



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

LAURA MAÍSA SOUZA DOS SANTOS

**INVESTIGAÇÃO DO COMPORTAMENTO CELULAR EM AMBIENTES
POLIMÉRICOS BIOCAMPATÍVEIS E MICROESTRUTURADOS POR
LITOGRAFIA 3D MULTIFOTÔNICA**

**MACEIÓ, AL
DEZEMBRO DE 2024**

LAURA MAÍSA SOUZA DOS SANTOS

**INVESTIGAÇÃO DO COMPORTAMENTO CELULAR EM AMBIENTES
POLIMÉRICOS BIOCOMPATÍVEIS E MICROESTRUTURADOS POR
LITOGRAFIA 3D MULTIFOTÔNICA**

Tese 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 título de Doutora em Física, sob orientação do Prof. Dr. Eduardo Jorge da Silva Fonseca e coorientação do Prof. Dr. Jonathas Matias de Oliveira.

**MACEIÓ, AL
DEZEMBRO DE 2024**

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária: Elisângela Vilela dos Santos – CRB-4 – 2056

- S237i Santos, Laura Maísa Souza dos.
Investigação do comportamento celular em ambientes poliméricos biocompatíveis e microestruturados por litografia 3D multifotônica / Laura Maísa Souza dos Santos. – 2024.
158 f. : il. color.
- Orientador: Eduardo Jorge da Silva Fonseca.
Coorientador: Jonathas Matias de Oliveira.
Tese (Doutorado em Física) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Física. Programa de Pós-Graduação em Física. Maceió, 2024.
- Bibliografia: f. 146-152.
Apêndice: f. 156-158.
1. Resina biocompatível. 2. Arcabouços celulares. 3. Polimerização. 4. Absorção de dois fótons. I. Título.

CDU: 535:661.183.123



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

ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DA PÓS-GRADUANDA LAURA MAÍSA SOUZA DOS SANTOS, REALIZADA NO DIA DOZE DE DEZEMBRO DE DOIS MIL E VINTE E QUATRO.

Aos doze dias do mês de dezembro de dois mil e vinte e quatro, às quatorze horas, em sessão pública realizada no Auditório do IF, o professor Italo Marcos Nunes de Oliveira, na qualidade de Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Física, instalou os trabalhos para defesa de tese de doutorado da Pós-Graduanda **Laura Maísa Souza dos Santos**. O coordenador apresentou a Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores: Eduardo Jorge da Silva Fonseca, como presidente da banca examinadora e orientador, do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas; Jonathas Matias de Oliveira, coorientador, do Instituto Federal de Alagoas; Carlos Jacinto da Silva, do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas; Glauber José Ferreira Tomaz da Silva, do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas; Marcelo Duzzioni, do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas; e Adriano José Galvani Otuka, da Universidade Estadual Paulista; e como suplentes: Laís Farias Azevedo de Magalhães Oliveira, da Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da Universidade Federal de Alagoas; e Samuel Teixeira de Souza, do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas. Em seguida, o presidente da banca convocou a candidata a expor seu trabalho de tese, intitulado: **“Investigação do comportamento celular em ambientes poliméricos biocompatíveis e microestruturados por litografia 3D multifotônica”**. Após a exposição da candidata, teve início a arguição por parte da banca examinadora. O presidente da banca examinadora, após solicitar perguntas ou comentários do público presente, suspendeu os trabalhos para que fosse realizado o julgamento. **A banca examinadora decidiu aprovar a candidata com conceito A**. Nada mais havendo a tratar, foi encerrada a sessão, da qual eu, Raíssa Cavalcante Pinto, secretária do Programa de Pós-Graduação em Física, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e que depois de lida e aprovada, será assinada pelo presidente da banca examinadora e demais membros, pela candidata e por testemunhas que quiserem. Maceió, doze de dezembro de dois mil e vinte e quatro.

Documento assinado digitalmente
gov.br ADRIANO JOSE GALVANI OTUKA
Data: 12/12/2024 17:40:55-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br MARCELO DUZZIONI
Data: 12/12/2024 19:19:53-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br CARLOS JACINTO DA SILVA
Data: 12/12/2024 20:51:48-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br GLAUBER JOSE FERREIRA TOMAZ DA SILVA
Data: 17/12/2024 14:09:38-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br JONATHAS MATIAS DE OLIVEIRA
Data: 17/12/2024 18:03:18-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br EDUARDO JORGE DA SILVA FONSECA
Data: 20/12/2024 10:27:15-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br RAISSA CAVALCANTE PINTO
Data: 20/12/2024 10:40:58-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br LAURA MAISA SOUZA DOS SANTOS
Data: 26/12/2024 15:30:18-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

*Dedico este trabalho à minha mãe Maura
José de Souza, ao meu padrasto 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 estar 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, 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 e aos amigos, agradeço o apoio e o carinho.

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 coorientador Prof. Dr. 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 estar disposto a ajudar, pela paciência e por me motivar cada dia mais com sua sabedoria e experiência. Pretendo continuar aprendendo ainda mais com seus ensinamentos.

A Prof^a. Dra Anielle e ao Prof. Dr. Noelio, por terem disponibilizado as nanopartículas utilizadas na síntese das resinas. 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, Julianderson e Vitor 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 Nanofotônica e Imagem por disponibilizar o acesso em seu laboratório para uso de equipamentos de medidas.

As colegas de grupo Elaine e a Laís, pela disponibilidade em realizar as medidas AFM e pela síntese das nanopartículas, a colaboração de vocês foi muito importante no desenvolvimento deste trabalho. A técnica de laboratório, Ana, por me auxiliar 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 Universidade Federal de Rondônia (UNIR), Campus de Ji-Paraná, 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 (IF) da UFAL, pelos ensinamentos importantes em minha formação acadêmica. Agradeço também a todos os técnicos e demais funcionários do IF. A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para minha formação e na realização deste projeto. Ao CNPq, CAPES e FAPEAL/FAPESP 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 tridimensional (3D) dentre os muitos processos existentes, por permitir a construção de microestruturas 3D com elevada resolução espacial na ordem submicrométrica, alta complexidade geométrica e uso mínimo de material fotossensível. Essa poderosa ferramenta tem atraído o interesse de diversas áreas da ciência, incluindo a engenharia de tecidos, com aplicação na fabricação de arcabouços tridimensionais para cultura celular. Estes microambientes são projetados para mimetizar condições *in vivo*, e reproduzir 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 torna-las biocompatíveis e com baixa citotoxicidade. O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito de arcabouços tipo microgrooves em diferentes geometrias sobre o módulo de elasticidade celular, propor um método eficiente de tratamento de superfícies poliméricas para promover uma melhor adesão celular e sintetizar nanocompósitos biocompatíveis, antibacterianos e flexíveis para aplicação na engenharia de tecidos. Neste trabalho, os resultados obtidos demonstraram que todas as resinas sintetizadas apresentaram biocompatibilidade aceitável. Em destaque, a amostra com nanocristais de dióxido de titânio (TiO_2) exibiu baixa citotoxicidade e alta taxa de proliferação celular, que se manteve superior à do controle por até 48 h. As propriedades biomecânicas das células osteoblastos em contato direto com os arcabouços circulares apresentaram o módulo de Young significativamente maior (22.66 ± 6.62 MPa) quando comparado às células semeadas sobre arcabouços retangulares e superfícies planas, que apresentaram valores de 13.79 ± 2.54 MPa e 18.27 ± 3.31 MPa, respectivamente. Os resultados evidenciados por observações ópticas e espectroscópicas demonstraram que é possível regular as propriedades físico-químicas, incluindo rugosidade moderada, aumento da hidrofiliabilidade e surgimento de grupos funcionais no substrato polimérico tratado com solução salina tamponada com fosfato (PBS), para melhorar a adesão de células epiteliais pulmonares. Além disso, foi demonstrado que o polímero funcionalizado com nanopartículas de própolis vermelha (NPs PV) apresentou efeito antibacteriano significativo contra *S. aureus*. Esse efeito foi atribuído à presença de compostos fenólicos nas amostras poliméricas, confirmado por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Por fim, os arcabouços com microgrooves paralelos e circulares, fabricados via P2F, demonstraram potencial para liberação controlada de NPs PV, indicando grande aplicabilidade em processos de cicatrização.

Palavras-chave: Resina biocompatível. Arcabouços celulares. Polimerização por absorção de dois fótons.

ABSTRACT

The two-photon polymerization (2PP) additive technique has emerged as an excellent method for three-dimensional (3D) microfabrication among the many existing processes, enabling the construction of 3D microstructures with high spatial resolution at the submicrometer scale, complex geometric designs, and minimal use of photosensitive materials. This powerful tool has drawn the interest of various scientific fields, including tissue engineering, with applications in the fabrication of three-dimensional scaffolds for cell culture. These microenvironments are designed to mimic in vivo conditions, replicating their key features to enable the study of cellular behavior and the treatment of diseases through drug testing. Photosensitive resins serve as the raw material for the construction of scaffolds, and although there is a wide range of these materials available for biological studies, there is a significant focus on ensuring their biocompatibility and low cytotoxicity. The objective of this study was to investigate the effect of microgroove-type scaffolds with different geometries on the cellular elastic modulus, propose an efficient surface treatment method for polymeric substrates to enhance cell adhesion, and synthesize biocompatible, antibacterial, and flexible nanocomposites for tissue engineering applications. The results demonstrated that all synthesized resins exhibited acceptable biocompatibility. Notably, the sample containing titanium dioxide (TiO₂) nanocrystals showed low cytotoxicity and a high cell proliferation rate, which remained superior to the control for up to 48 hours. The biomechanical properties of osteoblast cells in direct contact with circular scaffolds exhibited a significantly higher Young's modulus (22.66 ± 6.62 MPa) compared to cells seeded on rectangular scaffolds and flat surfaces, which displayed values of 13.79 ± 2.54 MPa and 18.27 ± 3.31 MPa, respectively. Optical and spectroscopic observations revealed that it is possible to regulate the physicochemical properties—including moderate roughness, increased hydrophilicity, and the formation of functional groups on polymeric substrates treated with phosphate-buffered saline (PBS)—to improve the adhesion of pulmonary epithelial cells. Additionally, the polymer functionalized with red propolis nanoparticles (RP NPs) exhibited a significant antibacterial effect against *S. aureus*. This effect was attributed to the presence of phenolic compounds in the polymeric samples, confirmed by Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy. Finally, the scaffolds with parallel and circular microgrooves fabricated via 2PP demonstrated potential for the controlled release of RP NPs, indicating significant applicability in wound healing processes.

Keywords: Biocompatible Photoresin. Cellular scaffolds. Polymerization via two-photon absorption.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
Referências	18
2 ABSORÇÃO DE DOIS FÓTONS (A2F) – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA, CONTEXTO HISTÓRICO E APLICAÇÕES	20
2.1 CONTEXTO HISTÓRICO	20
2.2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
2.2.1 Processo de absorção de dois fótons	23
2.3 APLICAÇÕES	28
2.3.1 Armazenamento óptico de dados	28
2.3.2 Terapia fotodinâmica	29
2.3.3 Microscopia multifotônica	30
2.3.4 Microfabricação por P2F	31
Referências	33
3 MICROFABRICAÇÃO VIA POLIMERIZAÇÃO POR ABSORÇÃO DE DOIS FÓTONS	36
3.1 CONTEXTO HISTÓRICO	36
3.2 POLIMERIZAÇÃO POR ABSORÇÃO DE DOIS FÓTONS (P2F)	39
3.2.1 Tipos de resinas	41
3.2.2 Grau de conversão	42
3.3 RESINAS POLIMÉRICAS	44
3.3.1 Monômero acrilato	45
3.3.2 Fotoiniciador	46
3.4 APARATO EXPERIMENTAL	48
3.4.1 Compressão temporal: Laser de pulso ultracurto	49
3.4.2 Compressão espacial: Limite de resolução do voxel	50
3.4.3 Feixe gaussiano	51
3.4.4 Objetivas de microscópio	54
3.4.5 Distribuição espacial da propagação do feixe gaussiano pela lente objetiva	58
3.4.6 Estágio de translação	61
3.4.7 Sistema de imageamento em tempo real	62
3.5 PROGRAMAÇÃO PARA CONFEÇÃO DAS MICROESTRUTURAS	62
3.6 METODOLOGIA DA MICROFABRICAÇÃO	64
Referências	67
4 RESULTADOS	70
4.1 RESINAS BIOCAMPATÍVEIS	70
4.1.1 Pontos Quânticos Semicondutores Ultra-pequenos de CdSe/CdS	71
4.1.2 Nanocristais de Dióxido de titânio (TiO ₂)	72
4.1.3 Nanopartículas de própolis vermelha	75
4.1.4 Síntese das resinas funcionalizadas	76
4.2 INFLUÊNCIA DOS PONTOS QUÂNTICOS SEMICONDUCTORES ULTRA-PEQUENOS E DO DIÓXIDO DE TITÂNIO EM RESINAS POLIMÉRICAS	81
4.2.1 Espectro de fluorescência	81
4.2.2 Espectro de absorção óptica	86
4.2.3 Espectroscopia Raman	87
4.2.4 Potência limiar de polimerização	90
4.2.5 Investigação da influência dos parâmetros de escrita	91
4.2.6 Ensaios Biológicos	94
4.2.6.1 Avaliação da viabilidade celular	94

4.3 RESPOSTAS BIOMECÂNICAS E MORFOLÓGICAS DE CÉLULAS OSTEÓBLASTOS CULTIVADAS EM ARCABOUÇOS MICROGROOVES FABRICADOS POR MICROFABRICAÇÃO A LASER	99
4.3.1 Efeito dos arcabouços nas respostas celulares	99
4.3.2 Design e fabricação de arcabouços celulares	101
4.3.3 Cultura Celular Tridimensional	106
4.3.4 Investigação do Módulo de Young das células Osteoblastos MG-63 via AFM	113
4.4 MODIFICAÇÕES DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE SUPERFÍCIE POLIMÉRICA PARA APRIMORAMENTO DA ADESÃO DE CÉLULAS EPITELIAIS	120
4.4.1 Influência da superfície polimérica nas respostas celulares	120
4.4.2 Efeito do tratamento com PBS em superfícies poliméricas na adesão celular	121
4.5 NANOCOMPÓSITOS À BASE DE PRÓPOLIS VERMELHA BRASILEIRA MICROESTRUTURADOS POR POLIMERIZAÇÃO POR ABSORÇÃO POR DOIS FÓTONS COMO ESTRATÉGIA PARA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS.....	135
4.5.1 Resinas antibacterianas adequadas ao tratamento de feridas	135
4.5.2 Caracterização de propriedades físico-químicas e espectroscópicas das amostras	136
4.5.3 Comportamento flexural dos polímeros e nanocompósitos.....	139
4.5.4 Liberação <i>in vitro</i> de nanopartículas de própolis vermelha a partir dos nanocompósitos.....	142
4.5.5 Atividade antibacteriana das nanopartículas, polímeros e nanocompósitos.....	144
4.5.6 Arcabouços fabricados via polimerização por absorção de dois fótons.....	149
Referências	152
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	157
APÊNDICE A: Lista de Artigos Publicados e Submetidos	158

LISTA DE FIGURAS

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	21
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	24
Figura 2.3: Ilustração do feixe de alta potência ao incidir no material de largura d	26
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	27
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	28
Figura 2.6: Diferença entre o método CLSM e TPLSM	31
Figura 3.1: Imagens MEV da microestrutura em formato espiral construída por microfabricação via P2F após processo de remoção de resíduos não solidificados.....	37
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.....	37
Figura 3.3: Interação da radiação com a matéria, onde o feixe laser é focalizado na resina pela lente Objetiva	38
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 $\text{C}=\text{C}$ e (d) formação dos centros ativos	39
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 obtém estruturas rígidas com boa qualidade e (c) muito abaixo não ocorre polimerização.....	41
Figura 3.6: Esquema ilustra a diferença básica entre as resinas (a) positiva e (b) negativa no processo de exposição à luz UV.....	42
Figura 3.7: Típico espectro Raman da resina polimérica não polimerizada (curva em vermelho) e polimerizada (curva em preto) por UV	44
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	45
Figura 3.9: (a) Estrutura molecular e (b) espectro de absorção do I369 puro dissolvido em álcool isopropílico	47
Figura 3.10: Estrutura molecular do (a) I2959 e (c) I819. Espectro de absorção do FI (b) I2959 e (d) I819 obtido pelo espectrofotômetro UV-VIS-NIR (espectrômetro UV-3600, Shimadzu)	47
Figura 3.11: Configuração experimental para fabricação de microestruturas tridimensionais via P2F....	49
Figura 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.....	50
Figura 3.13: Representação da intersecção do voxel conforme a metodologia de escrita, ΔX e ΔZ são as distâncias de dois voxel nas direções x e z , respectivamente	51
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: $W_0 = 2 \text{ mm}$, $\lambda = 632,8 \text{ nm}$, $z = 0$ e $z_R = 19,85 \text{ m}$. (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 $z = 3$	52
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 θ	53
Figura 3.16: Intensidade normalizada do feixe de luz $I_{\text{gaussiano}}(r, z)/I_0$ como função da distância radial r em diferentes distâncias axiais, dada por: (a) $z = 0$; (b) $z = z_R$; (c) $z = 2z_R$	53
Figura 3.17: Lentes objetivas com diferentes aberturas numéricas para $n = 1$: (a) $\theta = 15^\circ$ e $\text{NA} = 0,25$; (b) $\theta = 24,8^\circ$ e $\text{NA} = 0,42$; (c) $\theta = 72,1^\circ$ e $\text{NA} = 0,95$	55

Figura 3.18: Geometria de um feixe luz incidindo sobre uma lente	56
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	57
Figura 3.20: Feixe gaussiano transmitido através de uma lente objetiva de microscópio com abertura angular θ	59
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 $z' \approx f$	59
Figura 3.22: Estágio de translação do sistema de microfabricação	61
Figura 3.23: Interface gráfica do software nFab usado para microfabricação por escrita direta a laser....	64
Figura 3.24: Etapas principais da microfabricação por escrita direta a laser	65
Figura 3.25: Representação dos voxel de acordo com a distância do eixo z	66
Figura 4.1: (a) Ilustração representativa das NPs de CdSe/CdS	72
Figura 4.2: (a) Padrões de difração de raios X e (b) Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM) de NCs de TiO ₂	74
Figura 4.3: (a-b) Origem botânica da própolis vermelha produzida no Estado de Alagoas. Própolis vermelha (c) na colmeia (d) nos coletores e (e) após ser coletada.....	75
Figura 4.4: Componentes necessários para síntese das resinas: monômero PETA, FI I369 e NPs de CdSe/CdS	77
Figura 4.5: Ilustração da síntese das resinas 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	78
Figura 4.6: Ilustração do processo de síntese das resinas incorporadas com TiO ₂ : (1) solvatação do I369, NCs e etanol, (2) adicionado PETA e (3) agitação contínua	79
Figura 4.7: Posicionamento da resina no sistema experimental	80
Figura 4.8: Microtubo com células endotélis (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 μ m	82
Figura 4.9: Espectro de fluorescência das resinas fotossensíveis constituída de FI I369 dissolvido em PETA (P.2.0 e P.0.5) variado λ_{Exc} de 350 a 400 nm durante (a-b) 15 min e (c-d) 8-10 h no UV.....	83
Figura 4.10: Espectro de fluorescência das resinas fotossensíveis constituída de I369 dissolvido em PETA (P.2.0 e P.0.5) variado λ_{Exc} de 410 a 490 nm durante (a-b) 15 min e (c-d) 8-10 h no UV.....	84
Figura 4.11: Espectro de fluorescência das resinas fotossensíveis constituída de fotoiniciador (I369) dissolvido em PETA (P.2.0 e P.0.5) variado λ_{Exc} de 550 a 590 nm durante (a-b) 15 minutos e (c-d) 8-10 horas no UV	85
Figura 4.12: Espectro de fluorescência das resinas constituídas de I369 dissolvido em PETA (P.2.0 e P.0.5) com adição dos PQs (A1) e do TiO ₂ (P369/TiO ₂ e P369/3TiO ₂) variado λ_{Exc} em (a) 350, (b) 400 e (c) 450 nm.....	86
Figura 4.13: Espectro de absorção pelo UV-Vis do FI (0.5% de I369) dissolvido em PETA na presença de (a) PQs CdSe/CdS e (b) TiO ₂	87
Figura 4.14: Espectros Raman de resinas com diferentes concentrações de NPs CdSe/CdS e TiO ₂ em volumes (a) não polimerizados e (b) polimerizados por UV. São destacados os picos dos modos vibracionais de interesse	88
Figura 4.15: Grau de conversão dos filmes de resinas em função da concentração de NPs CdSe/CdS e TiO ₂ (% massa de NPs em relação à PETA)	89
Figura 4.16: A potência mínima em função do tempo de exposição para resinas	90
Figura 4.17: (a) Largura de linha fabricadas na resina P.0.5 e (b) para diferentes P = 3–30 mW e V = 100–200 μ m/s	92
Figura 4.18: (a) Gráfico da altura de linhas fabricadas em diferentes velocidades. A Potência é fixada em 10 mW. (b) Caracterização das alturas das linhas por MEV	92
Figura 4.19: Largura de linha fabricada com a resina A1 para potência variando entre 20 a 160 mW e velocidade de escrita fixada em 100 μ m/s	93
Figura 4.20: Efeito das amostras de resina 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)	95

Figura 4.21: Ensaio biológico das células Osteoblastos (indicada pela seta em amarelo) semeadas após 48 h em amostras contendo 2% de I369 (P.2 e P.2 (H ₂ O)), 0,5% de I369 (P.0.5, A1 e P369/TiO ₂) e poliestireno (CTRL). Barra de escala = 10 μ m	97
Figura 4.22: Esquema representa direção e sentido da trajetória do laser focalizado na resina para confeccionar uma camada formada por (a) linhas paralelas e (b) espiral	102
Figura 4.23: (A) Ilustração dos microgrooves 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	102
Figura 4.24: (A) e (C) Criação do modelo sólido por meio de uma ferramenta de design 3D. (B) e (D) Visualização do arquivo de vetorização para execução da escrita	103
Figura 4.25: Imagens de microscópio óptico do filme P369/TiO ₂ com microestruturas (barra de escala = 50 μ m)	105
Figura 4.26: Imagens MEV do filme polimérico P369/TiO ₂ com microestruturas microgrooves	106
Figura 4.27: 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 μ m); (b) MGR e (d) MGC com (b: 10 μ m). Barra de escala = 50 μ m	107
Figura 4.28: Imagens de microscópio óptico das células MG-63 após 72 h no meio de cultura. (a) Filme, (b) MGR e (c) MGC com (b: 20 μ m) no polímero P59; (d) Filme, (e) MGR e (f) MGC com (b: 10 μ m) no polímero P59/TiO ₂ . Barra de escala = 50 μ m	108
Figura 4.29: Imagens ópticas de células MG-63 (seta em amarelo) fixadas após 72 h de cultura em (a) arcabouço MGR, (b) arcabouço MGC (b: 20 μ m), (c) Filme P369/TiO ₂ e (d) Filme PI59. Barra de escala = 40 μ m	109
Figura 4.30: Resposta morfológica das células osteoblásticas MG-63 ao polímero P369/TiO ₂ . (a) Comprimento e largura celular após interação no plano, microestruturas paralelas e circulares. (b) Razão de alongamento e área celular média relativa. Imagens de microscopia óptica das amostras (c) Filme (d) MGR e (e) MGC (b: 20 μ m)	110
Figura 4.31: Resposta morfológica das células osteoblásticas MG-63 ao polímero P59. (a) Comprimento e largura celular após interação no plano, microestruturas paralelas e circulares. (b) Razão de alongamento e área celular média relativa. Imagens de microscopia óptica das amostras (c) Filme (d) MGR e (e) MGC (b: 20 μ m)	111
Figura 4.32: Resposta morfológica das células osteoblásticas MG-63 ao polímero P59/TiO ₂ . (a) Comprimento e largura celular após interação no plano, microestruturas paralelas e circulares. (b) Razão de alongamento e área celular média relativa. Imagens de microscopia óptica das amostras (c) Filme (d) MGR e (e) MGC (b: 20 μ m)	112
Figura 4.33: Módulo de Young de osteoblastos MG-63 cultivados após 3 dias no grupo (a) Filme, MGR e MGC do polímero P369/TiO ₂ . O módulo de Young médio é dado pela linha horizontal dentro de cada caixa	116
Figura 4.34: Módulo de Young de osteoblastos MG-63 cultivados após 3 dias no grupo Filme, MGR e MGC para os polímeros (a) P59 e (b) P59/TiO ₂ . O módulo de Young médio é dado pela linha horizontal dentro de cada caixa	117
Figura 4.35: Imagens AFM da topografia de células (a) na superfície plana e (b) no microgroove circular do polímero P59/TiO ₂	119
Figura 4.36: Espectro de absorção UV-Vis das amostras poliméricas P59 e S59	122
Figura 4.37: Imagens de microscópio óptico de células A549 cultivadas em meio DMEM por 24 horas em placas de cultura comerciais para células aderentes (ampliação de 100x). As células identificadas com morfologia esferoidal e espalhada foram ampliadas	123
Figura 4.38: Avaliação do comportamento de adesão das células A549 após 24h	124
Figura 4.39: Medidas de molhabilidade de superfícies poliméricas tratadas ou não com PBS	125
Figura 4.40: Energia livre de superfície em função da porcentagem de células aderidas nas amostras CTRL, S59/PBS e P59/PBS	126
Figura 4.41: (a) Os valores da rugosidade média (R_a) das amostras. Imagens topográficas detectadas através do AFM nos substratos (b) S59, S59/PBS, (c) P59 e P59/PBS	128
Figura 4.42: Efeito da razão de rugosidade de filmes poliméricos tratados com PBS no comportamento da célula A549	129
Figura 4.43: FTIR das amostras P59, S59, P59/PBS, S59/PBS e PBS	130

Figura 4.44: (a) O valor do fator de forma e da proporção das células A549 após a modificação da superfície com PBS e CTRL. (b) As imagens experimentais de células A549 cultivadas em diferentes superfícies por 24 h	132
Figura 4.45: (a) Arcabouço triangular, (b) micropoço, (c) arcabouço circular, (d) malha quadrada 10x10 µm e (e) micropilares	133
Figura 4.46: (A) Extrato de própolis vermelha (EPV); (B) sílica mesoporosa; (C) NPs de própolis vermelha (D) P59.2 puro; (E) P59.2 incorporado com 1.5% de NPs PV	136
Figura 4.47: (A) Imagem de TEM e (B) histograma de distribuição de diâmetro das NPs de Própolis Vermelha	137
Figura 4.48: (A) Espectro de absorção do EPV, Sílica e NPs PV. (B) Espectro de absorção dos polímeros S59.2, P59.2, S59.2+P e P59.2+P	138
Figura 4.49: Espectros de fluorescência das nanopartículas de SM, EPV e NPs PV; dos polímeros S59.2 e P59.2 e dos nanocompósitos S59.2+P e P59.2+P em (a, c) $\lambda_{exc} = 300$ nm e (b, d) 500 nm.....	138
Figura 4.50: Espectros de infravermelho por transformada de Fourier de polímeros, nanocompósitos e NPs PV: (A) P59.2, P59.2+P e (B) S59.2 e S59.2+P.....	139
Figura 4.51: Comportamento de flexão de polímeros e nanocompósitos.....	140
Figura 4.52: Dinâmica de liberação <i>in vitro</i> das NPs PV em nanocompósitos de P59.2+P e S59.2+P	142
Figura 4.53: Ilustração do procedimento para determinar a atividade antibacteriana pelo teste de contato direto.....	143
Figura 4.54: Atividade antibacteriana contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 de SM, EPV e NPs PV, pelo método de microdiluição. Significativamente diferente quando valor de $p < 0,001$	145
Figura 4.55: Atividade antibacteriana contra <i>Staphylococcus aureus</i> dos polímeros P59.2 e S59.2 e nanocompósitos P59.2+P, E59 e S59.2+P pelo método de contato direto	146
Figura 4.56: Imagens de MEV e microscópio óptico das superfícies planas e superfícies de microgrooves paralelas (MGP) e circulares (MGC) feitas dos nanocompósitos pela técnica P2F.....	147

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A1F – Absorção de um fóton.
A2F – Absorção de dois fótons.
ALP - Fosfatase Alcalina
AFM - Microscopia de Força Atômica
CLSM – Confocal Laser-Scanning Microscopy
Col-1 - Colágeno tipo 1
CS-USQDs – Core-Shell Ultrasmall Quantum Dots
CTRL – Controle
ELA – Esclerose Lateral Amiotrófica
ELS - Energia Livre Superficial
EPV - Extrato de Própolis Vermelha
FI – Fotoiniciador
FL – Fotoluminescência
FTIR - Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
fs – Femtossegundos
GM – Goeppert-Mayer.
GC – Grau ou taxa de Conversão
HRTEM – Microscopia Eletrônica de Transmissão de Alta Resolução
IR – Infravermelho
I369 – Irgacure 369
I2959 – Irgacure 2959
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
MGC - Micro-Grooves Circular
MGR – Micro-Grooves Retangular
NCs – Nanocristais
NPs – Nanopartículas
NPs PV - Nanopartículas de Própolis Vermelha
OC – Osteocalcina
P59 – Monômero PETA + 1% I2959
P59.2 – Monômero PETA + 2% I2959
P2F – Polimerização por absorção de 2 fótons
PETA - Pentaerythritol Triacrylate
P – Profundidade
P2F – Polimerização por Absorção de Dois Fótons
PEG-DA – Poly (ethylene glycol) Diacrylate
PMMA – Poly(methylmethacrylate)
PQs – Pontos Quânticos
QDs – Quantum Dots
RPM – Rotações por minuto
 R_a - Rugosidade média
r - Razão de rugosidade
SM - Sílica Mesoporosa
S59 – Monômero SR499 + (1% ou 2%) I2959
SR499 - Trimethylolpropane Ethoxylate Triacrylate
S. Aureus - Staphylococcus Aureus
TPLSM – Two-Photon Laser-Scanning Microscopy
UV - Ultravioleta
w.d – Distância de trabalho

1 INTRODUÇÃO

A criação do laser possibilitou o desenvolvimento de inúmeras linhas de pesquisas que envolvem os princípios da óptica não linear, uma vez que a maioria dos fenômenos físicos não lineares somente pôde ser reproduzida experimentalmente com o uso de fontes de alta intensidade. Neste regime, observa-se a alteração das propriedades ópticas dos materiais, que passam a depender da intensidade da fonte luminosa.

Anos após a invenção do primeiro laser, os primeiros fenômenos ópticos não lineares observados foram a geração de segundo harmônico, relatada por Franken et al. [1], e a comprovação experimental do efeito de absorção de dois fótons (A2F) por Kaiser e Garrett [2], teoricamente prevista por Maria Göppert-Mayer [3].

Com a modernização dos lasers, diversos outros fenômenos foram descobertos e estudados. Consequentemente, esse campo de pesquisa avançou significativamente, com aplicações em áreas como fotônica, microscopia de fluorescência, armazenamento óptico, terapia fotodinâmica e microfabricação [4-8], todas associadas ao processo de absorção multifotônica, que constitui a base teórica de várias aplicações.

A microfabricação por escrita direta a laser, ao explorar os fundamentos dos processos ópticos não lineares, em particular o processo de A2F, permite que a polimerização da resina fotossensível ocorra exclusivamente no volume focal do laser. Como resultado, obtém-se um elemento de volume polimerizado de tamanho micrométrico ou até mesmo nanométrico, conhecido como voxel [9].

Essa configuração é possível porque a taxa de ocorrência da A2F depende diretamente com o quadrado da intensidade luminosa. Assim, apenas no ponto focal a intensidade é suficientemente elevada para gerar tal fenômeno. Portanto, a técnica de Polimerização por Absorção de dois Fótons (P2F) pode ser utilizada com sucesso na fabricação de diversas estruturas em escala micrométrica e submicrométrica.

Na engenharia de tecidos, a cultura de células ósseas em microestruturas tridimensionais fabricadas por microfabricação via P2F tornou-se uma estratégia eficiente para estabelecer métodos e rotas adequadas à regeneração de tecidos danificados. Isso ocorre porque o arcabouço tem como papel fundamental proporcionar às células um suporte tridimensional sintético temporário, que permita sua proliferação e diferenciação até o crescimento do novo tecido [10].

Portanto, este método de fabricação versátil permite projetar arcabouços celulares com geometrias específicas, diferentes tamanhos e formatos de poros, que imitam o ambiente *in vivo*

das células. Assim, esses arcabouços são capazes de contribuir para uma resposta celular aprimorada, relacionada à adesão, morfologia e proliferação celular.

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

Estudos demonstraram que, em altas concentrações do FI Irgacure 369, a resina fotossensível se torna citotóxica, o que resulta na diminuição da viabilidade celular [12]. Embora o FI seja essencial e indispensável no processo de P2F, a literatura relata o uso de diversos outros componentes acrescentados à síntese das resinas, tais como fotoiniciadores solúveis em água, compostos biológicos e nanopartículas (NPs) [13-16]. Esses aditivos têm como finalidade minimizar os efeitos nocivos do FI em altas concentrações, além de proporcionar propriedades ópticas e conferir características biológicas específicas.

Neste contexto, os Pontos Quânticos (PQs) Semicondutores Ultra-pequenos de CdSe/CdS, ou, em inglês, Ultrasmall Semiconductor Quantum Dots (USQDs), apresentam boa biocompatibilidade, o que resulta em um desempenho mecânico aprimorado [17] e mantém uma citocompatibilidade controlada *in vitro* [18]. Os nanocristais de dióxido de titânio (NCs TiO₂), além de exercerem excelente biocompatibilidade, também conferem melhor proliferação celular, adesão e propriedades antibacterianas, com alta aplicabilidade em células ósseas, induzindo a osseointegração de implantes [19, 20]. Por sua vez, as NPs de própolis vermelha (PV) apresentam atividades biológicas interessantes, como ação antimicrobiana, antiviral, antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena e leishmanicida, com diversas aplicações na farmácia, na medicina e em outras áreas [21].

Nessa circunstância, nosso estudo inicial teve como objetivo melhorar a biocompatibilidade do material e reduzir a toxicidade. Foi realizada a preparação de uma resina à base do monômero Pentaerythritol Triacrylate (PETA), com apenas 0,5% de FI e incorporação das NPs de CdSe/CdS e dos NCs de TiO₂.

Neste primeiro estudo, foi proposto sintetizar resinas com incorporação de NPs e NCs, investigar os parâmetros adequados de escrita direta a laser nas resinas, caracterizar as resinas por meio das técnicas de espectroscopia de absorção óptica, espectroscopia de fluorescência e espectroscopia Raman, além de avaliar a citotoxicidade das resinas em contato direto com células de osteoblastos humanos da linhagem MG-63.

Na sequência, foram construídos arcabouços do tipo groove, em duas diferentes geometrias (retangular e circular), que mimetizam ambientes naturais do tecido ósseo. Desta forma, busca-se entender como as características físico-químicas do microambiente alteram as propriedades mecânicas das células MG-63 cultivadas sobre estes arcabouços, em comparação às células cultivadas em um filme plano feito da resina, que foram analisadas por meio de medidas do Módulo de Young utilizando o Microscópio de Força Atômica (AFM).

Embora a literatura já apresenta conhecimento sobre a morfologia, diferenciação e taxa de proliferação das células osteoblastos MG-63 semeadas no interior de arcabouço tipo groove [22], até o momento, não havia estudos sobre as propriedades biomecânicas das células ósseas em microgrooves. Essa lacuna foi preenchida pelo nosso trabalho, publicado em *Journal of biomedical materials research part A* [23]. Nos estudos anteriores, ainda não estava claro como as interações células-groove influenciam as propriedades biomecânicas das células ósseas, o que exigia uma compreensão mais aprofundada.

É notável que a investigação das interações das células ósseas em arcabouços microgroove é essencial na engenharia de tecidos, uma vez que este estudo visa possíveis aplicações na adequação da geometria e topografia de implantes ortopédicos e dentários [24], bem como na cultura de células ósseas no interior dos arcabouços para o desenvolvimento de enxertos ósseos implantados *in vivo* [25], sendo ainda um grande desafio na engenharia de tecidos [26].

