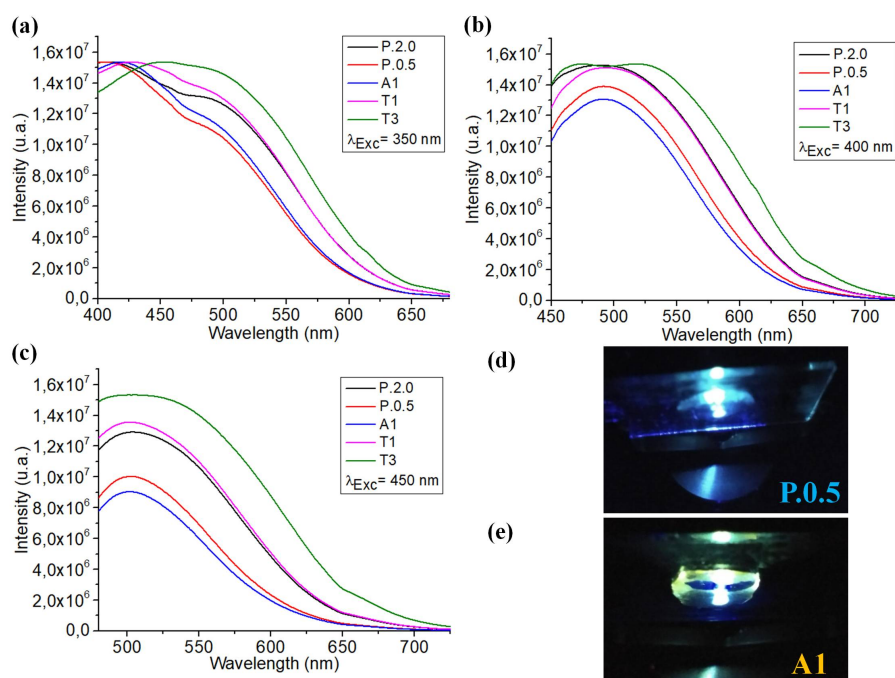
Em todos os espectros foi observado o aumento da fotoluminescência com o aumento na concentração de dióxido de titânio, mas também um alargamento da banda de fluorescência em comparação as amostras P.2.0 e P.0.5 sem a nanopartícula. Além disso, para a amostra T3 houve um deslocamento desta ampla banda, com desvio para o vermelho em relação às outras amostras e um pico de emissão em 518 nm na figura 4.12(b).

A fluorescência da amostra A1 com incorporação de 0,5% em massa de CdSe/CdS



com relação a massa da PETA foi investigada por meio da excitação em 400 nm (figura 4.12(b)) e 450 nm (figura 4.12(c)), fica evidente uma sutil redução da luminescência da A1 em comparação da P.0.5, porém para ambas amostras os picos de emissão permanecem inalterados em 491 nm ( $\lambda_{Exc}=400$  nm) e 502 nm ( $\lambda_{Exc}=450$  nm). Também foram feitas imagens de fluorescência obtidas experimentalmente em laboratório, figuras 4.12(d) e 4.12(e), foi incidido um feixe laser ajustado em 400 nm sobre um volume polimerizado de cada amostra. Estas medidas experimentais expressão o resultado esperado conforme o gráfico de fluorescência já analisado anteriormente.

Figura 4.12: Espectro de fluorescência das fotoreinas constituídas de IRG 369 dissolvido em PETA (P.2.0 e P.0.5) com adição dos QDs (A1) e do  $TiO_2$  (T1 e T3) variado  $\lambda_{Exc}$  em (a) 350, (b) 400 e (c) 450 nm. Fluorescência das amostras (d) P.0.5 e (e) A1 excitadas em 400 nm.



Fonte: Elaborado pela autora.

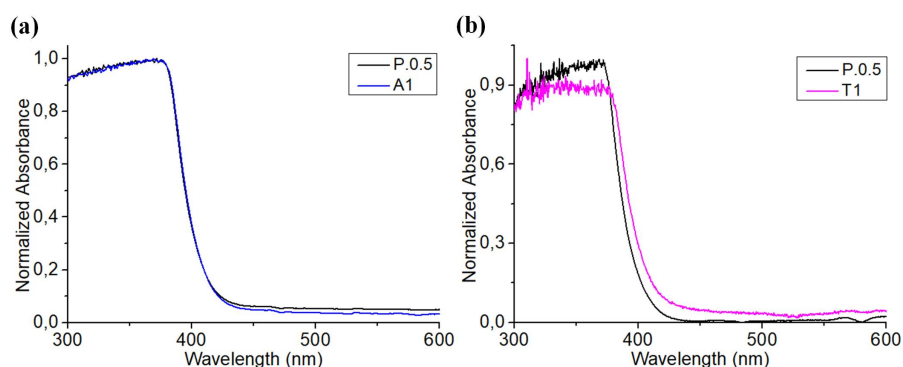
#### 4.2.2 Espectro de absorção óptica

Os espectros de absorção das resinas fotossensíveis não polimerizadas foram obtido por meio de um espectrofotômetro UV-VIS-NIR (UV-3600 SHIMADZU), operando entre 300 nm a 600 nm, com resolução espectral de 1 nm. Sabe-se que o FI apresenta forte absorção na faixa do UV, para que ocorra o processo fotoquímico de polimerização é necessário garantir que a incorporação das NPs não impossibilite esta reação química. Pelos gráficos da figura 4.13 é comprovado que não houve mudança na banda de absorção com a adição das NPs, posto que, as resinas continuaram absorvendo abaixo de 400 nm como desejado.

Embora as NPs de CdSe/CdS e  $TiO_2$  puras absorvam na faixa do UV, não foram relatados procedimentos experimentais bem sucedidos, independente dos parâmetros

de escrita utilizados, em que conseguissem polimerizar uma resina composta apenas de monômero PETA e NPs (CdSe/CdS e  $\text{TiO}_2$ ), sem utilização de um FI. Portanto, pode-se concluir que, na ausência do FI, as moléculas das nanopartículas sozinhas não possuem uma seção de choque de A2F necessária para iniciar a etapa de radicalização dos monômeros.

Figura 4.13: Espectro de absorção pelo UV-Vis do FI (0.5% de IRG 369) dissolvido em PETA na presença de (a) QDs CdSe/CdS e (b)  $\text{TiO}_2$ .



Fonte: Elaborado pela autora.

### 4.2.3 Espectroscopia Raman

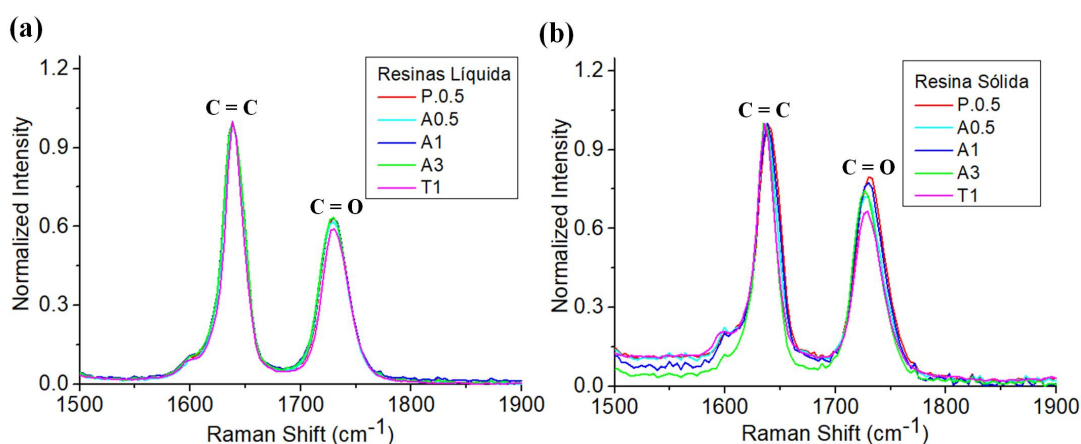
Ao obter uma adequada polimerização bem sucedida dos presentes compostos que englobam a composição da resina, é esperada a máxima conversão das moléculas do FI e dos monômeros em polímeros. Todavia, dificilmente todos os monômeros acrilatos vão reagir com o FI, dito isso, é comum permanecerem monômeros residuais no material final. Em aplicações biológicas é recomendável um alto grau de conversão, pois as concentrações de monômeros residuais podem desempenhar efeitos citotóxicos as células [30].

Para mensurar o  $GC$  dos monômeros envolvidos na formação dos polímeros é utilizado o método por espectroscopia Raman, que ao comparar o espectro Raman da resina não polimerizada ao espectro emitido das resinas polimerizadas fornecem informações para realizar o cálculo do  $GC$ , conforme definido pela equação (10) descrito na seção 3.2.2 do capítulo anterior.

A intensidade Raman das amostras em suas condições originais (Resina Líquida) e em regiões que foram modificadas sob iluminação UV durante 30 min (Resina Sólida) foram medidas, à temperatura ambiente, através de um LabRAM HR Evolution (HORIBA, Japão) operando no comprimento de onda de excitação usual de 785 nm. Com um espectrômetro JY-T64000 microRaman excitado com uma linha de laser Ar 514 nm de baixa potência. O sistema de detecção foi realizado em geometria de retroespalhamento, usando uma lente objetiva de 50x para focar o laser sobre os filmes de resinas.

Os espectros Raman das resinas estudadas são representados na figura 4.14, neles são mostrados a região espectral entre  $1500\text{ cm}^{-1}$  e  $1900\text{ cm}^{-1}$  para compreensão do processo químico de polimerização. As medições são realizadas em amostras feitas de resina à base de PETA: 0,5% de IRG 369 (6 mg), contendo concentrações de 0,25% (A0.25), 0,5% (A1) e 1,5% (A3) em massa de CdSe/ CdS e num proporção de 0,5% em massa de dióxido de titânio (T1) com relação à massa do monômero.

Figura 4.14: Espectros Raman de fotoresinas com diferentes concentrações de NPs CdSe/CdS e  $\text{TiO}_2$  em volumes (a) não polimerizados e (b) polimerizados por UV. São destacados os picos dos modos vibracionais de interesse.



Fonte: Elaborado pela autora.

A análise dos espectros Raman das cinco amostras medidas permitem monitorar os modos de vibrações das ligações que envolvem a formação da cadeia polimérica específicas na polimerização. Para quantificar a eficiência na polimerização das resinas incorporadas com as NPs, foram comparados os picos de duas ligações importantes que participam da etapa de fotopolimerização por radicais livres, mostradas na figura 4.14, são os picos em  $1640\text{ cm}^{-1}$  que representam as ligações duplas entre carbonos ( $\text{C}=\text{C}$ ) e em  $1730\text{ cm}^{-1}$  que são ligações duplas entre carbono e oxigênio ( $\text{C}=\text{O}$ ).

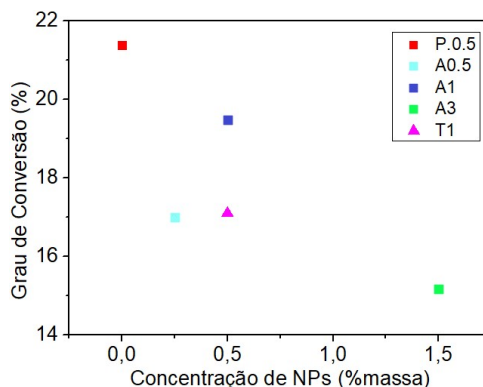
Note-se que nos espectros são vistos pequenos deslocamentos na região de  $1730\text{ cm}^{-1}$  que apontam possíveis variações do ambiente. Na figura 4.14(b), os gráficos são interpretados da seguinte forma, claramente há um aumento na intensidade do pico  $1730\text{ cm}^{-1}$  para a amostra P.0.5 (sem nanopartículas) após a polimerização, isso significa que mais ligações duplas entre carbonos foram rompidas durante o processo de polimerização. Entretanto, para amostras A0.5 e T1, o aumento na intensidade do pico  $1730\text{ cm}^{-1}$  é muito inferior das outras amostras, isso reflete em uma menor conversão polimérica, já que menos ligações duplas entre carbonos foram quebradas no processo de radicalização da cadeia polimérica para surgirem os centros ativos.

A partir deste método empregado, foi determinado as porcentagens do *GC* em



função da concentração de NPs, organizado na figura 4.15. Observa-se que as NPs de CdSe/CdS e de TiO<sub>2</sub> não contribuíram para melhorar o *GC*, pois para amostra P.0.5, na ausência das NPs, o grau de conversão do polímero foi maior chegando a aproximadamente 21%.

Figura 4.15: Grau de conversão dos filmes de resinas em função da concentração de NPs CdSe/CdS e TiO<sub>2</sub> (% massa de NPs em relação à PETA).



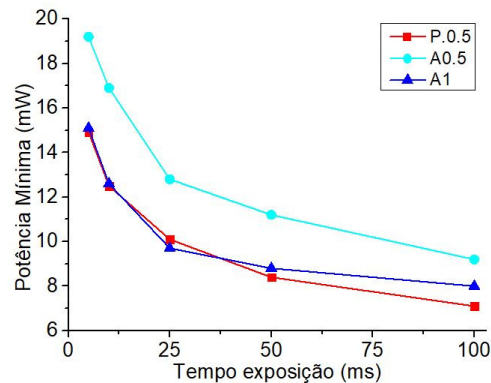
Fonte: Elaborado pela autora.

No entanto, a amostra A1 para concentrações de 0,5% em massa de CdSe/CdS com razão de FI/NPs de (1:1), demonstrou um desempenho melhor que as outras amostras com diferentes concentrações, pois teve um percentual de 19,48% mais próximo numericamente do valor obtido para a amostra P.0.5. Portanto, as NPs atuam como agentes inibidores dos processos de polimerização, já que, o aumento da quantidade de NPs resultou na redução do *GC*.

De modo a entender como os USPQs interferem no processo de polimerização foi investigado qual é a menor potência incidida no interior da amostra capaz de polimerizar um pequeno volume visível (voxel). Nos procedimentos experimentais para realização dos testes, foi utilizada uma lente objetiva de microscópio de 40X (NA = 0,65, Newport) para todas as amostras e fixado o comprimento de onda em 750 nm. Em seguida, é variado o tempo de exposição entre 5 ms a 100 ms e anotado em que potência surgia o primeiro voxel para cada tempo de exposição.

A potência mínima necessária para o feixe laser polimerizar as resinas foi organizada no gráfico dado na figura 4.16, é constatado que para resinas incorporadas com NPs a potência mínima necessária deve ser aumentada para desencadear o processo de fotopolimerização, posto que, a curva tende a se posicionar mais acima, este acréscimo na potência para concentrações de 0,25% em massa de CdSe/CdS para a amostra A0.5 com razão de FI/NPs de (1:0.5), indica que parte da energia incidente na amostra é absorvida pelas NPs sem que haja a polimerização, esta informação reflete no valor do grau de conversão que foi de 17%.

Figura 4.16: A potência mínima em função do tempo de exposição para resinas.



Fonte: Elaborado pela autora.