No segundo estudo, foi proposto um método rápido, de baixo custo e ecológico para o tratamento de superfícies poliméricas, com o objetivo de modificar as propriedades físico-químicas a fim de ajustar o comportamento celular na interface célula-substrato. Dois diferentes polímeros foram sintetizados a partir dos monômeros PETA e Trimethylolpropane Ethoxylate Triacrylate (SR499), com o FI Irgacure 2959 (I2959), e posteriormente tratados com solução salina tamponada com fosfato (PBS). A rugosidade, molhabilidade, e o surgimento de grupos químicos nas superfícies após o tratamento foram investigados. As células epiteliais pulmonares da linhagem A549 foram cultivadas por 24 horas nas superfícies poliméricas antes e depois do tratamento para observação da adesão celular.

No terceiro estudo, foi proposto o desenvolvimento de resinas a partir dos monômeros PETA e SR499, com o FI I2959, incorporadas com NPs de própolis vermelha do Estado de Alagoas, visando obter um material microestruturado a laser com propriedades antibacterianas, que servirá como curativo para feridas cutâneas, auxiliando na cicatrização do tecido lesionado e, simultaneamente, protegendo-o contra a proliferação de bactérias. Para isso, a ação antibacteriana das superfícies poliméricas foi avaliada contra *Staphylococcus aureus*, utilizando

o teste de contato direto. A espectrometria UV-Vis foi empregada para investigar a dinâmica de liberação *in vitro* do medicamento durante quatro dias. Além disso, as amostras foram caracterizadas por meio das técnicas de espectroscopia de absorção óptica, espectroscopia de fluorescência e FTIR.

É importante destacar que a técnica de microfabricação por escrita a laser via P2F é uma linha de pesquisa recente na Universidade Federal de Alagoas (UFAL), sendo o segundo laboratório na América Latina a desenvolver atividades neste campo. Logo, por se tratar da primeira tese 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 à técnica, visto que os estudos e resultados alcançados servirão de referência para os próximos estudantes, buscando garantir a consolidação desta linha de pesquisa no Programa de Pós-graduação em Física (PPGF).

Este trabalho está organizado da seguinte maneira: no capítulo 2, é apresentada a trajetória do surgimento da óptica não linear, além da descrição de alguns conceitos fundamentais, com ênfase nos processos de A2F e suas diversas aplicações tecnológicas. No capítulo 3, descreve-se 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, altera a geometria do ponto focal, visto que a ocorrência da absorção não linear possui dependência espacial. Em seguida, foram abordadas as noções básicas da metodologia de microfabricação, explicado o processo de fotopolimerização por radicais livres e definido o parâmetro grau de conversão.

No capítulo 4, descreve-se a etapa de síntese das resinas fotossensíveis incorporadas com NPs e NCs, utilizadas para a construção dos arcabouços microgrooves por meio da técnica de microfabricação por escrita direta a laser via P2F. Ainda neste capítulo, as resinas foram caracterizadas por vários métodos de espectroscopia, AFM, FTIR, Tensiômetro Óptico, TEM, MEV, entre outros. Além disso, foram realizados ensaios biológicos pelo método de exclusão do azul de tripan e ensaios de atividade antibacteriana pelo teste de contato direto. Por fim, no capítulo 5, serão apresentadas as considerações finais deste projeto de pesquisa e as perspectivas para 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 (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 Submicron (TiO_2) 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] OLIVEIRA, Lais Farias Azevedo de Magalhães. **Nanopartículas de sílica mesoporosa carregadas com extrato de própolis vermelha: síntese, caracterização e avaliação in vitro da atividade antioxidante, antimicrobiana e antiviral.** 2022. 134. Tese (Doutorado em Ciência dos Materiais) - Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2021.
- [22] SUN, L. et al. Controlling Growth and Osteogenic Differentiation of Osteoblasts on Microgrooved Polystyrene Surfaces. **PLOS ONE.** v. 11, n. 8, 2016.
- [23] SANTOS, LAURA M. S. et al. Mechanical and morphological responses of osteoblast-like cells to two-photon polymerized microgrooved surfaces. **J. Biomed. Mater. Res. A,** v. 110, p. 1-11, 2022.

- [24] GUI, N., et al. Osteoblast Responses to Titanium-Coated Subcellular Scaled Microgrooves. **ACS Applied Biomaterials**. v. 2, n. 6, p. 2405-2413, 2019.
- [25] 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.
- [26] RASOULIAN BOROUJENI, M. et al. Development of 3D printed PLGA/TiO₂ 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, serão discutidas as bases teóricas relevantes para a compreensão do fenômeno da 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 apresentadas algumas aplicações que utilizam esses processos ópticos não lineares como base teórica, abrangendo áreas como biologia, óptica, fotônica e outras inúmeras áreas interdisciplinares.

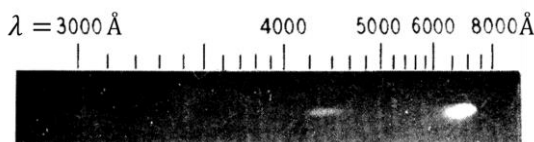
2.1 CONTEXTO HISTÓRICO

No contexto histórico, a teoria do fenômeno da A2F tornou-se 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 ela propôs que um átomo ou uma molécula, ao interagir com uma fonte de luz de alta intensidade, poderia sofrer uma transição eletrônica de um nível de baixa energia para um nível de alta energia através da absorção simultânea de dois fótons. Assim, de acordo com os princípios da teoria quântica, Mayer obteve a probabilidade de ocorrência da transição eletrônica por A2F.

No entanto, somente 30 anos depois, como desenvolvimento do primeiro laser óptico em 1960 por Theodore Maiman [2], foi possível a verificação experimental, visto que, para realizar o experimento, era necessária uma fonte intensa de radiação eletromagnética monocromática, devido ao fato de que a probabilidade de ocorrência da transição eletrônica era numericamente pequena [3].

Diante disso, em 1961, Kaiser e Garrett comprovaram experimentalmente este 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 ($\text{CaF}_2:\text{Eu}^{+2}$) de 1 mm de espessura. Ao iluminar a amostra, eles observaram o sinal de fluorescência por A2F, caracterizado em torno de 425 nm [4], como registrado na figura 2.1. Esse resultado indica que o campo incidente promove a transição de um elétron, inicialmente no estado fundamental (nível real), para o estado intermediário (nível virtual) por meio da absorção de um fóton e, quase simultaneamente, ao absorver um segundo fóton, o elétron atinge um estado de energia superior (nível real), o que resulta na 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, incidida no material na região de $\lambda = 694,3 \text{ nm}$, e o sinal de fluorescência do cristal por A2F, na região com comprimento de onda em torno de 425 nm, correspondente à emissão de luz azul. Dessa maneira, os resultados forneceram uma confirmação prática do conceito de absorção simultânea de dois fótons, que, até então, era apenas teórico.

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

Atualmente, esses resultados sobre a A2F são utilizados como base teórica para investigações científicas em inúmeras aplicações, tais como: 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], entre 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 são fortemente ligadas aos átomos. Os materiais são considerados isotrópicos quando suas propriedades, como a susceptibilidade, não se alteram com a mudança de direções, permanecendo constantes [13].

Primeiramente, considera-se que esse material apresenta uma resposta linear à interação com o campo elétrico aplicado, desde que as intensidades não sejam muito altas. Em resposta ao campo elétrico, causa-se uma distorção na configuração das cargas dos átomos no dielétrico, e surge um momento de dipolo por unidade de volume, ou também chamado de polarização induzida $\tilde{P}(t)$, que é dependente do tempo e paralela ao campo elétrico $\tilde{E}(t)$, ou seja, depende linearmente da 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, a qual está relacionada à estrutura microscópica da substância trabalhada, e ε_0 representa a permissividade elétrica do vácuo. Para simplificar a notação, tanto a polarização quanto o campo aplicado, dados por $\tilde{P}(t)$ e $\tilde{E}(t)$, são tratados como grandezas escalares, descartando a natureza tensorial de χ na equação (1) e nas demais. Usa-se \tilde{A} para representar uma quantidade A qualquer que varia rapidamente no tempo. Na equação (1), considera-se que $\tilde{P}(t)$ depende somente do valor instantâneo da força do campo elétrico.

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

Em princípio, é possível generalizar a equação (1) para descrever a resposta não linear em materiais na presença de campos eletromagnéticos extremamente altos, com amplitudes que são numericamente próximas 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 os **parâmetros são**: $-e$ é a carga elétrica do elétron e a_0 é o raio de Bohr do átomo de hidrogênio. Assim, 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 denominadas susceptibilidades ópticas não lineares de segunda e terceira ordem, respectivamente. Observe-se que, nesta situação, a polarização correspondente é expressa por uma série de potências do campo elétrico, enquanto na equação (1) havia apenas o termo inicial. Nas equações (1) e (2), assume-se que a resposta do meio será instantânea. Este é o tratamento mais simples e sugere que, ao aplicar o campo no material, a polarização surge instantaneamente.

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

Na prática, verifica-se que a susceptibilidade de segunda ordem somente ocorre em materiais caracterizados por serem não centrossimétricos, ou seja, aqueles meios que não possuem simetria de inversão. Exemplo disso são os cristais de niobato de lítio (LiNbO_3), sulfeto de cádmio (CdS), nitrato de lítio (LiIO_3), quartz, entre outros. Esses meios são responsáveis por desencadear o processo de retificação óptica [14], [17], e geração de segundo harmônico [18]. Como resultado desse efeito, o segundo termo da equação (2) torna-se proporcional ao quadrado da intensidade do campo aplicado [15].

Observe-se que, do ponto de vista histórico, o desenvolvimento do primeiro laser foi um marco para o surgimento da óptica não linear. Isso ocorreu porque, um ano após esse acontecimento, além da comprovação da A2F por Kaiser e Garrett, foi descoberto, em 1961, por Franken e colaboradores [19], outro fenômeno não linear conhecido como geração de segundo harmônico. Nesse experimento, foi utilizado um cristal de quartzo, no qual 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 quartzo.

Por outro lado, a susceptibilidade de terceira ordem independe das características de simetria do material, pode ocorrer tanto em meios não centrossimétricos (assimétricos) quanto em meios com um centro de simetria, chamados centrossimétricos ou, ainda, 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. Exemplo de materiais centrossimétricos incluem sólidos e líquidos.

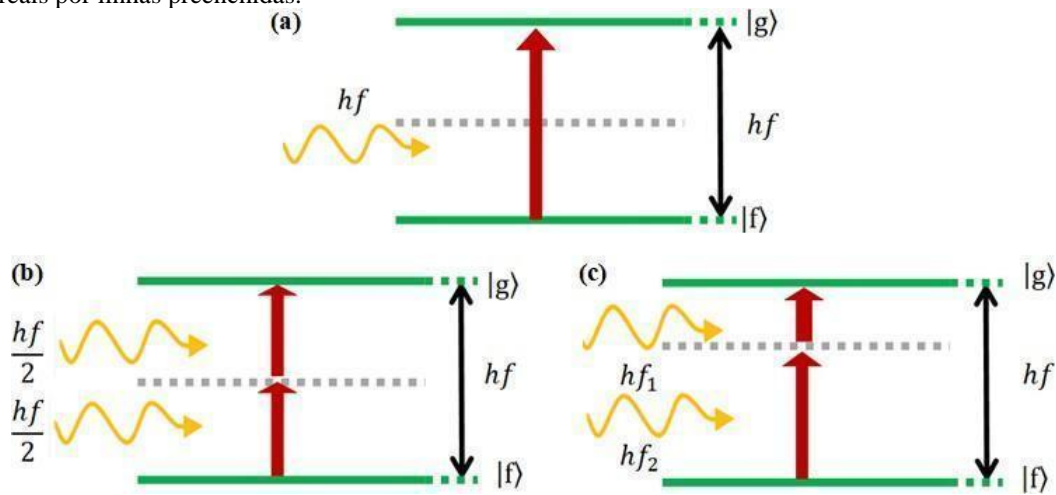
2.2.1 Processo de absorção de dois fótons

O processo de absorção multifotônica, classificado como um processo não paramétrico, inicia-se quando uma fonte de luz de alta intensidade incide sobre a 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 pode ocorrer de duas formas, 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 como degenerado [24]. Já na segunda situação, figura 2.2(c), as frequências dos fótons são diferentes, dadas por f_1 e f_2 . Essa configuração é chamada de não degenerada [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, mostrada pelo diagrama de energia na figura 2.2(a), deve ser igual à soma das energias dos dois fótons absorvidos durante a transição eletrônica, sendo que, no 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 ocorrer devido ao surgimento de um nível intermediário virtual, que se difere de um estado estacionário real do sistema, pois ele existe 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 o qual o estado intermediário virtual permanece, conhecido como tempo de vida (Δt), que é criado pela absorção do primeiro fóton nos 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 à seguinte relação:

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

Ou, ainda, isolando Δt , tem-se:

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

em que ΔE 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-se 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 necessário para ocorrer a transição dos fótons, como exemplo, suponha que $\Delta E = 1,55$ eV, que equivale a um fóton com $\lambda = 800$ nm. Isso resulta em um tempo 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, nessas 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 β é um coeficiente que descreve o processo de A2F e I é a intensidade do feixe de luz incidente. O coeficiente de absorção linear α_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; assim, terá valor nulo. O coeficiente de A2F está diretamente relacionado à parte imaginária da susceptibilidade de terceira ordem, dada por [30, 31]:

$$I_m \chi^{(3)} = \frac{2n_0^2 \varepsilon_0 c^2}{3\omega} \beta. \quad (6)$$

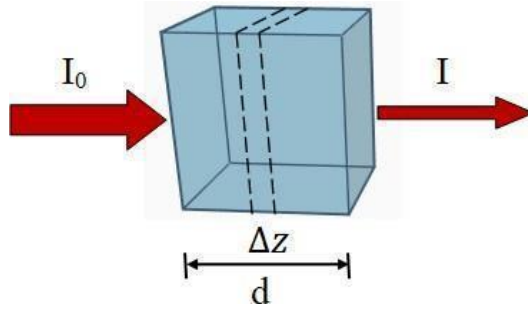
A resposta do material ao campo aplicado pode ainda ser expressa em termos de outra quantidade física, isto é, pela seção de choque de A2F, que está relacionada ao coeficiente de A2F pela seguinte equação: $\delta = \frac{\hbar\omega}{N_0} \beta$, onde N_0 é número de moléculas por cm^3 [28]. A grandeza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

Com base na lei de Beer-Lambert, torna-se 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 Δz , diminui de maneira exponencial, uma vez que parte da luz será absorvida, como ilustrado na figura 2.3. Dessa forma, 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 ao longo 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 $z_0 = 0$, obtém-se a lei de Beer-Lambert [33]:

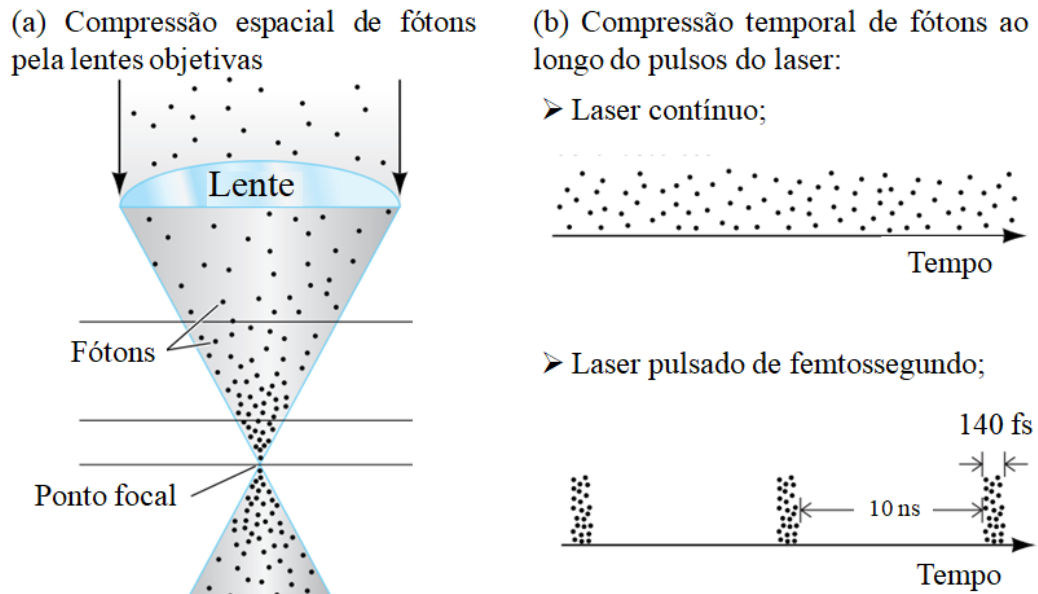
$$I(z) = I_0 e^{-\alpha z}, \quad (8)$$

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) na (7):

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

Este resultado estabelece que a probabilidade de o meio absorver simultaneamente dois fótons será proporcional ao quadrado da intensidade da luz usada para excitação. Esta relação não linear é expressa na equação (9). Espacialmente, a densidade de fótons ao longo do eixo óptico de lasers pulsados de femtossegundos 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.

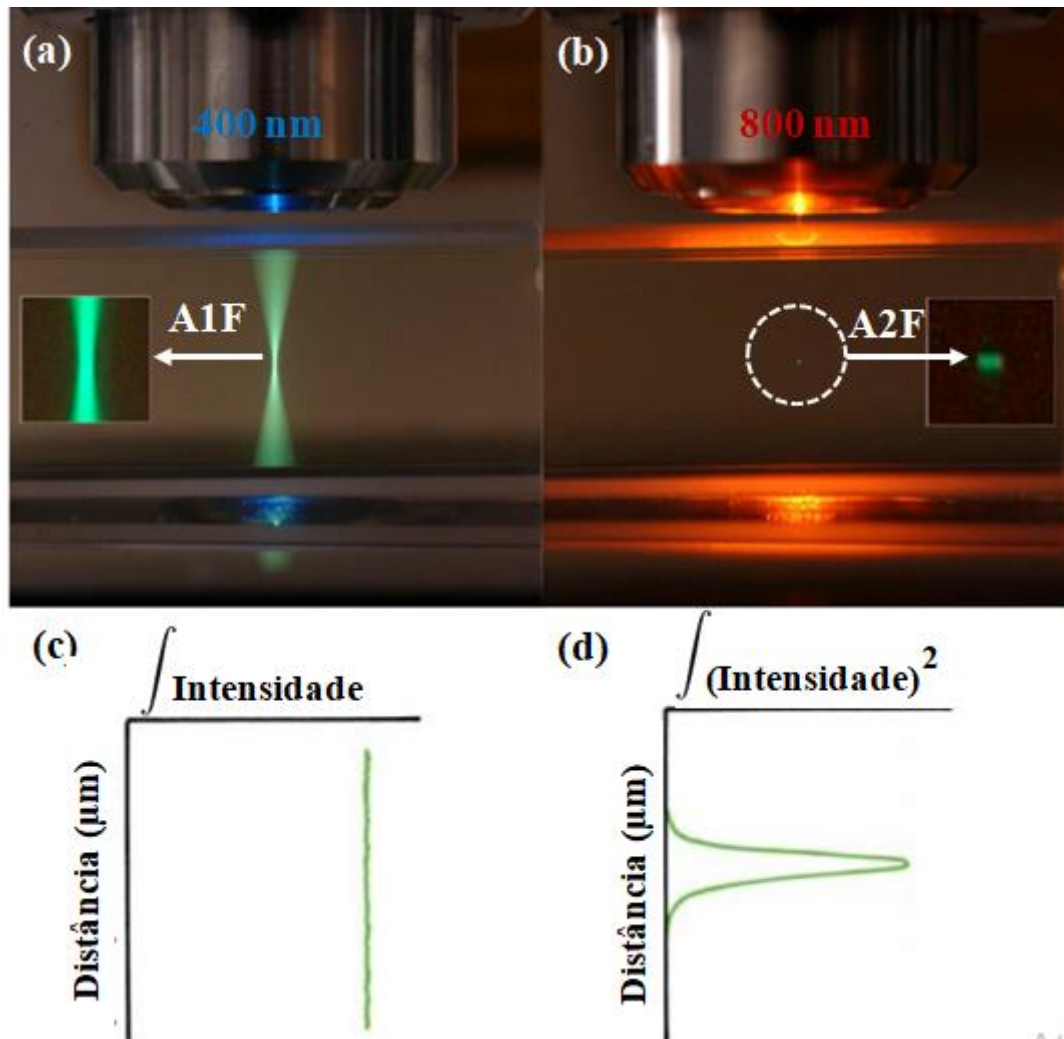


Esta configuração espacial dos fótons está diretamente associada ao perfil transversal da intensidade do feixe gaussiano, que é suficientemente alto na região central. Consequentemente, no plano focal, possui-se a maior probabilidade de ocorrência da A2F. Já em regiões mais distantes, a probabilidade é reduzida.

Na figura 2.5(a), observa-se 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 a 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 há energia suficiente para o meio absorver simultaneamente dois fótons, que, juntos, possuem a energia da luz UV. Nota-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), observa-se que a integral da intensidade do feixe do laser é constante ao longo do eixo de propagação, o que está associado à 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. Um 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 ópticas 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. No dispositivo proposto, seria possível armazenar, por A2F, uma maior densidade de dados em 3D, cerca de aproximadamente 10^{12} bits/cm³, 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/cm² [39]. Posteriormente, vários outros estudos

foram introduzidos para facilitar a leitura das informações armazenadas pelos feixes infravermelho por A2F, além da utilização de outros 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 aplicações dessa técnica têm se mostrado eficientes desde o tratamento de cânceres até o combate de infecções no campo odontológico e patologias dermatológicas [41, 42]. Essa terapia se baseia na interação de uma fonte de luz, com um comprimento de onda apropriado, utilizada para excitação de substâncias fotoquímicas, sendo estas compostas por fotossensibilizadores não tóxicos.

Portanto, durante o processo, quando as moléculas do fotossensibilizador, excitadas pela luz, entram em contato com as moléculas de oxigênio (O_2) presentes no ambiente, estas são ativadas e reagem quimicamente, desempenhando funções específicas. Esse mecanismo ocorre por meio da produção de substâncias fototóxicas no local da aplicação, conhecidas como espécies reativas de oxigênio, as quais têm a capacidade de induzir a morte celular tanto de micro-organismos patogênicos quanto de células cancerosas [43].

Essa terapia apresenta uma resposta extremamente benéfica nos tratamentos, devido à sua capacidade de causar danos aos sistemas celulares patogênicos. O sucesso desse tratamento ocorre pela formação de espécies reativas de oxigênio, originadas a partir da absorção de fótons pelas moléculas do fotossensibilizador. Por meio da A2F, há uma transição eletrônica do estado fundamental, de menor energia, para um estado excitado, de maior energia.

As moléculas excitadas, ao entrarem em contato com o oxigênio no estado tripleto, transferem parte de sua energia. Como resultado, o oxigênio no estado tripleto torna-se altamente reativo e instável, retornando ao seu estado fundamental. Consequentemente, essa reação, proveniente da terapia fotodinâmica, leva à formação do oxigênio no estado singleto [44], responsável por causar danos irreparáveis às células-alvo das doenças.

2.3.3 Microscopia multifotônica

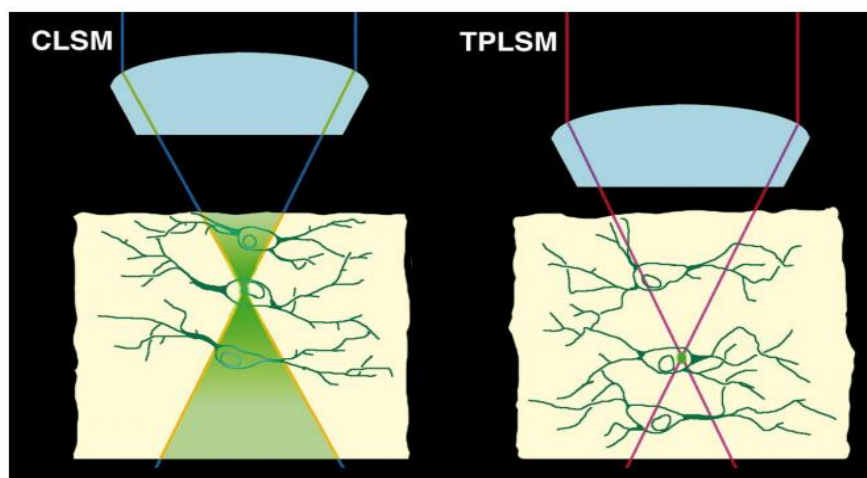
A microscopia multifotônica teve origem em 1990 com as pesquisas de Webb e colaboradores [45]. Trata-se de um método promissor, especialmente aplicado em estudos

biológicos, sendo indispensável para a análise de processos celulares. Essa técnica permite o monitoramento de células, fornecendo informações detalhadas sobre seus aspectos estruturais e funcionais.

Nesta técnica, a amostra é excitada por meio da absorção simultânea de dois fótons, cujo comprimento de onda do laser está próximo da faixa do infravermelho (IR). Caso a amostra possua absorção linear no ultravioleta (UV), ela será transparente à frequência de excitação utilizada. Devido a essas características, o feixe laser pode penetrar no tecido a uma profundidade maior sem causar danos físicos significativos à região irradiada. . Dessa forma, além de minimizar a agressão ao organismo, essa técnica permite a obtenção de imagens de amostras biológicas com maior resolução, devido à alta intensidade de fluorescência emitida por elas [46].

A microscopia multifotônica apresenta vantagens significativas em relação à microscopia confocal linear (Confocal Laser-Scanning Microscopy - CLSM) que, diferentemente da técnica de A2F, utiliza a absorção de um único fóton (A1F) para excitação do tecido. Na microscopia por A2F (Two-Photon Laser-Scanning Microscopy - TPLSM), a excitação ocorre de forma mais localizada, interagindo exclusivamente no plano focal com a região específica da amostra. Esse aspecto reduz a probabilidade de fotolesões ou fotodegradação, problemas frequentemente observados no método CLSM, onde o feixe laser, na faixa do visível, interage com toda a seção transversal do tecido, tanto dentro quanto fora do ponto focal. Além disso, uma limitação adicional do CLSM é sua menor profundidade de penetração, conforme ilustrado na Figura 2.6 [47, 48].

Figura 2.6: Diferença entre o método CLSM e TPLSM.



Fonte: Potter [49].

Na literatura, diversos estudos utilizaram a microscopia de fluorescência por absorção de dois fótons em aplicações biológicas. Um exemplo é a geração de imagens tridimensionais de neurônios, permitindo o acompanhamento do comportamento desses sistemas biológicos. Essa abordagem tem sido essencial no estudo de doenças degenerativas, pois possibilita uma melhor compreensão dos fatores que as desencadeiam [50-53].

2.3.4 Microfabricação por P2F

Entre os diversos processos de escrita direta a laser, a técnica aditiva de P2F desperta interesse especial devido à sua capacidade de estruturar um modelo 3D, pela montagem do objeto proposto, camada por camada, com o mínimo necessário 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, alcançando resoluções de até 100 nm.

São encontrados inúmeros trabalhos baseados em microestruturação 3D via P2F nos últimos anos, com grande perspectiva de crescimento, envolvendo pesquisas em diferentes campos, tais como na microeletrônica, microfluídica [54], nanofotônica [55], bioengenharia [56], dispositivos médicos [57], óptica não linear [58], sistemas de comunicação, entre outros [59-60]. Com especial interesse na área de bioengenharia, são desenvolvidos diversos arcabouços que variam em sua geometria, complexidade, composição química e funcionalidade, além da busca pela síntese resina biocompatível, biodegradável e com reduzida citotoxicidade [61]. Neste tópico, a técnica de microfabricação via P2F foi abordada de maneira sucinta; no entanto, no capítulo seguinte, 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 $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{2+}$. **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://grupestudo.com.br/livro/Fisica3/lentes_esfericas.html>. Acesso em: 08 jul. 2023.
- [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://13dw.com/what-is-two-photon-absorption/>>. Acesso em: 29 jan. 2023.
- [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. 2023.
- [37] BURR, G. W. Three-dimensional optical storage. Nano- and Micro-Optics for Information Systems. **Proc. SPIE**. v. 5225, p. 78-92, 2003.
- [38] PARTENOPOULOS, 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 multilens 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, serão descritos 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, bem como o entendimento e domínio destas informações, que são essenciais para o aprimoramento dessa importante técnica.

3.1 CONTEXTO HISTÓRICO

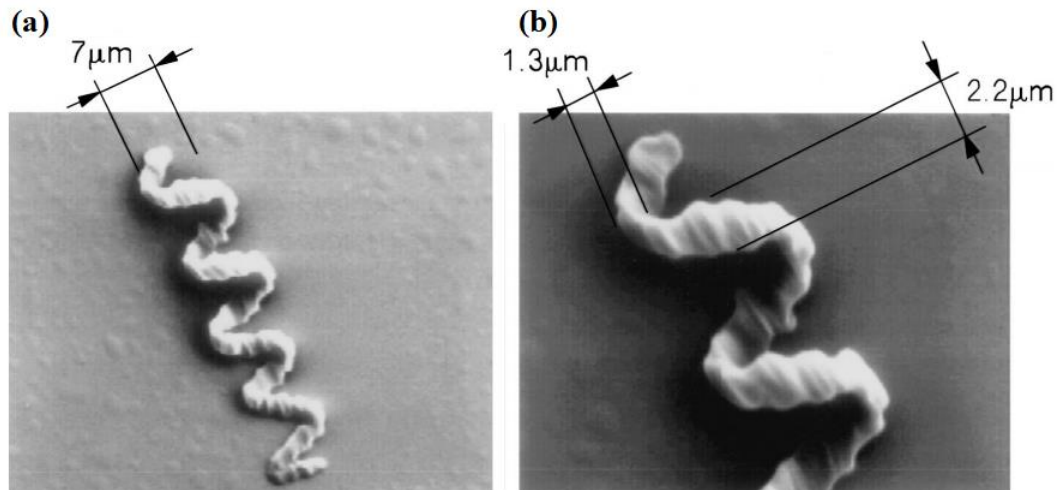
De modo geral, a microfabricação demonstrou-se capaz de atuar de maneira interdisciplinar e relacionar-se com diversas áreas científicas, que se refletem na criação de subáreas como, por exemplo, microtecnologia, microfluídica, microeletrônica, entre outras [1-4].

Existem várias técnicas que utilizam o método de escrita direta a laser para microfabricação, entre as quais se destaca a técnica de P2F. No contexto histórico, a primeira microestrutura tridimensional construída por meio 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 μm . A resolução espacial era de 1,3 μm na direção lateral e de 2,2 μm na direção longitudinal, valores que correspondem aproximadamente ao diâmetro e à altura do voxel formado, respectivamente, conforme 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: acrilato de uretano e oligômeros de acrilato de uretano. A partir deste primeiro trabalho, outros pesquisadores reconheceram o potencial dessa técnica e desenvolveram várias microestruturas com complexidade ainda maior, mas igualmente aplicáveis, desde a física até a biologia.

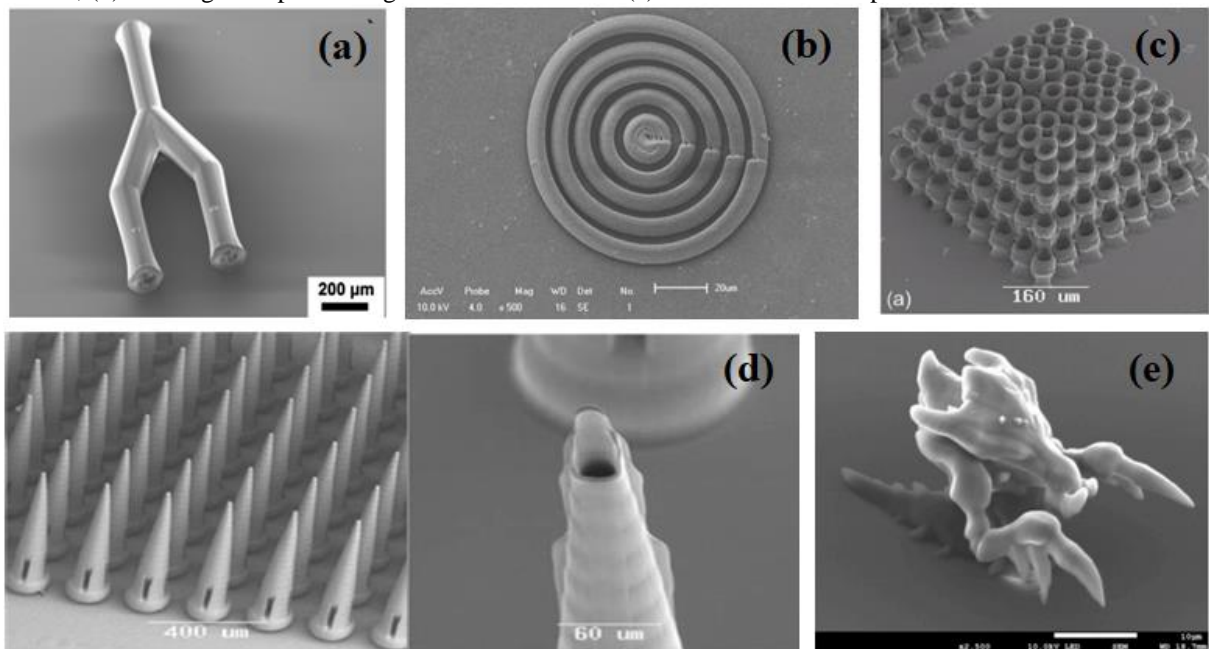
Figura 3.1: Imagens MEV da microestrutura em formato espiral construída por microfabricação via P2F após processo de remoção de resíduos não solidificados.



Fonte: Maruo et al. [5].

Para exemplificar, na figura 3.2, são apresentados diversos exemplos dessa técnica, 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 [9-11], microdispositivos [12], além de sensores microfluídicos integrados [13] e guias de ondas de luz [14, 15], entre 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.

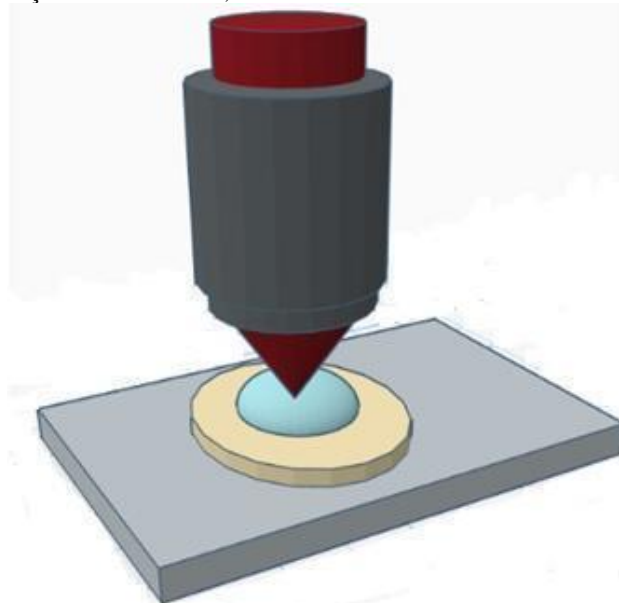


Fonte: Bieda et al. [16]; Oliveira et al. [6]; Ovsianikov et al. [7]; Ostendorf et al. [9]; Balčiūnas et al. [12].

O processo de microfabricação via P2F consiste, basicamente, em focalizar o feixe de luz, que opera em regime pulsado na ordem de femtossegundos, por meio de uma lente objetiva

de microscópio, capaz de direcioná-lo até a resina fotossensível, cuja sensibilidade é determinada pelos componentes utilizados em sua síntese. A figura a seguir mostra em detalhes essa 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 o objetivo de fabricar estruturas da ordem de micrômetros, não é vantajoso utilizar comprimentos de onda na região da absorção linear do material, pois a probabilidade de ocorrência da A1F é mais elevada e ocorre ao longo de todo o eixo de propagação do feixe do laser pela amostra fotossensível [17]. Como consequência, uma região extensa da resina será polimerizada uniformemente, tornando-se impossível confeccionar microestruturas bem definidas e com alta resolução.

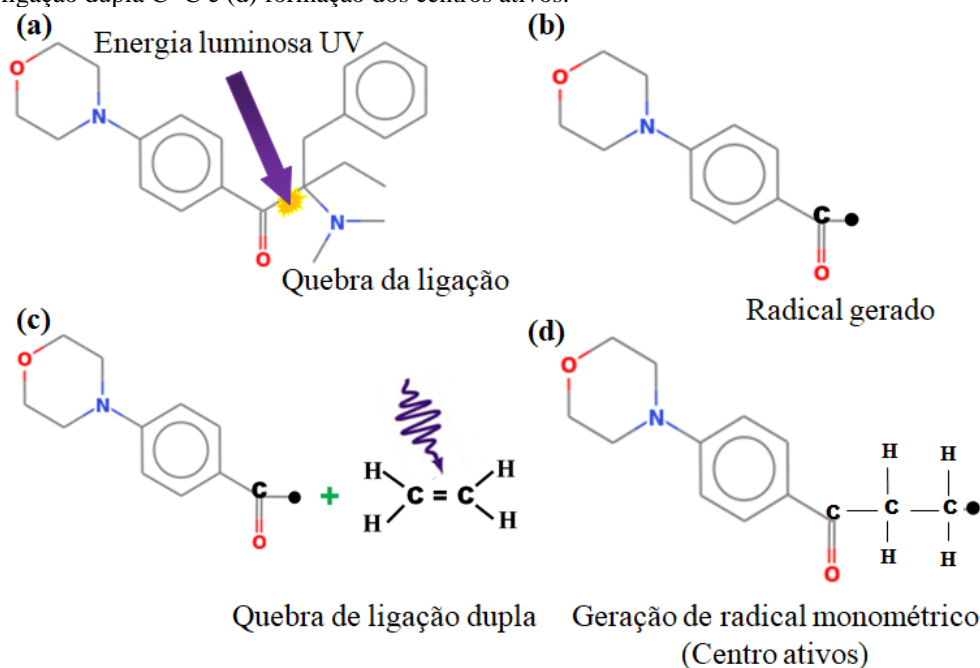
Devido à seletividade espacial dos processos de absorção multifotônica, semelhante ao que ocorre na absorção de dois fótons (A2F), esse fenômeno passou a ser estudado como uma alternativa para induzir propriedades ópticas não lineares em compostos poliméricos. Para isso, é necessário promover uma absorção não linear por meio da A2F, a qual, devido à probabilidade de ocorrência, é diretamente proporcional ao quadrado da intensidade da luz, restringindo a absorção ao volume focal. Esse processo gera um menor volume polimerizado, o que permite atribuir formas às microestruturas. Um cuidado essencial na fabricação dessas estruturas é garantir que a fonte de excitação tenha um comprimento de onda fora da região de absorção linear das moléculas do fotoiniciador e do monômero, assegurando assim que apenas a A2F ocorra.

3.2 POLIMERIZAÇÃO POR ABSORÇÃO DE DOIS FÓTONS (P2F)

Amplas são as técnicas empregadas nos processos de microfabricação, entre as quais se destaca a técnica de P2F, por meio 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 compostas por monômeros e fotoiniciadores.

O processo de fotopolimerização por radicais livres usado na microfabricação via P2F é constituído por três etapas, conhecidas como: iniciação, propagação e terminação, representadas pela figura 3.4. Na primeira etapa, o monômero e fotoiniciador são expostos à energia luminosa. Durante essa interação, no material ocorrem reações químicas que permitem a quebra das ligações das moléculas do fotoiniciador, que absorvem a luz e formam os radicais livres. Na etapa subsequente, os radicais livres atuam nos monômeros e, como consequência, as ligações duplas entre os carbonos nas moléculas dos monômeros são rompidas e se conectam com as ligações em aberto dos radicais livres. Estas novas estruturas moleculares formadas são denominadas 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, ela consiste no desenvolvimento e aumento do tamanho da cadeia polimérica por meio de ligações entre os centros ativos e outros monômeros, uma vez que na resina há maiores quantidades de moléculas de monômeros do que de fotoiniciadores.

A última etapa é o processo de terminação. Na ausência de 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 a polimerização da resina ocorra com êxito. 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 à 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 entre esses componentes impedem a formação dos centros ativos e causam 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 de O_2 contidas no ambiente com os radicais livres, formando um radical peróxido. Portanto, torna-se importante o conhecimento de sua influência, uma vez que resulta na inibição do processo pelo oxigênio [20, 21].

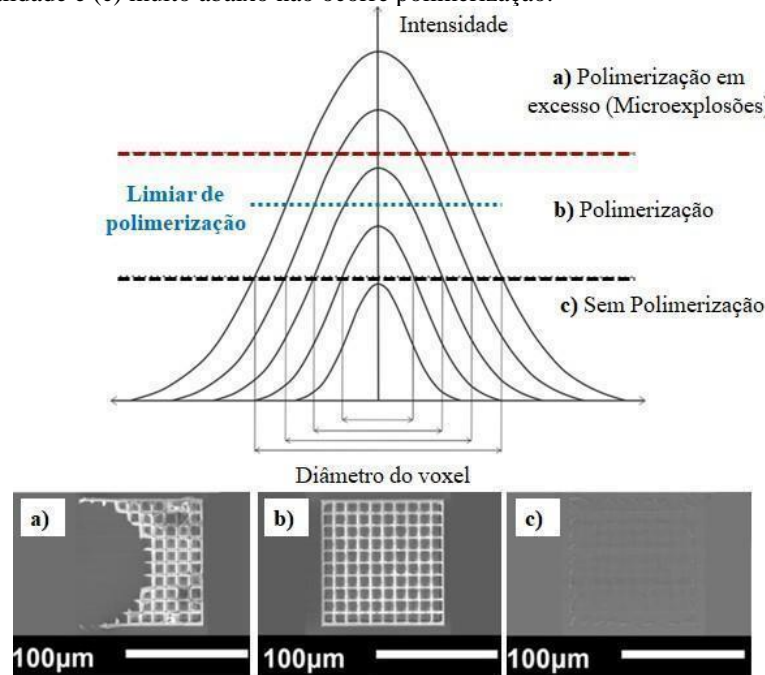
Contudo, dentro da metodologia de fotopolimerização, tem-se conhecimento da existência de um limiar de polimerização (linha pontilhada em azul na figura 3.5), definido como a potência mínima capaz de polimerizar um elemento de volume. Para intensidades do feixe gaussiano inferiores ao limiar de polimerização,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

Esta informação é útil para a confecção de microestruturas 3D inclusas em um determinado volume da resina. Entretanto, ela se torna desvantajosa para a fabricação de filmes finos em duas dimensões devido ao efeito do oxigênio [17, 22, 23].

Na prática, o limiar de polimerização revela que a intensidade de excitação fornecida ao material no processo de escrita é extremamente relevante, pois reflete na qualidade e nas propriedades mecânicas das microestruturas fabricadas. Além disso, outros parâmetros também influenciam, como a velocidade de escrita, o tempo de exposição, entre outros. Diante disso, o

limiar de polimerização indica quais intensidades do laser são realmente necessárias para que ocorra 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 obtém 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 for fornecida uma elevada intensidade da fonte luminosa (região acima da linha tracejada em vermelho), isso causará danos na microestrutura fabricada e, conseqüentemente, observam-se microexplosões nas paredes da resina polimerizada [16]. No segundo caso, em 3.5(b), é possível obter estruturas adequadas ajustando a intensidade para próximo 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 iniciam as reações químicas de fotopolimerização e a estrutura mal polimerizada apresenta as paredes instáveis, rompidas e pouco visíveis.

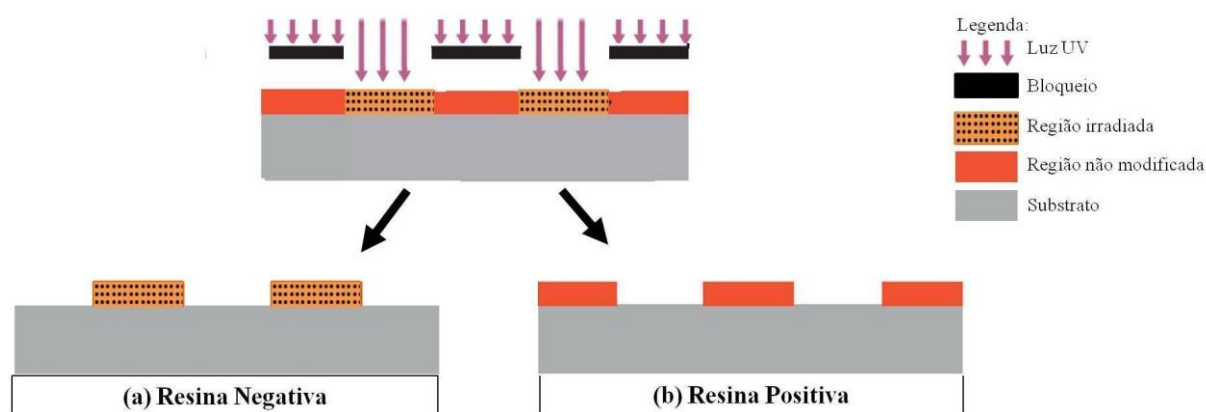
3.2.1 Tipos de resinas

Encontram-se comercialmente disponíveis dois tipos de resinas destinadas à construção de microestruturas, as quais podem ser classificadas como positivas ou negativas, e diferem-se 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 permitem ao composto perder sua resistência e enfraquecer, resultando na ruptura das suas ligações da cadeia principal do polímero [25]. Este tipo de resina é utilizado, 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. À medida que as regiões do material são submetidas à radiação da luz no comprimento de onda do UV, elas se tornam sólidas por meio das ligações da cadeia molecular. Essas resinas são geralmente utilizadas no processo de escrita direta a laser por P2F. A figura 3.6 apresenta um esquema ilustrativo que demonstra as diferenças entre os 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 resina possui para desempenhar o processo de fotopolimerização com eficiência, investiga-se a taxa ou grau de conversão (GC) polimérico. Basicamente, entende-se como o índice percentual que indica quanto do material foi realmente utilizado na etapa de polimerização, isto é, a porcentagem de monômeros iniciais convertidos em cadeias poliméricas. Por essa razão, 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 permanece contida na resina, assim como fotoiniciadores não reagidos. Esses resíduos são inevitáveis, pois raramente a fotopolimerização é realizada por completo.

A taxa de conversão polimérica varia de acordo com o tipo de resina, pois depende das propriedades dos monômeros e dos fotoiniciadores usados em sua síntese, mas também está

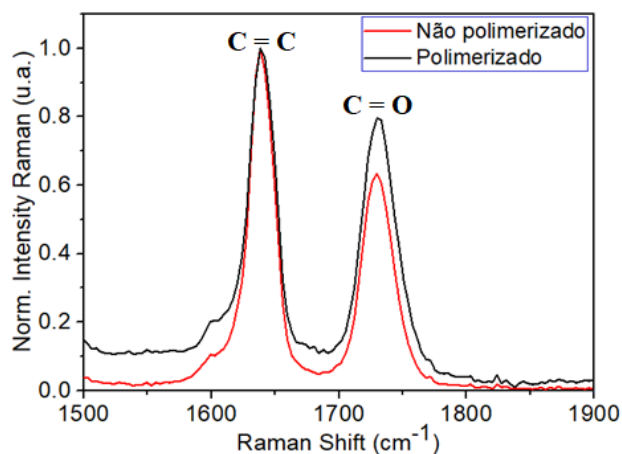
sujeita aos parâmetros utilizados no processo de polimerização. Geralmente, na literatura, são encontrados alguns valores do grau de conversão considerados aceitáveis, que estão compreendidos na faixa de 20% a 90% [26].

Este parâmetro quantitativo pode ser obtido por meio de diversos métodos diferentes, como, por exemplo, medição fotocalorimétrica, espectroscopia Raman, Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), entre outros meios de caracterização [20].

O tipo de caracterização empregado neste estudo é o método de espectroscopia Raman, por meio da 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, propõe-se que, em resinas ainda líquidas, seus monômeros apresentam ligações duplas entre carbonos ($C = C$) com pico característico em 1640 cm^{-1} (vinil), e somente através da formação dos polímeros essas ligações são quebradas, transformando-se em ligações simples intermoleculares entre carbonos ($C - C$). De modo que, após as reações químicas ocorridas no material, espera-se que esse pico em 1640 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 cm^{-1} . No entanto, esses 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 compará-la ao espectro Raman da amostra após a etapa de polimerização (sólida), é obtido um gráfico semelhante ao da 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 com referência ao pico em 1640 cm^{-1} , por isso, sua intensidade permanece a mesma e, conseqüentemente, a intensidade do pico em 1730 cm^{-1} aumenta após a polimerização.

Ao considerar as razões das intensidades dos picos das ligações dos compostos ($\text{C} = \text{C}$) e ($\text{C} = \text{O}$), é possível 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 cm^{-1} e 1730 cm^{-1} antes da polimerização da resina, respectivamente e P_{1640}^{pol} e P_{1730}^{pol} são as intensidades dos picos 1640 cm^{-1} e 1730 cm^{-1} após a polimerização, respectivamente. Em resumo, há uma diminuição da altura relativa do pico ($\text{C} = \text{C}$) quando comparado ao pico ($\text{C} = \text{O}$), 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

Existem diversos tipos de fotoiniciadores e monômeros disponíveis. Diante disso, é possível criar várias resinas poliméricas experimentais, que se diferem pelo desempenho de suas propriedades, tais como: compatibilidade com solventes, resistência, adesão e até mesmo biocompatibilidade com materiais biológicos [20]. Além disso, na manipulação da resina, é possível adicionar mais de um monômero, bem como outros tipos de componentes, como dopantes, corantes e nanopartículas, com o objetivo de aumentar a funcionalidade do composto e melhorar a qualidade mecânica da microestrutura fabricada, almejando futuras aplicações.

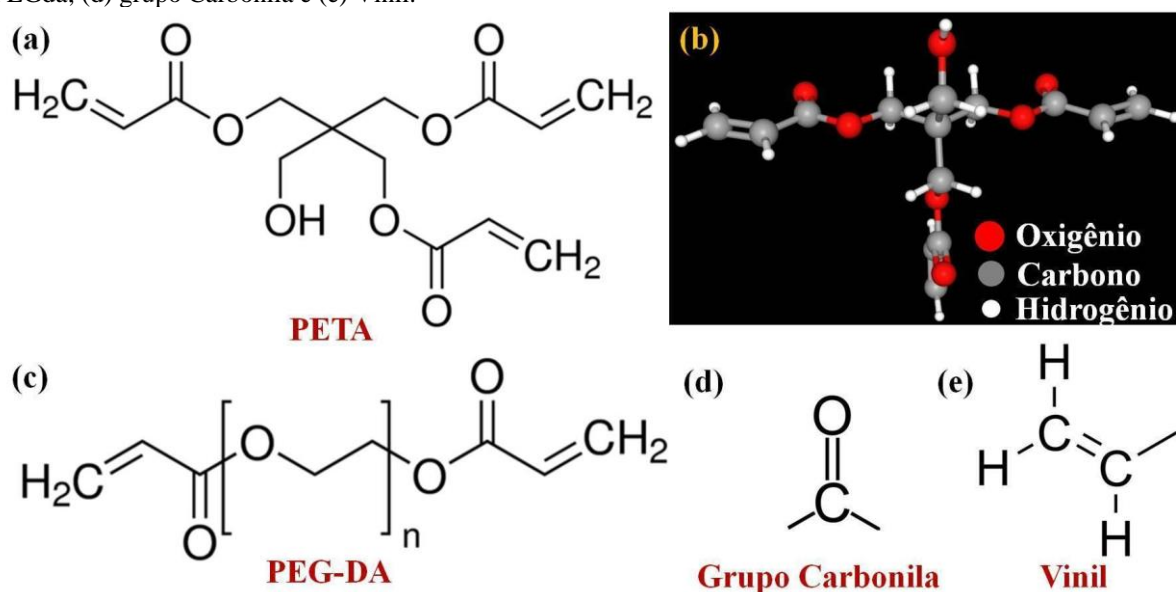
A resina polimérica utilizada na construção das microestruturas 3D via P2F estudada neste projeto é classificada como do tipo negativa e foi preparada por meio da combinação de dois componentes principais: monômero triacrilato e fotoiniciador. Nos dois tópicos seguintes, 3.3.1 e 3.3.2, serão descritos esses materiais mencionados, além de outros componentes que comumente são utilizados nesta linha de pesquisa.

3.3.1 Monômero acrilatos

Os monômeros acrilatos apresentam em suas fórmulas químicas compostos contendo grupo vinil e carbonila, conforme ilustrado na figura 3.8. O Pentaerythritol Triacrylate (PETA, $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_7$), também denominado ([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 mostrado na figura 3.8(a). Na presença da molécula do fotoiniciador, esses grupos são capazes de reagir durante a fotopolimerização [28]. Este composto foi utilizado na manipulação da resina preparada neste trabalho; trata-se de um líquido viscoso, transparente e insolúvel em água, mas 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 a confecção das microestruturas, já que, na presença dos radicais livres e dos centros ativos, têm como função principal formar uma rede complexa conhecida como polímero. Todavia, esses 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, esse componente tem várias vantagens, sendo usado principalmente por sua capacidade de gerar estruturas poliméricas muito mais rígidas e resistentes ao solvente, o que resulta no aumento da dureza do polímero, reduzindo o encolhimento das paredes das microestruturas polimerizadas após a limpeza [29], um procedimento necessário para a 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, que consiste em dois

grupos de acrilatos, um em cada extremidade de sua estrutura molecular, como mostrado na figura 3.8(c). É 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].

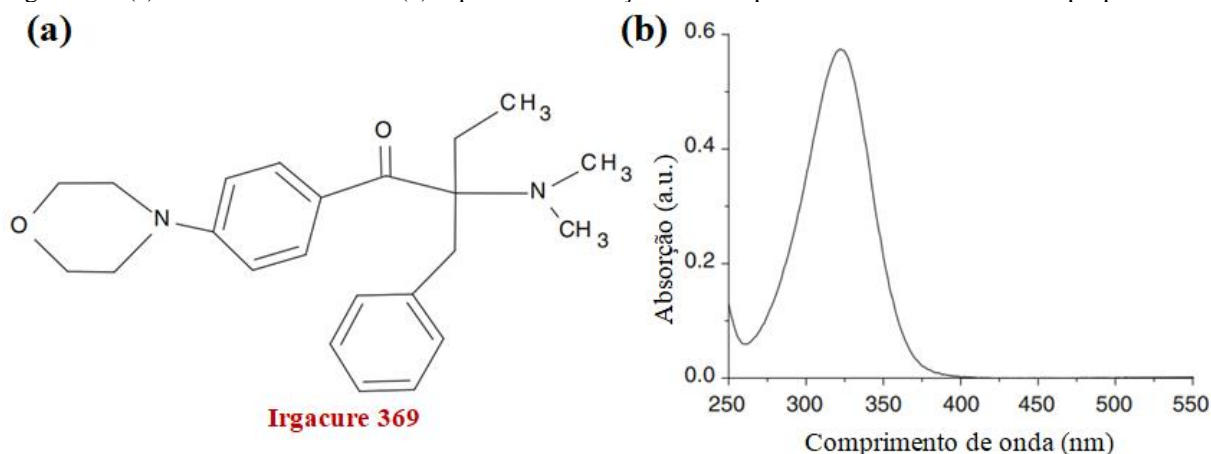
3.3.2 Fotoiniciador

O fotoiniciador Irgacure 369 (2-Benzyl-2-dimethylamino-1-(4-morpholin-oxophenyl)-butanone-1), também conhecido como IRG 369, foi utilizado neste trabalho para formulação da resina, como mostrado na figura 3.9. Trata-se de uma substância em pó com peso molecular de 366.5 g/mol e solubilidade em acetona, hexanediol diacrylate (HDDA), entre 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, verniz ou ainda na construção de microestruturas de diversos tipos. A concentração de massa (% massa) do FI é determinada com relação a massa do monômero, sendo frequentemente utilizado de 0,5% até 5%, dependendo da finalidade de sua aplicação [33].

O espectro de absorção UV-Visível do FI puro dissolvido em álcool isopropílico é mostrado na figura 3.9(b). Ele exibe uma ampla banda de absorção centrada em torno de 325 nm e tem se mostrado eficiente no processo de polimerização na geração de radicais livres para P2F usando lasers de femtossegundos na faixa do IR.

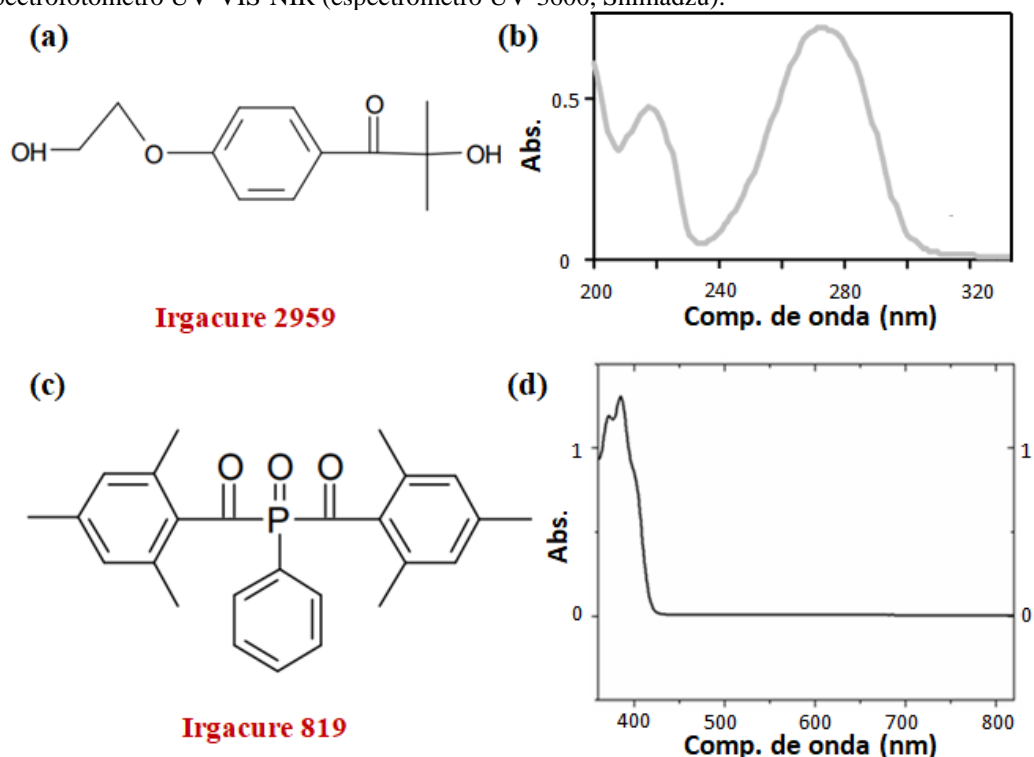
Figura 3.9: (a) Estrutura molecular e (b) espectro de absorção do I369 puro dissolvido em álcool isopropílico.



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

Existem também um grupo de FIs caracterizados por sua solubilidade em água, amplamente utilizados na síntese de hidrogéis. Um exemplo é o Irgacure 2959 (usado neste trabalho) (1-[4-(2-Hydroxyethoxy)-phenyl]-2-hydroxy-2-methyl-1-propane-1-one), um composto em pó de 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, conforme mostrado nas figuras 3.10 (a) e (b).

Figura 3.10: Estrutura molecular do (a) I2959 e (c) I819. Espectro de absorção do FI (b) I2959 e (d) I819 obtido pelo espectrofotômetro UV-VIS-NIR (espectrômetro UV-3600, Shimadzu).



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

O FI Irgacure 819 (Bis(2,4,6-trimethylbenzoyl)-phenylphosphineoxide) é uma substância líquida de cor amarelo claro, com peso molecular de 418.5 g/mol e é solúvel em acetona, hexanediol diacrylate (HDDA), entre outros. É comum sua utilização em processos não lineares 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). Este FI pode ser ativado por lasers de pulsos ultracurtos centrados em 780 nm, para desencadear o fenômeno desejado.

3.4 APARATO EXPERIMENTAL

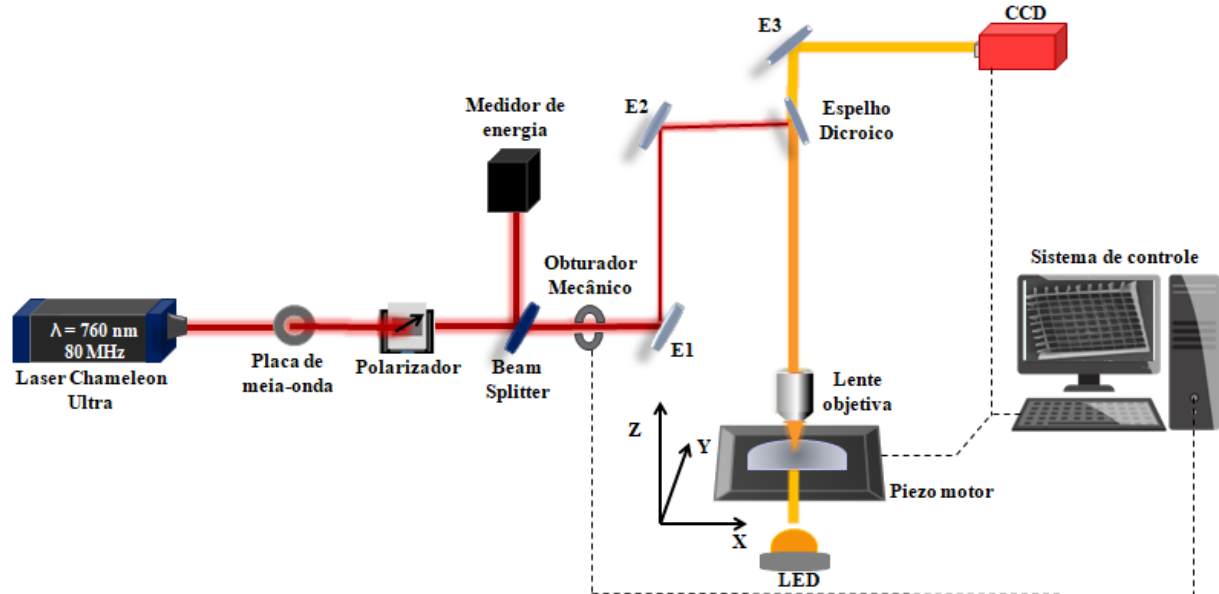
Para a construção das microestruturas tridimensionais via P2F, utiliza-se um aparato experimental (μ Fab Workstation-NEWPORT), como ilustrado na figura 3.11. Este aparato é

configurado com um laser de femtossegundos 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 responsável por regular a intensidade de energia, composto por uma placa de meia onda (HWP), um polarizador (GLP), um beam splitter (BS), que separa parte da potência, e um obturador mecânico (Shutter), que controla a velocidade de interação e o tempo de escrita na amostra (abrindo e fechando o Shutter). Todo esse processo é controlado por um software no computador, que gerencia esses dispositivos.

Em seguida, a luz percorre um par de espelhos e é direcionada até um espelho dicróico, cuja função é permitir a passagem da luz no comprimento de onda do espectro visível até a câmera CCD, enquanto 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 é 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. Além disso, antes de iniciar a escrita a laser, o sistema μ Fab permite ajustar o foco do laser movendo a resina ao longo do eixo z , por meio do estágio de translação, conectado a um translado em escala micrométrica. Esse ajuste pode ser feito de forma manual ou, para maior precisão, por meio do software no computador, enquanto o laser permanece fixo [35].

Uma pequena gota da amostra é depositada sobre um substrato, que geralmente é uma lamínula ou lâmina de vidro. Em seguida, a amostra é iluminada pela câmera CCD localizada na parte superior e por um LED vermelho na parte inferior. Esses dispositivos são necessários para acompanhar em tempo real o processo de escrita a laser, que é visualizado pelo software no monitor do computador, o qual controla todos os dispositivos e permite inserir os parâmetros de escrita.

3.4.1 Compressão temporal: Laser de pulso ultracurto

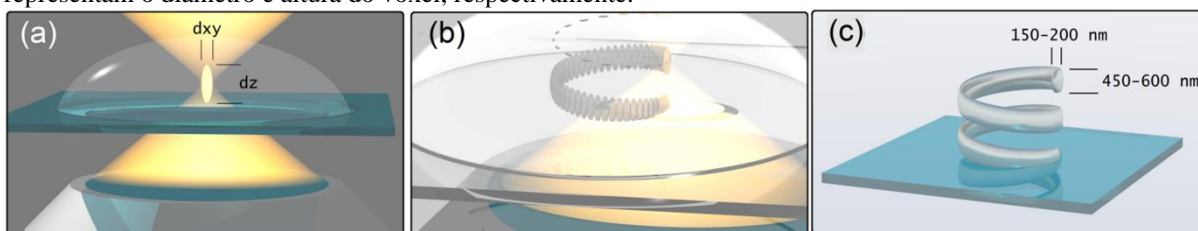
O sistema experimental montado é alimentado pelo laser com pulsos ultracurtos modelo Chameleon Ultra-COHERENT, que produz pulsos com duração em torno de 140 fs, a uma taxa de repetição da ordem de 80 MHz. Este laser possui uma ampla faixa de comprimento de onda sintonizável, variando de 690 nm a 1020 nm. Para este 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, busca-se construir microestruturas cada vez menores, com alta resolução espacial da escala submicrométrica. Para tal êxito, é essencial ter a noção das dimensões e a geometria do voxel formado para determinada potência (associada à energia do feixe laser) e a 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 limpeza das microestruturas.

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

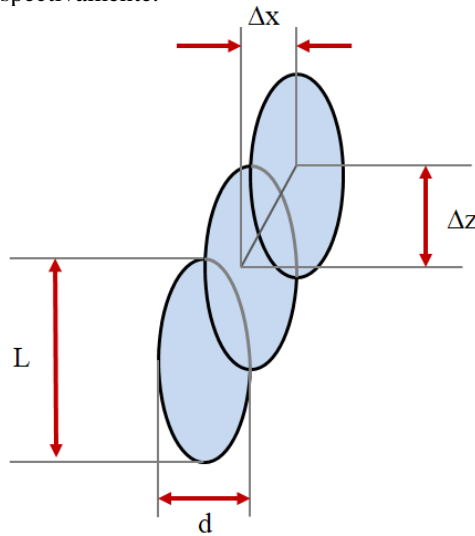


Fonte: Varapnickas; Malinauskas [38].

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 irão 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, ΔX e ΔZ 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 da 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:

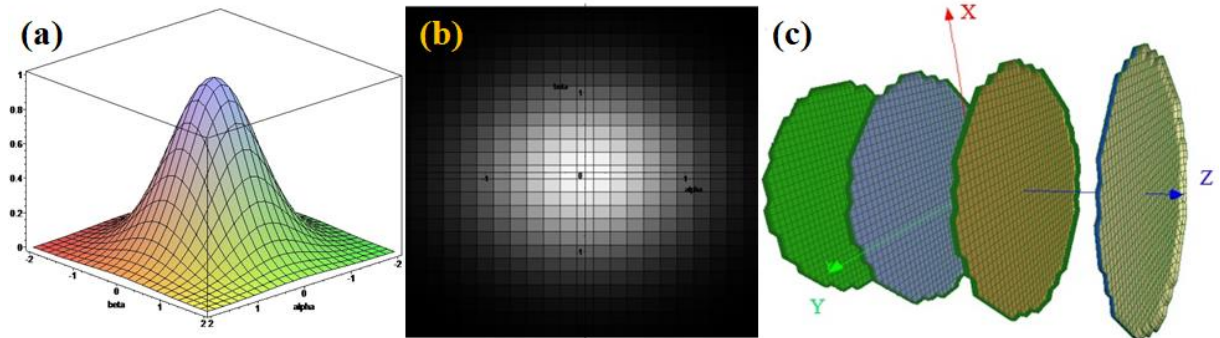
$$P = \frac{I_0}{2} (\pi W_0^2), \quad (12)$$

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 $z = 3$.



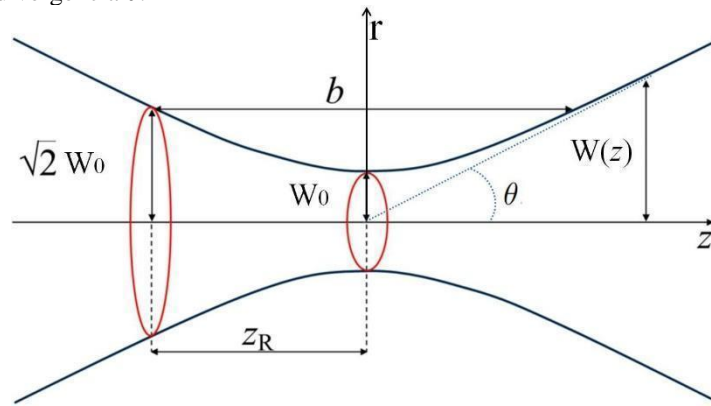
Fonte: Elaborado pela autora.

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 θ , 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 θ .



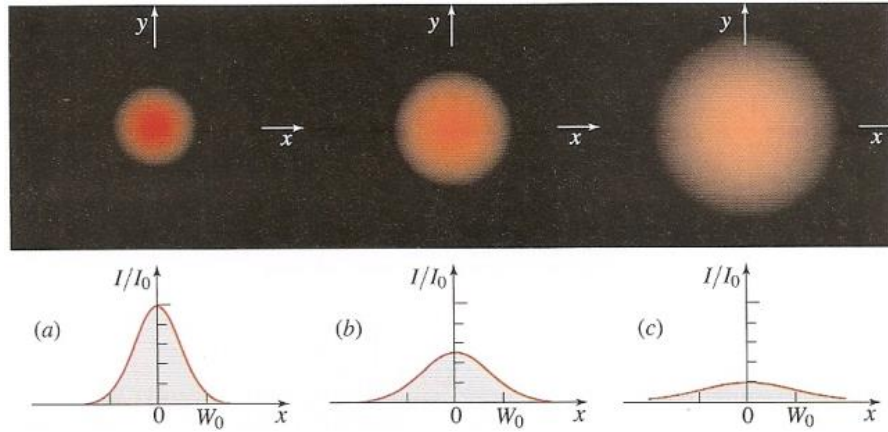
Fonte: Mroczkowska [40].

A distribuição de energia do feixe gaussiano em função da distância radial e uma determinada distância axial é mostrado na figura 3.16. Para interpretá-la fisicamente, considere que seja fixado o eixo óptico do feixe em $r = 0$, pela equação (11), é obtido apenas:

$$I_{gaussiano}(r, z) = I_0 \left[\frac{W_0}{W(z)} \right]^2 = \frac{I_0}{1 + \left(\frac{z}{z_R} \right)^2}.$$

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

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

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

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 consequentemente $A_R = \pi W(z_R)^2 = 2A_0$. 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:

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

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 à cintura mínima do feixe. Se o feixe laser é focalizado em uma área muito pequena, a equação sugere que a profundidade de campo terá sua distância reduzida também.

3.4.4 Objetivas de microscópio

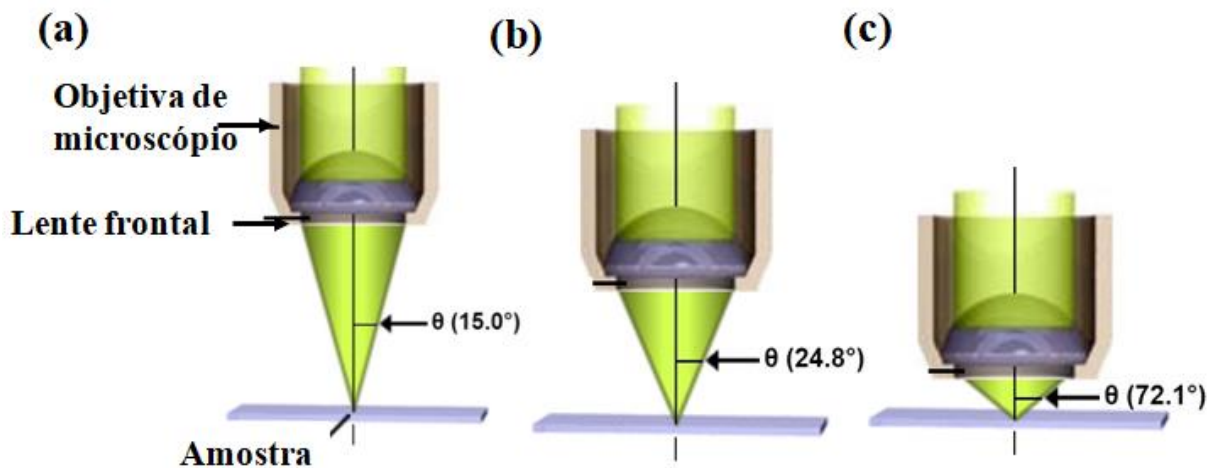
O conceito de abertura numérica, é definido por Abbe em 1873 [51], como o método de mensurar a capacidade que as lentes objetivas têm de captar a luz, representada pela fórmula algébrica:

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

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 θ 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.