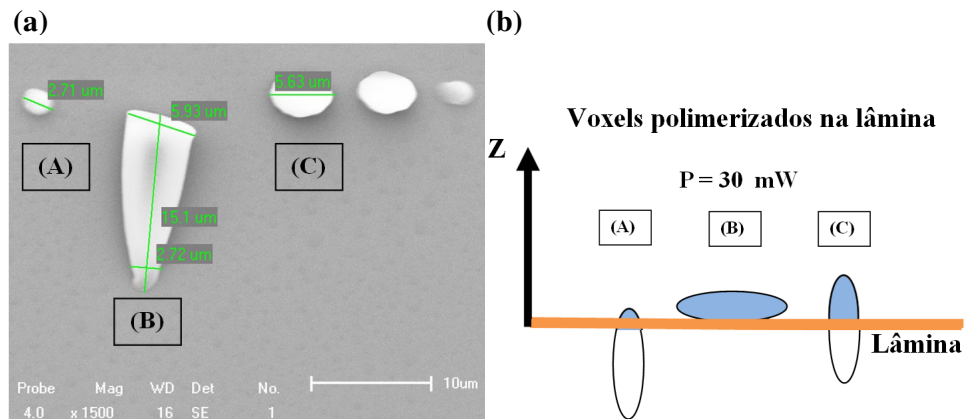
Entretanto, para a amostra A1 com mesmas quantidades de CdSe/CdS e de FI, não houve grandes variações de sua potência mínima comparada a amostra P.0.5, deste modo, este resultado confirma o motivo do valor do grau de conversão das duas amostras serem mais próximos, pois para um tempo de exposição de 5 ms a 100 ms é possível polimerizar ambas amostras com  $15 \pm 1$  mW e  $8,0 \pm 9$  mW, respectivamente. Para todas as amostras, como esperado, é notável que aumentar o tempo de exposição fica mais fácil polimerizar o material e é preciso reduzir cada vez mais a potência mínima.

#### 4.2.4 Investigação da influência dos parâmetros de escrita

O conhecimento do tamanho do voxel formado através do processo de P2F é essencial na microfabricação, pois é a menor unidade polimerizada alcançada a cada exposição do pulso de luz na resina. Em geral, esta informação é requerida durante o processo de programação da microestrutura e no planejamento do desenho 3D para saber em que distância deve ser colocado outro voxel de um voxel pré-existente, portanto, o conhecimento das resoluções transversal e longitudinal do voxel ajuda a definir quais serão as separações entre os voxel que darão origem às espessuras das paredes e das camadas.

Diante disso, a escolha dos parâmetros de escrita, tais como: potência (P), velocidade de escrita (V) e tempo de exposição ( $t_{exp}$ ) estão associados à resolução longitudinal (altura do voxel) e a resolução transversal (largura do voxel) de um determinado elemento polimerizado. Na figura 4.17 é mostrado um exemplo do resultado experimental da formação de vários voxel individuais na resina P.0.5, onde foi variado a posição ao longo do eixo  $z$ . Para esta investigação foi utilizado uma lente objetiva de imersão em óleo com abertura numérica de 1,4 (63X, w.d.= 0,19 mm, Zeiss), para focalizar na amostra e usado um tempo de exposição ( $t_{exp}$ ) de 10 ms, potência média de 30 mW e velocidade de  $100 \mu\text{m/s}$ .

Figura 4.17: Resultado experimental dos (a) voxel na lâmina com  $P = 30 \text{ mW}$  e  $t_{exp} = 10 \text{ ms}$  em diferentes posições no eixo  $z$  e (b) Ilustração do esquema experimental.



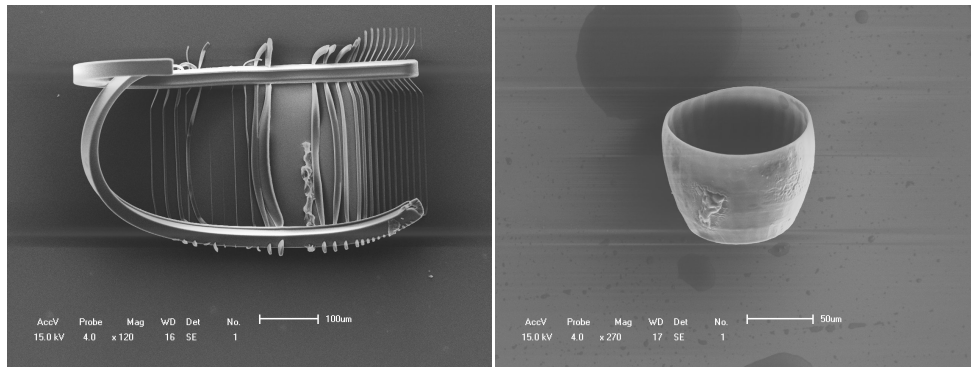
Fonte: Elaborado pela autora.

A fim de avaliar a resolução e as condições mecânicas dos voxel e microestruturas fabricadas foi realizado imagens via MEV (SSX-500 SHIMADZU) feito o procedimento de metalização com corrente de 5 mA por 1 minuto de recobrimento por ouro sobre as lamínulas de vidro com as amostras.

Na figura 4.17(a), é demonstrado a largura e a altura dos voxel medidos, estes voxel foram separados na direção lateral por  $7 \mu\text{m}$ . Na figura 4.17(b) são ilustradas as posições do voxel no eixo  $z$  que corresponde à posição do ponto focal do feixe laser. As posições em  $z$  foram variadas e escolhidas de maneira a permitir que alguns dos elementos de volume ficassem fixados na lâmina depois do processo de retirada da resina não polimerizada.

Observa-se que o primeiro voxel na posição (A), estava bem focado no vidro, no entanto, pouco visível. Já o voxel na posição (B) ficou preso no vidro por uma área muito pequena em comparação a extensão de seu volume, por não ficar bem preso na superfície do substrato, ele cedeu e caiu. Na terceira posição (C) o voxel ficou bem preso na superfície. Nota-se que as dimensões do voxel criados se assemelham a elipsoides bem compridos e estreitos, mas também podem se parecer com esferas menos alongadas dependendo do valor dos parâmetros  $P$ ,  $V$  e  $NA$  utilizada. É crucial que os voxel estejam realmente fixados na superfície do substrato, semelhante à posição (C) no eixo  $z$ , para que as microestruturas não venham a soltar. São apresentados alguns casos onde os voxel que formavam a camada inferior das microestruturas não foram bem ajustados na superfície do substrato, figura 4.18, isso explica por que na microestrutura tipo “escada” formada por duas colunas paralelas e linhas perpendiculares a elas, se desprenderam e curvaram e no cilindro sua região inferior também se soltou.

Figura 4.18: Exemplos de uma má fixação dos voxel que formavam as microestruturas.

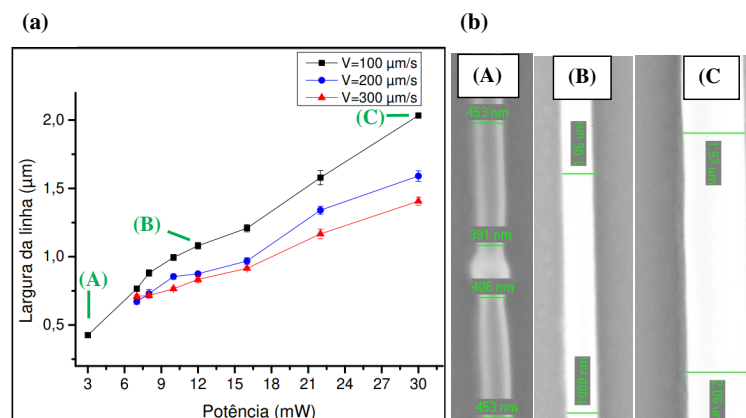


Fonte: Elaborado pela autora.

Para determinar o tamanho do voxel formado são feitos testes de variação dos parâmetros de escrita. É seguida as seguintes metodologias: Para medir a largura do voxel foram escritas várias linhas paralelas bem presas ao substrato assim como na posição (C) ilustrado na figura 4.17. Para medir a altura do voxel foi construída uma coluna para servir como apoio das linhas paralelas fixadas por uma de suas extremidades e a cada linha paralela escrita foi variado à posição ao longo do eixo  $z$ , subindo  $1 \mu\text{m}$  para que as linhas ficassem suspensas. Todas as linhas foram construídas por apenas uma passagem do laser (Scan 1x) pela resina e tinham um comprimento de  $1000 \mu\text{m}$ .

Na figura 4.19, é mostrado às larguras das linhas construídas em função de diferentes potências do laser e da velocidade de escrita. É notório que se obtém um padrão entre a potência e a largura das linhas, uma vez que, são diretamente proporcionais. No procedimento experimental de P2F ajustado  $V = 100 \mu\text{m/s}$  e  $t_{exp} = 10 \text{ ms}$ , houve um aumento da largura da linha dada por  $2,1 \mu\text{m}$  com uma  $P = 30 \text{ mW}$  e para uma potência dez vezes menor foi obtido uma menor largura de linha sendo de apenas  $425 \text{ nm}$  ( $P = 3 \text{ mW}$ ).

Figura 4.19: (a) Largura de linha fabricadas na resina P.0.5 e (b) para diferentes  $P = 3\text{--}30 \text{ mW}$  e  $V = 100\text{--}200 \mu\text{m/s}$ .

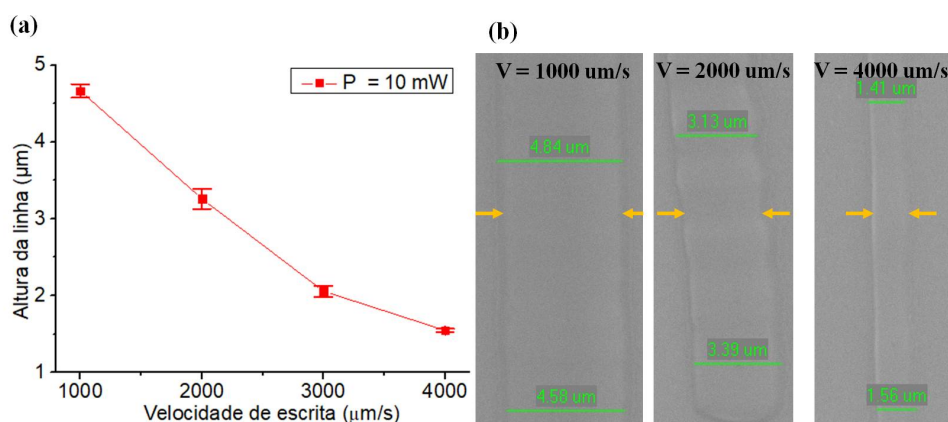


Fonte: Elaborado pela autora.

Há também uma relação entre a velocidade de escrita e a largura da linha que são inversamente proporcionais, ao fixar a P em 12 mW e variado a V em 100, 200 e 300  $\mu\text{m/s}$ , foi obtido a maior resolução para velocidade de 300  $\mu\text{m/s}$ , pois o tempo de interação do laser com o material é menor, já que, o laser tem 1 segundo para interagir ao longo de 300  $\mu\text{m}$  de comprimento da resina.

A fim de obter resoluções cada vez maiores, para este teste foi feito usando uma potência do laser de 10 mW, enquanto a velocidade de escrita é variada de 1000  $\mu\text{m/s}$  a 2000  $\mu\text{m/s}$ , de modo que, cada linha será polimerizada com uma energia diferenciada. Os resultados foram organizados no gráfico da figura 4.20, a menor altura de linha obtida foi de 1,55  $\mu\text{m}$  para velocidade de 4000  $\mu\text{m/s}$ , como era esperado. Para velocidade de 2000  $\mu\text{m/s}$ , a menor largura de linha alcançada foi de 0,755  $\mu\text{m}$  e a menor altura de linha obtida foi de 3,26  $\mu\text{m}$ . Nota-se, na figura 4.20(b), que as imagens de MEV foram medidas da parte lateral das linhas que viraram no substrato (é possível ver as ondulações), mas presas por uma das extremidades na coluna de apoio, por isso que é nítido a diferença no índice de refração nas figuras 4.19(b) e 4.20(b).

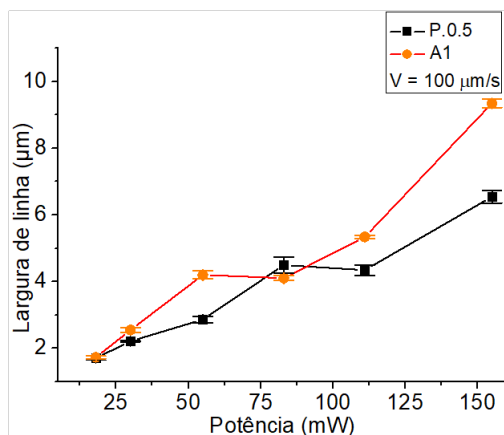
Figura 4.20: (a) Gráfico da altura de linhas fabricadas em diferentes velocidade. A Potência é fixada em 10 mW. (b) Caracterização das alturas das linhas por MEV.



Fonte: Elaborado pela autora.

Foi investigado também como as NPs de CdSe/CdS interferem na largura de linha para a resina A1. Nota-se pela figura 4.21, que o comportamento obtido entre a largura das linhas com a potência é semelhante com os discutidos anteriormente. Porém, não houve melhoras na resolução espacial das linhas para amostras que continham as NPs, como havia sido relato por Peng, et al. [22] ao usar 5 mg/ml de Quantum dots Blue (QDs-B), Green (QDs-G) (CdSe/ZnS) e red (QDs-R) (CdSe /CdS/ZnS), dispersos no monômero PETA e FI IRG 819, os quais obtiveram linhas com maior resolução, apenas 75 nm de largura, usando um laser pulsado centrado em 780 nm com objetiva de imersão a óleo (100x, NA = 1,4, Zeiss) com P = 9 mW e V = 100  $\mu\text{m/s}$ .

Figura 4.21: Largura de linha fabricadas na resina A1 para P variando entre 20 a 160 mW e  $V = 100 \mu\text{m/s}$ .



Fonte: Elaborado pela autora.

### 4.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS

A possibilidade de fabricar microestruturas 3D complexas de alta resolução feitas de resina fotossensível com propriedades funcionais customizadas representa um passo importante para a integração dessa ferramenta em fins biológicos. Através da técnica P2F pode ser explorado o seu potencial para biomimetizar microambientes da matriz extracelular para cultura de células em espaço 3D que colabora no estudo de diversos tecidos biológicos aplicáveis na engenharia de tecidos.

Os ensaios biológicos tem sido utilizado para avaliar os efeitos citotóxicos de diferentes compostos contidos em fotoresinas [31], incluindo investigações das NPs de  $\text{TiO}_2$  e suas ações em meio celular [32]. Os estudos *in vitro* oferecem muitas vantagens, já que, contribuem para o aumento de informação sobre o possível risco tóxico em potencial associado à exposição destas NPs as células-alvo.

#### 4.3.1 Avaliação da viabilidade celular

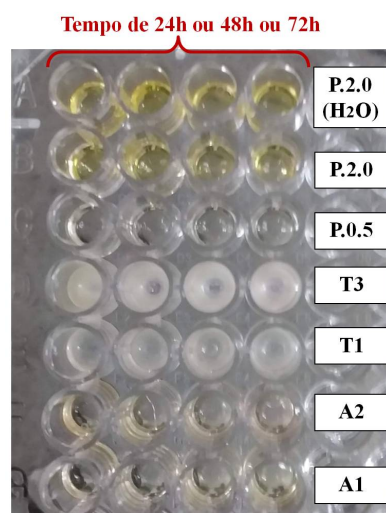
Para o estudo da citotoxicidade das amostras e viabilidade celular foi mensurado pelo método de exclusão do azul de tripan em células osteoblastos humanos da linhagem MG-63 no Laboratório de Biologia Celular (LBC) do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS) da Universidade Federal de Alagoas - UFAL. Foram preparadas amostras com diferentes resinas em uma placa de cultura com 96 poços para um período de tempo de 24, 48 até 72 horas de cultura celular, sendo que, neste procedimento cada amostra foi repetida quatro vezes para confirmação dos dados coletados. Optou-se por não utilizar a técnica do Teste de Citotoxicidade pelo Método Direto (MTT) no ensaio de viabilidade celular para analisa a biocompatibilidade das resinas, uma vez que, este método faz uma leitura da absorvância da superfície da amostra, sendo assim, devido a densidade óptica

dos filmes de resina haveria interferência na obtenção dos dados.

Todas as concentrações por porcentagem em massa do FI e das NPs foram determinadas com relação à massa do monômero PETA. As primeiras amostras consistiam em concentrações de 2,0% e 0,5% em IGR 369, com o intuito de verificar a citotoxicidade em alta e baixa concentração do FI e demais componentes, mas também avaliar a capacidade de estimular a proliferação celular. Em seguida, foram analisadas amostras mantendo fixo a baixa concentração do IRG 369 e variado os tipos de NPs de CdSe/CdS amarela (A1 e A2) e TiO<sub>2</sub> (T1 e T3) para conferir a resina diferentes propriedades, as concentrações foram organizados na tabela 4.1.

Neste estudo foram preparadas amostras de fotoreinas em três placas de 96 poços, cada uma destinada para 1 dia do experimento, desta forma reduz ao máximo possíveis erros dos resultados obtidos. Em um ambiente na ausência de luz visível, para evitar a fotopolimerização, com auxílio de uma micropipeta foi depositado em cada poço um volume de aproximadamente 10  $\mu$ L de cada amostra nos poços com diâmetro cerca de 6,4 mm, com exceção das amostras T1 e T3, que por terem características mais viscosas e translúcidas foi colocado apenas 5  $\mu$ L destas fotoreinas. Em seguida, as placas foram polimerizadas sob irradiação UV por uma lâmpada negra durante pelo menos 3 horas a uma distância de 30 cm da fonte de luz. Na figura 4.22 são mostrados as amostras após os processos descritos.

Figura 4.22: Placas de 96 poços com fotoreinas polimerizadas após o processo de lavagem com álcool etílico e tratamento com água destilada.



Fonte: Elaborado pela autora.

Após o processo de fotopolimerização, todas as amostras nos poços foram lavadas para diluição dos componentes residuais do FI e outros componentes que não participaram das reações químicas, foi utilizado como solvente o álcool etílico, deixado agir por 30 min e posteriormente retirado. Em seguida, apenas a amostra P.2.0 (H<sub>2</sub>O) foi lavada com



água destilada deixando agir em contato direto com a superfície da resina por 4 dias para avaliar o potencial de redução da citotoxicidade que corresponde ao protocolo sugerido por Ovsianikov et al. [3].

As células ósseas humanas da linhagem MG-63 foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) cultivadas em Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF), aminoácidos não-essenciais (1%), L-glutamina (2 mM), piruvato de sódio (1 mM), bicarbonato de sódio (1500 mg/mL), glicose (1 g/L), e mantidas em estufa úmida à 37 °C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> até atingirem a confluência para execução dos experimentos. Para início da análise da interação celular, os poços foram primeiramente esterilizados, sendo assim, as placas contendo as amostras foram mantidas na cabine de fluxo laminar por 1 hora sob luz ultravioleta antes de receberem as células. Ao fim deste procedimento, as células (10<sup>4</sup>) foram semeadas em cada poço e mantidas sob condições de cultura pelos tempos de 24h, 48h e 72h.

Após cada intervalo de tempo de exposição das células em cultura com as amostras, cada poço foi lavado com meio DMEM e as células foram recuperadas e transferidas para tubos eppendorfs. Alíquotas de 10 µL de suspensão celular foram homogeneizadas com 10 µL de corante azul de tripan. Dessa mistura, 10 µL foram tomados e depositados em câmara de Neubauer para observação das alterações morfológicas e realização da contagem de células viáveis. As células viáveis, que excluíram o corante, possuíam aspecto translúcido e as células mortas apresentavam coloração arroxeadada. O experimento foi realizado em triplicata.

Tornou-se possível, a partir dos testes pelo método de exclusão do azul de tripan, mensurar a quantidade de células vivas expostas às superfícies de diferentes amostras de polímeros aperfeiçoadas com incorporação de nanopartículas. Através dos dados coletados nesse ensaio biológico foi realizada a análise da citotoxicidade e da viabilidade celular. É trivial que o grupo controle (CTL), o qual continha células cultivadas em poços sem fotoresina, exibiu um aumento progressivo no número de células e com crescimento aproximadamente linear ao longo do tempo, este resultado indica um comportamento proliferativo. Como visto na figura 4.23, é mostrado o número de células em termos das amostras com fotoresinas de acordo com cada síntese e tratamento adotado.

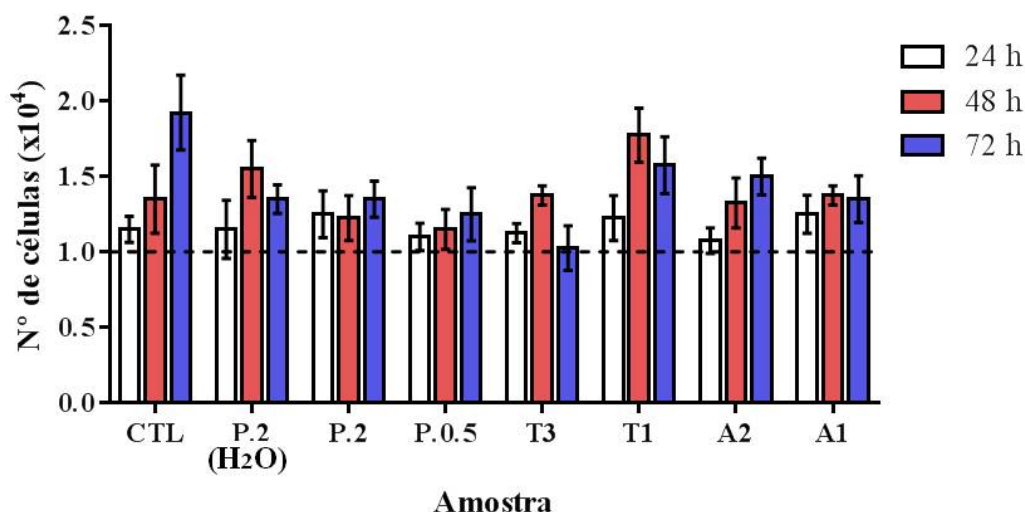
Ao avaliar os efeitos das amostras sobre as células. As amostras não induziram morte celular, pois de acordo com o ensaio biológico a viabilidade não conduziu a níveis inferiores ao observado no controle.

Entretanto, quando se observa as interferências das amostras no comportamento proliferativo comparado com o grupo controle, é possível notar que as amostras P.2, P.0.5 e T3 interferiram de maneira mais intensa na viabilidade das células. Por outro lado, as amostras com as fotoresinas P.2(H<sub>2</sub>O), T1, A2 e A1 interferiram de maneira menos



intensa.

Figura 4.23: Efeito das amostras de fotoresina sobre a viabilidade dos osteoblastos MG-63 por 24, 48 e 72 h. As barras representam a contagem de células viáveis após cada tempo de exposição. A linha pontilhada representa a quantidade de células no início do experimento (0h).



Fonte: Elaborado pela autora.

Em especial, a fotoresina T1, com 0.5% IRG 369 e 0.5% TiO<sub>2</sub>, teve o melhor desempenho quanto a proliferação celular, posto que, o número de células viáveis foi superior ao controle durante 48 horas. Este dado indica que este composto sustenta a proliferação celular, pois somente após 72 horas houve diminuição do número de células viáveis. Uma possível justificativa para o excelente comportamento desta fotoresina está amparada na comprovada biocompatibilidade das NPs de dióxido de titânio, como também devido ao seu grande potencial para aplicação na regeneração de tecidos ósseos (formando por células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos presentes na matriz celular do tecido ósseo) [33], uma vez que, elas promovem a osseointegração e previne a adesão bacteriana.

É importante ressaltar que durante os experimentos ficou nítida a interferência das fotoresinas no comportamento de adesão das células, houve uma dificuldade das superfícies promoverem a adesão celular, esta configuração já foi relatada em outros estudos com fotoresinas contendo materiais formados por monômeros acrilatos [34], aonde cabe à utilização de novos compostos como um ligante adesivo celular com a finalidade de facilitar a adesão das células na superfície da resina. Considerando que a adesão celular é uma etapa determinante para a proliferação e diferenciação das células, essa observação justifica a interferência das amostras no comportamento proliferativo das células.

Ao verificar a proliferação das células em amostras contendo diferentes concentrações do FI. Foi notório que filmes de fotoresinas contendo elevadas quantidades de FI (2%) e menores quantidades (0.5%) não resultaram em níveis mais altos de citotoxicidade, pois

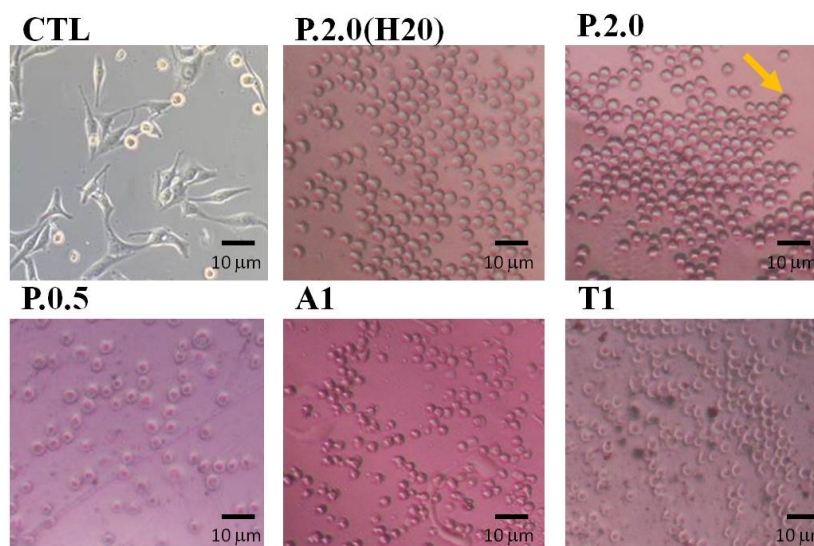
em relação ao número de células foram aproximadamente iguais. Todavia, a dinâmica do comportamento proliferativo da amostra P.0.5 em comparação a P.2.0, demonstrou um aumento linear significativo com o decorrer do tempo de incubação de 24 para 72 h, conforme o padrão visto no grupo CTL.

Além disso, para a amostra P.2.0 (H<sub>2</sub>O) realizada a etapa da lavagem residual com água destilada por quatro dias, foi reduzido a quantidade de componentes tóxicos solúveis em água, de modo que, reduz significativamente os níveis de toxicidade quando comparados com a amostra P.2.0 sem este tratamento. A diminuição do número de células viáveis apenas ocorreu após 48 horas.

Portanto, os resultados obtidos neste estudo destacam que as fotoreinas com baixa concentração do FI e com adição das NPs não foram prejudiciais às células, pois a viabilidade celular dos osteoblastos MG-63 não foi impedida significativamente e permaneceram superiores a 100% em todas as amostras.

Nas imagens feitas pelo microscópio óptico mostrada pela figura 4.24 é visto as células MG-63 em contato com as amostras na placa de 96 poços e confirmam os resultados anteriores, revelando que as fotoreinas investigadas não têm efeito citotóxico.

Figura 4.24: Ensaio biológico das células Osteoblastos (indicada pela seta em amarelo) semeadas após 48 h em amostras contendo 2% de IRG 369 (P.2 e P.2 (H<sub>2</sub>O)), 0,5% de IRG 369 (P.0.5, A1 e T1) e poliestireno (CTL). Barra de escala = 10  $\mu$ m



Fonte: Elaborado pela autora.

As células possuem comportamento proliferativo, porém não conseguem se diferenciar morfológicamente sobre os filmes como seria normal no grupo CTL. Este resultado característico também já foi visto em outros trabalhos [3] que utilizaram concentrações de 2% a 0.5% do FI IRG 2959 e um monômero acrilato, sendo que, o monômero acrilato é apontado como o causador da dificuldade de promover adesão celular, embora não seja

nocivo a proliferação das células, age impedindo o espraimento que resultaria na diferenciação morfológica das células. Por este motivo, as células cultivadas em amostras à base de PETA e IRG 369, exibem morfologia em formato arredondado; este comportamento das células sugere que ocorreu uma má fixação da célula a superfície de contato.

#### 4.4 DESIGN E FABRICAÇÃO DE ARCABOUÇOS CELULARES

Nesta pesquisa, é apresentado um arcabouço celular tridimensional fabricado pelo método de microfabricação por escrita direta a laser pela técnica de P2F, constituído pela fotoresina T1 do tipo negativo, a qual foi utilizada para construir os microambientes em cima de um substrato feito da própria substância. A etapa de confecção do substrato de resina é simples e rápida, a vantagem de sua utilização está na máxima fixação dos arcabouços fabricado ao filme composto de resina, pois foi notado que os arcabouços fabricados sobre lamínulas de vidro possuem uma fixação bastante inferior.

Todos os substratos de vidros passaram pelo processo de limpeza como foi discutido no tópico 4.1.3. Inicialmente a amostra T1 foi usada para confeccionar filmes circulares com espessura próxima a da própria lamínula circular de vidro (diâmetro de 13 mm) utilizada como molde. Em uma lâmina de vidro é colocada uma gota da resina, em seguida, cuidadosamente para não criar bolhas é posicionada uma lamínula circular sobre ela. Posteriormente, colocado por 10 minutos sob a luz UV e após polimerizar, é lavado com álcool etílico para desprender o filme T1 dos vidros e remoção dos compostos não polimerizados. Com o filme de resina pronto, é fixado por fitas em uma lâmina de microscópio utilizada como suporte.

Um dos principais e mais importantes objetivos do arcabouço é retratar o mais fiel possível às propriedades físico-químicas e características essenciais de um ambiente celular específico, claro que levando em consideração suas limitações. Portanto, células-alvo, fotoresina e arcabouço são três elementos fundamentais que devem estar interligados e em concordância ao projetar uma microestrutura destinada a fins biológicos.

Primeiramente, deve-se determinar a linhagem das células-alvo a serem estudadas, pois a partir da definição das células poderão surgir ideias relacionadas à utilização ou não de fármacos ou NPs para o tratamento de doenças ou lesões ósseo, utilização de métodos de análises, caracterizações quantitativas e/ou qualitativas da dinâmica celular. Posteriormente, o composto da resina deve ser um material biocompatível, que permita a proliferação das células escolhidas e não afete negativamente a viabilidade e morfologia celular. Por fim, a geometria da microestrutura deve estar ligada a algum ambiente natural das células escolhidas na pesquisa. Logo, tanto no segundo quanto no terceiro elemento, novas rotas de sínteses podem ser criadas para influenciar na melhoria do desempenho biológico do composto e diferentes modelagens 3D exploradas [35].

Neste contexto, Osteoblastos humanos da linhagem MG-63 foram escolhidos como células-alvo, proposto sintetizar uma resina biocompatível à base de NPs de  $\text{TiO}_2$  e foi idealizado construir arcabouços, de modo que, pudessem reproduzir os arranjos de fibrilas de colágenos presentes em excesso na matriz extracelular (MEC) do tecido ósseo [36], usando os mecanismos de microfabricação por escrita direta a laser pela técnica aditiva é possível simular no arcabouço algumas das características essenciais das estruturas de fibrilas de colágeno naturais.

Dentre os tipos de células que participam da etapa de formação do tecido ósseo, as células osteoblastos são encarregadas do processo de sintetizar e secretar componentes orgânicos da matriz óssea, atuando principalmente na produção da atividade enzimática de Fosfatase Alcalina (ALP), incluindo proteínas, como por exemplo, a osteocalcina (OC) e colágeno tipo 1 (Col-1) [38].