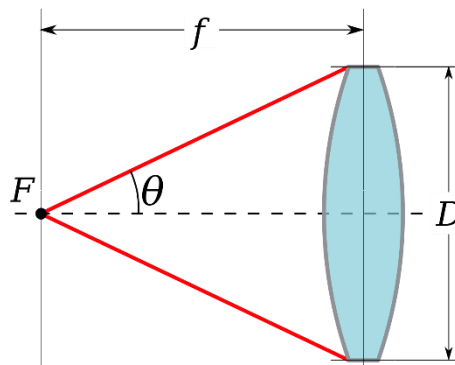
Figura 3.17: Lentes objetivas com diferentes aberturas numéricas para $n = 1$: (a) $\theta = 15^\circ$ e $NA = 0,25$; (b) $\theta = 24,8^\circ$ e $NA = 0,42$; (c) $\theta = 72,1^\circ$ e $NA = 0,95$.



Fonte: Adaptado de Davidson [43].

Na figura 3.18 são apresentados 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, θ 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 θ seja pequeno, tem-se que [45]:

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

Esta aproximação é obedecida para ângulos de até 30° 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 $NA = 0,40$.

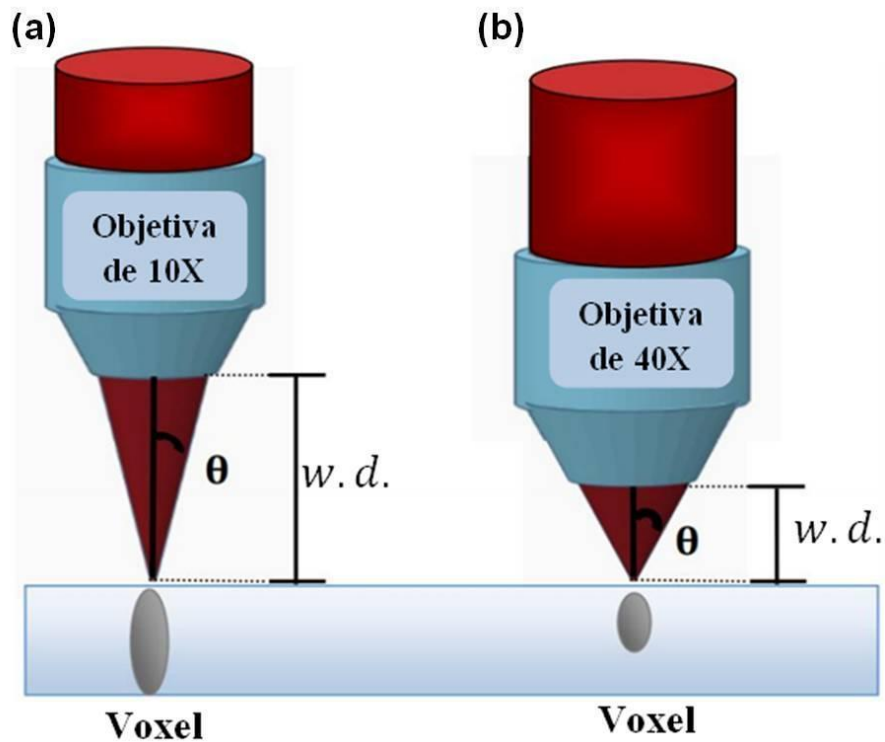
Por outro lado, uma outra lente objetiva de microscópio (Olympus Plan N) com parâmetros: $n = 1$, magnificação de 40X, diâmetro de 7,5 mm e distância focal de 4,5 mm, pela aproximação se tem como resultado uma $NA = 0,833$, que não condiz com o esperado sendo de $NA = 0,65$ [46].

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° , 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 a 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 refletem 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 objetivas¹, 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

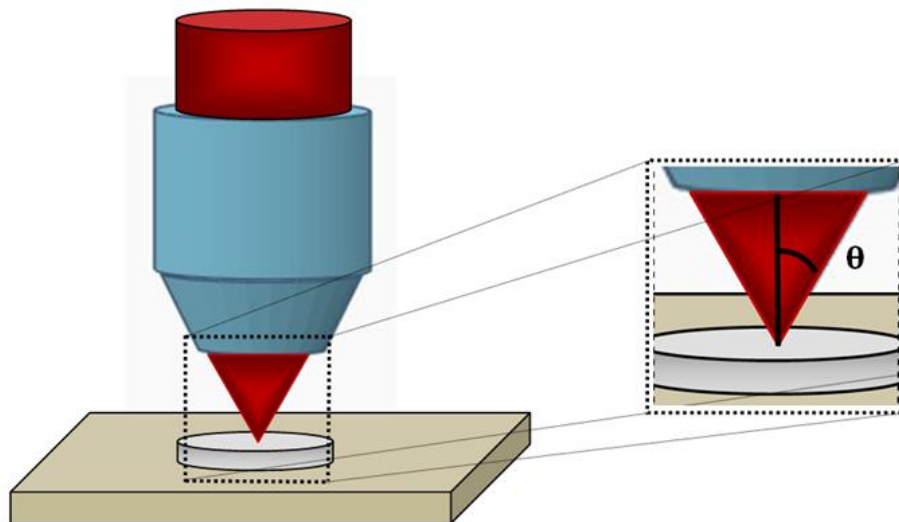
Fonte: Elaborada pela autora.

¹Em 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 $\leq 4 \mu\text{m}$.

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.

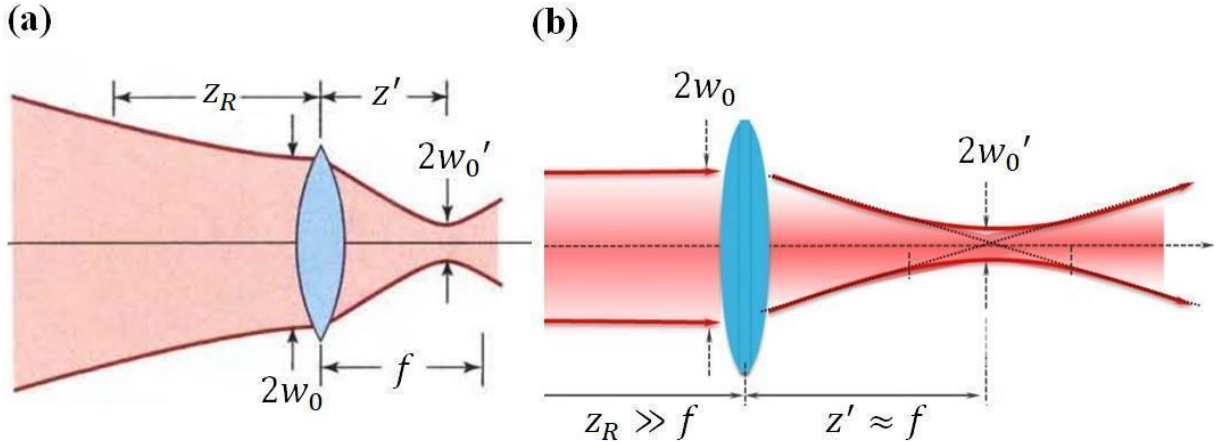
Figura 3.20: Feixe gaussiano transmitido através de uma lente objetiva de microscópio com abertura angular θ .



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 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 feito 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 $W_0' \approx \frac{f W_0}{z_R}$ e em seguida, substituindo as equações (16) e (14) nesta mesma ordem, é obtida a expressão da equação (22a):

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

$$z' \approx f. \quad (23b)$$

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:

$$w_0' \approx \frac{\lambda}{\pi NA} \quad (24)$$

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 focalizada 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.

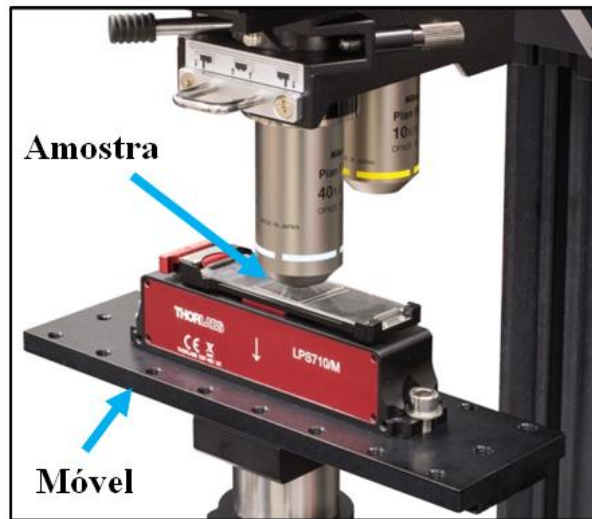
Em geral, é essencial esta investigação para que as linhas que formam as microestruturas tenham o mínimo de espaçamento entre elas e se conectarem, para isso é preciso ter uma noção das dimensões do voxel constituído. A partir destes estudos é provável prever a resolução do menor elemento de volume que 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 3D, 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 $0,05\mu\text{m}$) [35, 52].

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 [19, 55].

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

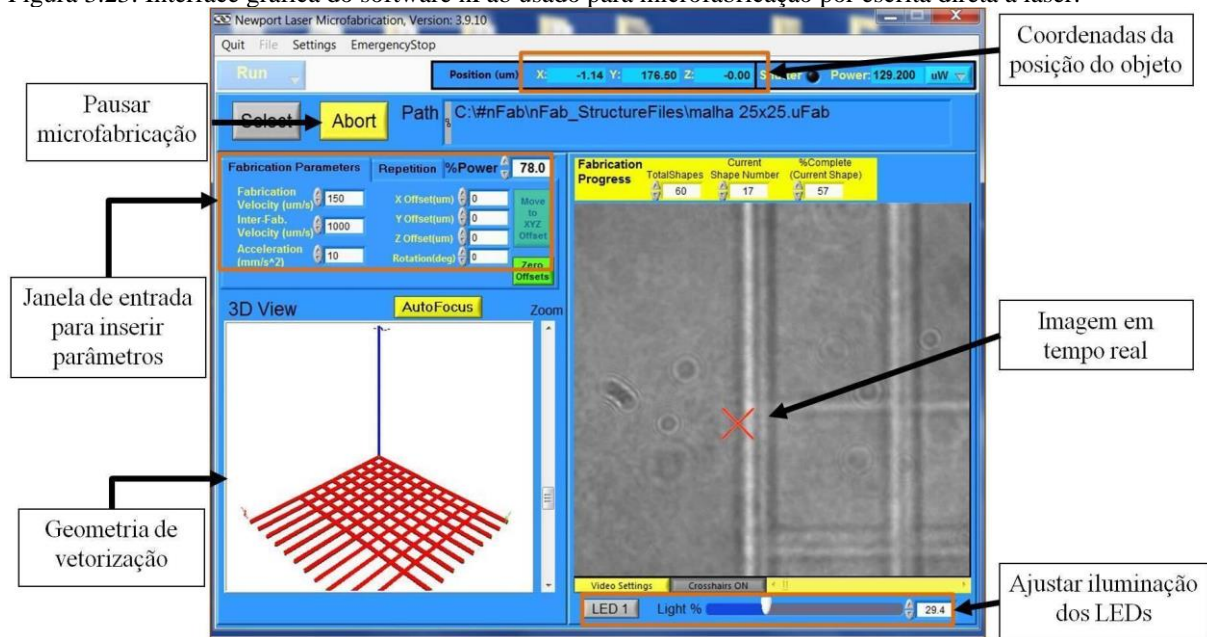
O comando de todos os processos de microfabricação de escrita a laser é realizado através do software identificado como nFab, desenvolvido pela empresa Newport, cuja função é estabelecer comunicação entre os equipamentos, incluindo sistema motorizado de translação, medidor de potência e obturador mecânico,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

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 definidas 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.



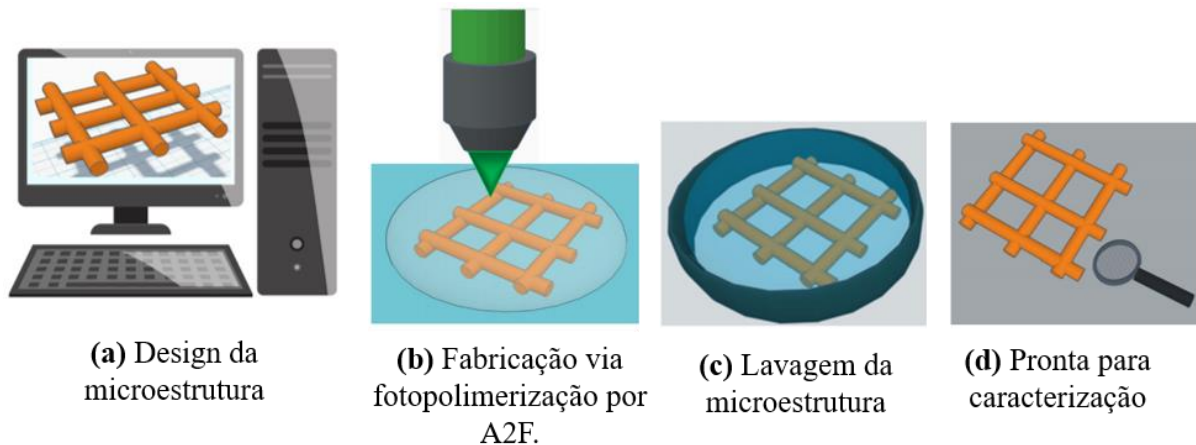
Fonte: Elaborado pela autora.

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.



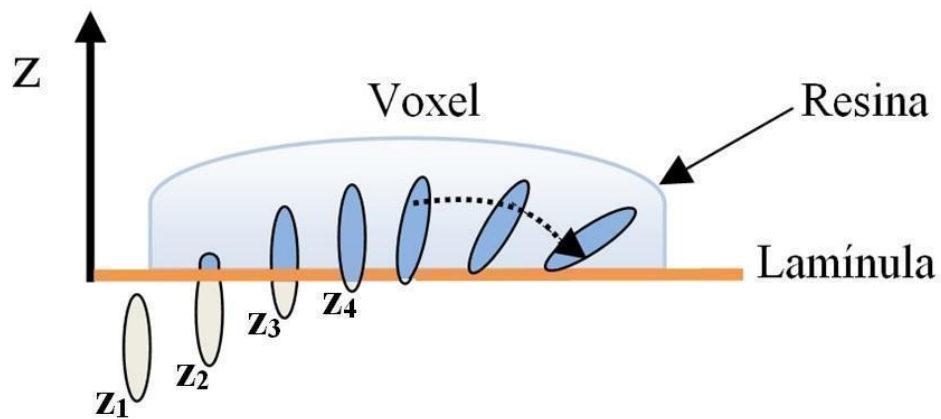
Fonte: Adaptado de Rekstyle [54].

Por seguinte, em um ambiente na ausência de luz, a lamínula com as microestruturas 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] FRANSSILA, Sami. **Introduction to Microfabrication**. ed. 2, v.1, Wiley, 2010.
- [2] ZHANG, D; MEN, L; CHEN, Q. Microfabrication and applications of optomicrofluidic 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 fotoiniciada 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 nanoparts 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/ChemicalStructure.17977.html?rid=7a330ea8-3838-416b-9d0d-496fd9da46c1>>. Acesso em: 29 nov. 2023.
- [30] SIGMA-Aldrich. **Pentaerythritol triacrylate**. Disponível em: <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 out. 2023.
- [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/filearchiv/e/chameleonultra_1.pdf>. Acesso em: 02 mai. 2023.
- [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, Xiaojin; 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. 2023.
- [44] ABERTURA numérica. Disponível em: <<https://www.pngwing.com/pt/free-png-pdhgd>>. Acesso em: 10 de mai. 2023.
- [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. 2023.
- [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. 2024.
- [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>. Acesso em: 05 fev. 2023.
- [53] THORLABS. **Amplified Piezo Stage for Microscope Slides.** Disponível em: <https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=11303>. Acesso em: 27 nov. 2023.
- [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 INVESTIGAÇÃO DO COMPORTAMENTO CELULAR EM MICROAMBIENTES FABRICADOS POR P2F EM RESINAS BIOCOMPATÍVEIS

Neste capítulo, os resultados obtidos durante a pesquisa estão organizados em subseções, apresentando os diversos estudos realizados sobre polímeros acrilatos funcionalizados e microestruturados por lasers ultracurtos, com foco em aplicações biológicas.

Na primeira subseção 4.1, será abordada a metodologia de síntese das resinas funcionalizadas com nanopartículas (NPs) e nanocristais (NCs), destacando suas principais vantagens e aplicações de interesse.

Na seção 4.2, serão investigados os múltiplos aspectos relacionados ao processo fotoquímico de polimerização, bem como as propriedades ópticas e de biocompatibilidade das resinas incorporadas com pontos quânticos (PQs) semicondutores ultra-pequenos de Seleneto de Cádmio/Sulfeto de Cádmio (CdSe/CdS) e com NCs de TiO₂.

Na seção 4.3, será apresentado o processo de construção dos arcabouços celulares do tipo microgroove, os quais são fabricados a partir da resina incorporada com dióxido de titânio (TiO₂), por meio da microfabricação a laser pela técnica de polimerização por absorção de dois fótons (P2F). O módulo de Young e a morfologia de células ósseas foram investigados tanto em superfícies planas do polímero quanto em contato direto com os microgrooves paralelos e circulares.

Na seção 4.4, será demonstrada uma estratégia eficiente, rápida e ecológica para tornar a superfície de polímeros acrilatos mais aderentes às células epiteliais do pulmão, a partir de um tratamento com solução salina tamponada com fosfato, conhecida pelo termo em inglês phosphate-buffered saline (PBS). Foram investigados parâmetros como molhabilidade, energia livre de superfície, nanorugosidade, razão de rugosidade e o surgimento de grupos químicos nas superfícies poliméricas após o tratamento. A morfologia das células epiteliais cultivadas nas superfícies poliméricas antes e após o tratamento foi analisada. A técnica P2F foi utilizada para a construção de vários arcabouços para o cultivo de células.

Na seção 4.5, será investigada a ação antibacteriana, bem como as propriedades ópticas e químicas dos polímeros acrilatos incorporados com NPs de própolis vermelha (PV) brasileira, proveniente do Estado de Alagoas. A técnica P2F foi usada para a construção de arcabouços do tipo microgrooves, destinados à produção de curativos antibacterianos microestruturados, com foco na aplicação em cicatrização de feridas da pele.

4.1 RESINAS BIOCOMPATÍVEIS

As resinas fotossensíveis utilizadas neste trabalho consistem, basicamente, em um monômero acrilato multifuncional ou combinações desses compostos, como Pentaerythritol Triacrylate (PETA) [1] e Trimethylolpropane Ethoxylate Triacrylate (SR499), além de um fotoiniciador (FI) com absorção na região do ultravioleta (UV), como Irgacure 369 (I369) e Irgacure 2959 (I2959).

Estudos anteriores demonstraram a biocompatibilidade dos fotoiniciadores I369 e I2959 quando utilizados em baixas concentrações [2]. No entanto, em concentrações acima de 3%, esses fotoiniciadores tornam-se citotóxicos em meios biológicos, o que implica na redução da taxa de viabilidade celular [3].

Para aplicar essas resinas no cultivo de células, é necessário que o material seja funcional, apresentando propriedades físico-químicas aprimoradas e capazes de biomimetizar o ambiente natural do tecido biológico, além de não oferecer riscos às células.

Nessa circunstância, uma estratégia utilizada é a síntese de resinas funcionalizadas com NPs de interesse [4]. Ao combinar as propriedades benéficas das NPs com o potencial dos microambientes conhecidos como arcabouços celulares, obtém-se um método promissor para promover e estimular o crescimento celular. Isso permite o estudo de células específicas em um microambiente que simula as condições reais dos sistemas celulares e suas características mais importantes, incluindo as interações célula-célula e célula-matriz extracelular [5], com aplicações potenciais na engenharia de tecidos e biofotônica.

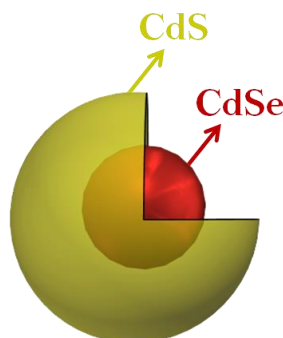
Portanto, para obter uma resina biocompatível, foram preparadas amostras à base de monômeros acrilatos e 0,5% em massa do FI, em relação à massa do monômero, de modo a manter uma baixa e controlada citotoxicidade do polímero. Além disso, incorporamos diferentes concentrações de NPs de TiO_2 , PQs semicondutores ultra-pequenos de CdSe/CdS e NPs de PV, as quais possuem biocompatibilidade comprovada [6-9].

Os NCs de TiO_2 e as NPs de CdSe/CdS foram sintetizadas e disponibilizadas pela prof.^a Dr.^a Anielle C. A. Silva e pelo Prof. Dr. Noelio O. Dantas, enquanto as NPs de PV foram sintetizadas pela Dr.^a Laís F. A. M. Oliveira no Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas (IF/UFAL). Nas seções a seguir, serão apresentadas as principais propriedades e vantagens das NPs citadas.

4.1.1 Pontos Quânticos Semicondutores Ultra-pequenos de CdSe/CdS

Os PQs semicondutores ultra-pequenos de CdSe/CdS, ou Core-Shell Ultrasmall Quantum Dots (CS-USQDs), são extremamente pequenos, com diâmetro de ~2 nm para o CdSe [10], cuja organização estrutural é ilustrada na figura 4.1.

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



Fonte: Adaptado de Silva [14].

Os PQs apresentam propriedades físicas e químicas ligeiramente aprimoradas em comparação aos Quantum Dots convencionais [11, 12]. Elas se diferem conforme o modo de preparação e protocolo de síntese, os quais modificam suas características ópticas e se tornam relevantes ao serem empregadas em diversas aplicações biológicas [13]. Em geral, as amostras de CdSe apresentam uma ampla banda de absorção, com boa absorção na região do UV.

Os índices de toxicidade das NPs estão relacionados à dispersão de íons Cd^{2+} presentes na superfície do Cádmio (Cd), o que torna o material tóxico e pode causar danos às células [15-17]. Estudos encontrados na literatura revelam que o tamanho, assim como outros aspectos físicos, interfere na toxicidade das NPs contendo Cd [18].

Diante disso, esse aprimoramento da nanoestrutura com a adição de 1-thioglycerol reflete também em sua toxicidade, pois um dos objetivos é diminuí-la por meio do processo de manipulação da NP. Dessa forma, possibilita-se apresentar baixa toxicidade, pois a espessura da casca formada na síntese protege o núcleo, permitindo, assim, conservar suas características e reduzir a possibilidade de destruição parcial do núcleo, tornando os PQs atóxicos, estáveis e biocompatíveis em sistemas biológicos [19]. Esses aspectos notáveis os diferenciam dos QDs comuns.

Dentre as aplicações dessas NPs, destaca-se a inserção delas em células solares, sensores químicos e biológicos [14], bem como componentes essenciais para a incorporação em resinas poliméricas devido às suas propriedades fluorescentes [20], possível aumento da resolução das linhas polimerizadas [21] por P2F e excelente biocompatibilidade, como evidentemente e estabelecido neste trabalho de pesquisa.

4.1.2 Nanocristais de Dióxido de titânio (TiO_2)

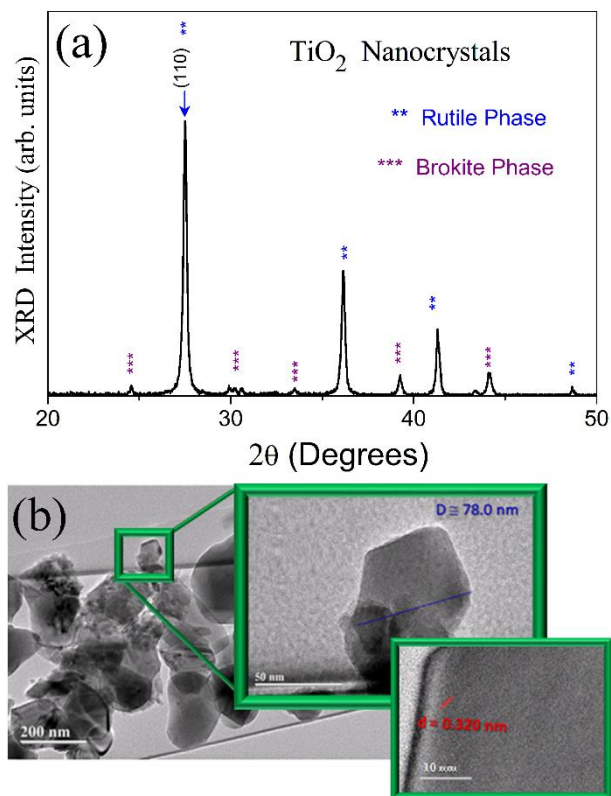
Os NCs de TiO_2 , também chamadas de óxido de titânio (IV) ou titânia, correspondem às estruturas cristalinas [22] e semicondutoras pertencentes à família dos óxidos de metais de transição [23]. Os NCs de TiO_2 foram sintetizados em solução aquosa à temperatura ambiente, de acordo com a metodologia de Silva et al. [12], seguida de recozimento térmico a 800°C por 1 hora.

A difração de raios X (DRX) foi registrada com um DRX-6000 (Shimadzu), utilizando radiação monocromática $\text{Cu-K}\alpha_1$ ($\lambda=1.54056 \text{ \AA}$) para confirmar a formação das NCs de TiO_2 , bem como a estrutura cristalina, o tamanho e a fração média de massa da fase rutilica. O tamanho dos NCs foi estimado com base na equação de Debye-Scherrer [24], utilizando o pico (110) da fase rutilica. A porcentagem das fases brookita e rutilo foi calculada com base na literatura [25]. As imagens de microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM) foram obtidas com uma tensão de aceleração de 200 kV, utilizando o equipamento JEOL SIOD.

As propriedades estruturais e morfológicas dos NCs de TiO_2 foram investigadas por DRX e HRTEM, conforme mostrado na figura 4.2. O tipo de cristal, a fase cristalina e a porcentagem das fases da amostra foram confirmadas e determinadas com base nos padrões de DRX apresentados na figura 4.2(a). Nos padrões de DRX, observam-se picos de difração característicos das fases brookita (cartão JCPDS nº 29-1360) e rutilo (cartão JCPDS nº 21-1276) dos cristais de TiO_2 . O tamanho do cristalito foi estimado em cerca de 70 nm, e a porcentagem das fases foi de 65% para a fase rutilica e 35% para a fase brookita.

Imagens de HRTEM foram empregadas para confirmar o tamanho, a fase e as morfologias dos NCs de TiO_2 , conforme mostrado na figura 4.2(b). No painel esquerdo, foram observados aglomerados de nanopartículas, a partir dos quais foram realizadas duas ampliações. A primeira ampliação mostra que o tamanho dos NCs é de 78 nm, e na segunda ampliação verifica-se que o espaçamento de rede dos NCs é de 0,352 nm, correspondente ao espaçamento d_{110} do cristal rutilo de TiO_2 . A formação de outras formas de NCs indica a presença de diferentes fases.

Figura 4.2: (a) Padrões de difração de raios X e (b) Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM) de NCs de TiO_2 .



Fonte: Reis, 2016 [6].

Reis et al. avaliaram a genotoxicidade de NPs cristalinas (nanocristais) de TiO_2 em função da fase cristalina, observando que a mistura das fases brookita e rutilo apresenta a maior biocompatibilidade. Os NCs de TiO_2 utilizados neste trabalho são os mesmos testados por Reis et al., os quais constataram que o recozimento térmico da amostra a 800°C por 1 hora resultou na melhor biocompatibilidade [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 [26], mas também devido às suas propriedades antibacterianas e ao seu potencial na aceleração do processo de osseointegração. Outra vantagem está nas suas propriedades mecânicas, que demonstram boa resistência à corrosão [27].

Devido às várias vantagens das NCs de TiO_2 , seu uso tem sido constante nas áreas biológicas. Algumas pesquisas relatam sua utilização com mais frequência em tecidos ósseos, com o objetivo de desencadear a regeneração óssea e suprimir o crescimento bacteriano.

Em estudos anteriores, Vercellino et al. [28] demonstraram um efeito positivo de superfícies nanoestruturadas feitas de TiO_2 , onde houve aumento da atividade da 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.

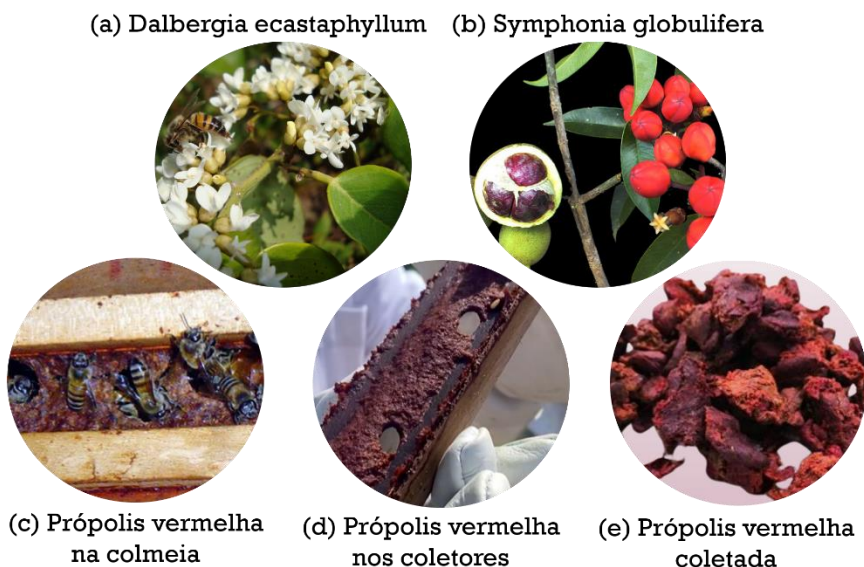
No estudo de Zhao et al. [29], foi comprovado que implantes de titânio com revestimentos microporosos de TiO_2 dopado com magnésio (Mg-TiO_2) por oxidação eletrolítica de plasma auxiliam na proliferação, na adesão e na diferenciação de células osteoblastos, promovendo uma rápida osseointegração, mas também inibem o crescimento das bactérias identificadas como *Staphylococcus aureus*.

4.1.3 Nanopartículas de própolis vermelha

A própolis tem despertado grande interesse devido às suas propriedades únicas. Trata-se de um composto natural, resinoso, de mistura complexa e não tóxica, produzido pelas abelhas a partir de pólen, gomas, seiva, fluidos vegetais, folhas e frutos encontrados nas plantas. Esses materiais coletados são, então, modificados pelas secreções salivares e enzimas das próprias abelhas, que resulta em um composto viscoso conhecido como própolis bruta. As abelhas utilizam a própolis principalmente para proteger a colmeia contra rachaduras nas paredes, invasão de pragas e para manter estáveis a temperatura, a umidade e os ventos [30, 31].

No Brasil, são conhecidos diferentes tipos de própolis, cuja variação decorre de sua rica biodiversidade, a qual exerce influência sobre a composição química da própolis e, consequentemente, sobre suas propriedades medicinais. Na região Sul do país, encontra-se a própolis com coloração marrom, proveniente da planta *Populus sp.* Enquanto isso, na região Sudeste, obtém-se a própolis com coloração verde, originária da planta *Baccharis dracunculifolia*, e no Nordeste, coleta-se a própolis vermelha, produzida a partir das plantas *D. ecastaphyllum* e *S. globulifera* (Figura 4.3).

Figura 4.3: (a-b) Origem botânica da própolis vermelha produzida no Estado de Alagoas. Própolis vermelha (c) na colmeia (d) nos coletores e (e) após ser coletada.



Fonte: Adaptado de Silva, 2023 [9].

É possível identificar na composição da própolis bruta basicamente resinas, ceras e óleos essenciais, pólen e outros compostos orgânicos, cuja concentração pode variar dependendo da origem geográfica e da fonte botânica em que está localizada a colmeia. Vários componentes podem ser encontrados em todos os tipos de própolis, incluindo hidrocarbonetos superiores, álcoois, ácidos alifáticos e seus ésteres derivados, ácidos aromáticos e seus ésteres aromáticos derivados, ácidos graxos superiores típicos de ceras e seus ésteres, aldeídos, cetonas, ácidos fenólicos, flavonas e flavonóis, flavanonas, chalconas e diidrochalconas, terpenóides e sesquiterpenóides, esteróides, aminoácidos, açúcares, lignanas, vitaminas e minerais.

Especificamente, na PV encontrada no estado de Alagoas, usada nesta pesquisa, ela é caracterizada quimicamente pela presença de terpenos, flavonoides, isoflavonoides, ácidos aromáticos e ácidos graxos [32].

Amplamente utilizada na farmácia e medicina, a própolis apresenta atividades biológicas interessantes, tais como ação antimicrobiana, antiviral, antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena e leishmanicida. Vale ressaltar que os compostos fenólicos e flavonoides presentes na própolis são, na literatura, associados como responsáveis por desencadear suas características anti-inflamatórias e antimicrobianas [32].

Devido às inúmeras vantagens promissoras que a própolis tem demonstrado em diversos setores, como nas indústrias cosmética, alimentícia e de saúde, diversas estratégias têm sido desenvolvidas para explorar seu potencial. Um exemplo disso é a incorporação de PV em matrizes poliméricas para possibilitar uma liberação controlada da substância e uma ação regular sobre patógenos.

Moreno et al. fabricaram arcabouços usando a técnica de modelagem de deposição fundida, feitos de termoplástico de ácido polilático (PLA), incorporado com extrato de própolis da região de Arauca, na Colômbia, que apresentaram atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *S. epidermidis*, causadores de osteomielite [33].

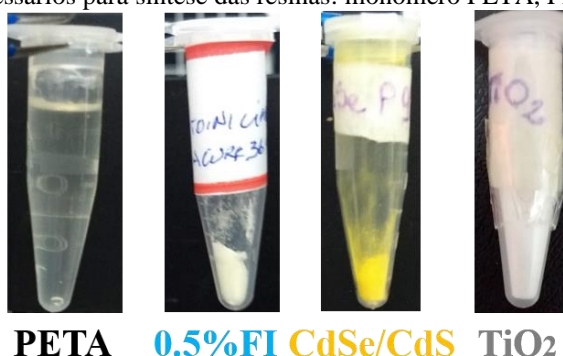
4.1.4 Síntese das resinas funcionalizadas

A síntese das resinas poliméricas com a incorporação de materiais de interesse, tais como fármacos, NPs, NCs, deve promover uma distribuição uniforme do nanomaterial na matriz polimérica e uma eficiente polimerização entre os componentes. Com base nessas informações, foram sintetizadas resinas do tipo negativas. Todas as amostras apresentadas nesta seção foram preparadas no Laboratório de Caracterização e Microscopia de Materiais do Grupo

de Ótica 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).

Para a preparação das resinas poliméricas incorporadas com os nanomateriais, são requeridos principalmente os seguintes materiais: monômeros no estado líquido e FIs, PQs de CdSe/CdS e NCs de TiO₂, todos em pó. Na figura 4.4(a), são mostrados no eppendorf alguns dos compostos necessários para a manipulação das resinas fotossensíveis.

Figura 4.4: Componentes necessários para síntese das resinas: monômero PETA, FI I369 e NCs de CdSe/CdS.



Fonte: Elaborado pela autora.

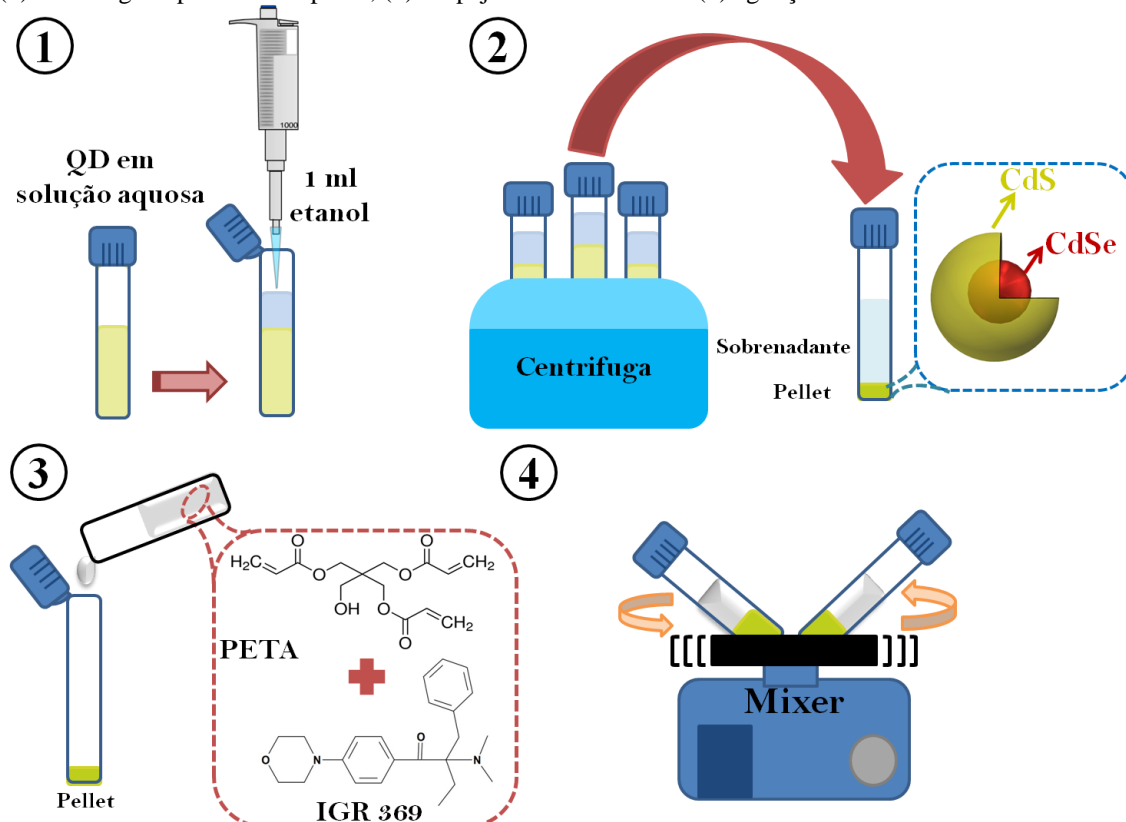
As resinas foram obtidas da seguinte maneira: em dois tubos de ensaio, foram despejados 10 ml do monômero PETA em cada um deles. Por meio de uma balança de precisão (0,0001 g), foi mensurada a massa do monômero. Tomando como referência a massa do monômero, acrescentaram-se 2,0% e 0,5% em massa do FI I369. Devido ao material ser altamente fotopolimerizável quando exposto à luz UV, todo o manuseado foi realizado sob lâmpada vermelha. Posteriormente, as concentrações de I369 foram diluídas na PETA por agitação mecânica contínua, utilizando um mixer para homogeneização das amostras, misturando lentamente durante aproximadamente 24 horas à temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C). Todos os produtos químicos foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

Com o objetivo de tornar a resina biocompatível e melhorar sua aplicabilidade na fabricação de arcabouços celulares 3D para o cultivo de células *in vitro*, utilizou-se uma baixa concentração de FI, apenas 0,5% em massa do I369, e incorporaram-se as NPs de CdSe/CdS.

Como ilustrado na figura 4.5, as NPs inicialmente estavam diluídas em uma solução aquosa armazenada em um eppendorf com uma concentração de 18 mg/ml. Desta forma, a solução aquosa foi distribuída em tubos Falcon para novas concentrações de (3, 6 e 9) mg/ml, com o auxílio de uma micropipeta. Posteriormente, foi necessário centrifugar as amostras aquosas para selecionar somente as partículas de interesse. Portanto, em cada tubo de ensaio,

foi adicionado 1 ml de álcool etílico, e os tubos foram centrifugados durante 5 a 10 minutos, com uma velocidade de 5000 rotações por minuto (RPM). Após o processo, ao pellet foi adicionado 1 ml da resina. Por fim, os tubos foram colocados no mixer por 24 h até que a solução estivesse totalmente homogênea.

Figura 4.5: Ilustração da síntese das resinas 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.



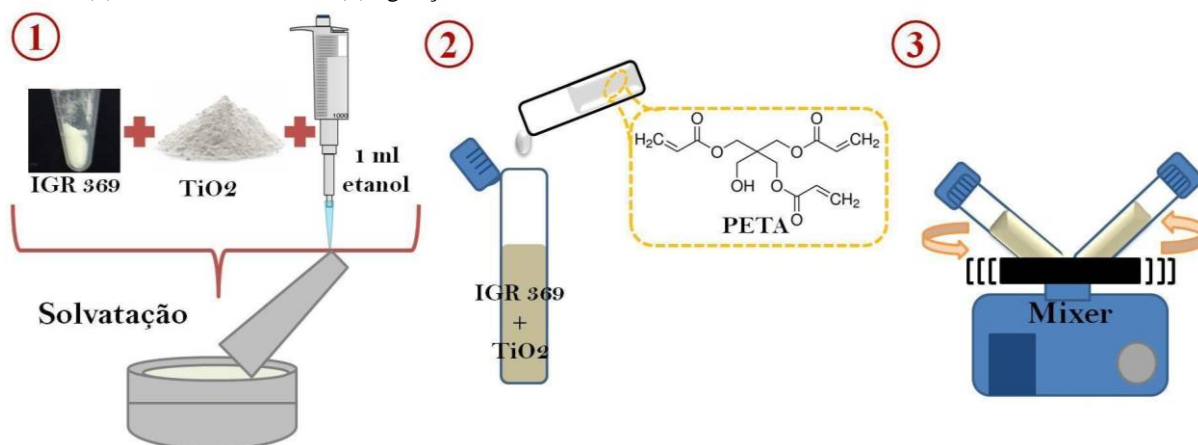
Fonte: Elaborado pela autora.

A incorporação das NCs de TiO_2 na resina ocorreu de maneira diferenciada, pois o composto I369 e o TiO_2 são insolúveis em água [34]. Ao realizar a mesma síntese descrita anteriormente, obteve-se uma solução heterogênea e instável, caracterizada por aglomerados de NCs de TiO_2 visíveis e dispersos no volume da amostra, que decantam. Logo, seguiu-se a preparação de acordo com o protocolo adotado por Chang e colaboradores [35].

Nesta síntese, o TiO_2 e o FI, ambos em pó, foram depositados no almofariz de ágata e dispersos em 1 ml de etanol. Em seguida, após a diluição dos NCs e do FI, iniciou-se a etapa de solvatação, até a evaporação do álcool. Portanto, espera-se que, na fase de solvatação, as forças de cisalhamento aplicadas na pasta viscosa, transformem-na em um pó uniforme, de modo que o TiO_2 e o FI se aderem e se liguem. Por fim, uma quantidade específica de PETA

foi adicionada à mistura em pó resultante, e a solução foi colocada para agitação contínua no mixer por 24 h. Na figura 4.6, é mostrada a representação esquemática da preparação das resinas com adição do TiO_2 .

Figura 4.6: Ilustração do processo de síntese das resinas incorporadas com TiO_2 : (1) solvatação do I369, NCs e etanol, (2) adicionado PETA e (3) agitação contínua.



Fonte: Elaborado pela autora.

As concentrações dos componentes usados nas sínteses das resinas foram organizadas na tabela 4.1 para melhor compreensão e foram nomeadas de acordo com seus componentes relevantes em abundância.

Tabela 4.1: Resinas sintetizadas à base do monômero PETA e do FI I369 incorporadas com PQs CdSe/CdS e NCs de TiO_2 .

Amostras	Compostos principais da resina				Incorporação de componentes para desempenhar propriedades específicas de biocompatibilidade			
	PETA (g)	SR499 (g)	I369 (%)	I2959 (%)	PQs CdSe/CdS (%)	TiO_2 (%)	NPs PV (%)	Razão entre FI/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)
P369/TiO ₂	12,04	-	0,5	-	-	0,5	-	(1:1)
P369/3TiO ₂	12,04	-	0,5	-	-	1,5	-	(1:3)
P59	1,0	-	-	1,0	-	-	-	(1:0)
S59		1,0	-	1,0	-	-	-	(1:0)
P59/TiO ₂	1,0	-	-	1,0	-	0,5	-	(1:0.5)
P59.2	1,0	-	-	2,0	-	-	-	(1:0)
S59.2	-	1,0	-	2,0	-	-	-	(1:0)
P59.2+P	1,0	-	-	2,0	-	-	1,5	(1:0.75)
S59.2+P	-	1,0	-	2,0	-	-	1,5	(1:0.75)

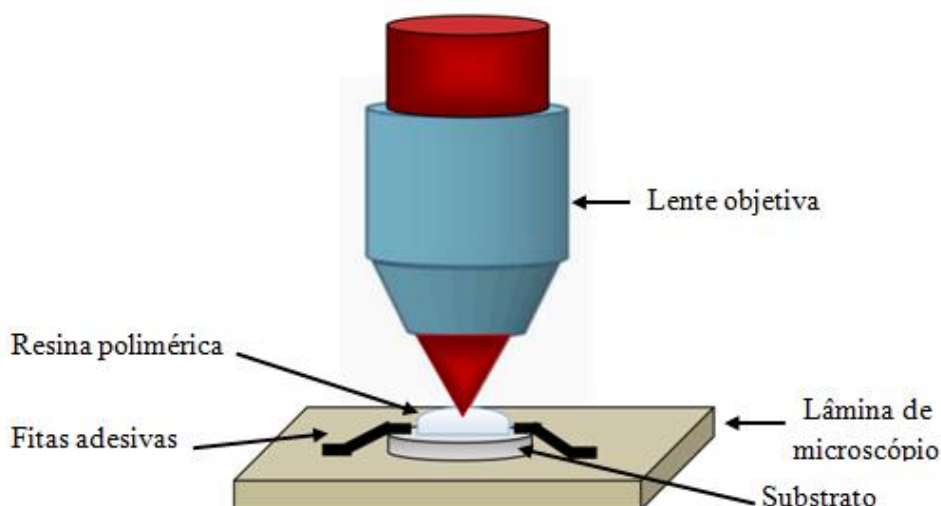
Fonte: Elaborado pela autora.

Os filmes poliméricos foram moldados em lâminas de vidro circulares (16 mm de diâmetro \times 0,6 mm de espessura) e polimerizados à luz UV por 20 minutos. Em seguida, as amostras foram cuidadosamente imersas em etanol por 20 minutos para retirar o material não polimerizado. Este processo foi repetido 3 vezes para garantir a remoção completa.

Após o preparo da síntese, realizou-se a limpeza das lâminas e das lamínulas de vidro que serão usadas durante a caracterização e na escrita dos arcabouços. Estas foram limpas com álcool isopropílico e colocadas no forno por 20 a 30 minutos a uma temperatura de 100 °C. Este procedimento assegura que as superfícies estejam livres de partículas de poeira que possam impedir a adesão da resina polimérica no substrato ou atrapalhar a visualização durante a microfabricação.

Posteriormente, uma pequena quantidade da resina é depositada sobre uma lamínula circular ou sobre um filme polimérico que será fixado o auxílio de fitas adesivas na superfície da lâmina de microscópio, configuração ilustrada na figura 4.7. Por fim, a lâmina é posicionada no suporte de translação e o próximo passo é iniciar a microfabricação.

Figura 4.7: Posicionamento da resina no sistema experimental.



Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

4.2 INFLUÊNCIA DOS PONTOS QUÂNTICOS SEMICONDUTORES ULTRA-PEQUENOS E DO DIÓXIDO DE TITÂNIO EM RESINAS POLIMÉRICAS

4.2.1 Espectro de fluorescência

Estudar a luminescência das resinas poliméricas é fundamental em pesquisas que exigem a visualização das interações célula-arcabouço, geralmente realizada por meio de microscopia de fluorescência.

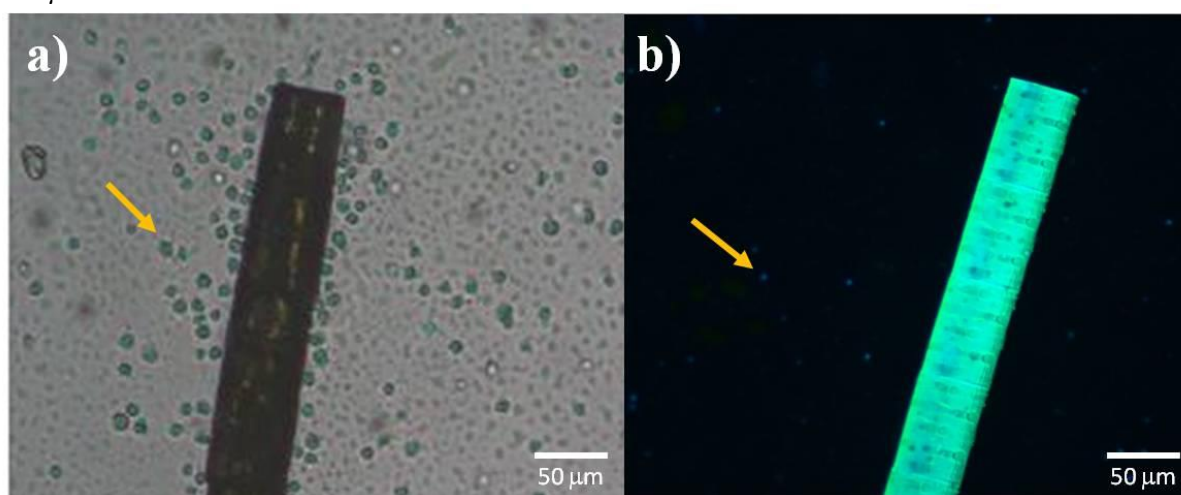
Para esse tipo de análise, são utilizados dois ou mais marcadores nas células-alvo, que permitem evidenciar algumas estruturas específicas dentro delas, como os núcleos, as membranas celulares, as organelas citoplasmáticas, entre outras. Dessa forma, para obter imagens precisas do comportamento celular em arcabouços 3D, é essencial que a fluorescência das microestruturas poliméricas não coincida com a faixa de comprimento de onda dos marcadores celulares, nem a exceda. Isso assegura que a visualização das células não seja prejudicada por interferências de fluorescência indesejadas.

Na prática, ao planejar a aplicação de resinas poliméricas em usos biológicos *in vitro*, essa informação é fundamental na escolha de um corante celular. Atualmente, já existe uma variedade de corantes, que apresentam diferentes comprimento de onda de excitação e emissão.

Um corante fluorescente frequentemente utilizado em pesquisas nas áreas biológicas, especialmente em estudos que envolvem o monitoramento da morfologia celular, é o DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), o qual exige excitação entre 345 nm a no máximo 358 nm, apresentando uma emissão máxima de 455 a 461 nm, na cor do azul [36].

Pode-se constatar, pela figura a seguir, que quando a banda de luminescência do corante utilizado nas células coincide com a da resina polimérica, as células dificilmente poderão ser avaliadas na superfície do arcabouço. Na figura 4.8(a), é mostrado um microtubo (60 μm de diâmetro) fabricado pela técnica P2F a partir da resina poli-isoprene adicionada com a PETA e 2% de I369. Na figura 4.8(b), é observada a luminescência do microtubo e do marcador com emissão próxima ao azul, utilizado nas células endoteliais da linhagem celular EA.hy926 (densidade celular: 3×10^5).

Figura 4.8: 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 μm .



Fonte: Elaborado pela autora.

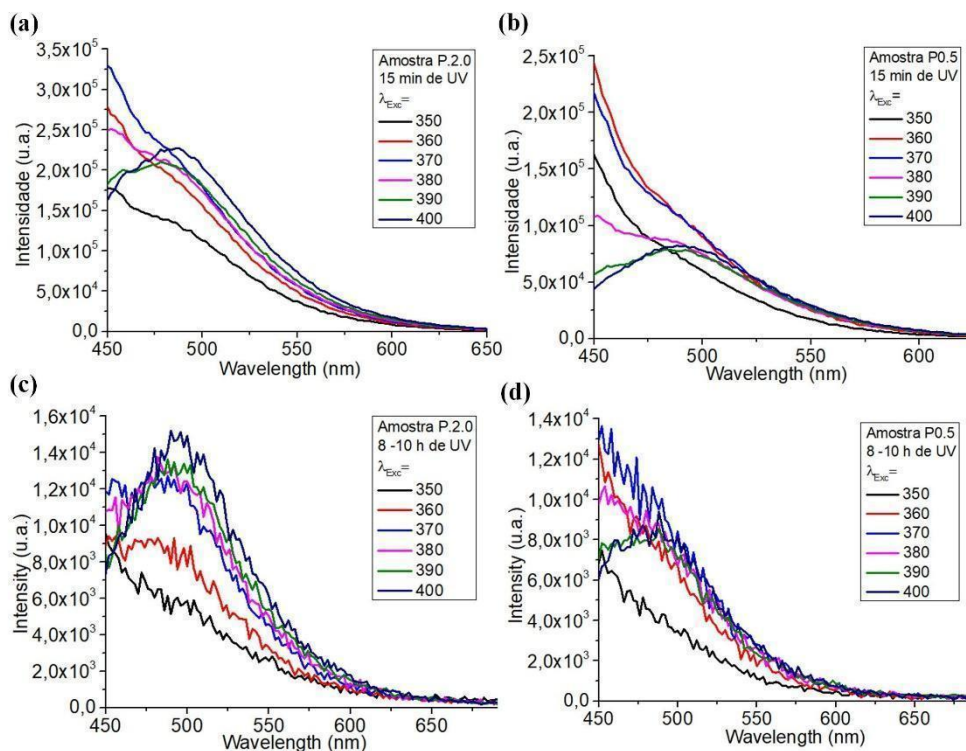
Portanto, torna-se essencial estudar a fluorescência desses materiais poliméricos e propor estratégias para mitigar possíveis interferências. A fluorescência das resinas poliméricas foi investigada em função do tempo de polimerização, utilizando amostras de monômero PETA com concentrações de 2,0% e 0,5% de FI I369, denominadas P2.0 e P0.5, respectivamente. As medições foram realizadas em um fluorímetro (Modelo Horiba Fluorolog), com lâmpada de xenônio como fonte de excitação. Para o experimento, as amostras foram divididas em dois grupos: o grupo 1 foi exposto à luz UV na câmara por 15 minutos, enquanto o grupo 2 permaneceu sob a mesma condição de 8 a 10 horas.

Após o término dos tempos de polimerização pré-estabelecidos, as lâminas com as amostras foram lavadas com álcool etílico. Em seguida, foram realizadas medições variando o comprimento de onda de excitação (λ_{Exc}) entre 350 e 400 nm, 410 e 490 nm, e 550 e 590 nm, conforme mostrado nas figuras 4.9 a 4.11. Esse procedimento teve como objetivo identificar a

luminescência das amostras em comprimentos de onda próximos aos de emissão dos marcadores comumente utilizados em imageamento celular.

Nota-se, pelas figuras 4.9 (a, b), que ao excitar as amostras P2.0 e P0.5 no λ_{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 a intensidade de luminescência das resinas P2.0 e P0.5, observa-se que ela está efetivamente relacionada à concentração do FI. Assim, uma amostra com elevada concentração do FI terá uma emissão de fluorescência mais intensa, em comparação com uma amostra em concentrações inferiores (quatro vezes menos). Isso ocorre independentemente do tempo de polimerização, como mostrado na figura 4.9(c, d).

Figura 4.9: Espectro de fluorescência das resinas fotossensíveis constituída de FI I369 dissolvido em PETA (P.2.0 e P.0.5) variado λ_{Exc} de 350 a 400 nm durante (a-b) 15 min e (c-d) 8-10 h no UV.



Fonte: Elaborado pela autora.

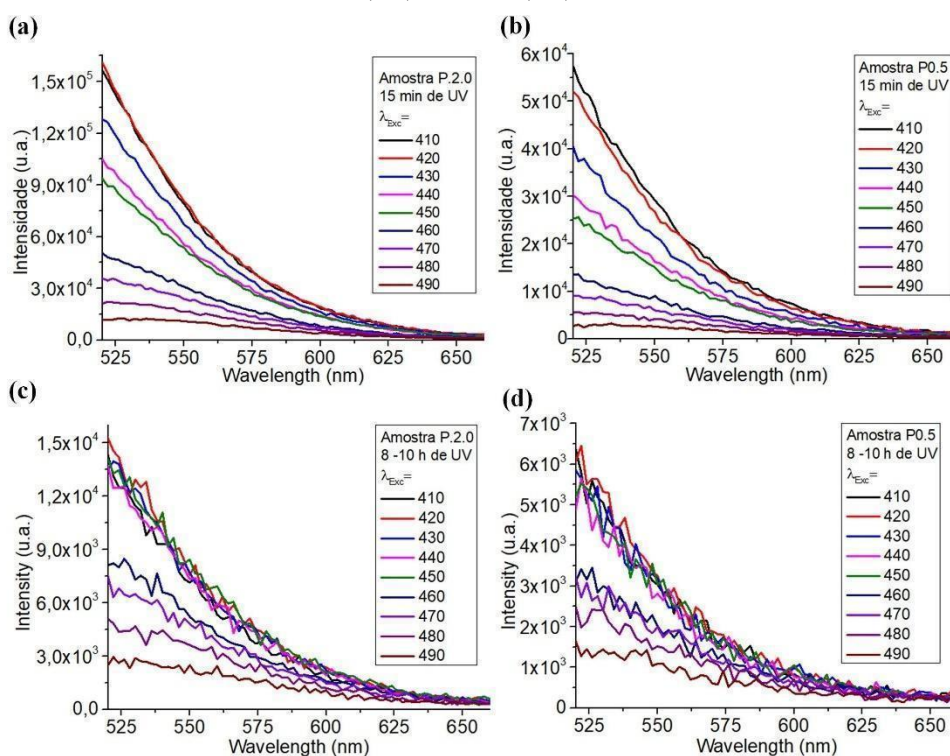
Observou-se que a intensidade da fluorescência das resinas varia de acordo com a duração da etapa de polimerização. Ao analisar o espectro de fluorescência das resinas fotossensíveis com $\lambda_{Exc} = 350$ nm, próximo da faixa da excitação máxima do DAPI, verificou-se que as amostras P.0.5 e P.2.0, polimerizadas por 15 min, apresentam intensa fluorescência com emissão em 450 nm. Entretanto, ao prolongar o período de exposição à luz UV, a

fluorescência diminui aproximadamente 95% e 96% em comparação à intensidade inicial para as amostras P.2.0 e P.0.5, respectivamente.

Esses dados abrem possibilidades para o desenvolvimento de estratégias que inibam consideravelmente a intensa fluorescência das resinas, quando for necessário utilizar marcadores celulares que emitem exatamente na mesma banda de emissão, como é o caso do DAPI. Portanto, uma primeira estratégia seria reduzir a concentração do FI para 0.5% e, após a etapa de microfabricação, expor as microestruturas fabricadas à luz UV por mais algumas horas (tempo mínimo de polimerização ≥ 8 h).

Nas figuras 4.10(a-d), são mostrados os espectros de fluorescência obtidos para excitação na faixa do azul, de 410 a 490 nm. Observa-se que as amostras emitem fortemente próximo ao verde, em 520 nm.

Figura 4.10: Espectro de fluorescência das resinas fotossensíveis constituída de I369 dissolvido em PETA (P.2.0 e P.0.5) variado λ_{Exc} de 410 a 490 nm durante (a-b) 15 min e (c-d) 8-10 h no UV.



Fonte: Elaborado pela autora.

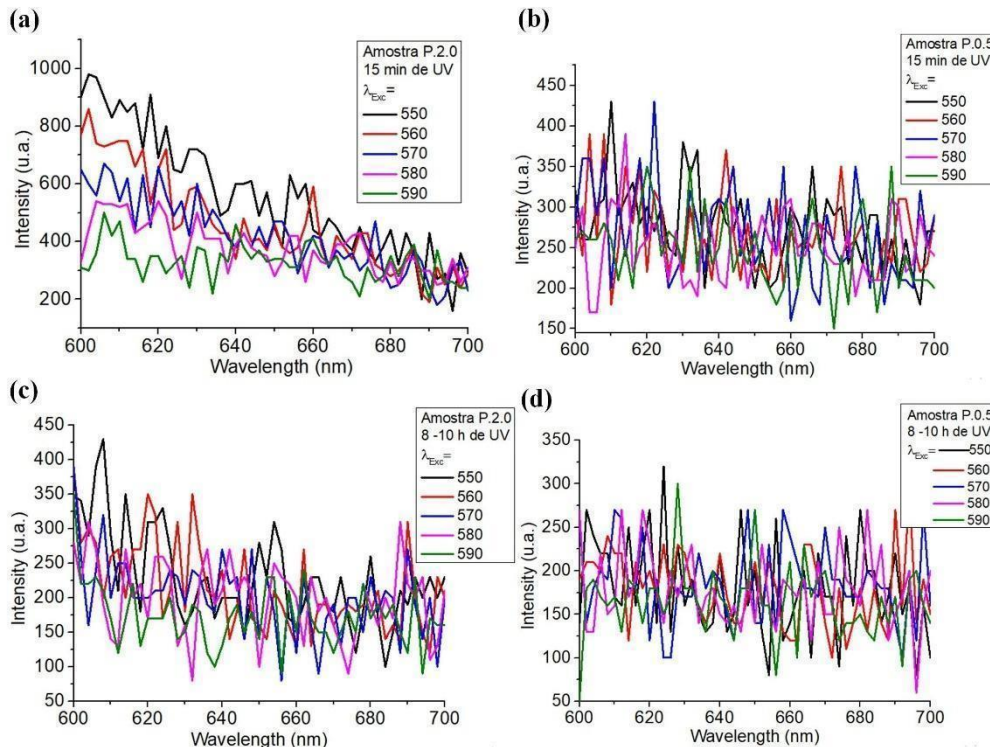
Comparando os espectros de luminescência para 15 min e 8-10 h de iluminação UV, fica claramente comprovada a diminuição da intensidade das curvas de fluorescência das amostras P.2.0 e P.0.5 em todos os comprimentos de excitação, conforme o aumento do tempo de polimerização.

Em especial, as curvas geradas pela excitação em 490 nm, próxima à excitação do corante Green CMFDA (5-chloromethylfluorescein diacetate) da linha CellTracker™, com excitação de 492 nm e emissão máxima de 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 dessas resinas, quando se reduz a concentração do FI durante a etapa de síntese e aumenta-se o tempo de fotopolimerização.

Nas figuras 4.11(a-d), são mostradas as curvas de fluorescência para excitação na faixa do verde ao amarelo, de 550 a 590 nm. Nota-se que as amostras não fluorescem no vermelho. Sendo assim, corantes que emitem na região do vermelho, como, por exemplo, o Red CMTX 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 na superfície dos arcabouços. As curvas de fluorescência, que já eram próximas de zero, diminuam ainda mais conforme o aumento do período de polimerização (8-10 horas).

Figura 4.11: Espectro de fluorescência das resinas fotossensíveis constituída de fotoiniciador (I369) dissolvido em PETA (P.2.0 e P.0.5) variado λ_{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 é o mais adequado na presença de amostras que contêm o FI I369 e o monômero PETA. Porém, seu

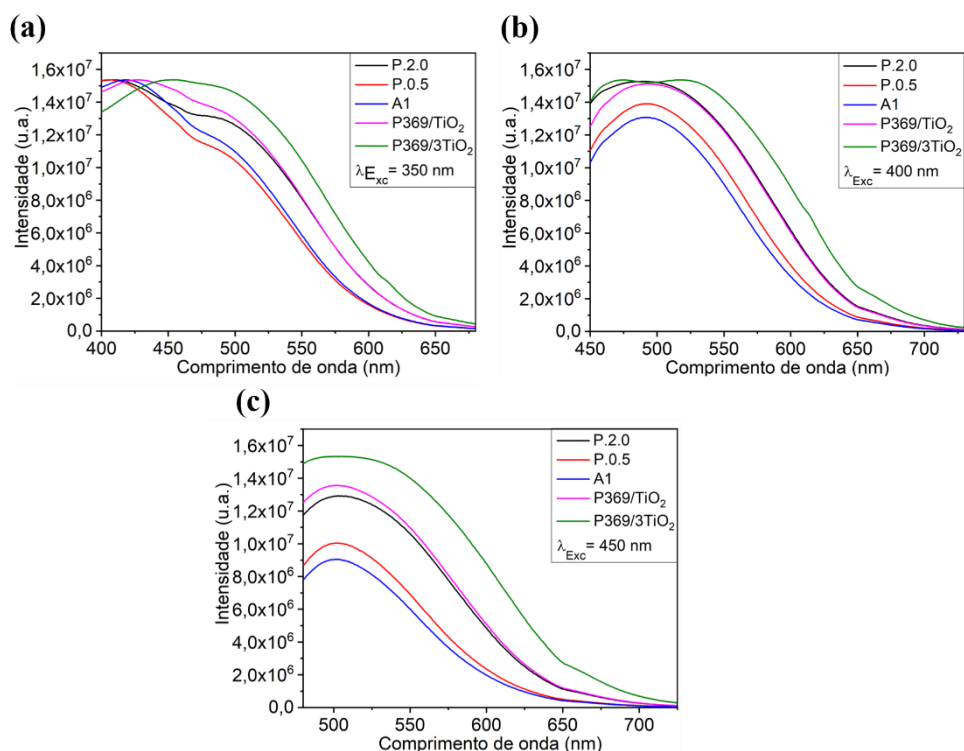
custo pode ser menos atrativo em comparação aos marcadores que emitem na faixa do azul ao verde. Nesta faixa de emissão, os resultados mostraram que as concentrações do FI e o tempo de polimerização podem ser ajustados para minimizar a luminescência.

Investigou-se como a presença das NPs CdSe/CdS e TiO₂ nas resinas sintetizadas altera suas propriedades ópticas. A caracterização dessas amostras, polimerizadas durante 30 min por iluminação UV, foi realizada no fluorímetro, variando o comprimento de onda de excitação de 350, 400 e 450 nm.

Para a amostra P369/3TiO₂, com adição de 1,5% de TiO₂, em todos os espectros de fluorescência das figuras 4.12(a-c), foi observado o aumento da luminescência com o aumento da concentração de TiO₂, bem como um alargamento da banda de fluorescência em comparação às amostras P.2.0 e P.0.5, sem o nanocristal. Além disso, para a amostra P369/3TiO₂, houve um deslocamento do pico, com desvio para o vermelho em relação às outras amostras e com emissão em 518 nm, conforme mostrado na figura 4.12(b).

Quando a amostra A1, com incorporação de 0,5% de CdSe/CdS, foi excitada em 400 nm (figura 4.12(b)) e 450 nm (figura 4.12(c)), observa-se uma sutil redução de sua luminescência em comparação com a amostra P.0.5. No entanto, para ambas as amostras, os picos de emissão permanecem inalterados em 491 nm ($\lambda_{Exc}=400$ nm) e 502 nm ($\lambda_{Exc}=450$ nm).

Figura 4.12: Espectro de fluorescência das resinas constituídas de I369 dissolvido em PETA (P.2.0 e P.0.5) com adição dos PQs (A1) e do TiO₂ (P369/TiO₂ e P369/3TiO₂) variado λ_{Exc} em (a) 350, (b) 400 e (c) 450 nm.



Fonte: Elaborado pela autora.

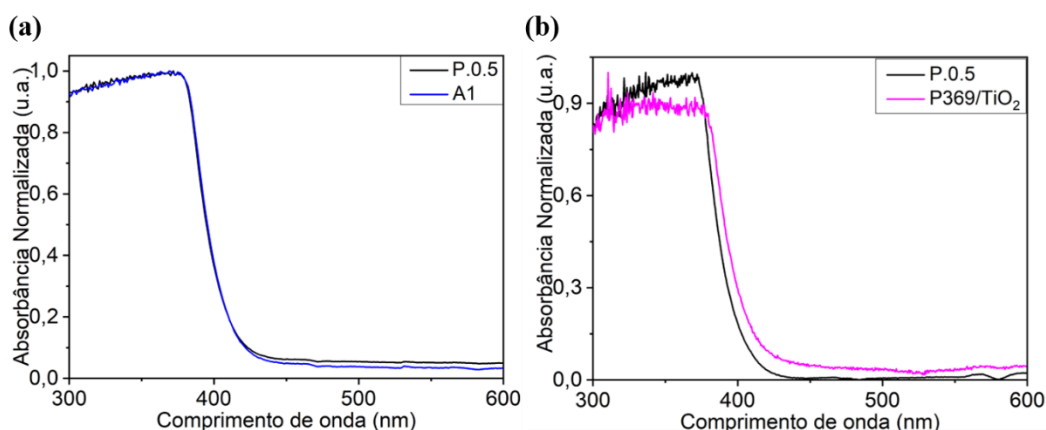
4.2.2 Espectro de absorção óptica

Ao combinar os NCs ou as NPs com a matriz polimérica, torna-se possível obter resinas opticamente homogêneas, com propriedades ópticas equivalentes às do material incorporado. Essas propriedades são associadas à flexibilidade e solubilidade fornecidas pelo componente polimérico, permitindo que a resina seja estruturada pelo sistema de microfabricação por escrita direta a laser.

Os espectros de absorção das resinas fotossensíveis não polimerizadas foram obtidos pelo espectrofotômetro UV-VIS-NIR (UV-3600 SHIMADZU), operando de 300 nm a 600 nm, com resolução espectral de 1 nm.

Sabe-se que o FI apresenta forte absorção na faixa do UV. Por isso, os materiais adicionados à matriz polimérica não podem inibir o processo fotoquímico de polimerização. Pelos gráficos da figura 4.13, comprova-se que não houve mudança na banda de absorção com a adição das NPs e dos NCs, uma vez que as resinas continuam absorvendo abaixo de 400 nm, como desejado.

Figura 4.13: Espectro de absorção pelo UV-Vis do FI (0.5% de I369) dissolvido em PETA na presença de (a) PQs CdSe/CdS e (b) TiO₂.



Fonte: Elaborado pela autora.

Embora as NPs de CdSe/CdS e TiO₂ puras absorvam na faixa do UV, não foi possível polimerizar resinas compostas apenas pelo monômero PETA e CdSe/CdS ou TiO₂, sem a utilização de um FI, independentemente dos parâmetros de escrita utilizados. Portanto, pode-se concluir que, na ausência do FI, as moléculas das NPs sozinhas não possuem uma seção de choque de A2F necessária para iniciar a etapa de radicalização dos monômeros.