A implementação de design de arcabouços celulares com estímulos caracterizados por rugosidades e topografias na mesma ordem escalar das células é um método promissor de promover a resposta celular, bem como, a proliferação, comunicação e diferenciação das células no interior do microambiente. O estudo do comportamento celular em contato direto com arcabouços biomiméticos deve ser explorado e é de fundamental interesse no campo da engenharia de tecido [39], pois serve para conduzir no desenvolvimento de novos modelos e materiais funcionalizados aplicados na adequação e melhoria dos implantes e estruturas 3D que ao serem implantados no corpo, buscam reparar defeitos ósseos causados por lesões, fraturas, traumas e doenças degenerativas, geralmente acompanhadas por sintomas prejudiciais que afetam e limitam as condições de vida e bem-estar dos indivíduos.

O desenvolvimento do arcabouço tridimensional como suporte apropriado na proliferação, adesão e diferenciação osteogênica, exerce funções semelhantes ao original e permite ser substituído no local danificado (enxerto ósseo), assim como, os implantáveis metálicos (Titânio e suas ligas, ligas de cobalto-cromo, dentre outros) [40], ambos são dispositivos usados como estratégias que colaboram no processo da regeneração óssea [41].

Em especial, no caso da inserção dos implantes *in vivo* faz-se necessária a etapa de osseointegração com o tecido ósseo, a saber, é constituída pelo processo de fixação estável do dispositivo (arcabouço ou implante sintético) que foi implantado com o tecido ósseo existente. É desejável que as células do organismo vivo interagem e se conectem com a superfície do implante para desempenhar alta adesão e crescimento ósseo ao redor do implante no processo de consolidação óssea [42].

Entende-se que, durante a etapa da regeneração óssea, as células osteoblastos direcionam a produção da matriz óssea mineralizada, este processo permite que osteoblastos interajam com íons inorgânicos, proteínas e fosfato de cálcio, posteriormente, ocorre à

diferenciação de osteoblastos em osteócitos e por fim, temos o processo de remodelação da matriz óssea pela participação do conjunto de células osteócitos [38].

Portanto, os ensaios biológicos *in vitro* sob influência dos arcabouços auxiliam na otimização de parâmetros, tais como, a geometria, a rugosidade, a topografia e a compatibilidade dos compostos químicos [41] presentes nos implantes, de modo a garantir uma boa e rápida osseointegração do dispositivo implantado.

Este estudo pode ser aplicado na adequação da topografia, geometria e compostos ideais para adaptação de implantes ortopédicos e dentários. De acordo com pesquisas anteriores, é conhecido que implantes com superfícies planas sem nenhuma modificação topográfica em contato com células ósseas oferecem menos estímulos para uma boa osseointegração do implante.

Todavia, a modificação das superfícies do implante exibem melhores resultados, pois admitem que às células ósseas se reorganizem e cresçam conforme as características da microestrutura, além de contribuírem na resposta celular influenciando na adesão, morfologia e proliferação das células conforme os parâmetros geométricos do arcabouço.

Para microfabricação destes arcabouços conhecidos como microgrooves ou apenas grooves do tipo retangulares e circulares, destinados ao estudo da regeneração óssea várias técnicas já foram usadas como, por exemplo, através do uso de moldes na fotolitografia pelo método de fundição por fusão [43], fotolitografia combinada com o método de estampagem a quente - hot embossing [44] e escrita por impressora 3D [45], entretanto, para este objetivo até o momento não foi explorada a técnica P2F.

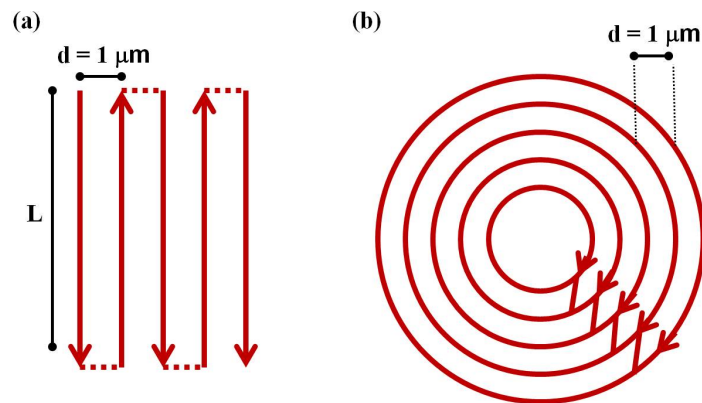
Para iniciar a etapa de construção dos arcabouços Micro-Grooves Retangulares (denominados como MGR) e Micro-Grooves Circulares (referidos como MGC), é necessário programar em um software de modelagem 3D quais serão as trajetórias percorridas pelo feixe laser. Foram utilizados os recursos presentes no próprio software de microfabricação *nFab*, nele possui uma aba para criar e editar o design das microestruturas.

Para projetar os grooves retangulares, foi utilizado a função *Lines* no software de design, primeiramente foi montado à coluna formada por cinco linhas com espaçamento entre as linhas ( $d$ ) de  $1\ \mu\text{m}$  e comprimento da linha ( $L$ ) de  $500\ \mu\text{m}$ , estes parâmetros foram ajustados através das opções no software: “number of rows”, “distance between rows” e “Row Length”, respectivamente.

Na prática, estas linhas como mostradas na figura 4.25, vão ficar bem unidas com o intuito de obter uma camada preenchida, por isso, foi colocado entre elas apenas  $1\ \mu\text{m}$  de distância, tendo como referência que a largura da linha é de aproximadamente  $2\ \mu\text{m}$  e a altura da linha de  $8\ \mu\text{m}$ , usando os seguintes parâmetros,  $NA = 100\times$ ,  $P = 62\ \text{mW}$  e  $V = 250\ \mu\text{m/s}$ , de acordo com testes semelhantes aos realizados na seção 4.2.4. Em cada

linha em vermelho possuem setas indicando o sentido e direção do movimento do laser durante a escrita, as linhas contínuas são as regiões que a resina é polimerizada e as linhas tracejadas é o caminho feito pelo laser com o Shutter fechado sem que haja modificação do material.

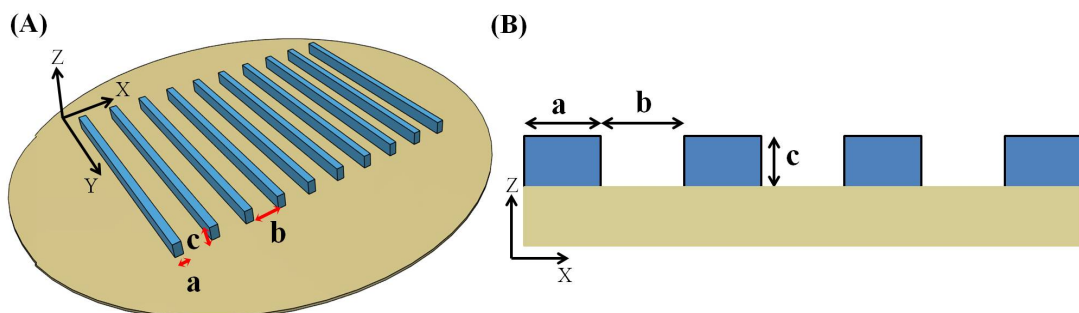
Figura 4.25: Esquema representa direção e sentido da trajetória do laser focalizado na resina para confeccionar uma camada formada por (a) linhas paralelas e (b) espiral.



Fonte: Elaborado pela autora.

Em seguida, para alcançar a altura da coluna desejada foram depositadas três camadas sucessivas, repetindo duas vezes o conjunto de cinco linhas ao longo do eixo  $z$  no sentido positivo, com uma variação de  $\Delta z = 3 \mu\text{m}$  a cada repetição. Por fim, basta repetir este conjunto de cinco linhas ao longo do eixo  $x$  com certo espaçamento entre elas para formar a largura dos grooves (b), assim como ilustrado na figura 4.26.

Figura 4.26: (A) Ilustração dos micro-grooves feitos em cima da superfície do substrato (resina), a: largura da coluna, b: largura do groove, c: altura da coluna; (B) Visto da seção transversal no plano  $zx$ .



Fonte: Elaborado pela autora.

A modelagem 3D dos microgrooves circulares é feita por meio da função *Spiral*, onde permite definir uma espiral centrada na origem  $(x,y,z) = (0,0,0)$  no plano  $XY$ . A espiral começa com um raio inicial, prosseguindo no sentido horário por um número específico de revoluções e com a possibilidade de variar o raio a cada revolução, estes

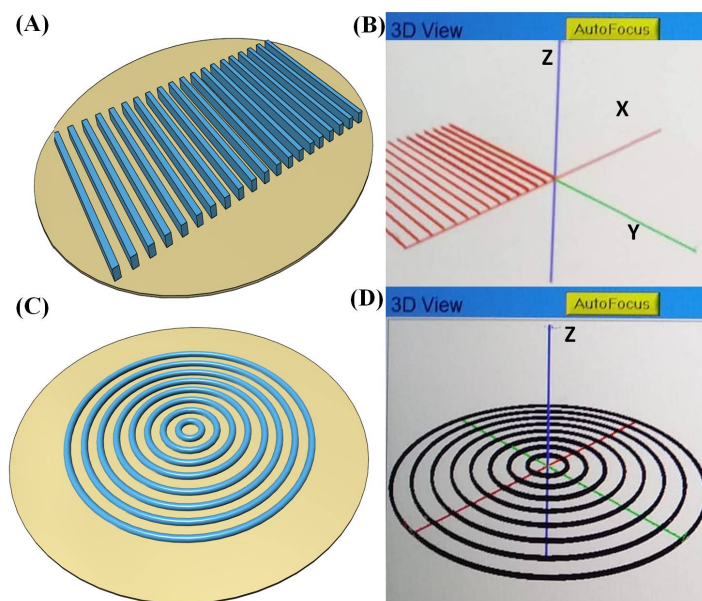


parâmetros foram ajustados por meio das opções: “InitialRadius( $\mu\text{m}$ )”, “Revolutions” e “Delta r( $\mu\text{m}$ )/rev”, respectivamente.

A primeira espiral tinha um raio inicial de  $10\ \mu\text{m}$ , seguido por cinco revoluções acrescentando  $1\ \mu\text{m}$  ao raio inicial por revolução, visto na figura 4.25(b). A altura da espiral em torno do eixo  $Z$  pode ser configurada por repetições das camadas, no total foram colocadas três camadas sucessivas, repetindo duas vezes a espiral no eixo  $z$ , com uma variação de  $\Delta z = 3\ \mu\text{m}$  a cada repetição. Para obter um padrão de micro-grooves circulares concêntricos foi repetido oito vezes a primeira espiral ao longo do plano  $xy$ , variando apenas o raio inicial de cada uma delas acrescentando  $15\ \mu\text{m}$  para o MGC ( $b=10\ \mu\text{m}$ ) e para o MGC( $b = 20\ \mu\text{m}$ ) foi variado em  $25\ \mu\text{m}$ , no total foram posicionadas oito espirais concêntricas com raio externo total de  $240\ \mu\text{m}$ , veja figura 4.27(C-D).

Uma vez definidos o design dos arcabouços, o sistema  $\mu\text{Fab}$  gera um arquivo final da microestrutura projetada contendo pares de coordenadas  $(x, y, z)$ , cada um representando um passo do laser na amostra, onde podem ser visualizadas todas as trajetórias representadas por linhas e círculos, como mostrado a seguir na figura 4.27(B-D).

Figura 4.27: (A) e (C) Criação do modelo sólido por meio de uma ferramenta de design 3D. (B) e (D) Visualização do arquivo de vetorização com as configurações para execução da escrita.



Fonte: Elaborado pela autora.

O processo de construção das microestruturas tridimensionais foram escritas por um sistema de microfabricação tridimensional ( $\mu\text{Fab}$  Workstation - NEWPORT) utilizando pulsos de laser de  $fs$  (Chameleon Ultra - COHERENT) sintonizado a  $730\ \text{nm}$  próximo ao IF e uma lente objetiva de  $100\times$ , ( $NA = 0,70$ , Nikon). De acordo com as geometrias colocadas no design dos arcabouços foram configurados os parâmetros ópticos para sua escrita. As linhas verticais paralelas e os círculos concêntricos espaçados foram

construídos, com diferente velocidade de escrita e aceleração, porém mantendo fixada a potência do laser em 62 mW.

A mudança dos parâmetros (velocidade de escrita e aceleração) é obrigatória conforme indicado no manual do sistema, o qual especifica quando houver geometrias com curvas, a aceleração utilizada deve ser no máximo dez vezes o valor da velocidade de escrita, caso esta restrição não seja obedecida ocorre erro ao executar o arquivo projetado devido à alta aceleração. Conforme esta justificativa, os arcabouços MGR foram executados com  $V_{scan} = 250,0 \mu\text{m/s}$  e aceleração de 10 mm/s, enquanto os arcabouços MGC foi reduzido para  $100,0 \mu\text{m/s}$  à  $V_{scan}$  e 0.5 mm/s à aceleração.

Foram então fabricados dois tipos diferentes de arcabouço, MGR com colunas paralelos, onde foi fixada a largura da coluna em  $5 \mu\text{m}$  e a altura da coluna em  $8 \mu\text{m}$ , enquanto que a largura do groove, ou seja, distância entre as colunas eram diferentes, com aproximadamente  $10 \mu\text{m}$  e outro de  $20 \mu\text{m}$ . Os MGC concêntricos tinham uma largura e altura das colunas circulares fixada em  $5 \mu\text{m}$  e  $8 \mu\text{m}$ , respectivamente. A distância entre as colunas circulares adjacentes foi definida em  $10 \mu\text{m}$  e outro em  $20 \mu\text{m}$ , como mostrado na tabela 4.2.

Tabela 4.2: Dimensões dos arcabouços tipo grooves fabricados na superfície do filme T1.

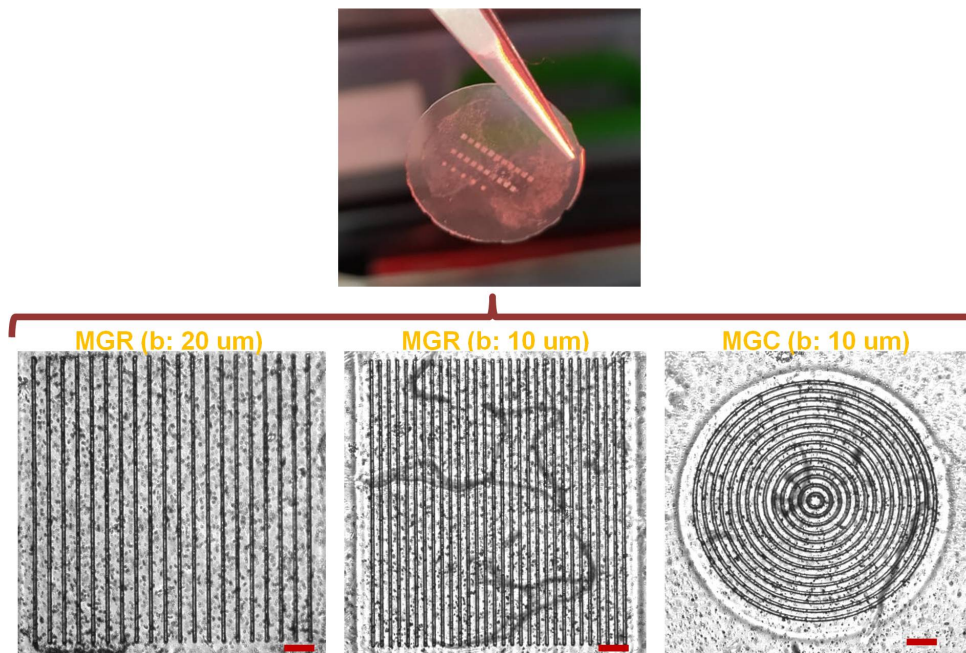
Arcabouço	Largura da coluna (a, $\mu\text{m}$ )	Largura do groove (b, $\mu\text{m}$ )	Altura da coluna (c, $\mu\text{m}$ )	Razão entre b/a
MGR	5	$\approx 10$	8	$\sim 2:1$
MGR	5	$\approx 20$	8	$\sim 4:1$
MGC	5	$\approx 10$	8	$\sim 2:1$
MGC	5	$\approx 20$	8	$\sim 4:1$

Fonte: Elaborado pela autora.

Uma série de microgrooves circulares concêntricos e microgooves retangulares foram projetados e fabricados na superfície de um filme de T1 para biomimetizar um ambiente celular específico. Em resumo, foram preparados quatro filmes iguais e cada um com 11 unidades de MGR com  $b = 10 \mu\text{m}$ , 10 unidades de MGR com  $b = 20 \mu\text{m}$  e 5 unidades de MGC com  $b = 10 \mu\text{m}$  e com  $b = 20 \mu\text{m}$ , todos alinhados visto na figura 4.28. Em média, cada microestrutura (MGR ou MGC) precisava de 15 a 20 minutos de duração para ser finalizada.



Figura 4.28: Imagens de microscópio óptico do filme T1 com microestruturas (barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ ).



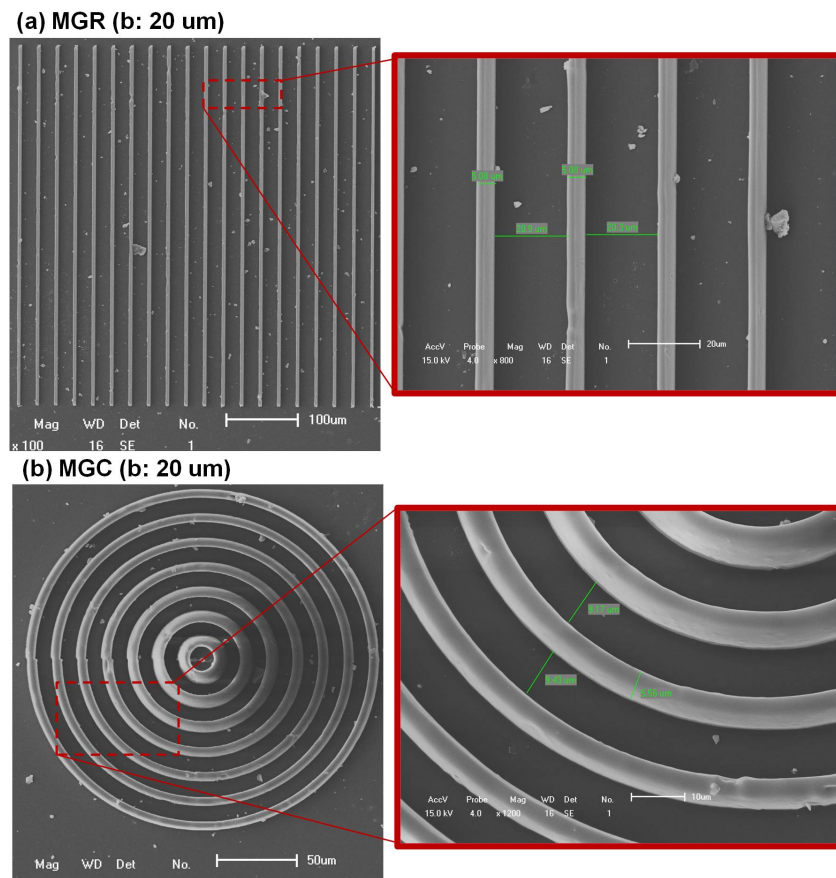
Fonte: Elaborado pela autora.

Depois de concluído a etapa de escrita, o filme foi colocado em um recipiente de vidro em cima de um espaçador rígido com a face em que estava depositada a resina virada para baixo. O espaçador rígido feito de PMMA com 0,3 cm de altura foi usado para delimitar o espaço suficiente para evitar que a resina tocasse o fundo do recipiente, em seguida, com cuidado foi colocado álcool etílico para remoção do material não polimerizado deixado reagir por 20 minutos, trocado o álcool após o prazo e colocado novamente por mais 10 minutos.

Conforme mostrado na figura 4.28, nas amostras observadas por microscópio óptico (20X, NA = 0,40, Newport), é visível na superfície do filme e entre as paredes das microestruturas distribuições de várias aglomerações de NPs  $\text{TiO}_2$  conectadas. Em seguida, as microestruturas também foram caracterizadas pela técnica MEV com diferentes ampliações para exibir suas características mecânicas.

Conforme mostrado na figura 4.29, os microambientes apresentam paredes estáveis, contínuas e com boa integridade estrutural, sem deformações ou microexplosões, sendo um indicativo que os parâmetros de escrita escolhidos foram adequados, pois as geometrias e dimensões dos arcahouços escrito no sistema de microfabricação coincide com o modelo 3D projetado no software proposto.

Figura 4.29: Imagens MEV do Filme T1 com microestruturas Microgroove.



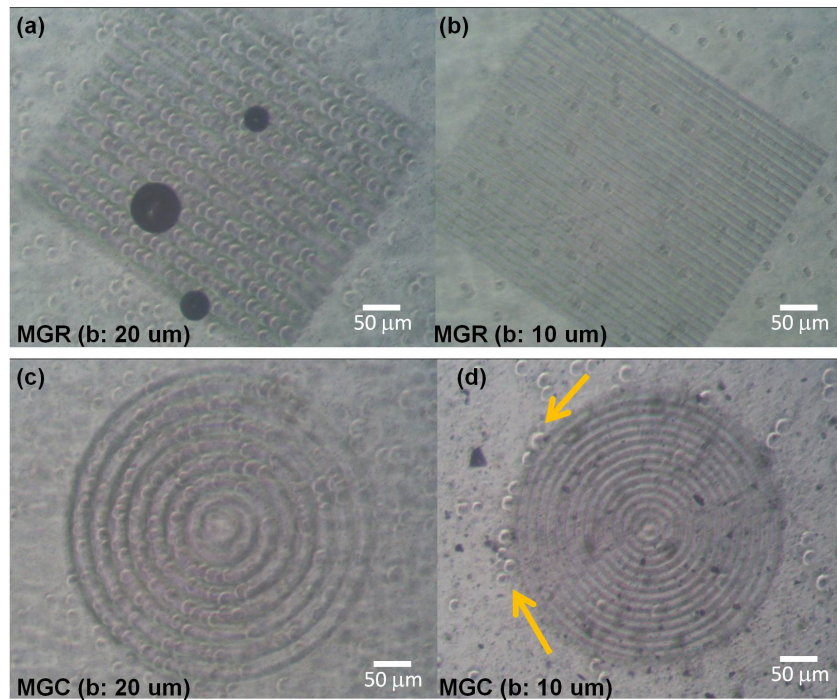
Fonte: Elaborado pela autora.

## 4.5 CULTURA CELULAR TRIDIMENSIONAL

Para iniciar os ensaios biológicos, os arcabouços fabricados sobre o filme polimérico foram inseridos em placas de 12 poços e mantidos na cabine de fluxo laminar por 1h sob luz UV antes de receberem as células. Ao fim deste procedimento, as células (densidade de  $2 \times 10^4$  /poço) foram semeadas em cada poço sobre as superfícies das amostras, com e sem arcabouços, e mantidas sob condições de cultivo por um período de 3 dias.

O microscópio óptico foi usado para observar a dinâmica da morfologia e organização das células crescidas em amostras constituídas de fotorecina T1 ainda no meio de cultura após 72 h. Esta investigação é essencial na área da engenharia tecidual, pois o comportamento das células é regido pelas propriedades químicas e físicas presentes no microambiente, que atuam efetivamente no estímulo da resposta celular. Conforme mostrado pela figura 4.30, pode-se notar através da interação arcabouço-célula no meio de cultura, que os arcabouços permitiram o alinhamento das células de acordo com a orientação do microgroove retangular e circular.

Figura 4.30: Imagens de microscópio óptico das células MG-63 (indicado pelas setas em amarelo) após 72 h no meio de cultura. (a) MGR e (c) MGC com (b: 20  $\mu\text{m}$ ); (b) MGR e (d) MGC com (b: 10  $\mu\text{m}$ ). Barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ .



Fonte: Elaborado pela autora.

Entretanto, nos arcahouços com largura do groove mais estreitos de 10  $\mu\text{m}$  mostrados nas figuras 4.30(b) e (d), um número menor de células foram encontradas dentro dos grooves. Foi perceptível que no grupo MGC (b: 10  $\mu\text{m}$ ) mais estreito as células ficaram orientadas ao redor da última coluna seguindo a mesma curvatura da microestrutura, mostrado pelas setas amarelas, porém não conseguiram entrar no interior do microambiente.

Em contraste, um grande número de células MG-63 permaneceram alinhadas entre as colunas da microestrutura seguindo a mesma direção da geometria do arcahouço MGR e do MGC, ambos com largura do groove de 20  $\mu\text{m}$ , mostrado na figura 4.30(a) e (c), desta forma, foi estabelecido que as células optaram por ocupar arcahouços com largura do groove superiores a 10  $\mu\text{m}$ .

Já em regiões externas dos arcahouços, isto é, na superfície do Filme T1 são encontrados osteoblastos espalhados de maneira aleatória e sem direção predominante. Este resultado demonstra a importante função desempenhada por estes arcahouços na orientação e comunicação entre as células.

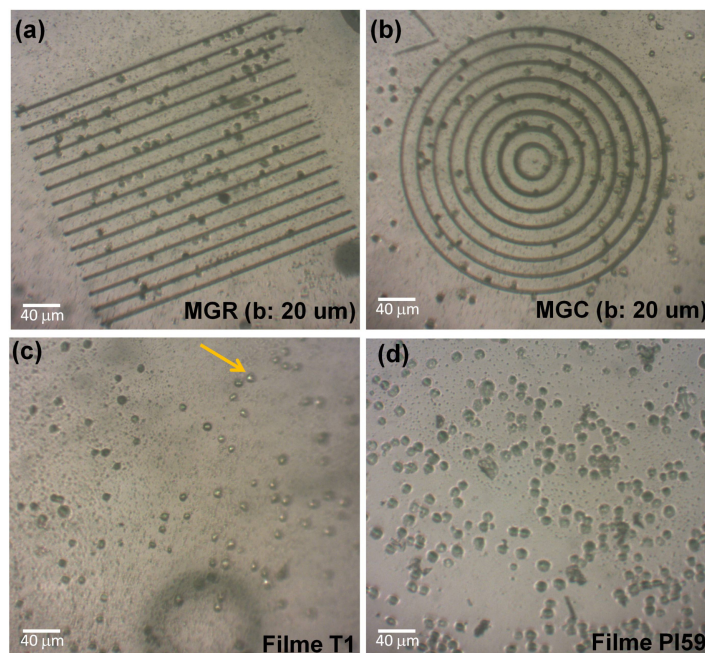
Optou-se por avaliar também o efeito do FI IRG 369 sobre a morfologia dos osteoblastos substituindo-o por outro FI, já que, o comportamento das células é regido pelas características químicas contidas no substrato. Para esta avaliação foi utilizado o mesmo

monômero PETA adicionado a um diferente FI, conhecido por IRG 2959, escolhido por ter excelente solubilidade em água, e ser frequentemente usado na síntese de hidrogéis sintéticos.

Esta nova resina foi preparada com 1% de FI IRG 2959 dissolvidos em 5 ml de PETA, denominada PI59, seguindo o mesmo roteiro de síntese das resinas P.2.0 e P.0.5. Em seguida, foi confeccionado um filme fino da resina PI59 com as mesmas dimensões da lamínula de vidro, semelhante ao procedimento realizado com a fotoresina T1.

Para examinar a resposta das células ósseas inseridas dentro e fora dos arcabouços e sobre os Filmes, as amostras com células foram fixadas com glutaraldeído a 0,5% e submetidas à análise. Devido à baixa adesão celular, seguido do aparecimento de curtos prolongamentos celulares da membrana citoplasmática, após o processo de fixação, poucas células permaneceram aderidas ao substrato feito da fotoresina T1, como é visto na figura 4.31.

Figura 4.31: Imagens ópticas de células MG-63 (seta em amarelo) fixadas após 72 h de cultura em (a) arcabouço MGR, (b) arcabouço MGC (b: 20  $\mu\text{m}$ ), (c) Filme T1 e (d) Filme PI59. Barra de escala = 40  $\mu\text{m}$



Fonte: Elaborado pela autora.

Para quantificar a interação das células nos substratos, é definido a quantidade razão de alongamento como sendo a razão entre o comprimento médio e a largura média das células, foram analisadas no total 41 células de cada grupo. Entende-se que, quando a razão de alongamento equivale a 1, significa dizer que a célula possui um formato mais próximo do circular e, conseqüentemente muito menos alongada. A partir da figura 4.32 é possível analisar a morfologia celular em amostras com MGR (b: 20  $\mu\text{m}$ ), MGC (b: 20

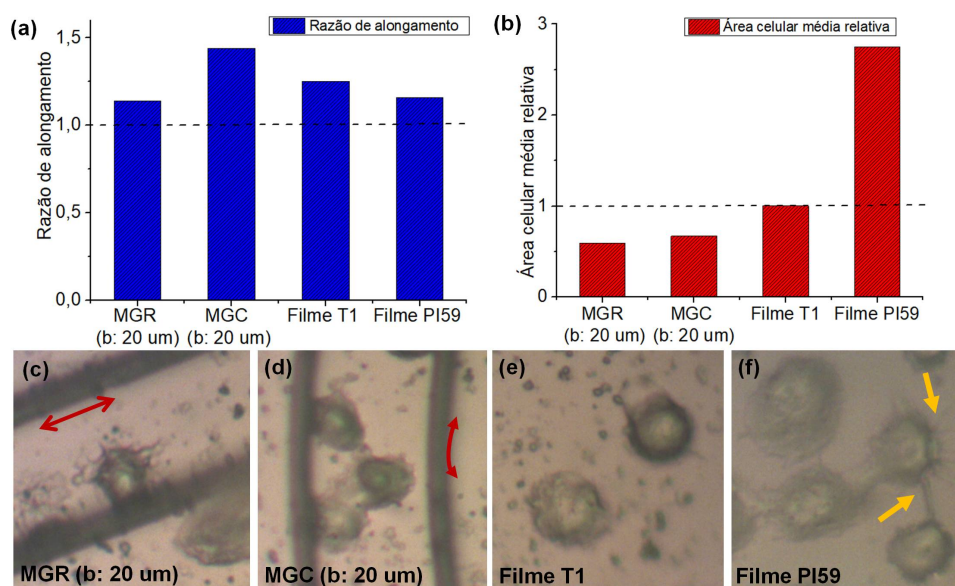


$\mu\text{m}$ ), Filme T1 e no Filme PI59.

Foi constatado que no grupo MGR (b:  $20\ \mu\text{m}$ ) com arcabouço, a razão de alongamento das células eram mais próximas de 1, que indica uma forma celular mais simétrica, mostrado na figura 4.32(c). Entretanto no grupo MGC (b:  $20\ \mu\text{m}$ ), foi evidente que houve uma diferença no formato das células quando estavam em contato dos arcabouços curvos. Pois as células apresentaram uma razão de alongamento maior em comparação aos outros grupos, portanto, significada que os osteoblastos ficavam mais alongados com uma forma elíptica, mais compacto e com apenas algumas extensões citoplasmáticas, como visto na figura 4.32(d) (Seta em vermelho indica a direção do groove).