4.2.3 Espectroscopia Raman

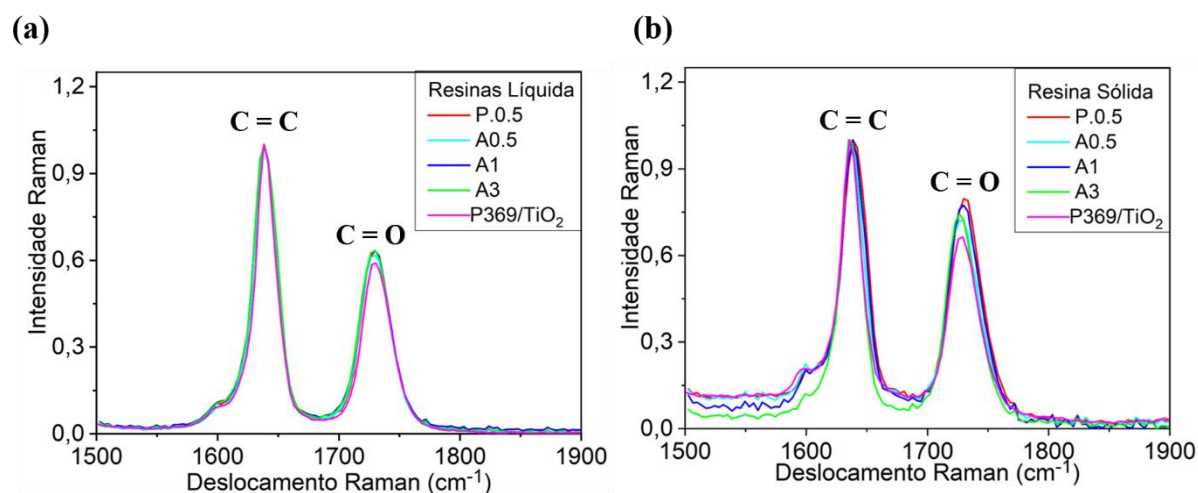
Para uma polimerização bem-sucedida dos compostos que compõem a resina, espera-se a máxima conversão das moléculas do FI e dos monômeros em polímeros. No entanto, dificilmente todos os monômeros acrilatos reagirão com o FI. Dito isso, é comum que permaneçam monômeros residuais no material final. Em aplicações biológicas, é recomendável um alto grau de conversão, pois as concentrações de monômeros residuais podem ter efeitos citotóxicos nas células [37].

Para mensurar o grau de conversão (GC) dos monômeros envolvidos na formação dos polímeros, utiliza-se o método por espectroscopia Raman, que, ao comparar o espectro Raman da resina não polimerizada com o espectro emitido das resinas polimerizadas, fornece informações para a realização do cálculo, conforme definido pela equação (10), descrita na seção 3.2.2 do capítulo anterior.

A intensidade Raman das amostras em suas condições originais (resina líquida) e das amostras modificadas sob iluminação UV durante 30 min (resina sólida) foi medida, à temperatura ambiente, com um LabRAM HR Evolution (HORIBA, Japão), operando no comprimento de onda de excitação usual de 785 nm, e com um espectrômetro JY-T64000 microRaman excitado por 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 resina.

Os espectros Raman das resinas estudadas são representados na figura 4.14. Neles, é mostrada a região espectral entre 1500 cm^{-1} e 1900 cm^{-1} para compreensão do processo químico de polimerização. As medições foram realizadas em amostras formuladas com resina à base de PETA: 0,5% de I369, contendo concentrações de 0,25% (A0.5), 0,5% (A1) e 1,5% (A3) em massa de CdSe/CdS, e com 0,5% (P369/TiO₂) em massa de TiO₂, relacionado à massa do monômero.

Figura 4.14: Espectros Raman de resinas com diferentes concentrações de NPs CdSe/CdS e TiO₂ em volumes (a) não polimerizados e (b) polimerizados por UV. São destacados os picos dos modos vibracionais de interesse.



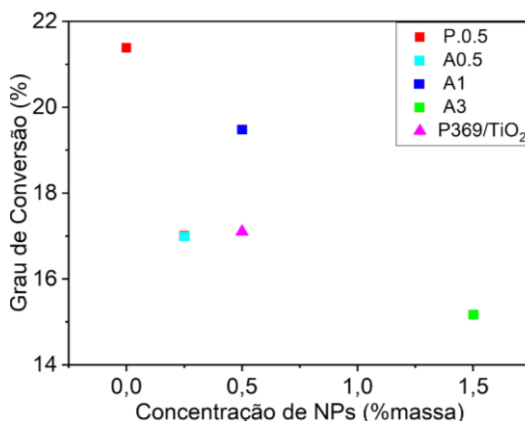
Fonte: Elaborado pela autora.

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

Note-se que, nos espectros, observam-se pequenos deslocamentos na região de 1730 cm^{-1} , que apontam possíveis variações no ambiente. Na figura 4.14(b), os gráficos são interpretados da seguinte forma: claramente, há um aumento na intensidade do pico 1730 cm^{-1} para a amostra P.0.5 (sem NPs) após a polimerização. Isso indica que mais ligações duplas entre carbonos foram rompidas durante o processo de polimerização. Entretanto, para amostras A0.5 e P369/ TiO_2 , a intensidade do pico 1730 cm^{-1} é muito inferior à das outras amostras, o que reflete uma menor conversão polimérica, já que menos ligações duplas entre carbonos foram quebradas no processo de radicalização da cadeia polimérica para surgir os centros ativos.

A partir deste método empregado, foram determinadas as porcentagens do GC em função da concentração de NPs, organizadas na figura 4.15. Observa-se que as NPs de CdSe/CdS e NCs de TiO_2 não contribuíram para melhorar o GC, pois para a 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_2 (% massa de NPs em relação à PETA).



Fonte: Elaborado pela autora.

No entanto, a amostra A1, com concentração de 0,5% de CdSe/CdS e 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 afetaram pouco o grau de conversão, já que o aumento da quantidade de NPs resultou em uma redução insignificante do GC.

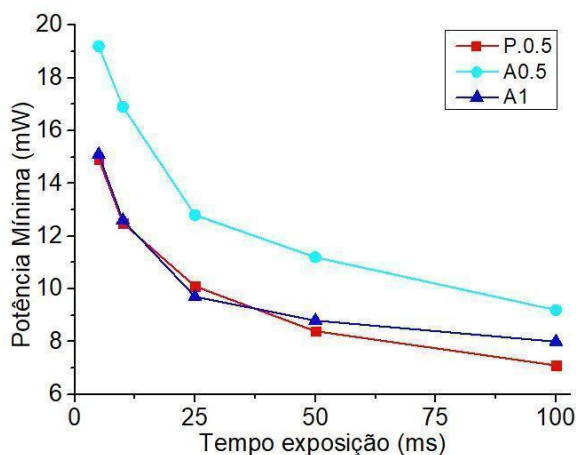
4.2.4 Potência limiar de polimerização

O limiar de polimerização na técnica P2F representa a intensidade mínima de luz abaixo da qual a taxa de polimerização não é alta o suficiente para produzir uma estrutura sólida (voxel). Assim, ao ajustar a intensidade de luz para um nível ligeiramente superior ao do limiar de polimerização, pode-se restringir o processo de fotopolimerização a um volume ainda menor, alcançando alta resolução.

De modo a entender como os PQs interferem no processo de polimerização, foi investigado qual a menor potência capaz de polimerizar um pequeno volume visível (voxel) no interior das amostras. Nos procedimentos experimentais, foi utilizada uma lente objetiva de microscópio de 40X (NA = 0,65, Newport) e o comprimento de onda foi fixado em 750 nm para todas as amostras. Em seguida, variou-se o tempo de exposição entre 5 ms a 100 ms e anotou-se em qual potência surgia o primeiro voxel.

Na figura 4.16, observa-se que a potência mínima deve ser aumentada para desencadear o processo de fotopolimerização para a amostra A0.5 (0,25% de CdSe/CdS). Isso indica que parte da energia incidida na amostra é absorvida pelas NPs sem que haja a polimerização. Essa informação reflete-se 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 as mesmas quantidades de CdSe/CdS e de FI, não houve grandes variações na sua potência mínima quando comparada à amostra P.0.5. Dessa forma, este resultado confirma o motivo de o valor do grau de conversão das duas amostras serem mais próximos, pois, para um tempo de exposição de 5 ms e 100 ms, é possível polymerizar ambas amostras com 15 ± 1 mW e $8,0 \pm 9$ mW, respectivamente. Para todas as amostras, como esperado, é notável que, ao aumentar o tempo de exposição, fica mais fácil polymerizar o material, e é preciso reduzir cada vez mais a potência mínima.

4.2.5 Investigação da influência dos parâmetros de escrita

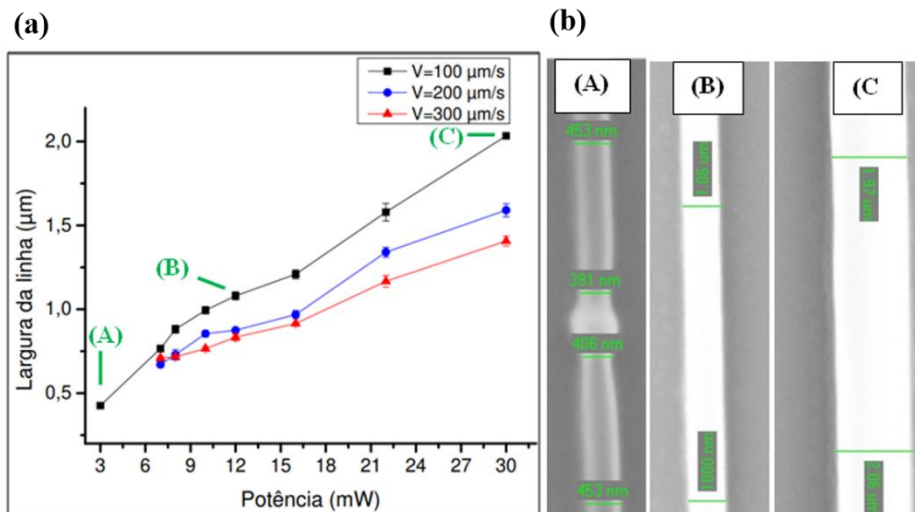
Conhecer o tamanho do voxel formado pelo processo de P2F é essencial na microfabricação, pois ele é a menor unidade polymerizada a cada exposição do pulso de luz na resina. Em geral, essa informação é crucial durante o processo de programação da microestrutura e no planejamento do desenho 3D para definir a distância entre um voxel e outro voxel pré-existente. Portanto, saber as resoluções transversal e longitudinal do voxel ajuda a definir 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), abertura numérica (NA) da lente objetiva e tempo de exposição (t_{exp}), estão associados à resolução longitudinal (altura do voxel) e à resolução transversal (largura do voxel) de um determinado elemento polymerizado.

Na figura 4.17, são mostradas as larguras das linhas construídas em função de diferentes potências do laser e da velocidade de escrita. É notório que a potência e a largura das linhas são diretamente proporcionais. No procedimento experimental de P2F, para uma $V = 100 \mu\text{m/s}$ e $t_{exp} = 10$ ms, com uma $P = 30$ mW, foi obtido uma largura de $2,1 \mu\text{m}$, e para uma potência dez vezes menor, obteve-se uma largura de linha menor, sendo de apenas 425 nm ($P = 3$ mW).

Há uma relação inversamente proporcional entre a velocidade de escrita e a largura da linha. Ao fixar a P em 12 mW e variar a V em 100, 200 e 300 $\mu\text{m/s}$, obteve-se a maior resolução para a 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 μm de comprimento na resina.

Figura 4.17: (a) Largura de linha fabricadas na resina P.0.5 e (b) para diferentes $P = 3\text{--}30$ mW e $V = 100\text{--}200$ $\mu\text{m/s}$.

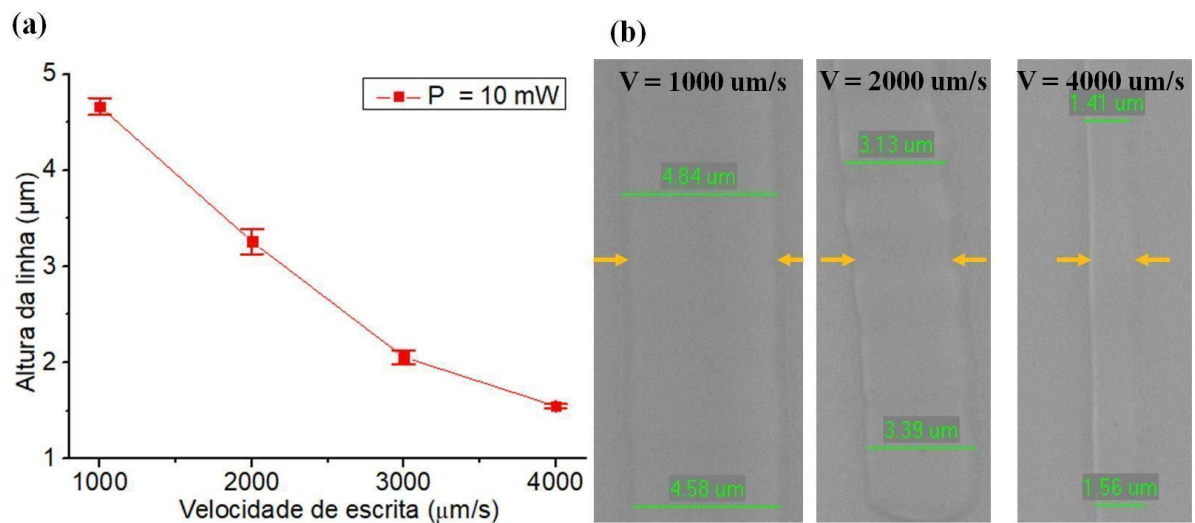


Fonte: Elaborado pela autora.

A fim de obter resoluções progressivamente maiores, foi usado $P = 10$ mW, e a V foi variada de 1000 $\mu\text{m/s}$ a 4000 $\mu\text{m/s}$, com $\Delta V = 1000$ $\mu\text{m/s}$, de modo que cada linha fosse polimerizada com uma energia diferenciada. Na figura 4.18, os resultados mostram que a menor altura de linha alcançada foi de 1,55 μm para a velocidade de 4000 $\mu\text{m/s}$, como esperado. Para a velocidade de 2000 $\mu\text{m/s}$, a altura de linha obtida foi de 3,26 μm .

As imagens de MEV figura 4.18(b) mostram as medidas da parte lateral de cada linha que virou no substrato (é possível ver as ondulações), mas presas por uma das extremidades na coluna de apoio, por isso é nítido a diferença no índice de refração nas figuras 4.17(b) e 4.18(b).

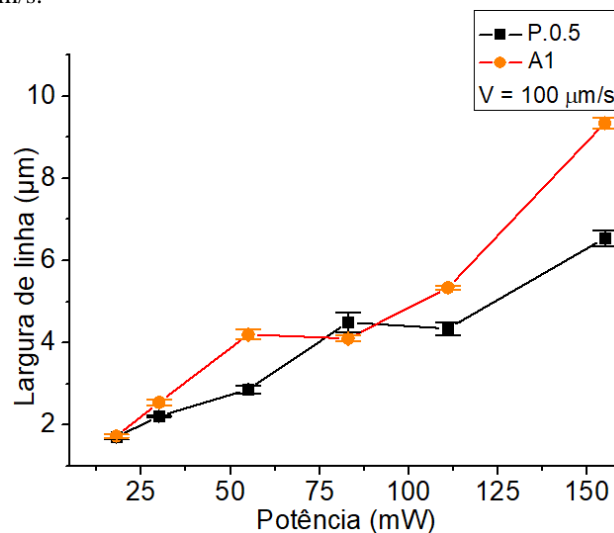
Figura 4.18: (a) Gráfico da altura de linhas fabricadas em diferentes velocidades. A Potência é fixada em 10 mW. (b) Caracterização das alturas das linhas por MEV.



Fonte: Elaborado pela autora.

Foi investigado também como as NPs de CdSe/CdS interferem na dimensão da largura de linha na resina A1. Observa-se, pela figura 4.19, que o comportamento obtido entre a largura das linhas e a potência é semelhante ao discutido anteriormente. Os resultados indicam que, ao adicionar as NPs na matriz polimérica contendo monômero PETA e FI I369, houve um aumento significativo na largura das linhas.

Figura 4.19: Largura de linha fabricada com a resina A1 para potência variando entre 20 a 160 mW e velocidade de escrita fixada em 100 μm/s.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.2.6 Ensaios Biológicos

A possibilidade de fabricar microestruturas 3D complexas e de alta resolução, feitas de resina fotossensível com propriedades funcionais, representa um passo importante para a integração dessa ferramenta em aplicações biológicas. Por meio da técnica P2F, pode-se

explorar seu potencial para biomimetizar microambientes da matriz extracelular, criando espaços 3D para cultura de células que favorecem o estudo de diversos tecidos biológicos aplicáveis à engenharia de tecidos.

Os ensaios biológicos têm sido amplamente utilizados para avaliar os efeitos citotóxicos de diferentes compostos presentes em resinas [38], incluindo investigações sobre as NPs de TiO_2 e suas ações em meio celular [39]. Os estudos *in vitro* oferecem diversas vantagens, pois contribuem para aumentar o conhecimento sobre o possível risco tóxico associado à exposição dessas NPs às células-alvo.

4.2.6.1 Avaliação da viabilidade celular

A citotoxicidade das amostras e a viabilidade celular foram mensuradas 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 UFAL.

Optou-se por não utilizar o ensaio de viabilidade celular por MTT (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) para analisar a biocompatibilidade das resinas, uma vez que esse método realiza uma leitura da absorbância da superfície da amostra. Assim, devido à densidade óptica dos filmes de resina, haveria interferência na obtenção dos dados.

As primeiras amostras consistiram em concentrações de 2,0% e 0,5% do I369, com o intuito de verificar a citotoxicidade em altas e baixas concentrações do FI, mas também avaliar a capacidade de estimular a proliferação celular. Em seguida, mantendo fixa a concentração do I369, foram analisadas amostras em que as concentrações das NPs de CdSe/CdS amarelas (A1 e A2) e de TiO_2 (P369/ TiO_2 e P369/3 TiO_2) foram variadas, conforme mostrado na tabela 4.1.

Neste estudo, amostras com diferentes resinas foram preparadas em placas de cultura com 96 poços para a realização da cultura celular durante 24, 48 e 72 horas. Cada amostra foi repetida quatro vezes para confirmar os dados coletados. Em um ambiente na ausência de luz UV, para evitar a fotopolimerização, foi depositado um volume pré-determinado de cada resina nos poços, com o auxílio de uma micropipeta. Em seguida, as placas foram polimerizadas sob irradiação UV de uma lâmpada negra durante 3 horas, a uma distância de 30 cm da fonte de luz.

Após esse processo, todas as amostras nos poços foram lavadas com álcool etílico por 30 minutos para diluir os componentes residuais que não participaram das reações químicas. Apenas a amostra P.2.0 (H_2O) foi lavada com água destilada e deixado agir por 4 dias, para

avaliar o potencial de redução da citotoxicidade, conforme o 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) e 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) e glicose (1 g/L). As células foram mantidas em estufa úmida a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ até atingirem a confluência necessária para a execução dos experimentos.

Para o início da análise da interação celular, os poços foram primeiramente esterilizados. 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 (10⁴) foram semeadas em cada poço e mantidas sob condições de cultura por 24h, 48h e 72h.

Após cada intervalo de cultivo das células na superfície das amostras, os poços foram lavados com meio DMEM, e as células recuperadas foram transferidas para tubos eppendorf. Alíquotas de 10 µL da suspensão celular foram homogeneizadas com 10 µL de corante azul de tripan.

Em seguida, 10 µL dessa mistura foram depositados em uma câmara de Neubauer para a observação de alterações morfológicas e a realização da contagem de células viáveis. As células viáveis, que não absorveram o corante, apresentavam aspecto translúcido, enquanto as células mortas mostravam coloração arroxeada. O experimento foi realizado em triplicata. Tornou-se possível, a partir deste método, mensurar a quantidade de células vivas expostas às superfícies de diferentes amostras de polímeros funcionalizadas com incorporação de NPs.

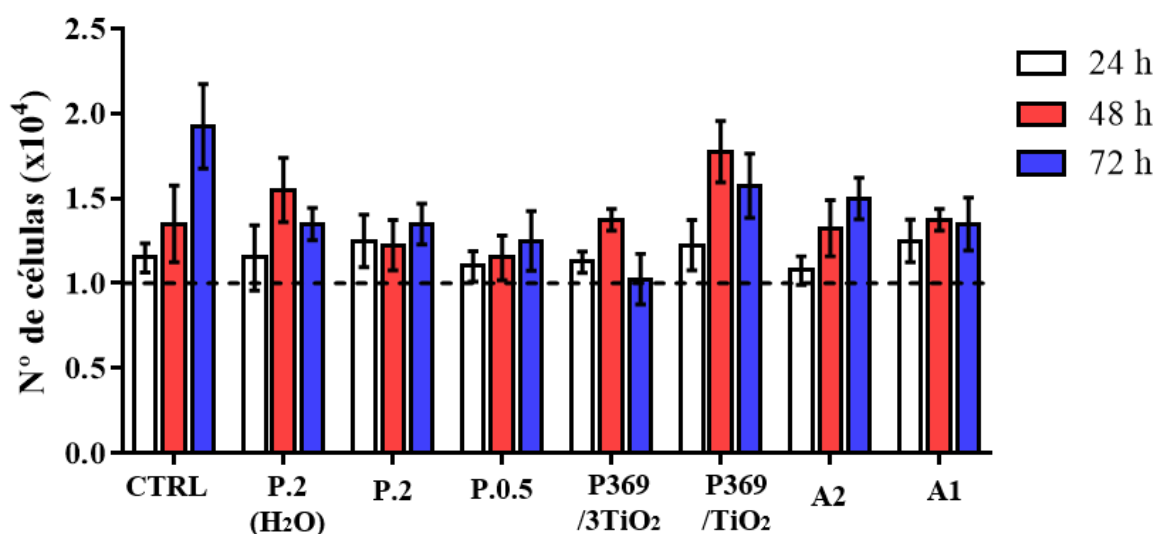
Na figura 4.20, é apresentado o número de células viáveis para cada resina. Nota-se que o grupo controle (CTRL), que continha células cultivadas em poços sem resina, exibiu um aumento progressivo no número de células, com crescimento aproximadamente linear ao longo do tempo. Este resultado indica um comportamento proliferativo.

Ao avaliar os efeitos das resinas sobre as células, pode-se interpretar que nenhuma das resinas induziu uma alta taxa de morte celular, pois, de acordo com o ensaio biológico, a viabilidade não apresentou níveis inferiores ao número inicial de células.

Pode-se concluir que as resinas promoveram proliferação celular. Os resultados do ensaio biológico indicam que a taxa de proliferação foi superior à taxa de mortalidade, demonstrando uma viabilidade celular aceitável, já que a quantidade de células após 48h de cultura foi maior do que o número inicial de células.

Entretanto, ao observar as interferências das amostras no comportamento proliferativo em comparação com o grupo controle, é possível notar que a amostra P369/3TiO₂ teve uma interferência mais intensa na redução da viabilidade das células, que resultou em uma diminuição no número de células viáveis após 72h. Por outro lado, as demais resinas, incluindo P.2(H₂O), P369/TiO₂, A2 e A1, promoveram um aumento na taxa de proliferação celular.

Figura 4.20: Efeito das amostras de resina 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 resina P369/TiO₂, com 0.5% I369 e 0.5% TiO₂, teve o melhor desempenho quanto à proliferação celular, posto que o número de células viáveis foi superior ao CTRL durante 48 horas. Este dado indica que esse composto sustenta a proliferação celular, pois somente após 72 horas houve diminuição do número de células viáveis. Uma possível justificativa para o excelente comportamento dessa resina está amparada na comprovada biocompatibilidade dos NCs de TiO₂, como também devido ao seu grande potencial para aplicação na regeneração de tecidos ósseos (formados por células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos presentes na matriz celular do tecido ósseo) [40], uma vez que eles promovem a osseointegração e previnem a adesão bacteriana.

É importante ressaltar que, durante os experimentos, ficou nítida a interferência das resinas no comportamento de adesão das células. Houve uma dificuldade das superfícies em promoverem a adesão celular. Essa configuração já foi relatada em outros estudos com resinas contendo materiais formados por monômeros acrilatos [41], nos quais cabe a 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.

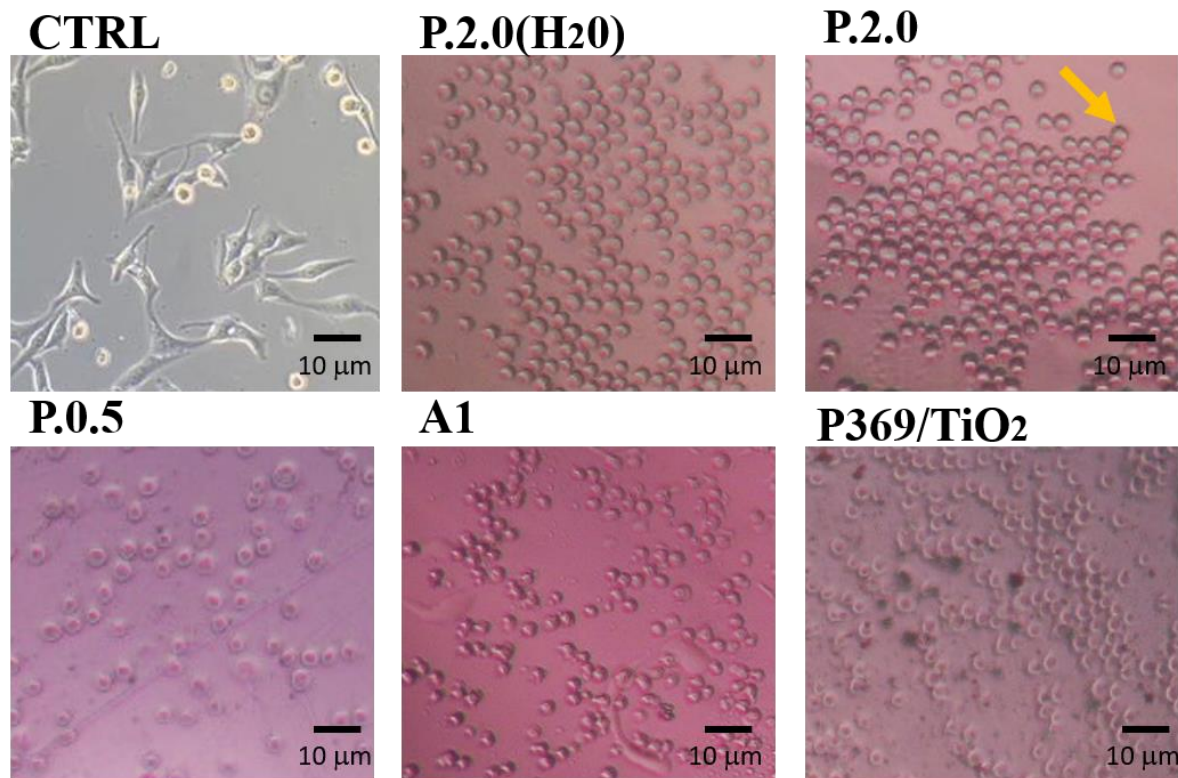
Ao verificar a proliferação das células em amostras contendo diferentes concentrações do FI, foi notório que as resinas com elevadas quantidades de FI (2%) e menores quantidades (0.5%) não resultaram em níveis mais altos de citotoxicidade, pois, em relação ao número de células, foram aproximadamente iguais. Todavia, a dinâmica do comportamento proliferativo da amostra P.0.5, em comparação à P.2.0, demonstrou um aumento linear significativo com o decorrer do tempo de incubação, de 24 para 72 h, conforme o padrão observado no grupo CTRL.

Além disso, os resultados mostraram que, na amostra P.2.0 (H₂O), em que a água destilada foi usada na etapa de retirada dos resíduos, houve um aumento no número de células viáveis em 48 h, que foi superior ao da amostra P.2.0. A água destilada ajudou a reduzir a quantidade de componentes tóxicos solúveis em água [42]. A diminuição do número de células ocorreu apenas após 48 horas.

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

Nas imagens obtidas no microscópio óptico, mostradas pela figura 4.21, é possível observar as células MG-63 em contato com as amostras na placa de 96 poços, o que confirma os resultados anteriores, revelando que as resinas investigadas não têm efeito citotóxico.

Figura 4.21: Ensaio biológico das células Osteoblastos (indicada pela seta em amarelo) semeadas após 48 h em amostras contendo 2% de I369 (P.2 e P.2 (H₂O)), 0,5% de I369 (P.0.5, A1 e P369/TiO₂) e poliestireno (CTRL). Barra de escala = 10 μ m.



Fonte: Elaborado pela autora.

Percebe-se que as células possuem comportamento proliferativo, porém não conseguem se diferenciar morfológicamente sobre os filmes, como ocorre no grupo CTRL. Este resultado característico também foi observado em outros trabalhos [3] que utilizaram concentrações de 2% a 0.5% do FI I2959 e um monômero acrilato. O monômero acrilato é apontado como o causador, pois, embora não seja nocivo à proliferação das células, impede o espreado, o que resultaria na diferenciação morfológica das células.

Por esse motivo, as células cultivadas em amostras à base de PETA e I369 exibem morfologia arredondada. Esse comportamento das células sugere que houve má fixação das células na superfície de contato.

Diante disso, no tópico 4.4 serão apresentados os resultados do segundo trabalho desenvolvido nesta pesquisa, que propôs um método simples, ecológico, rápido e de baixo custo para modificar as propriedades físico-químicas das superfícies, visando melhorar a fixação celular nas superfícies poliméricas e garantir sua aplicação na engenharia de tecidos.

4.3 RESPOSTAS BIOMECÂNICAS E MORFOLÓGICAS DE CÉLULAS OSTEÓBLASTOS CULTIVADAS EM ARCABOUÇOS MICROGROOVES FABRICADOS POR MICROFABRICAÇÃO A LASER

4.3.1 Efeito dos arcabouços nas respostas celulares

Um dos principais objetivos dos arcabouços é reproduzir o mais fielmente possível as propriedades físico-químicas e as características essenciais de um ambiente celular específico, levando em consideração suas limitações. Assim, as células-alvo, a resina e o 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 ósseas, mas também a escolha dos métodos de análise e das 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 relacionada a algum ambiente natural das células escolhidas na pesquisa. Logo, tanto no segundo quanto no terceiro elemento, novas rotas de síntese podem ser criadas para influenciar a melhoria do desempenho biológico do polímero, e diferentes modelagens 3D podem ser exploradas [43].

Neste contexto, osteoblastos humanos da linhagem MG-63 foram escolhidos como células-alvo, foi proposto sintetizar uma resina biocompatível à base de NCs de TiO_2 , com o objetivo de construir arcabouços que pudessem reproduzir os arranjos das fibrilas de colágenos presentes em excesso na matriz extracelular (MEC) do tecido ósseo [44]. Usando os mecanismos de microfabricação por escrita direta a laser, a técnica aditiva permite simular no arcabouço algumas das características essenciais das estruturas de fibrilas de colágeno naturais.

Dentre os tipos de células que participam da formação do tecido ósseo, os osteoblastos são responsáveis pelo processo de sintetizar e secretar os componentes orgânicos da matriz óssea, atuando principalmente na produção da atividade enzimática de Fosfatase Alcalina (ALP), além de proteínas como a osteocalcina (OC) e colágeno tipo 1 (Col-1) [45].

A implementação de design de arcabouços celulares com estímulos caracterizados por rugosidades e topografias na mesma ordem de magnitude das células é um método promissor para promover a resposta celular, incluindo 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 [46], pois contribui para o desenvolvimento de novos modelos e materiais funcionalizados aplicados na adequação e melhoria de 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 3D tem a finalidade de servir como suporte apropriado para a proliferação, adesão e diferenciação osteogênica, exercendo funções semelhantes às do tecido ósseo original e permitindo ser substituído no local danificado (enxerto ósseo), assim como os implantáveis metálicos (titânio e suas ligas, ligas de cobalto-cromo, entre outros) [47]. Ambos são dispositivos utilizados como estratégias que colaboram no processo da regeneração óssea [48].

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) ao tecido ósseo existente. É desejável que as células do organismo vivo interajam e se conectem com a superfície do implante, para desempenhar alta adesão e crescimento ósseo ao redor do implante durante o processo de consolidação óssea [49].

Entende-se que, durante a etapa da regeneração óssea, os osteoblastos direcionam a produção da matriz óssea mineralizada. Esse processo permite que as células interajam com íons inorgânicos, proteínas e fosfato de cálcio. Posteriormente, ocorre a diferenciação dos osteoblastos em osteócitos e, por fim, o processo de remodelação da matriz óssea é realizado pelo conjunto de células osteócitos [45].

Portanto, os ensaios biológicos *in vitro*, sob influência dos arcabouços, auxiliam na otimização de parâmetros, como a geometria, a rugosidade, a topografia e a compatibilidade dos compostos químicos [48] 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 a 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 exhibe melhores resultados, pois admitem que as células ósseas se reorganizem e cresçam de acordo com as características da microestrutura, além de contribuir para a resposta celular, influenciando a adesão, morfologia e proliferação das células conforme os parâmetros geométricos do arcabouço.

4.3.2 Design e fabricação de arcabouços celulares

Nesta pesquisa, é apresentado um arcabouço celular tridimensional do tipo microgroove, fabricado a partir das resinas P369 e P59, incorporadas com 1% de NCs de TiO_2 . O arcabouço foi produzido utilizando o sistema de microfabricação por escrita direta a laser, com a técnica de P2F. Optou-se por construir esses arcabouços em cima de um substrato feito da própria substância, devido à vantagem de garantir a máxima fixação dos microambientes ao filme de resina.

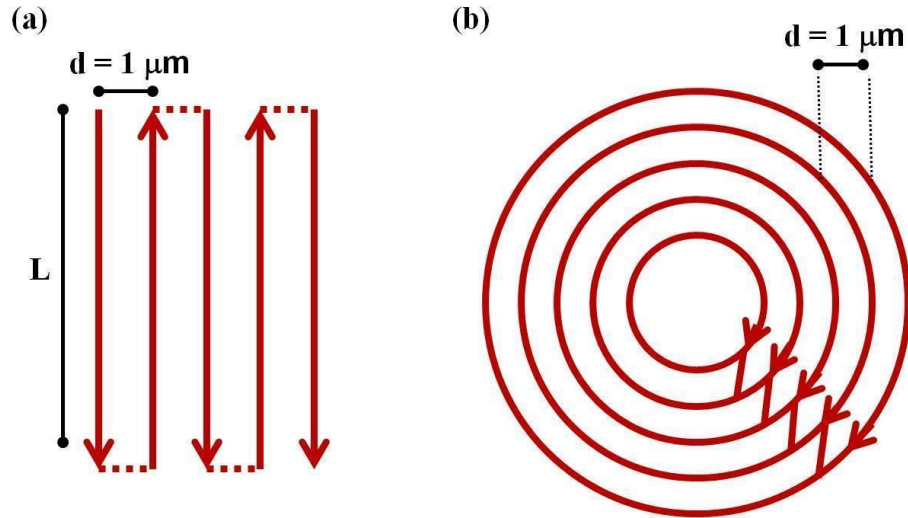
Para fabricação desses arcabouços, conhecidos como microgrooves ou simplesmente grooves do tipo retangular e circular, destinados ao estudo da regeneração óssea, várias técnicas já foram utilizadas, como o uso de moldes na fotolitografia pelo método de fundição por fusão [50], fotolitografia combinada com o método de estampagem a quente (hot embossing) [51] e escrita por impressora 3D [52]. No entanto, até o momento, a técnica P2F tem sido pouco explorada para este propósito.

Para iniciar a etapa de construção dos arcabouços Microgrooves Retangulares (denominados MGR) e Microgrooves Circulares (referidos MGC), é necessário programar, em um software de modelagem 3D, as trajetórias que o feixe laser deverá percorrer. Foram utilizados os recursos disponíveis no próprio software de microfabricação *nFab*, que possui uma aba específica para criar e editar o design das microestruturas.

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

Na prática, essas linhas, como mostradas na figura 4.22, ficarão bem unidas com o intuito de obter uma camada preenchida. Por isso, foi colocado entre elas apenas $1\ \mu\text{m}$ de distância, considerando que a largura da linha é de aproximadamente $2\ \mu\text{m}$ e a altura da linha é de $8\ \mu\text{m}$, utilizando os seguintes parâmetros: $\text{NA} = 100\times$, $P = 62\ \text{mW}$ e $V = 250\ \mu\text{m/s}$, de acordo com testes semelhantes aos realizados na seção 4.2.4. Em cada linha em vermelho, há setas indicando o sentido e direção do movimento do laser durante a escrita. As linhas contínuas representam as regiões em que a resina é polimerizada, enquanto as linhas tracejadas correspondem ao caminho percorrido pelo laser com o Shutter fechado, sem que haja modificação do material.