Ao comparar a morfologia das células sob efeito da interação com as superfícies do Filme T1 e do Filme PI59, sem interação com o arcabouço, mostradas nas figuras 4.32(e) e (f), pode ser observado que os dois grupos estimulam uma morfologia esférica nas células, com razão de alongamento próximo de 1, supostamente causado pela baixa adesão celular ao substrato.

Figura 4.32: (a) Razão de alongamento e (b) área celular média relativa. Morfologia dos osteoblastos MG-63 cultivados por 3 dias em diferentes superfícies, ampliação de 50x. Amostra (c) MGR e (d) MGC (b:  $20\ \mu\text{m}$ ), (e) Filme T1 e (f) Filme PI59.



Fonte: Elaborado pela autora.

Entretanto, no Filme PI59 foi percebido que as células se expandem mais sobre o substrato, com área celular media relativa muito superior do que as células no Filme T1 e nos outros grupos, mostrado na figura 4.32(b). Além disso, os osteoblastos apresentam projeções da membrana citoplasmática com expressão dos filopódios (apontados pelas setas em amarelo), que são formados por filamentos de actina organizados em paralelo e permitem as células interagir e explorar a superfície do material, como também promovem

conexões mais estáveis entre células mais próximas e induzir as migrações celulares [46]. Já no Filme T1 observa-se células caracterizadas por uma forma esferoide sem extensão visível de filopódios.

O aparecimento dos filopódios é essencial na dinâmica celular, pois quando as células estiverem na presença de nanoestruturas ou de arca-bouço nanogroove seus filopódios vão interagir com a superfície ao seu redor, a depender da geometria e da escala de tamanho, podem detectar estas características do ambiente e promover uma resposta celular, seguido do alinhamento dos filopódios pela topografia em nanoescala [47]. Também é conhecido que os filopódios conseguem interagir com nanoestruturas e NPs da ordem de até 35 nm [48].

Claramente, este resultado mostra a possibilidade de ampliar o potencial de ativação das células ao adotar um FI solúvel em água na síntese das fotoresinas ao invés do IRG 369, posto que, é nítida uma distinção da resposta celular dos osteoblastos pela expressão dos seus filopódios que é um característico da interação célula-célula e célula-matriz extracelular. Como também, permite ainda explorar as vantagens da incorporação das NPs de  $\text{TiO}_2$ , a fim de induzir melhor biocompatibilidade, maior grau de adesão e mudanças na forma das células. Outra estratégia a ser adotada seria aumentar o período de cultura com objetivo de acompanhar melhor a dinâmica celular quanto às conexões célula-célula e células-substrato e/ou arca-bouço.

#### 4.5.1 Investigação do Módulo de Young das células Osteoblastos MG-63 via AFM

Embora na literatura já se tenha conhecimento no que diz respeito à morfologia, diferenciação e taxa de proliferação das células osteoblastos MG-63 em contato dos arca-bouços tipo groove feitos a partir de diferentes materiais, incluindo Poliestireno (PS) [44], Titânio-6alumínio-4vanádio (Ti6-Al-4V) [49], Titânio [50] e Policaprolactona (PCL) [51]. Todavia, o efeito causado pelo arca-bouço microgroove incorporado com NPs de dióxido de titânio nas propriedades biofísicas dessas células ainda não é claro em nenhum destes estudos e necessita ser mais bem compreendido.

Neste contexto, o módulo elástico das células pode ser mensurado de maneira quantitativa por uma variedade de métodos [52], aqui é adotada a técnica de Microscopia de Força Atômica (AFM). Este método de análise se estabeleceu como uma excelente ferramenta no estudo da dinâmica e das propriedades mecânicas das células, frequentemente utilizado com intuito especificamente de investigar diferentes eventos e respostas celulares, incluindo locomoção, diferenciação, adesão, envelhecimento, patologia celular de diferentes tipos de células [53]. As propriedades biofísicas das células não são somente modificadas por processos fisiológicos e patológicos, mas também, são influenciadas por

características do ambiente de cultura, como por exemplo, a geometria, a composição química, a rugosidade e a rigidez do arcabouço que ao interagir com a membrana citoplasmática das células afeta sua rigidez [54].

O citoesqueleto das células é composto principalmente, dentre outros componentes, por filamentos de actina (F-actina) e microtúbulos [55], os quais regulam as propriedades elásticas dos osteoblastos, de modo que, a reorganização e alteração do citoesqueleto causado por estímulos locais do microambiente e pela diferenciação celular são refletidas na mudança da elasticidade das células [52].

É aceitável que células em diferenciação têm sua rigidez aumentada [56], assim como ocorre na dinâmica de alteração de uma morfologia arredondada para uma morfologia espalhada. Esta afirmação é comprovada por Darling et al. a partir de medidas via AFM com uma força de indentação da ponta esférica do *cantilever* de 2-3 nN, eles observaram uma diferença significativa no módulo elástico das células osteoblastos correlacionado com a mudança nas características observáveis das células, visto que, o grupo de células com morfologias esféricas tinham o módulo elástico inferior do grupo de células com morfologias espalhadas, sendo respectivamente de  $2,6 \pm 2,0$  kPa e  $6,5 \pm 2,7$  kPa [52].

Em relação à rugosidade e a composição química da superfície do substrato, Domke et al. confirmaram o impacto destes parâmetros no aumento do módulo de Young de células osteoblastos. Foi notado que células cultivadas em superfícies de titânio com maior rugosidade apresentaram perceptível aumento no módulo de Young, assim como no grau de adesão celular à medida que foram se espalhando e ficando mais achatadas ao longo do substrato, quando comparado às células cultivadas sobre uma superfície composta de Cobalto-Cromo (CoCr) e com menor rugosidade [40]. Portanto, tais estudos sugerem que as características biofísicas celulares atuam como marcadores biológicos, pois conseguem capturar as mudanças e configurações do fenótipo celular [53].

Outros estudos realizados por Zorlutuna e colaboradores relataram que as Células do Músculo Liso Vascular (VSMCs) cultivados durante 75 dias no arcabouço nanogroove feito de biomaterial (colágeno tipo 1) com largura do groove de 332,5 nm, mostraram ser úteis ao exercer o direcionamento das células na mesma direção do groove e melhorar significativamente as propriedades elásticas das células representado pelo aumento no módulo de Young [57] em comparação as células VSMCs cultivadas no vidro.

Neste presente estudo, as propriedades biofísicas de células Osteoblastos da linhagem MG-63, sujeito à influência do arcabouço microgroove, em duas diferentes geometrias, dopado com NPs de  $\text{TiO}_2$  foram investigadas, a fim de possivelmente correlacionar o módulo de Young das células com o comportamento celular observado (reorganização do citoesqueleto e forma celular).

As células foram medidas individualmente a partir do microscópio de força atômica Multiview 4000™ (Nanonics, Israel) acoplado ao microscópio óptico (BAXFM, Olympus, Japão) para obter os dados do módulo de Young. Com objetivo de reduzir quaisquer interferências do ambiente causadas por ruídos mecânicos e sonoros no decorrer das medidas, o aparelho AFM foi isolado acusticamente e mecanicamente.

Neste experimento, uma ponta com formato cônico fixado na extremidade do *cantilever*, movendo-se a velocidade constante de 5  $\mu\text{m/s}$  com precisão de ordem sub-micrométrica, foi aproximada em direção as amostras e posicionada sobre a parte central das células.

As curvas de força-distância obtidas foram realizadas em torno do centro das células na região do núcleo, onde as células são mais espessas. Tal condição assegura que a rigidez identificada pela ponta do AFM provém exclusivamente do material biológico e não do substrato, desta forma, garante maior confiabilidade aos resultados.

Para as medidas realizadas no AFM foram utilizados os seguintes parâmetros, a ponta de varredura usada tinha um raio típico de curvatura  $< 20$  nm acoplada em um *cantilever* de 320  $\mu\text{m}$  de comprimento, com constante de mola  $< 1$  N/m e uma frequência nominal de 38 kHz. A constante de mola do *cantilever* foi calibrada ajustando-se o espectro de potência a um oscilador harmônico simples, e foi ajustada uma força de indentação máxima para o *cantilever* em 20 nN.

No total foram medidas 80 células que correspondeu a 80 curvas adquiridas e analisadas, em cada grupo de amostras, todas obtidas com a mesma ponta de AFM. De modo a caracterizar as curvas de força-distância para obter a indentação elástica das células foi utilizado o modelo de Hertz modificado por Sneddon [58]. Ajustando esse modelo aos dados, foi possível calcular o módulo de Young médio das amostras<sup>2</sup>.

Os resultados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão. Para mostrar que todos os resultados são normalmente distribuídos, o teste Kolmogorov-Smirnov foi realizado e a significância estatística das diferenças no módulo de elasticidade entre os grupos de células foi avaliada com ANOVA usando o teste post hoc de Tukey com 95% de nível de confiança ( $p < 0.05$ ) para análise estatística.

É verificado a mudança nas propriedades mecânicas das células osteoblastos durante 3 dias de cultura nas amostras Filme T1, MGR e MGC, a fim de mensurar a importância da microestrutura na morfologia celular. A composição química da amostra dos filmes T1 e PI59, exerce influência no comportamento celular sendo um aliado para alteração da rigidez das células. Foi obtido um módulo de Young de  $16,6 \pm 9,4$  Pa para

---

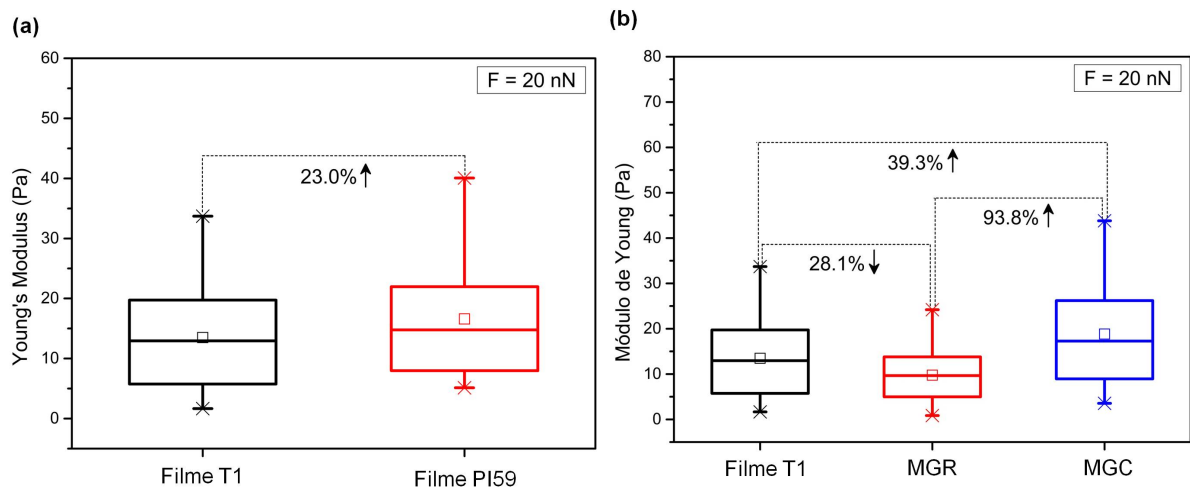
<sup>2</sup>Observa-se que os valores do módulo de Young aqui medidos não são absolutos, pois difere principalmente dos parâmetros usados na análise AFM e das condições morfológicas das células osteoblastos MG-63.



células em contato do Filme PI59 e para as células sobre o Filme T1 foi dado por  $13,5 \pm 8,3$  Pa, houve um aumento significativo de 23,0% para as células cultivadas no Filme PI59, retratado na figura 4.33(a).

Especificamente, as células cultivadas sobre o Filme T1 exibiram um módulo de Young de  $13,5 \pm 8,3$  Pa. Por outro lado, as células cultivadas sobre o arcabouço MGC apresentaram um módulo de Young expresso por  $18,8 \pm 11,2$  Pa, como mostrado na figura 4.33(b). Portanto, houve um aumento significativo no módulo de elasticidade de 39,3% para as células cultivadas no grupo MGC em comparação ao grupo na ausência do arcabouço. É notável que, supostamente, esta alteração na rigidez das células no grupo MGC esteja correlacionada ao fenótipo adquirido pela célula ao interagir com o arcabouço curvo, pois as células possuem uma razão de alongamento superior  $> 1$ , em comparação as outras amostras.

Figura 4.33: Módulo de Young de osteoblastos MG-63 cultivados após 3 dias no grupo (a) Filme T1, MGR e MGC e (b) Filme T1 e Filme PI59. O módulo de Young médio é dado pela linha horizontal dentro de cada caixa.



Fonte: Elaborado pela autora.

Embora as células sejam mais rígidas em contato do arcabouço MGC do que no Filme T1, a mesma relação não é mantida no arcabouço MGR. Como resultado, as células cultivadas no grupo MGR revelaram um módulo de Young dado por  $9,7 \pm 6,0$  Pa, com diminuição de 28,1% em sua rigidez quando comparado as células semeadas no Filme T1.

Já quando comparado à rigidez dos osteoblastos nos grupos MGR e MGC, em geometrias diferentes, é observado um valor mais alto para o módulo de Young de 93,8% maior para as células do grupo MGC, uma diferença que foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em comparação com as células no grupo MGR. Logo, estes resultados sugerem que a geometria do arcabouço é um parâmetro importante por regular a alteração da rigidez dos osteoblastos que reflete principalmente na resposta celular. É proposto que os

---

osteoblastos tiveram um melhor desempenho no comportamento celular em arcabouços microgroove com colunas curvas do que em colunas paralelas.

Conforme os estudos de Isenberg et al. [59] as folhas de tecido do músculo liso (espessura de 40  $\mu\text{m}$ ) cultivado em arcabouços microgroove feito de polydimethylsiloxane (PDMS) com a: 50  $\mu\text{m}$ , b: 20  $\mu\text{m}$  e c: 5  $\mu\text{m}$ , mostraram um aumento na rigidez devido a mudança na organização do tecido que foi alinhado pela microestrutura e não por causa da composição da matriz do tecido celular, pois foi comprovado que não houve diferença relevante na quantidade total de proteínas produzidas, incluindo a elastina e o colágeno, por células cultivadas no arcabouço e no plano.

Em contrapartida, Sun et al. demonstrou que especificamente para as células-alvo osteoblastos humano da linhagem MG-63 semeadas durante 21 dias em arcabouços microgroove feito de poliestireno com b: 2  $\mu\text{m}$  e 6  $\mu\text{m}$  exibiram um aumento na produção de proteínas quando comparado as células cultivadas em substrato sem a microestrutura [44], não sendo investigado pelos autores o módulo de Young.

A partir dos resultados das propriedades biofísicas aqui exploradas, em trabalhos futuros, será proposto utilizar a técnica de espectroscopia Raman, a fim de identificar possíveis sinais químicos proporcionado por células cultivadas nos arcabouços relacionado a expressão de proteínas (ALP, Col-1 e OC) e comparar com células cultivadas em filmes. Estas proteínas são essenciais e tipicamente estão presentes durante a síntese da matriz orgânica extracelular do osso, proliferação e na etapa de mineralização da matriz óssea [44].

Também será feito o uso de marcadores no citoesqueleto das células e no núcleo, de modo a visualizar se houve realmente uma nova reorganização dos F-actina nos grupos durante o período de cultura celular. Logo, será possível identificar se o aumento no módulo de Young está diretamente ligado às proteínas produzidas ou se o aumento reflete apenas a reorganização do citoesqueleto.