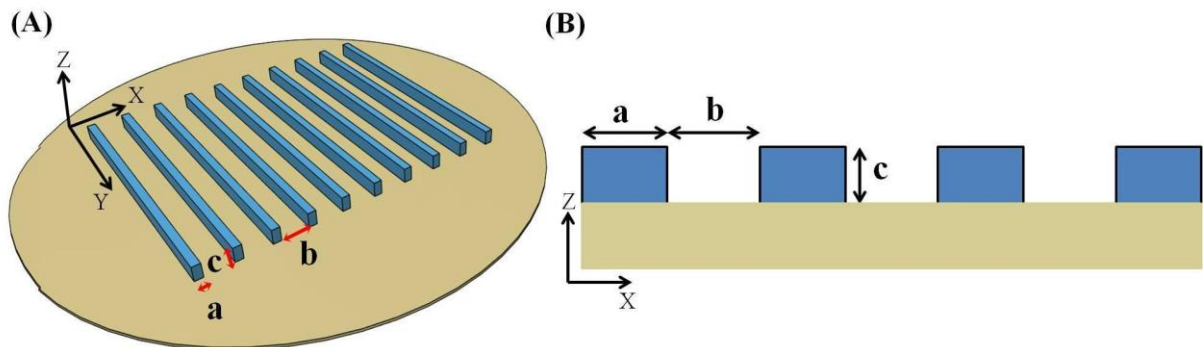
Figura 4.22: Esquema representa direção e sentido da trajetória do laser focalizado na resina para confeccionar uma camada formada por (a) linhas paralelas e (b) espiral.



Fonte: Elaborado pela autora.

Em seguida, para alcançar a altura da coluna (c) desejada, repetiu-se duas vezes o conjunto de cinco linhas ao longo do eixo $+z$, camada sobre camada com um deslocamento de $\Delta z = 3 \mu\text{m}$ por repetição. Por fim, basta repetir esse conjunto de cinco linhas ao longo do eixo x , com espaçamento definido entre elas, para determinar a largura dos grooves (b), conforme ilustrado na figura 4.23.

Figura 4.23: (A) Esquema ilustrativo dos microgrooves fabricados sobre a superfície do substrato (resina), a: largura da coluna; b: largura do groove; c: altura da coluna; (B) Vista da seção transversal no plano zx .



Fonte: Elaborado pela autora.

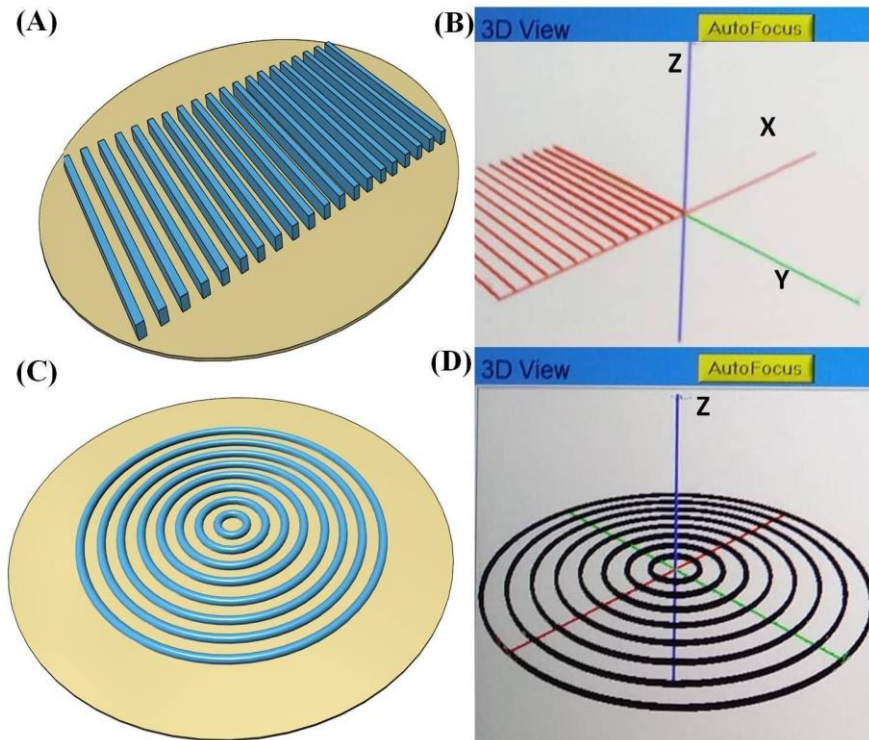
A modelagem 3D dos microgrooves circulares foi realizada utilizando a função “Spiral”, que permite definir uma espiral centrada na origem $(x, y, z) = (0, 0, 0)$ no plano XY . A espiral inicia com um raio inicial e prossegue no sentido horário por um número específico de revoluções, com a possibilidade de variação do raio a cada revolução. Esses parâmetros foram ajustados por meio das opções: “InitialRadius (μm)”, “Revolutions” e “Delta r ($\mu\text{m}/\text{rev}$)”, respectivamente.

A primeira espiral foi construída com um raio inicial de $10\ \mu\text{m}$, seguida por cinco revoluções, nas quais foi adicionado $1\ \mu\text{m}$ ao raio inicial a cada revolução, conforme ilustrado visto na figura 4.22(b). A altura da espiral em torno do eixo z foi configurada por meio de repetições de camadas, totalizando três camadas sucessivas ao longo do eixo z , com $\Delta z = 3\ \mu\text{m}$ por repetição.

Para obter um padrão de círculos concêntricos, a espiral foi repetida oito vezes ao longo do plano XY, variando o raio inicial de cada uma delas. No caso do MGC ($b=10\ \mu\text{m}$), foi acrescentado $15\ \mu\text{m}$ ao raio inicial a cada repetição, enquanto para o MGC ($b = 20\ \mu\text{m}$), a variação foi de $25\ \mu\text{m}$, conforme ilustrado nas figuras 4.24(c-d).

Uma vez definidos os designs dos arcabouços, o sistema μFab gerou um arquivo final da microestrutura projetada, contendo pares de coordenadas (x, y, z), cada um representando a trajetória percorrida pelo feixe de laser na amostra, conforme ilustrado nas figuras 4.24(b-d).

Figura 4.24: (a) e (c) Criação do modelo sólido utilizando uma ferramenta de design 3D. (b) e (d) Visualização do arquivo de vetorizado para execução da escrita.



Fonte: Elaborado pela autora.

O processo de construção das microestruturas tridimensionais foi realizado em um sistema de microfabricação tridimensional (μFab Workstation - NEWPORT), utilizando pulsos de laser de fs (Chameleon Ultra - COHERENT), sintonizado a $730\ \text{nm}$ próximo ao IR, com uma lente objetiva de $100\times$ ($NA = 0,70$, Nikon).

Os parâmetros ópticos de escrita foram configurados de acordo com as geometrias dos arcabouços. As linhas paralelas e os círculos concêntricos foram construídos com a potência do laser fixada em 62 mW. No entanto, a velocidade e a aceleração de escrita foram ajustadas de maneira diferenciada, conforme indicado no manual do sistema, que especifica que, em casos de curvas, a aceleração não deve exceder dez vezes o valor da velocidade de escrita. O descumprimento dessa restrição pode gerar erros durante a execução do arquivo projetado, devido à alta aceleração.

Conforme essa justificativa, os arcabouços MGR foram executados com uma $V_{scan} = 250 \mu\text{m/s}$ e aceleração de 10 mm/s^2 , enquanto os arcabouços MGC foi reduzido a V_{scan} para $100 \mu\text{m/s}$ e aceleração para 0.5 mm/s^2 .

Foram fabricados dois tipos diferentes de arcabouço: MGR, com colunas paralelas, e MGC, com círculos concêntricos. Ambos apresentavam a largura da coluna fixada em $5 \mu\text{m}$ e a altura da coluna em $8 \mu\text{m}$, enquanto a largura do groove foi de $10 \mu\text{m}$ e outro de $20 \mu\text{m}$, conforme mostrado na tabela 4.2.

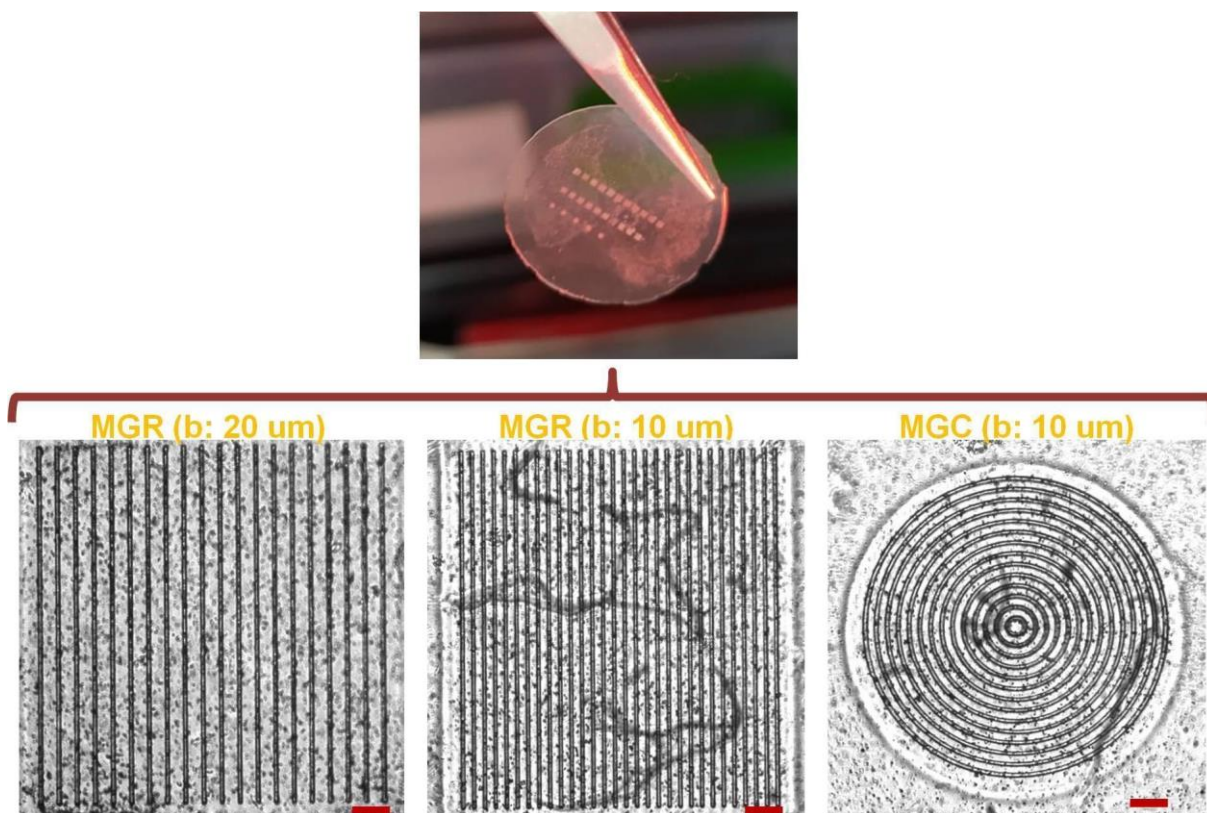
Tabela 4.2: Dimensões dos arcabouços tipo grooves fabricados na superfície dos filmes poliméricos.

Arcabouço	Largura da coluna (a, μm)	Largura do groove (b, μm)	Altura da coluna (c, μm)	Razão entre b/a
MGR	~ 5	~ 10	~ 8	~ 2:1
MGR	~ 5	~ 20	~ 8	~ 4:1
MGC	~ 5	~ 10	~ 8	~ 2:1
MGC	~ 5	~ 20	~ 8	~ 4:1

Fonte: Elaborado pela autora.

Uma série de microgrooves circulares e retangulares foi projetada e fabricada na superfície dos filmes poliméricos feitos com as resinas P59, P59/TiO₂ e P369/TiO₂, a fim de biomimetizar um ambiente celular específico. Em resumo, foram preparados quatro filmes idênticos, 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, conforme mostrado na figura 4.25. Em média, cada microestrutura (MGR ou MGC) levou de 15 a 20 minutos para ser finalizada.

Figura 4.25: Imagens de microscópio óptico do filme P369/TiO₂ com microestruturas (barra de escala = $50 \mu\text{m}$).



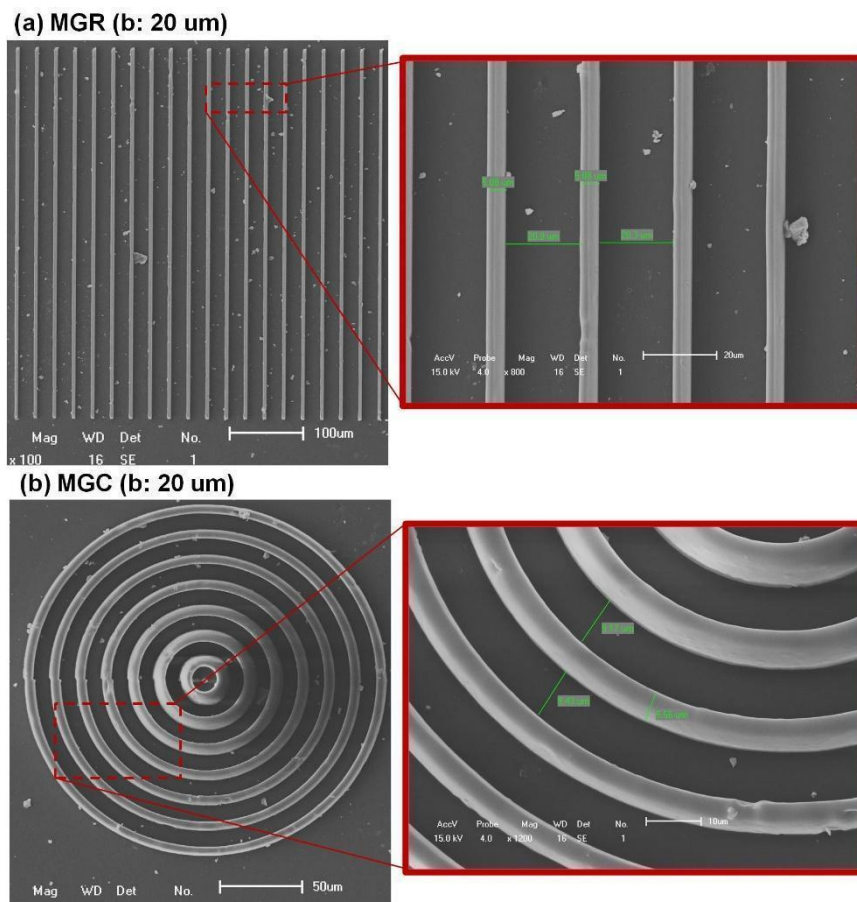
Fonte: Elaborado pela autora.

Concluída a etapa de escrita, os filmes foram lavados com álcool etílico durante 20 minutos para remoção do material não polimerizado. O procedimento foi repetido três vezes.

Nas amostras observadas por microscópio óptico (20X, NA = 0,40, Newport), figura 4.25, é visível na superfície do filme e entre as paredes das microestruturas a distribuição de várias aglomerações de NCs de TiO_2 conectadas.

As microestruturas também foram caracterizadas pelo MEV em diferentes ampliações. Conforme mostrado na figura 4.26, os microambientes apresentam paredes estáveis, contínuas e com boa integridade estrutural, sem deformações ou microexplosões. Isso indica que os parâmetros de escrita escolhidos foram adequados, pois as geometrias e dimensões dos arcabouços escritos no sistema de microfabricação coincidem com o modelo 3D projetado no software proposto.

Figura 4.26: Imagens de MEV do filme polimérico P369/ TiO_2 com microestruturas do tipo microgrooves.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.3.3 Cultura celular nos arcabouços

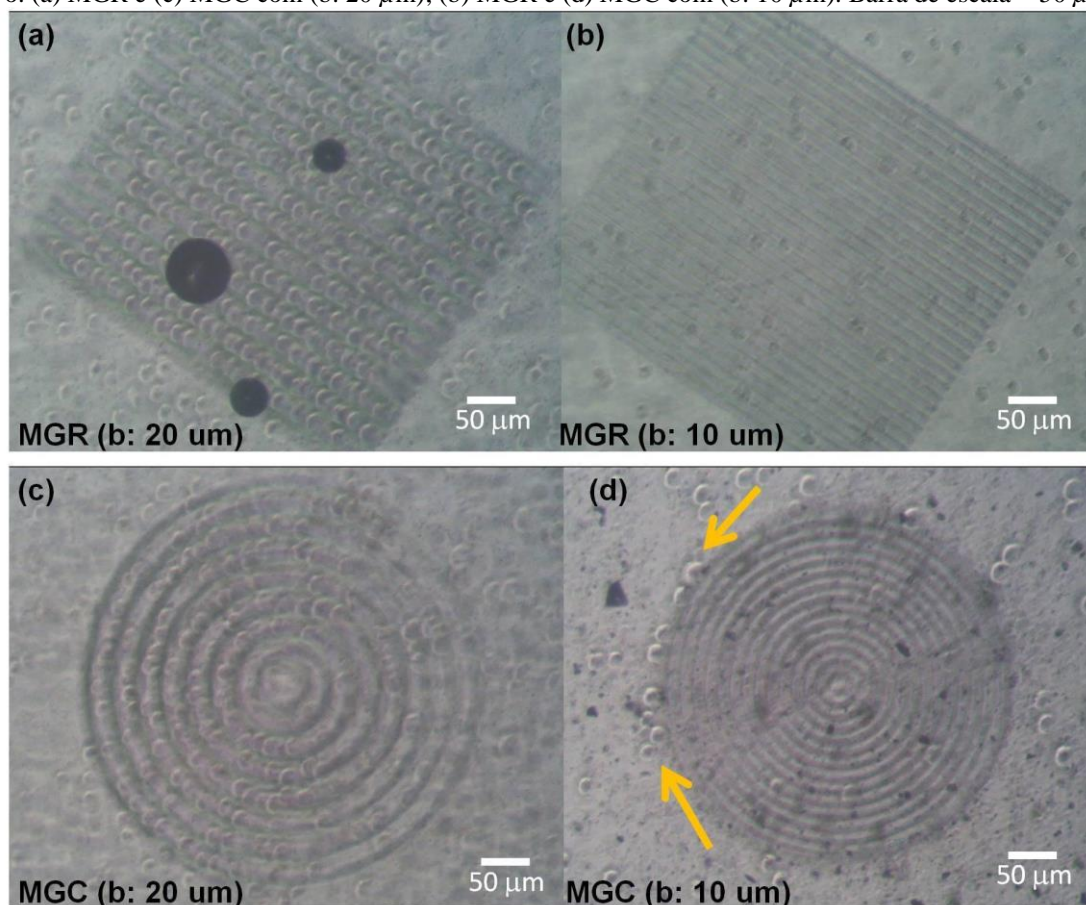
Para iniciar os ensaios biológicos, os arcabouços fabricados sobre os filmes poliméricos foram inseridos em placas de 12 poços e mantidos na cabine de fluxo laminar por 1 hora sob luz UV antes de receberem as células. Ao final deste procedimento, as células (com densidade de 2×10^4 /poço) foram semeadas em cada poço, tanto nas superfícies das amostras com os arcabouços quanto nas sem arcabouços, sendo mantidas sob condições de cultivo por um período de 3 dias.

O microscópio óptico foi utilizado para observar a dinâmica da morfologia e organização das células no meio de cultura após 72 horas de crescimento nas amostras constituídas pelas resinas P369/TiO₂, P59 e P59/TiO₂. 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 nas figuras 4.27 e figura 4.28, 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 dos microgrooves retangulares e circulares.

Entretanto, nos arcabouços com a largura do groove mais estreita (b: $10\ \mu\text{m}$), mostrados nas figuras 4.27(b) e (d), um número menor de células foi encontrado dentro dos grooves. Foi perceptível que, no grupo MGC (b: $10\ \mu\text{m}$), as células ficaram orientadas ao redor da última coluna, seguindo a mesma curvatura da microestrutura, conforme indicado pelas setas amarelas. Porém, elas não conseguiram entrar no interior do microambiente.

Figura 4.27: Imagens de microscópio óptico das células MG-63 (indicadas pelas setas em amarelo) após 72 h de cultivo. (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 = $50\ \mu\text{m}$.

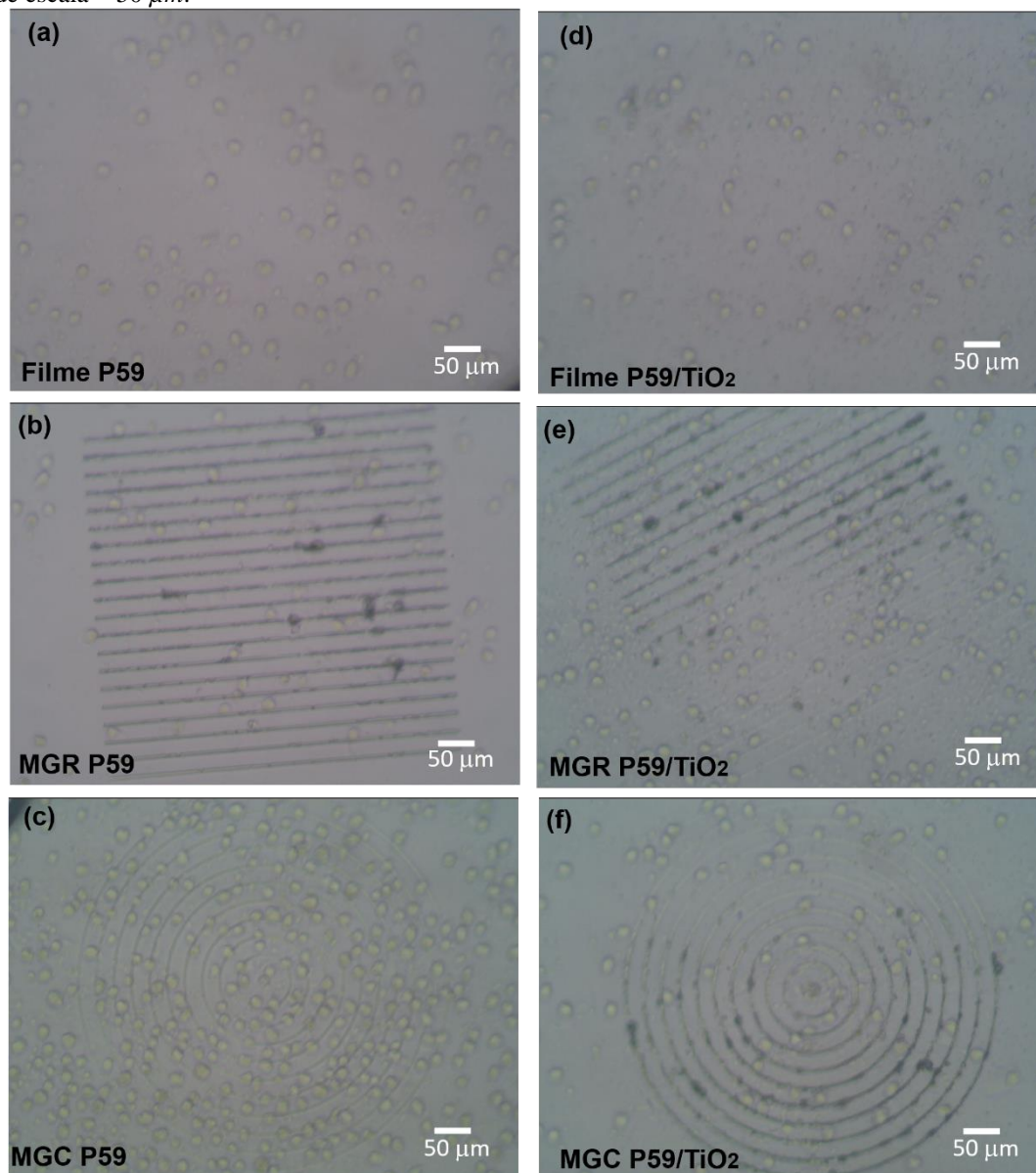


Fonte: Elaborado pela autora.

Em contraste, um grande número de células MG-63 permaneceu alinhado entre as colunas da microestrutura, seguindo a mesma direção da geometria do arcabouço MGR e do MGC, ambos com largura do groove de $20\ \mu\text{m}$, mostrado na figura 4.27(a) e (c) e na figura 4.28(b-c) e (e-f). Desta forma, foi observado que as células preferiram ocupar os arcabouços com largura do groove superior a $10\ \mu\text{m}$.

Nas regiões externas dos arcabouços, ou seja, na superfície dos filmes P369/TiO₂, P59 e P59/TiO₂, foram encontrados osteoblastos distribuídos de maneira aleatória, sem uma direção predominante, como mostrado na figura 4.28(a) e (d). Esse resultado evidencia a importante função desempenhada pelos arcabouços na orientação e comunicação entre as células.

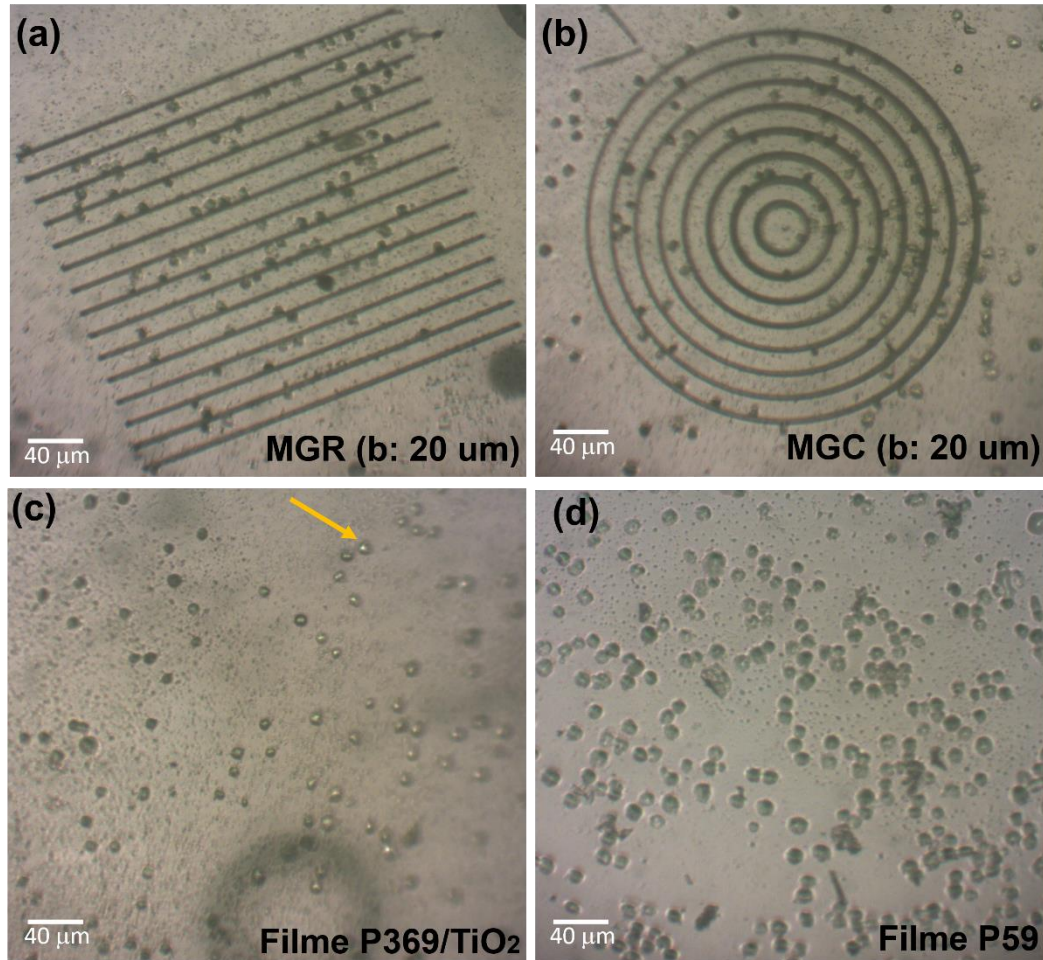
Figura 4.28: Imagens de microscópio óptico das células MG-63 após 72 h no meio de cultura. (a) Filme, (b) MGR e (c) MGC com (b: 20 μm no polímero P59; (d) Filme, (e) MGR e (f) MGC com (b: 10 μm no polímero P59/TiO₂. Barra de escala = 50 μm .



Fonte: Elaborado pela autora.

Para examinar a resposta das células ósseas inseridas nos arcabouços e sobre os filmes, as amostras com células foram fixadas com glutaraldeído a 0,5%, como visto na figura 4.29, e submetidas à análise.

Figura 4.29: Imagens ópticas de células MG-63 (indicadas pela seta amarela) fixadas após 72 h de cultura em (a) arcabouço MGR, (b) arcabouço MGC (b: 20 μm), (c) Filme P369/TiO₂ e (d) Filme PI59. Barra de escala = 40 μm .



Fonte: Elaborado pela autora.

Para quantificar a interação das células nos substratos, foi definido o parâmetro razão de alongamento, que corresponde à razão entre o comprimento médio da célula ($\langle y \rangle$, eixo maior da célula) e a largura média da célula ($\langle x \rangle$, eixo menor da célula). Um total de 41 células de cada grupo foi analisado, e cada medição foi repetida três vezes. Entende-se que, quando a razão de alongamento é igual a 1, a célula possui um formato próximo ao circular, enquanto valores superiores a 1 indicam uma célula mais alongada [53, 54].

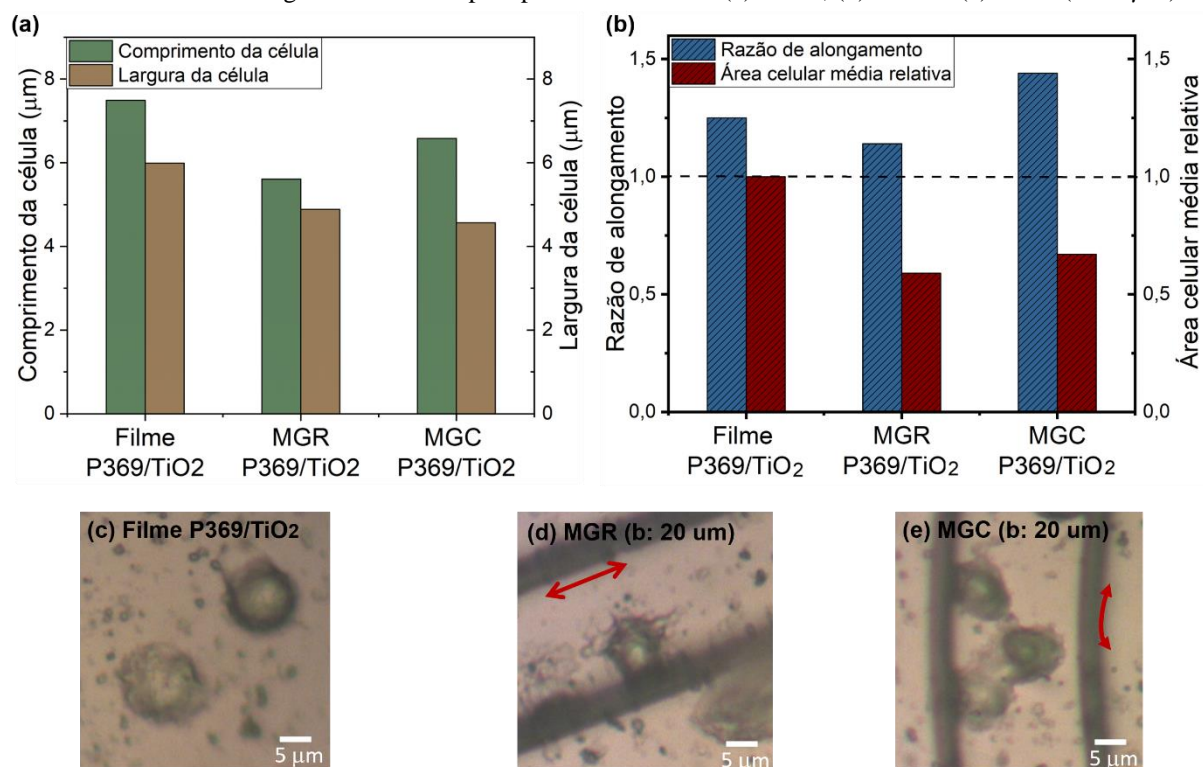
A área celular média foi estimada pela equação: $A_{celular} = \frac{\pi \langle x \rangle \langle y \rangle}{4}$, onde $\langle x \rangle$ representa a largura média e $\langle y \rangle$ o comprimento médio da célula. A área celular relativa foi determinada pela equação $A_{relativa} = \frac{A_{celular}}{A_{celular\ CTRL}} = \frac{\langle x \rangle \langle y \rangle}{\langle x_0 \rangle \langle y_0 \rangle}$, em que $\langle x_0 \rangle$ e $\langle y_0 \rangle$ correspondem à largura e ao comprimento médios das células no filme plano utilizado como controle. O software Gwyddion (versão 2.3) foi empregado para analisar a morfologia a partir de imagens ópticas das células.

Na figura 4.30(a) é mostrada a análise da morfologia celular em contato com as microestruturas MGR, MGC e o Filme produzido a partir do polímero P369/TiO₂. Observa-se

que as células cultivadas sobre o filme P369/TiO₂ apresentaram $\langle y \rangle = 7,492 \mu\text{m}$ e $\langle x \rangle = 5,99 \mu\text{m}$. A interação das células com microambientes de diferentes geometrias causou modificações no formato dos osteoblastos, resultando em uma redução da largura e do comprimento celular devido à influência das paredes dos grooves. As células em contato com as paredes paralelas apresentaram dimensões de $\langle y \rangle = 5,611 \mu\text{m}$ e $\langle x \rangle = 4,888 \mu\text{m}$, enquanto aquelas em contato com as paredes curvas mostraram $\langle y \rangle = 6,582 \mu\text{m}$ e $\langle x \rangle = 4,563 \mu\text{m}$.

Foi constatado que, no grupo MGR, a razão de alongamento das células era mais próxima de 1, que indica uma forma celular mais simétrica, conforme mostrado na figura 4.30(b) e (d). Entretanto, no grupo MGC, ficou evidente uma diferença no formato das células quando estavam em contato com os arcabouços curvos. As células apresentaram uma razão de alongamento maior em comparação aos demais grupos, portanto, significa que os osteoblastos assumiram uma forma mais alongada e elíptica, mais compacta e com apenas algumas extensões citoplasmáticas, como apresentado na figura 4.30(e) (Seta em vermelho indica a direção do groove).

Figura 4.30: Resposta morfológica das células osteoblastos MG-63 ao polímero P369/TiO₂. (a) Comprimento e largura celular após interação em plano, microestruturas paralelas e circulares. (b) Razão de alongamento e área celular média relativa. Imagens de microscopia óptica das amostras (c) Filme, (d) MGR e (e) MGC (b: 20 μm).