## Referências

- [1] BJÖRKNER, B. The sensitizing capacity of multifunctional acrylates in the guinea pig. **Contact Dermatitis**. v. 11, n. 4, p. 236-46, 1984.
- [2] NGUYEN, A. et al. Two-photon polymerization of polyethylene glycol diacrylate scaffolds with riboflavin and triethanolamine used as a water-soluble photoinitiator. **Regenerative medicine**. v. 8. p. 725-738, 2013.
- [3] OVSIANIKOV, A. et al. Three-dimensional laser micro- and nano-structuring of acrylated poly(ethylene glycol) materials and evaluation of their cytotoxicity for tissue engineering applications. **Acta Biomater**. v. 7, p. 967-74, 2011.
- [4] SZYMAŃSKI, T. et al. Utilization of Carbon Nanotubes in Manufacturing of 3D Cartilage and Bone Scaffolds. **Materials**. v. 13, n. 18, p. 1-25, 2020.
- [5] BASTOS, Victor A. F. **Avaliação da toxicidade de quantum dots de tamanhos mágicos de cdse/cds do tipo core shell no modelo animal C. elegans**. 2016, 72 p. Dissertação (mestrado em genética e bioquímica) - Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal De Uberlândia, Uberlândia, 2016.
- [6] REIS, Érica, et al. Evaluation of titanium dioxide nanocrystal-induced genotoxicity by the cytokinesis-block micronucleus assay and the Drosophila wing spot test. **Food and Chemical Toxicology**. v. 96, p. 309-319, 2016.
- [7] RASOULIANBOROUJENI, M. et al. Development of 3D-printed PLGA/(TiO<sub>2</sub>) nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering applications. **Mater Sci Eng C**. v. 96, p. 105-113, 2019.
- [8] OVSIANIKOV, A. et al. Two-photon polymerization for fabrication of biomedical devices. **Proc. SPIE**. v. 6465, p. 1-9, 2007.
- [9] JAGGESSAR, A. et al. Bacteria Death and Osteoblast Metabolic Activity Correlated to Hydrothermally Synthesised TiO<sub>2</sub> Surface Properties. **Molecules**. v. 24, n. 7, p. 1-18, 2019.
- [10] VIDAL, E. et al. Titanium Scaffolds by Direct Ink Writing: Fabrication and Functionalization to Guide Osteoblast Behavior. **Metals**. v. 10, n. 9, p. 1-18, 2020.
- [11] SILVA, A. C. A. **Pontos quânticos semicondutores sintetizados via soluções coloidais aquosas: estudos e aplicações nanobiotecnológicas**. 2014, 142 p. Tese (doutorado em Física) - Instituto de Física, Universidade Federal De Uberlândia, Uberlândia, 2014.
- [12] CHEN, X. et al. Investigation of the Crystallization Process in 2 nm CdSe Quantum Dots. **J. American Chemical Society**. v. 127, n. 12, p. 4372-4375, 2005.
- [13] SUN, Z.B., et al. Multicolor polymer nanocomposites: In situ synthesis and fabrication of 3D microstructures. **Advanced Materials**. v. 20, p. 914-919, 2008.
- [14] SAKELLARI, Ioanna. Quantum dot based 3D printed woodpile photonic crystals tuned for the visible. **Nanoscale Adv**. v. 1, p. 3413-3423, 2019.

- 
- [15] GOTO, T. E. et al. CdSe magic-sized quantum dots incorporated in biomembrane models at the air–water interface composed of components of tumorigenic and non-tumorigenic cells. **BBA - Biomembranes**. v. 858, n.7, p. 1533–1540, 2016.
- [16] SILVA, A. C., et al. Shell Thickness Modulation in Ultrasmall CdSe/CdS<sub>x</sub>Se<sub>1-x</sub>/CdS Core/Shell Quantum Dots via 1-Thioglycerol. **ACS Nano**. v. 8, n. 2, p. 1913-1922, 2014.
- [17] HAN, Xiaole, et al. Cytotoxicity of CdTe quantum dots with different surface coatings against yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 174, p. 467-474, 2019.
- [18] SHANG, Enxiang, et al. Comparative toxicity of Cd, Mo, and W sulphide nanomaterials toward *E. coli* under UV irradiation. **Environmental Pollution**. v. 224, p. 606-614, 2017.
- [19] MARTELLI, A. et al. Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals. **Biochimie**. v. 88, n. 11, p. 1807-1814, 2006.
- [20] POWERS, Kevin W., et al. Research Strategies for Safety Evaluation of Nanomaterials. Part VI. Characterization of Nanoscale Particles for Toxicological Evaluation. **Toxicological Sciences**. v. 90, n. 2, p. 296–303, 2006.
- [21] STAMPFL, Jürgen; LISKA, Robert; OVSIANIKOV, Aleksandr. **Multiphoton Lithography: Techniques, Materials and Applications**. ed. 1, Wiley-VCH, 2016.
- [22] PENG, Ying, et al. 3D Photoluminescent Nanostructures Containing Quantum Dots Fabricated by Two-Photon Polymerization: Influence of Quantum Dots on the Spatial Resolution of Laser Writing. **Advanced Materials Technologies**. v. 4, n. 2, p. 1-10, 2018.
- [23] GUPTA, S.; M. Tripathi. A review of TiO<sub>2</sub> nanoparticles. **Chinese Sci Bull**. v. 56, p. 1639-1657, 2011.
- [24] EL-SHAFI, Nagi M., et al. Fabrication and characterization of graphene oxide–titanium dioxide nanocomposite for degradation of some toxic insecticides. **J. Ind. Eng. Chem**. v. 69, p. 315-323, 2019.
- [25] ZHAO, Q. et al. Osteogenic activity and antibacterial ability on titanium surfaces modified with magnesium-doped titanium dioxide coating. **Nanomedicine**. v. 14, n. 9, p. 1109-1133, 2019.
- [26] VERCELLINO, M. et al. Nanostructured TiO<sub>2</sub> Surfaces Promote Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Differentiation to Osteoblasts. **Nanomaterials**. v. 6, n. 7, p. 124, 2016
- [27] ROVERI, Veridiana Z. et al. Desenvolvimento e caracterização de filmes de TiO<sub>2</sub> para aplicação como fotocatalisadores em processos oxidativos avançados. **Comunicado Técnico**. v. 114, n.1, 2010.
- [28] CHANG, Wenkai, et al. Preparation of titanium dioxide porous thin films via photopolymerization of the colloidal TiO<sub>2</sub> dispersion. **Materials Chemistry and Physics**. v. 140. p. 665-673, 2013.

- 
- [29] BRAMMER, S.P.; TONIAZZO, C.; POERSCH, L.B. Corantes comumente empregados na citogenética vegetal. **Arq. Inst. Biol.** (São Paulo). v. 82, p. 1–8, 2015.
- [30] NGUYEN, A. K.; NARAYAN, R. J. Two-photon polymerization for biological applications. **Materials Today**. v. 20, n. 6, p. 314–322, 2017.
- [31] TRAUTMANN, Anika, et al. Two-photon polymerization based large scaffolds for adhesion and proliferation studies of human primary fibroblasts. **Optics and Laser Technology**. v. 106, p. 474-480, 2018.
- [32] JINGA, Sorin-Ion, et al. PCL-ZnO/TiO<sub>2</sub>/HAp Electrospun Composite Fibers with Applications in Tissue Engineering. **Polymers**. v. 11, n. 11, p. 1-12, 2019.
- [33] ANSARI, M. Bone tissue regeneration: biology, strategies and interface studies. **Prog Biomater**. v. 8, p. 223–237, 2019.
- [34] MOON, J.J., et al. Micropatterning of poly(ethylene glycol) diacrylate hydrogels with biomolecules to regulate and guide endothelial morphogenesis. **Tissue Eng Part A**. v. 15, n. 3, p. 579-585, 2009.
- [35] BALDACCHINI, T. **Three-Dimensional Microfabrication Using Two-Photon Polymerization: Fundamentals, Technology, and Applications**; William Andrew: Oxford, U.K., 2015.
- [36] MCNALLY, E. A. et al. A Model for the Ultrastructure of Bone Based on Electron Microscopy of Ion-Milled Sections. **PLoS ONE**. v. 7, n. 1, p. 1-12, 2012.
- [37] GUI, N., et al. Osteoblast Responses to Titanium-Coated Subcellular Scaled Microgrooves. **ACS Applied Bio Materials**. v. 2, n. 6, p. 2405-2413, 2019.
- [38] ZHANG, L. et al. Local Cellular Responses to Metallic and Ceramic Nanoparticles from Orthopedic Joint Arthroplasty Implants. **Int. J. Nanomed**. v. 15, p. 6705–6720, 2020.
- [39] HUANG, C. et al. Controlled delivery of growth factor by hierarchical nanostructured core-shell nanofibers for the efficient repair of critical-sized rat calvarial defect. **ACS Biomaterials Science & Engineering**. p. 1-45, 2020.
- [40] DOMKE, J. et al. Substrate dependent differences in morphology and elasticity of living osteoblasts investigated by atomic force microscopy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 19, n. 4, p. 367–379, 2000.
- [41] EIVAZZADEH-KEIHAN, R. Carbon based nanomaterials for tissue engineering of bone: building new bone on small black scaffolds: A review. **J. Advanced Research**. v. 18, p. 185-201, 2019.
- [42] CHATTERJEE, D. et al. Osseointegration – An Overview. **Int. J. Prev. Clin. Dent. Res**. v. 5, n. 1, p. 131-136, 2018.
- [43] LI, M. et al. Regulation of an osteon-like concentric microgrooved surface on osteogenesis and osteoclastogenesis. **Biomaterials**. v. 216, p. 1-11, 2019.
- [44] SUN, L. et al. Controlling Growth and Osteogenic Differentiation of Osteoblasts on Microgrooved Polystyrene Surfaces. **PLOS ONE**. v. 11, n. 8, 2016.

- 
- [45] KAUR, K. et al. Regulation of Human Osteoblast-to-Osteocyte Differentiation by Direct-Write 3D Microperiodic Hydroxyapatite Scaffolds. **ACS Omega**. v. 4, n. 1, p. 1504–1515, 2019.
- [46] FAIX, J. et al. Filopodia: Complex models for simple rods. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** v. 41, n. 8, p. 1656–1664, 2009.
- [47] PERTZ, O. Filopodia. **Communicative & Integrative Biology**. v. 4, n. 4, p. 436–439, 2011.
- [48] DALBY, M. J.; GADEGAARD, N.; OREFFO, R. O. Harnessing nanotopography and integrin-matrix interactions to influence stem cell fate. **Nature materials**. v. 13, n. 6, p. 558–569, 2014.
- [49] LIU, Q. et al. Response of MG63 Osteoblast Cells to Surface Modification of Ti-6Al-4V Implant Alloy by Laser Interference Lithography. **J. Bionic Eng.** v. 14, p. 448–458, 2017.
- [50] LEE, S.-W., et al. Correlation Between Surface Hydrophilicity and Osteoblastic Differentiation on Microgrooved Titanium Substrata. **J. Oral Implantology**. v. 38, n.1, p. 11–19, 2012.
- [51] ZHANG, et al. Microgrooved Polymer Substrates Promote Collective Cell Migration To Accelerate Fracture Healing in an in Vitro Model. **ACS Applied Materials & Interfaces**. v. 7, n. 41, 23336–23345, 2015.
- [52] DARLING, E. M. et al. Viscoelastic properties of human mesenchymally-derived stem cells and primary osteoblasts, chondrocytes, and adipocytes. **J. Biomechanics**. v. 41, n. 2, p. 454–464, 2008.
- [53] KUZNETSOVA, T. G. et al. Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron*. **PMID**. v. 38, n. 8, p. 824–833, 2007.
- [54] SCHILLERS, H., et al. Standardized Nanomechanical Atomic Force Microscopy Procedure (SNAP) for Measuring Soft and Biological Samples. **Scientific Reports**. v. 7, n.1, p. 1–9, 2017.
- [55] MOUTZOURI, A. G.; ATHANASSIOU, G. M. Insights into the Alteration of Osteoblast Mechanical Properties upon Adhesion on Chitosan. **BioMed Research International**. v. 2014, p. 1–8, 2014.
- [56] PERNI, S., Yang et al. Cobalt and Titanium nanoparticles influence on human osteoblast mitochondrial activity and biophysical properties of their cytoskeleton. **J. Colloid and Interface Science**. v. 531, p. 410–420, 2018.
- [57] ZORLUTUNA, P. et al. Nanopatterning of Collagen Scaffolds Improve the Mechanical Properties of Tissue Engineered Vascular Grafts. **Biomacromolecules**. v. 10, n. 4, p. 814–821, 2009.
- [58] HAASE K.; Pelling AE. Investigating cell mechanics with atomic force microscopy. **J. R. Soc. Interface**. v. 12, p. 1–16, 2015.
- [59] ISENBERG, B. C. et al. Micropatterned cell sheets with defined cell and extracellular matrix orientation exhibit anisotropic mechanical properties. **J. Biomechanics**. v. 45, p. 756–761, ANO.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Esta pesquisa mostrou avanços na síntese de fotoresinas biocompatíveis incorporadas com NPs de CdSe/CdS e TiO<sub>2</sub>. Foi possível determinar os parâmetros de escrita que elevaram a resolução das microestruturas até valores submicrométricos. Pelo método de exclusão do azul de tripan foi comprovado que nenhuma das amostras de fotoresinas sintetizadas oferecem citotoxicidade elevada, isso sugere que o meio é adequado para a cultura celular.

Em destaque a fotoresina com adição de TiO<sub>2</sub> demonstrou ter uma viabilidade celular melhor que o controle durante 48 h de cultura, por isso, foi escolhida para fabricação dos arcabouços do tipo groove. A produção dos arcabouços, em diferentes geometrias, pela técnica P2F demonstraram excelentes condições estruturais com microestruturas compatíveis ao desenho 3D projetado no software *nFab*, isso indica que a investigação da dimensão do voxel e dos parâmetros de escrita anteriormente realizadas foram importantes para o sucesso da microfabricação a laser.

Pelo AFM foram investigadas as propriedades biomecânicas das células osteoblastos MG-63 pela ação da geometria do arcabouço tipo groove em nível celular e pelo efeito da composição química entre dois filmes, sendo eles, filme com FI IRG 369 e com IRG 2959. A rigidez dos osteoblastos cultivados nos grooves, até o momento não levada em consideração, é uma informação relevante no estudo da regeneração óssea.

Ao empregar técnicas de imagem via AFM, a morfologia das células nos arcabouços e nos filmes pôde ser visualizada. Resultados preliminares indicam que o arcabouço curvo permite estimular a resposta mecânica das células osteoblastos MG-63, uma vez que, ficou evidente pela grandeza razão de alongamento que o formato das células foi alterado após interagir com o arcabouço curvo, as quais ficaram mais alongadas e menos circulares, em comparação as células cultivadas no Filme com IRG 369.

Portanto, medidas do Módulo de Young demonstraram que está mudança foi refletida no aumento da rigidez celular, supostamente causado pela reorganização dos F-actina no citoesqueleto. Entretanto, ainda é necessário o uso de marcadores nas células para que através da visualização das estruturas intracelulares do citoesqueleto esta relação seja confirmação.

Foi mostrado também que as células sobre o Filme com IRG 2959 são mais rígidas em comparação ao Filme com IRG 369. Com relação ao comportamento celular, foi nítido o surgimento dos filopódios apenas na amostra com FI solúvel em água, já no Filme com FI IRG 369 (insolúvel em água) inibe o aparecimento dos filopódios, que são responsáveis pela comunicação entre células, migração celular e por explorar o microambiente.

Além disso, também é proposto em trabalho futuros a utilização da técnica de espectroscopia Raman para detectar sinais químicos de que os osteoblastos MG-63 tenham produzido proteínas e averiguar se houve diferença nos espectros Raman em cada um dos grupos, como foi observado em estudos anteriores. Outro detalhe a ser melhorado nos desenvolvimentos futuros, é prolongar para no mínimo 7 dias o tempo de cultura, pois 3 dias se torna um período curto de cultura para células ósseas.

A partir destes resultados iniciais, nota-se o potencial em explorar novas rotas de síntese, com utilização do FI IRG 2959 em baixa concentração (0,5%) e incorporada com NPs  $\text{TiO}_2$ . Este estudo *in vitro* estabelece os parâmetros (geometria e composição química) a serem adotados para otimizar as microestruturas tridimensionais como estratégia na regeneração óssea no campo da engenharia de tecido e adequar a superfície de implantes dentários e ortopédicos para permitir uma excelente osseointegração na interface do dispositivo implantado *in vivo*.



## A APÊNDICE: Processos ópticos não lineares de terceira ordem

No geral, os processos ópticos não lineares gerados através da interação de radiação dos campos ópticos em meios não lineares podem ser classificados em processos paramétricos e não paramétricos. Nos processos paramétricos não há troca de energia entre a radiação incidente e as moléculas do material, de modo que, a energia do fóton é sempre conservada. Entende-se que, a população que antes estava no nível fundamental passa para um nível virtual, no qual permanece por um tempo muito curto e retorna ao estado inicial, como exemplos destes processos, se tem a geração de segundo harmônico, geração de terceiro harmônico, geração de soma de frequência e geração de diferença de frequência.

Nos processos não paramétricos há troca de energia entre a radiação incidente e as moléculas que compõe o meio não linear, que pode ocorrer através da absorção da luz, sendo que, a energia não precisa ser conservada e neste processo a população é transferida do estado fundamental para um estado excitado (nível real), como exemplos destes processos pode citar: absorção saturada, A2F e efeito Raman estimulado. É notório que a susceptibilidade de terceira ordem é uma quantidade complexa e pode ser dividida em uma parte real e uma parte imaginária, em que sua contribuição real está associada ao efeito de refração não linear. Já sua contribuição imaginária está relacionada ao processo de absorção não linear de radiação.

### A.0.1 Geração de terceiro harmônico

Para descrever o processo óptico não linear de geração de terceiro harmônico associados à susceptibilidade de terceira ordem, considere que um campo elétrico de frequência  $\omega$  é aplicado em um meio não linear com  $\chi^{(3)} > 0$ , descrito por:

$$\tilde{E}(t) = \varepsilon \cos(\omega t) \quad (24)$$

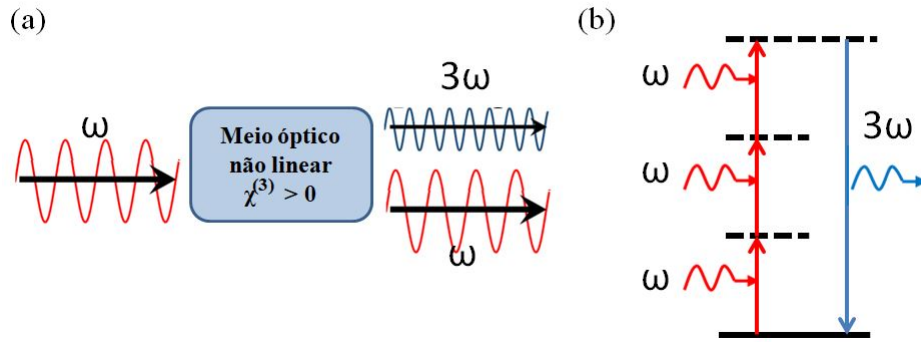
É possível reescrever a equação (24) utilizando a identidade trigonométrica dada por:  $\cos^{(3)}(\omega t) = \frac{\cos(3\omega t) + 3\cos(\omega t)}{4}$ , para expressar a resposta do meio com polarização não linear de terceira ordem como:

$$\tilde{P}^{(3)}(t) = \varepsilon_0 \chi^{(3)} \tilde{E}^3(t) \quad (25a)$$

$$\tilde{P}^{(3)}(t) = \frac{1}{4} \varepsilon_0 \chi^{(3)} \varepsilon^3 \cos(3\omega t) + \frac{3}{4} \varepsilon_0 \chi^{(3)} \varepsilon^3 \cos(\omega t) \quad (25b)$$

Ao interpretar cada termo da equação dada acima permite compreender quais processos são possíveis acontecer no material com interações não lineares de terceira ordem. Observa-se que, no primeiro termo do lado direito da equação (25b) é responsável pela geração de terceiro harmônico, conforme a figura A.1(b), ocorre quando são aniquilados três fótons com frequência angular da onda incidente  $\omega$  do sinal de entrada e vai criar um fóton com frequência  $3\omega$ . Um exemplo simples e prático é a possibilidade de se obter a partir de um laser com comprimento de onda de 1500 nm ao incidir em um material que tenha  $\chi^{(3)} > 0$ , gerar uma luz azul com comprimento de onda de 500 nm como desejado em um experimento específico em laboratório.

Figura A.1: Ilustração da (a) geração de terceiro harmônico. (b) Descrição do diagrama de níveis virtuais de energia (linhas pontilhadas representam níveis virtuais e linha preenchida nível real).



Fonte: Elaborado pela autora.

No segundo termo, expresso pela equação (25b), fornece uma contribuição na frequência do feixe de entrada  $\omega$ , descrevendo o efeito Kerr óptico em que produz o processo de autofocalização como resposta à interação não linear, no qual o índice de refração do meio vai variar linearmente com a intensidade do laser à medida que ela aumenta, descrito da seguinte forma:

$$n(\omega, I) = n_0(\omega) + n_2 I, \quad (26)$$

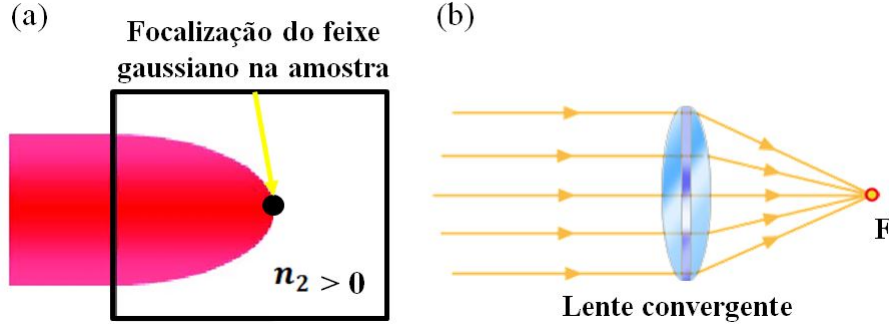
em que  $n_0$  é o índice de refração linear,  $I = \frac{n_0 c \epsilon_0 |E(\omega)|^2}{2}$  é a intensidade da onda incidente e  $n_2$  é o índice de refração não linear relacionado com a susceptibilidade de terceira ordem, descrito por:

$$n_2 = \frac{3\chi^{(3)}}{4n_0^2 \epsilon_0 c}. \quad (27)$$

Na figura A.2(a) é ilustrado o processo de autofocalização em que o feixe laser incide no material com índice de refração não linear maior que zero, em seguida, é focalizado no seu interior dependendo da intensidade da luz utilizada, como resultado deste efeito

o material produz as mesmas características do funcionamento de uma lente convergente mostrada na figura A.2(b).

Figura A.2: Ilustração da propagação de um feixe de luz (a) no meio não linear que possui  $n_2 > 0$  com efeito de autofocalização; (b) comportamento da lente convergente de espessura D.



Fonte: Adaptado de Kudriasov et al. [21]. Lentes... [22].

### A.0.2 Geração de soma e diferença de frequências

Semelhante ao caso anterior, agora é analisada a resposta não linear do meio sob interação do campo elétrico incidente composto por três diferentes componentes de frequência  $\omega_1$ ,  $\omega_2$  e  $\omega_3$ , descrito por:

$$\tilde{E}(t) = E_1 e^{-i\omega_1 t} + E_2 e^{-i\omega_2 t} + E_3 e^{-i\omega_3 t} + C.C. \quad (28)$$

Substituindo o campo óptico dado acima na polarização  $\tilde{P}^{(3)}(t)$  da equação (25a), encontramos 44 frequências distintas ao levar em consideração tanto as frequências positivas quanto as negativas. As frequências positivas que aparecem nos termos exponenciais relacionados com a polarização não linear  $\tilde{P}^{(3)}(t)$  são apresentadas a seguir:

$$\omega_1, \omega_2, \omega_3, 3\omega_1, 3\omega_2, 3\omega_3, (\omega_1 + \omega_2 + \omega_3), (\omega_1 + \omega_2 - \omega_3), (\omega_1 - \omega_2 + \omega_3), (\omega_2 + \omega_3 - \omega_1), (2\omega_1 \pm \omega_2), (2\omega_1 \pm \omega_3), (2\omega_2 \pm \omega_1), (2\omega_2 \pm \omega_3), (2\omega_3 \pm \omega_1), (2\omega_3 \pm \omega_2). \quad (29)$$

Para simplificar a notação a polarização não linear de terceira ordem é definida em função das amplitudes complexas da polarização não linear  $P(\omega_n)$  associada a cada componente de frequência positiva e negativa  $\omega_n$ .

$$\tilde{P}^3(t) = \sum_n P(\omega_n) e^{-i\omega_n t}, \quad (30)$$

em que o somatório varia entre as frequências positivas e negativas. Neste caso, através da forma como são representadas as amplitudes complexas da polarização não linear

em termos das frequências é possível identificar quais os fenômenos físicos que se pode obter em um meio centrossimétrico (ou não centrossimétrico com  $\chi^{(3)} > 0$ ), portanto, são observados processos de geração de terceiro harmônico para cada frequência  $\omega_n$ , geração de diferença de frequência e soma de frequência.

A partir destas componentes das frequências encontradas é possível diferenciá-las, pois elas caracterizam os fenômenos que podem ocorrer no material associado à polarização não linear de terceira ordem. Deste modo, a seguir são destacados alguns termos das amplitudes complexas da polarização não linear relacionados a diferentes fenômenos, dados como exemplificação:

Tabela A.1: Efeitos não lineares associados à polarização de terceira ordem.

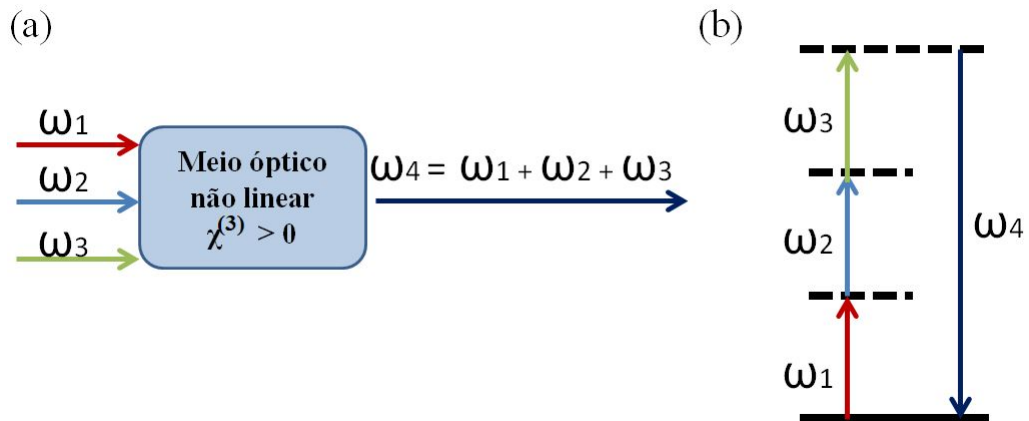
<b>Amplitude complexa da polarização não linear <math>P(\omega_n)</math></b>	<b>Fenômeno físico</b>
$P(3\omega_1) = \varepsilon_0\chi^{(3)}E_1^3$	Geração de terceiro harmônico na frequência $\omega_1$
$P(\omega_1 + \omega_2 + \omega_3) = 6\varepsilon_0\chi^{(3)}E_1E_2E_3$	Geração de soma de frequência
$P(\omega_1 + \omega_2 - \omega_3) = 6\varepsilon_0\chi^{(3)}E_1E_2E_3^*$	Geração de subtração de frequência
$P(\omega_1) = \varepsilon_0\chi^{(3)}(3E_1E_1^* + 6E_2E_2^* + 6E_3E_3^*)E_1$	Efeito Kerr

Fonte: Elaborada pela autora.

Vale ressaltar que as respostas não lineares em termos das frequências negativas não representam fenômenos físicos diferentes das frequências positivas, por exemplo, tanto a expressão  $P(3\omega_1) = \varepsilon_0\chi^{(3)}E_1^3$  em termos da frequência positiva  $3\omega_1$ , como a expressão  $P(-3\omega_1) = \varepsilon_0\chi^{(3)}E_1^{3*}$  em termos da frequência negativa  $-3\omega_1$ , estão representando o mesmo efeito de geração de terceiro harmônico, pois para obter a segunda expressão basta tomar o conjugado complexo da primeira, de acordo com a notação complexa.

No processo de soma de frequência, como mostrado pela figura A.3, na entrada do material é colocado três campos de frequências  $\omega_1$ ,  $\omega_2$  e  $\omega_3$  que ao se propagarem neste meio, que possui  $\chi^{(3)} > 0$ , gera um campo com frequência  $\omega_4$ . Percebe-se pelo diagrama de níveis de energia na figura A.3(b) que para este efeito ocorrer é necessário aniquilar um fóton de frequência  $\omega_1$ , um fóton de frequência  $\omega_2$  e um fóton de frequência  $\omega_3$ , conseqüentemente, um fóton com soma de frequência  $\omega_4 = \omega_1 + \omega_2 + \omega_3$  seja criado instantaneamente (perceba que são usados níveis virtuais neste processo), de acordo com os processos paramétricos, a energia do fóton será conversada.

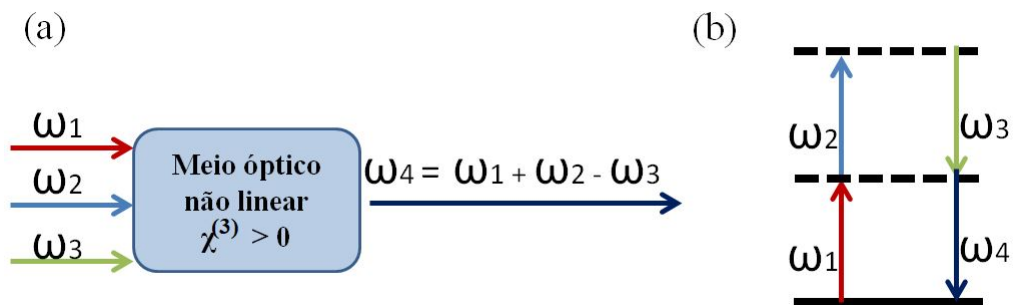
Figura A.3: Esquema ilustra três ondas na entrada de um meio caracterizado por  $\chi^{(3)} > 0$ , que dão origem ao (a) processo de geração de soma de frequência; (b) Diagrama de níveis de energia.



Fonte: Elaborado pela autora.

No processo de diferença de frequência, pelo diagrama de níveis de energia, dado pela figura A.4(b), neste efeito será aniquilado um fóton de frequência  $\omega_1$  e um fóton de frequência  $\omega_2$  e necessita ser criado um fóton de frequência  $\omega_3$  para instantaneamente gerar um fóton com frequência  $\omega_4 = \omega_1 + \omega_2 - \omega_3$ .

Figura A.4: (a) Esquema do processo de geração de diferença de frequência; (b) Diagrama de níveis de energia. Níveis virtuais são representados por linhas tracejadas e níveis reais por linhas preenchidas.



Fonte: Elaborado pela autora.