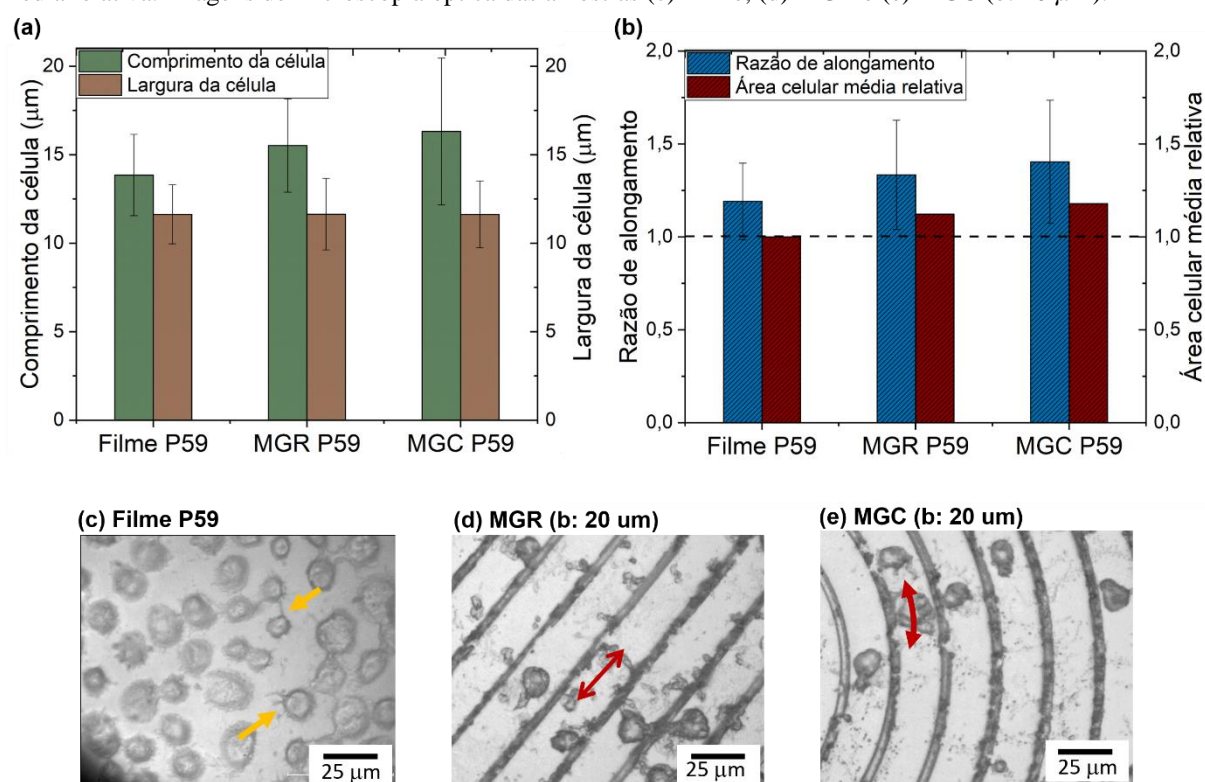
Fonte: Elaborado pela autora.

Para as amostras P59, o crescimento celular em superfícies com microgrooves apresentou valores maiores para os parâmetros de razão de alongamento e área celular média relativa em comparação às células que interagiram com superfícies planas do filme polimérico (Figura 4.31(b)).

Observou-se que a presença dos microgrooves não teve efeito sobre a largura das células, que permaneceu em aproximadamente $11,6\mu\text{m}$, enquanto o comprimento celular foi influenciado pelas superfícies com microgrooves, sendo maior na geometria circular, atingindo cerca de $16,32\mu\text{m}$ (Figura 4.31 (a)).

Nota-se que as superfícies com microgrooves circulares tornaram as células mais alongadas, com uma razão de alongamento de 1,40, enquanto nas superfícies planas esse valor foi de apenas 1,19 (Figura 4.31 (b)). Além disso, as células osteoblásticas MG-63 sementeas em superfícies com microgrooves paralelos e circulares apresentaram uma área celular média relativa maior do que aquelas cultivadas em superfícies planas. No entanto, ao comparar a área celular média relativa entre as superfícies MGR e MGC, não foram observadas diferenças perceptíveis.

Figura 4.31: Resposta morfológica das células osteoblásticas MG-63 ao polímero P59. (a) Comprimento e largura celular após interação com o plano, microestruturas paralelas e circulares. (b) Razão de alongamento e área celular média relativa. Imagens de microscopia óptica das amostras (c) Filme, (d) MGR e (e) MGC (b: $20\mu\text{m}$).



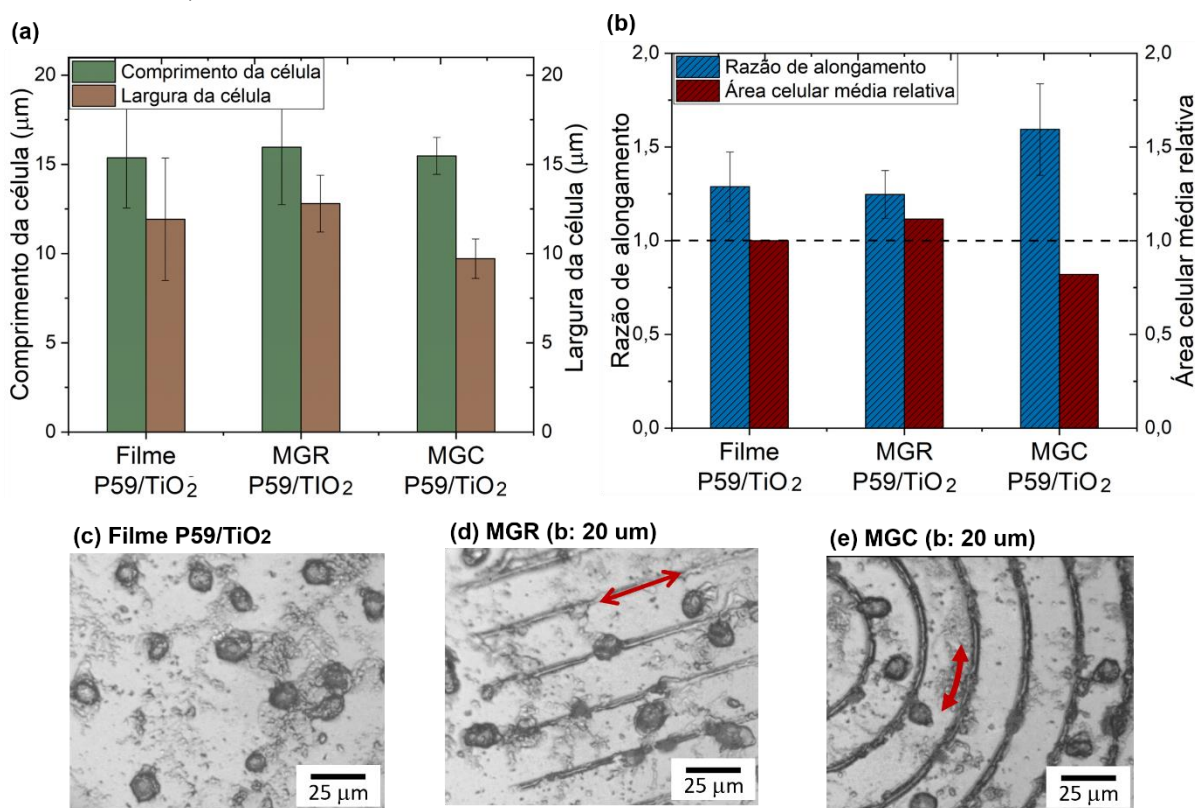
Fonte: Elaborado pela autora.

Para as amostras P59/TiO₂, observou-se que a presença dos microgrooves não influenciou o comprimento celular, que permaneceu em torno de 15,6 μm em todos os grupos. Enquanto, a largura celular foi afetada pelas superfícies microgrooves, sendo menor na geometria circular, com cerca de 9,71 μm (Figura 4.32(a)).

A Figura 4.32(b) revela que as células MG-63 exibiram uma forma mais alongada, com um aumento significativo no parâmetro de razão de alongamento em superfícies MGC ($\sim 1,6$) em comparação com MGR e superfícies planas. Embora os valores de razão de alongamento em MGR e superfícies planas sejam bastante próximos ($\sim 1,26$), notou-se um aumento na área celular relativa dos osteoblastos semeados em estruturas MGR, enquanto as células cultivadas em superfícies MGC apresentam uma redução substancial de área.

Destaca-se que a resina com NCs de TiO₂ atuou em sinergia com as microestruturas MGR e MGC, estimulando os osteoblastos e modificando suas dimensões celulares, o que impactou diretamente a razão de alongamento (Figura 4.32(b)).

Figura 4.32: Resposta morfológica das células osteoblásticas MG-63 ao polímero P59/TiO₂. (a) Comprimento e largura celular após interação em superfícies planas, microestruturas paralelas e circulares. (b) Razão de alongamento e área celular média relativa. Imagens de microscopia óptica das amostras: (c) Filme plano, (d) MGR e (e) MGC (b: 20 μm).



Fonte: Elaborado pela autora.

O efeito dos fotoiniciadores I369 e I2959 pode ser melhor compreendido ao comparar a morfologia celular em interação com as superfícies dos filmes P369/TiO₂ e filme PI59/TiO₂, conforme mostrado nas figuras 4.30 e 4.32. Observa-se que as células respondem melhor ao FI I2959, expressando um comprimento e uma largura celular aproximadamente duas vezes maiores ($\langle y \rangle = 15,36 \mu\text{m}$ e $\langle x \rangle = 11,92 \mu\text{m}$) em comparação com os valores dos eixos das células em contato com a resina contendo I369 ($\langle y \rangle = 7,49 \mu\text{m}$ e $\langle x \rangle = 5,99 \mu\text{m}$).

Esse resultado demonstra a possibilidade de ampliar o potencial das microestruturas ao adotar um FI solúvel em água na síntese das resinas, posto que, é nítida uma resposta celular aprimorada dos osteoblastos. Além disso, permite explorar as vantagens da incorporação de NCs de TiO₂, a fim de promover uma melhor biocompatibilidade e induzir alterações morfológicas celulares.

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

Embora a literatura já apresente informações sobre a morfologia, diferenciação e taxa de proliferação das células osteoblastos MG-63 em contato com arcabouços tipo groove feitos a partir de diferentes materiais, como Poliestireno (PS) [51], Titânio-6alumínio-4vanádio (Ti6-Al-4V) [55], Titânio [56] e Policaprolactona (PCL) [57]. Todavia, o efeito causado pelo arcabouço microgroove incorporado com NCs de TiO₂ sobre as propriedades biofísicas dessas células ainda não é claro em nenhum destes estudos e necessita ser mais bem compreendido, como está retratado nesta pesquisa desenvolvida e publicada [58].

Neste contexto, o módulo elástico das células pode ser mensurado quantitativamente por meio de uma variedade de métodos [59]. Aqui, adotou-se a técnica de Microscopia de Força Atômica (AFM), que se consolidou como uma excelente ferramenta no estudo da dinâmica e das propriedades mecânicas das células. Esse método é frequentemente utilizado com o intuito de investigar diferentes eventos e respostas celulares, incluindo locomoção, diferenciação, adesão, envelhecimento e patologia celular em diferentes tipos de células [60]. As propriedades biofísicas das células são influenciadas por características do ambiente de cultura, como geometria, composição química, rugosidade e rigidez do arcabouço, os quais, ao interagirem com a membrana citoplasmática das células, afetam sua rigidez [61].

O citoesqueleto das células é composto principalmente por filamentos de actina (F-actina) e microtúbulos [55], entre outros componentes, os quais regulam as propriedades elásticas dos osteoblastos. Assim, a reorganização e as alterações do citoesqueleto causadas por estímulos locais do microambiente e pela diferenciação celular se refletem na mudança da elasticidade das células [59].

Em relação à rugosidade e à composição química da superfície do substrato, Domke et al. confirmaram que o módulo de Young das células osteoblastos é maior quando estas são cultivadas em superfícies de titânio com maior rugosidade, em comparação com superfícies compostas de Cobalto-Cromo (CoCr) e de menor rugosidade [47]. Portanto, tais estudos sugerem que as características biomecânicas celulares atuam como marcadores biológicos, uma vez que conseguem capturar as mudanças e configurações do fenótipo celular [60].

Outros estudos realizados por Zorlutuna e colaboradores relataram que as Células do Músculo Liso Vascular (VSMCs) cultivadas em arcabouços nanogrooves feitos de biomaterial (colágeno tipo 1), com largura do groove de 332,5 nm, mostraram-se úteis ao exercer o direcionamento das células na mesma direção do groove e melhorar significativamente as propriedades elásticas das células, representadas pelo aumento no módulo de Young [63], em comparação às células VSMCs cultivadas no vidro.

Neste estudo, foram investigadas as propriedades biomecânicas das células osteoblastos da linhagem MG-63, sob a influência de arcabouços microgrooves com duas diferentes geometrias, funcionalizados com NCs de TiO_2 .

As células cultivadas no polímero P369/ TiO_2 foram medidas individualmente utilizando o microscópio de força atômica Multiview 4000™ (Nanonics, Israel) acoplado ao microscópio óptico (BXFM, Olympus, Japão) para obtenção dos dados do módulo de Young. O sistema AFM foi isolado acusticamente e mecanicamente para reduzir interferências do ruído ambiente durante as medições. Para isso, o instrumento foi fixado em uma mesa de amortecimento ativo, que suprimiu os ruídos mecânicos.

Neste experimento, uma ponta com formato cônico, fixada na extremidade do *cantilever* e movendo-se a uma velocidade constante de $5 \mu\text{m/s}$ com precisão submicrométrica, foi aproximada das amostras e posicionada sobre a região 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. Essa condição assegura que a rigidez medida pela ponta do AFM seja proveniente 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 apresentava um raio de curvatura típico $< 20 \text{ nm}$, acoplada a um *cantilever* de $320 \mu\text{m}$ de comprimento, com constante de mola $< 1 \text{ N/m}$ e frequência nominal de 38 kHz . A constante de mola do *cantilever* foi calibrada ajustando-se o espectro de potência a um oscilador harmônico simples. Além disso, foi definida uma força de indentação máxima para o *cantilever* em 20 nN .

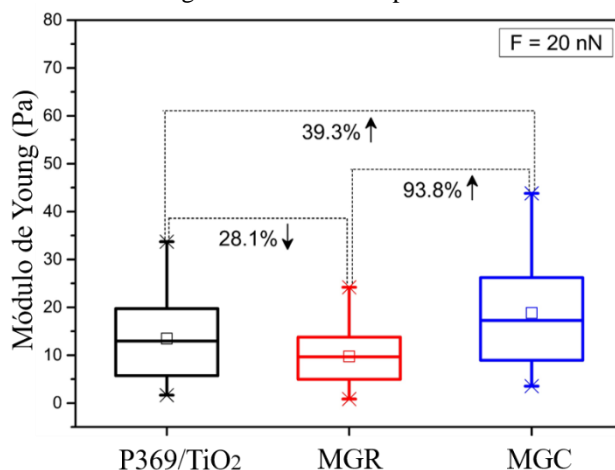
No total, foram medidas 80 células, que resultaram em 80 curvas adquiridas e analisadas para cada grupo de amostras, todas obtidas com a mesma ponta de AFM. Para caracterizar as curvas de força-distância e obter a indentação elástica das células, utilizou-se o modelo de Hertz modificado por Sneddon [64]. Ajustando esse modelo aos dados experimentais, foi possível calcular o módulo de Young médio das amostras.

Os resultados foram representados como média \pm desvio padrão. Para mostrar que todos os resultados são normalmente distribuídos, o teste Kolmogorov-Smirnov foi realizado. 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 nível de confiança de 95% ($p < 0.05$) para a análise estatística.

Foi verificada a mudança nas propriedades mecânicas das células osteoblastos durante 3 dias de cultura nas amostras Filme, MGR e MGC, feitas dos polímeros P369/TiO₂, P59 e P59/TiO₂, a fim de mensurar a importância da microestrutura na morfologia celular.

Especificamente, as células cultivadas sobre o Filme do polímero P369/TiO₂ 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 de $18,8 \pm 11,2$ Pa, conforme mostrado na figura 4.33. Portanto, houve um aumento significativo de 39,3% no módulo de elasticidade das células cultivadas no grupo MGC em comparação ao grupo na ausência do arcabouço. É notável que, supostamente, essa alteração na rigidez das células no grupo MGC esteja correlacionada ao fenótipo adquirido pela célula ao interagir com o arcabouço curvo, uma vez que as células possuem uma razão de alongamento superior a 1, em comparação com as outras amostras.

Figura 4.33: Módulo de Young de osteoblastos MG-63 cultivados por 3 dias nos grupos (a) Filme, MGR e MGC do polímero P369/TiO₂. O módulo de Young médio é indicado pela linha horizontal dentro de cada caixa.



Fonte: Elaborado pela autora.

Embora as células sejam mais rígidas em contato com o arcabouço MGC do que no Filme feito do polímero P369/TiO₂, a mesma relação não é mantida no arcabouço MGR. Como resultado, as células cultivadas no grupo MGR revelaram um módulo de Young de $9,7 \pm 6,0$ Pa, com uma diminuição de 28,1% em sua rigidez quando comparadas às células semeadas no filme.

Já quando comparada à rigidez dos osteoblastos nos grupos MGR e MGC, em geometrias diferentes, observa-se um aumento considerável no módulo de Young, 93,8% maior para as células do grupo MGC, uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em comparação com as células no grupo MGR. Logo, esses resultados sugerem que a geometria do arcabouço é um parâmetro importante para regular a alteração da rigidez dos osteoblastos que reflete principalmente na resposta celular.

Para as medições de elasticidade das células nos polímeros P59 e P59/TiO₂, devido a atualizações necessárias no sistema AFM, as análises foram realizadas utilizando uma configuração AFM padrão (Multiview 1000™, Nanonics), com um microscópio óptico combinado (BAXFM, Olympus).

Os experimentos de elasticidade foram realizados utilizando uma ponta de varredura com raio de curvatura de 2,5 μm , *cantilever* de 100 μm de comprimento, constante de mola de 0,29 N/m e frequência nominal de 80 kHz. A constante de mola do *cantilever* foi calibrada ajustando o espectro de potência a um oscilador harmônico simples, e a força máxima de recuo para o *cantilever* foi fixada em 20 nN.

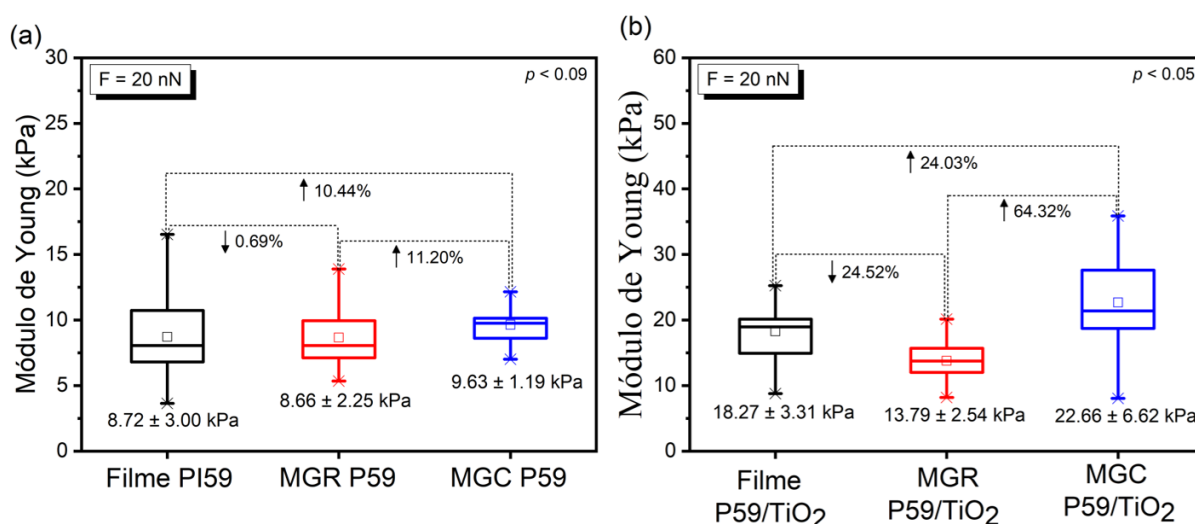
O modelo Hertziano foi utilizado para caracterizar as curvas força-distância, a fim de obter a indentação elástica das células. Esse modelo prevê uma relação entre a força e a profundidade da indentação de uma amostra mole. Ao aplicar esse modelo aos nossos dados, calculamos o módulo de Young médio local de cada amostra. Todas as medições das curvas força-distância foram realizadas movendo a ponta do *cantilever* em direção à amostra com uma velocidade de carga constante de 5 $\mu\text{m/s}$. Foram adquiridas 60 curvas força-distância para cada grupo de células. Todos os experimentos de curva força-distância foram realizados com a mesma ponta.

As células cultivadas nos filmes do polímero P59 exibiram um módulo de Young de $8,72 \pm 3,00$ kPa. Por outro lado, as células cultivadas nas superfícies MGC apresentaram um módulo de Young de $9,63 \pm 1,19$ kPa, conforme mostrado na Figura 4.34(a). Portanto, houve um aumento significativo de 10,44% no módulo de elasticidade das células cultivadas nas superfícies MGC em comparação com aquelas semeadas em filmes planos. Supostamente, essa alteração na rigidez das células do grupo MGC está correlacionada com o fenótipo adquirido

ao interagir com a microestrutura curva, uma vez que as células apresentam uma razão de alongamento de cerca de 1,5 e uma área celular média relativa 20% maior do que as células interagindo com superfícies planas (Figura 4.32b).

Diferentemente, as células cultivadas no grupo MGR apresentaram um módulo de Young de $8,66 \pm 2,25$ kPa. Quando comparadas às células semeadas no filme P59, não apresentaram diferenças significativas. Esse resultado indica que os osteoblastos são mais rígidos e mais aderentes em microgrooves circulares do que em microgrooves paralelos ou em superfícies planas feitas com o polímero P59.

Figura 4.34: Módulo de Young de osteoblastos MG-63 cultivados por 3 dias nos grupos Filme, MGR e MGC para os polímeros (a) P59 e (b) P59/TiO₂. O módulo de Young médio é indicado pela linha horizontal dentro de cada caixa.



Fonte: Elaborado pela autora.

O módulo de Young para células em amostras P59/TiO₂ é mostrado na Figura 4.34(b), com comportamento semelhante ao das amostras P59, mas com maior sensibilidade e destaque. O módulo de Young dos osteoblastos cultivados no grupo MGC aumentou 24,03% em comparação com o filme de P59/TiO₂, enquanto o módulo de elasticidade dos osteoblastos cultivados na superfície do MGR reduziu 24,52%. Portanto, observou-se que os microgrooves curvos favorecem os osteoblastos, proporcionando maior rigidez celular em comparação com as superfícies planas e os microgrooves paralelos.

É importante destacar que, ao comparar os três grupos do P59/TiO₂ com seus correspondentes nos grupos de P59, observou-se um aumento na rigidez celular em cada um (Figura 4.34a), evidenciando a atuação dos NCs de TiO₂ sobre as células osteoblastos.

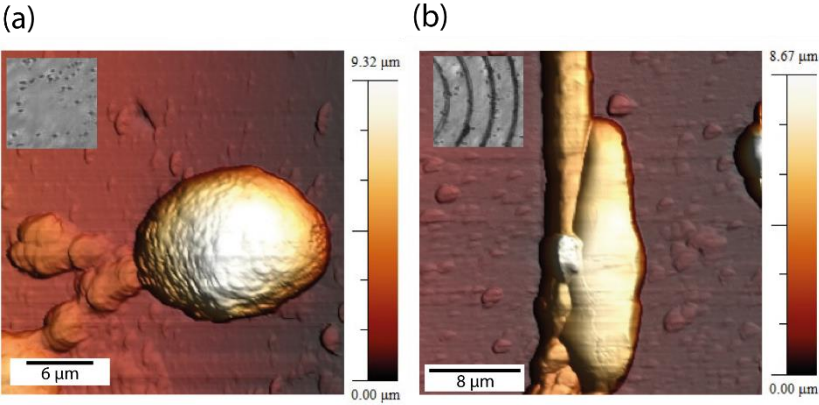
Este resultado se torna mais confiável, porque é obtido a mesma dinâmica independentemente do tipo de polímero analisado, seja P369/TiO₂, P59 ou P59/TiO₂. Isso

significa que a biomecânica dos osteoblastos foi influenciada pela geometria do microgroove e claramente aprimorada pela presença dos NCs nos polímeros P369/TiO₂ e P59/TiO₂. Notavelmente, o comportamento celular teve um melhor desempenho nos microgrooves com colunas curvas do que nas colunas paralelas ou superfícies planas. Essa informação é amparada devido ao fato de que os microgrooves circulares imitam os osteons [65, 66] e as unidades estruturais do osso cortical (sistemas Havers), que representam o ambiente natural das células ósseas.

Através do AFM, a topografia celular foi fotografada (256×256 pixels) no modo de toque, com uma taxa de varredura de 0,3-1 Hz, usando uma ponta de varredura com raio de curvatura típico < 20 nm, um cantilever de 320 µm de comprimento, constante de mola < 1 N/m, frequência nominal de 35 kHz e ângulo de meio cone de 10°. As imagens AFM foram processadas com o software gratuito WSxM para visualização 3D [67].

Foi observada a forma 3D e a rugosidade superficial das células aderidas às superfícies planas e ao microgroove circular do polímero P59/TiO₂. As células aderidas à superfície plana mostraram uma forma arredondada e uma superfície homogênea e lisa (Figura 4.35), enquanto as células aderidas à superfície do MGC, exibiram formas variadas e um aspecto mais áspero.

Figura 4.35: Imagens AFM da topografia de células (a) na superfície plana e (b) no microgroove circular do polímero P59/TiO₂.



Fonte: Elaborado pela autora.

Os efeitos dos microgrooves paralelos e circulares na morfologia e no módulo de elasticidade dos osteoblastos, em comparação com os filmes, estão resumidos na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Resumo das respostas dos osteoblastos MG-63 à geometria paralela e circular de superfícies micropadronizadas, em comparação com filmes planos.

Microgrooves (b: 20 µm)	Razão de alongamento			Área celular média relativa			Módulo de Young		
	P59	P59/ TiO ₂	P369/ TiO ₂	P59	P59/ TiO ₂	P369/ TiO ₂	P59	P59/ TiO ₂	P369/ TiO ₂

Paralelo	aumenta	NDS	NDS	aumenta	aumenta	diminui	diminui	diminui	diminui
Circular	aumenta	aumenta	aumenta	aumenta	diminui	diminui	aumenta	aumenta	aumenta

Legenda: Todos os dados são comparados com superfícies planas; NDS: Nenhuma diferença significativa.
Elaborado pela autora.

4.4 MODIFICAÇÕES DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE SUPERFÍCIE POLIMÉRICA PARA APRIMORAMENTO DA ADESÃO DE CÉLULAS EPITELIAIS

4.4.1 Influência da superfície polimérica nas respostas celulares

Os materiais poliméricos estão na vanguarda do desenvolvimento de dispositivos biofotônicos e biomédicos, com inúmeras aplicações, incluindo biossensores para diagnóstico, implantes e ambientes 3D adequados para cultura celular [68-70]. As características atrativas dos polímeros incluem facilidade de síntese, produção em larga escala, capacidade de funcionalização com NPs e outros grupos químicos funcionais, além de suas interessantes propriedades ópticas e mecânicas [71, 72].

Além disso, podem ser sintetizados para apresentar flexibilidade ajustável, o que os torna uma excelente ferramenta para entrega de medicamentos e suporte para o crescimento de células e tecidos [73-76]. Em particular, os polímeros à base de acrilato são amplamente utilizados em aplicações biomédicas devido à boa biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades mecânicas [77-80].

A adesão celular a uma superfície é crucial para várias funções celulares, incluindo proliferação e diferenciação. Ela também desempenha um papel significativo no desenvolvimento de biomateriais, sensores e dispositivos implantáveis [81]. A compreensão dos fatores que afetam a adesão célula-superfície permite controlar o comportamento celular no ambiente local circundante para beneficiar a investigação em tecnologias de engenharia de tecidos [82].

Por exemplo, B. Majhy et al. [83] mostraram que linhagens celulares de câncer cervical e de mama apresentam comportamentos diferentes para o mesmo substrato, ajustando suas propriedades aderentes para diferentes taxas de rugosidade. Isso demonstrou que cada linhagem celular responde de uma maneira particular a uma característica específica do substrato. Na verdade, nas interações célula-material, as características físicas e químicas precisam ser ajustadas para criar um ambiente favorável às células [84].

Numerosas abordagens para modificação de superfícies têm sido usadas para alterar as propriedades dos materiais e melhorar a fixação celular, incluindo tratamento de plasma,

deposição química de vapor, modificação dinâmica de superfície, adsorção de proteínas e salinização [85, 86]. Apesar da grande diversidade de métodos capazes de induzir modificações em superfícies poliméricas [87-89], ainda há a necessidade de propor métodos mais baratos e rápidos para o tratamento dessas superfícies. Além disso, é importante garantir que a biocompatibilidade de cada novo material polimérico esteja associada a um tratamento de superfície adequado. Essa abordagem ajuda a criar uma superfície mais favorável e biologicamente semelhante ao organismo.

Seguindo uma tendência ecologicamente correta, o uso de solução salina tamponada com fosfato (PBS) para induzir modificações superficiais em materiais inorgânicos atende aos requisitos atuais para facilitar a redução do uso de reagentes orgânicos e a menor produção de resíduos [90, 91].

O PBS é comumente usado para simular soluções biológicas em ambientes de pesquisa e laboratório. É escolhido por sua capacidade de corresponder de perto à osmolaridade e às concentrações de íons encontradas no corpo humano. Como meio isotônico e não tóxico, o PBS proporciona um ambiente adequado para manter a viabilidade e funcionalidade das células vivas. Embora a técnica de aumentar a hidrofiliabilidade superficial de polímeros usando PBS esteja bem documentada [92-98], os efeitos do PBS na rugosidade e no surgimento de grupos funcionais nas superfícies dos polímeros P59 (Pentaerythritol Triacrylate + 1% I2959) e S59 (Trimethylolpropane Ethoxylate Triacrylate + 1% I2959) para criar uma superfície amigável às células, não foram extensivamente explorados e descritos, até onde sabemos.

Diante disso, os substratos poliméricos foram tratados por 60 minutos à temperatura ambiente com PBS (1×, pH 7,4), composto por NaCl, KH_2PO_4 e Na_2HPO_4 , como estratégia para torná-los mais hidrofílicos e potencialmente mais aderentes para às células. Aqui, a amostra controle são placas comerciais de cultura celular aderentes tratadas para promover a adesão celular, feitas de poliestireno. Por fim, as amostras foram secas em estufa a 50°C por 10 minutos. Após o tratamento com PBS, as amostras foram renomeadas para P59/PBS e S59/PBS.

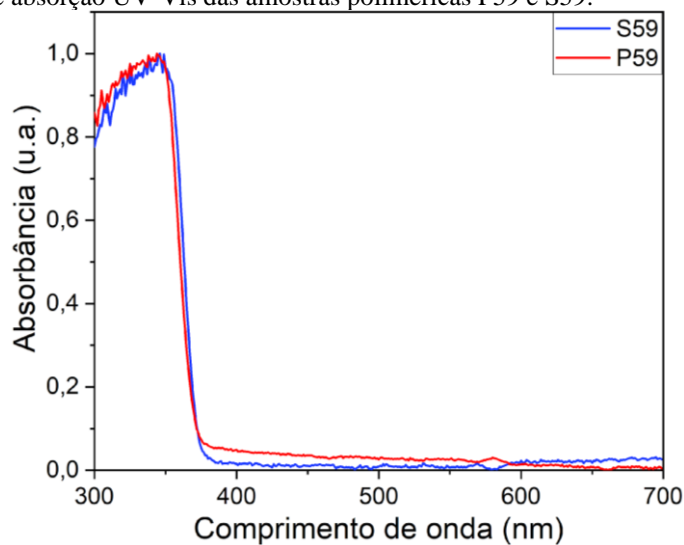
Nesta subseção, investigamos o impacto da modificação química induzida por PBS na adesão de células epiteliais humanas A549 na superfície de polímeros acrilatos. Nossos resultados foram apoiados por vários métodos de caracterização.

4.4.2 Efeito do tratamento com PBS em superfícies poliméricas na adesão celular

As resinas não polimerizadas P59 e S59 foram analisadas utilizando um espectrofotômetro UV-3600 (Shimadzu, Kyoto, Japão), com os espectros registrados na faixa de 300-700 nm. Conforme mostrado na Figura 4.36, os espectros de absorção UV-Vis

revelaram um comportamento idêntico para as resinas sintetizadas com diferentes monômeros, como era esperado. O Irgacure® 2959 foi o responsável pela banda de absorção predominante abaixo de 350 nm e pela transparência à radiação visível em ambas as amostras. Por ser solúvel em água, o FI I2959 pode ser aplicado em inúmeros estudos biológicos e permite que o processo químico de polimerização seja realizado em condições mais ecológicas [99].

Figura 4.36: Espectro de absorção UV-Vis das amostras poliméricas P59 e S59.



Fonte: Elaborado pela autora.

Investigar a adesão celular em superfícies poliméricas é fundamental quando se pretende destinar esses materiais no desenvolvimento de arcabouços celulares. Deste modo, as células epiteliais pulmonares A549 foram cultivadas nas amostras P59, S59, P59/PBS e S59/PBS por 24 h para analisar o grau de adesão.

A interação das células epiteliais em contato com as amostras foi observada por microscopia óptica (ampliação de 100×). As imagens das células foram capturadas em duas regiões diferentes do substrato. Em cada imagem, foram selecionadas 4 regiões com a mesma área ($\sim 57 \times 57 \mu\text{m}^2$). Para cada região específica, as células foram contadas e sua morfologia analisada pelo software Gwyddion (versão 2.3), com os dados resultantes processados no Origin (OriginLab). A quantificação da adesão celular foi orientada pelo aspecto morfológico das células após a interação com substratos poliméricos. Considerou-se que as células não aderentes apresentam uma morfologia arredondada e brilhante por ser mais espessa, enquanto as células aderidas são mais alongadas, com morfologia semelhante à de fibroblastos, como mostrado na Figura 4.37 para o substrato CTRL.

Figura 4.37: Imagens de microscópio óptico de células A549 cultivadas em meio DMEM por 24 horas em placas de cultura comercial para células aderentes (ampliação de 100x). As células, identificadas com morfologia esferoidal e espraçada, foram ampliadas.

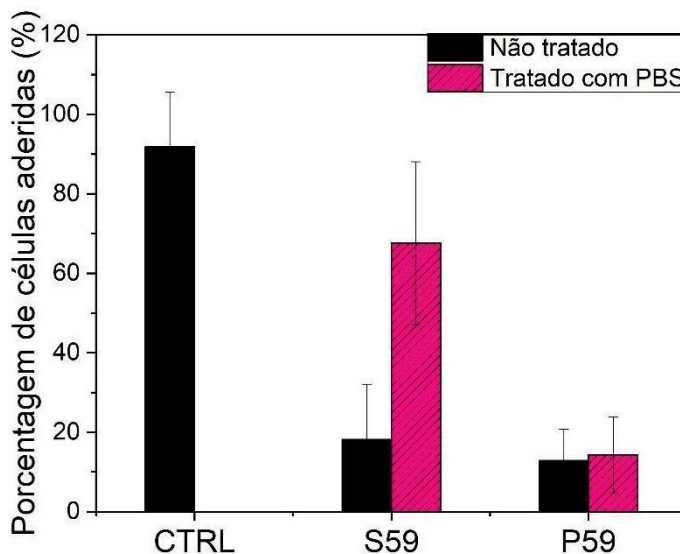


Fonte: Elaborado pela autora.

A Figura 4.38 mostra a porcentagem de células aderidas após interação com cada substrato tratado ou não com PBS. Ao observar a adesão das células e compará-la com as placas controle, foi possível notar que os substratos S59 e P59 não apresentaram características físico-químicas suficientes para promover a adesão celular. No entanto, após tratamento com PBS, a superfície das amostras S59/PBS permitiu um aumento significativo no comportamento adesivo das células, cerca de três vezes maior em comparação à condição sem tratamento com PBS.

O comportamento celular nos substratos S59/PBS foi comparável ao observado nas placas de cultura comerciais. Enquanto que, o polímero P59 não induziu alterações no comportamento adesivo celular após tratamento com PBS (Figura 4.38). Esses resultados revelaram que os substratos S59, após o tratamento com PBS, mostraram uma superfície favorável à adesão de células epiteliais.

Figura 4.38: Avaliação do comportamento de adesão das células A549 após 24 horas.



Fonte: Elaborado pela autora.

Os resultados mostrados na figura 4.38 indicam que houve alterações significativas nas propriedades físico-químicas das superfícies dos polímeros após o tratamento com PBS, as quais foram perceptíveis e impactaram a resposta de adesão das células epiteliais pulmonares e necessitam ser investigadas.

As investigações sobre os fenômenos de molhabilidade na superfície do substrato foram realizadas utilizando o método da gota sêssil, um método óptico preciso e reprodutível para medidas de ângulo de contato. Apenas uma gota de água (3μL) foi depositada em diferentes amostras, e a medição do ângulo de contato foi realizada com o Tensiômetro Óptico Theta (T200 Biolin Scientific), com uma câmera CCD embutida e o software Attension. Todas as 5 medições para cada amostra foram realizadas a 23°C.

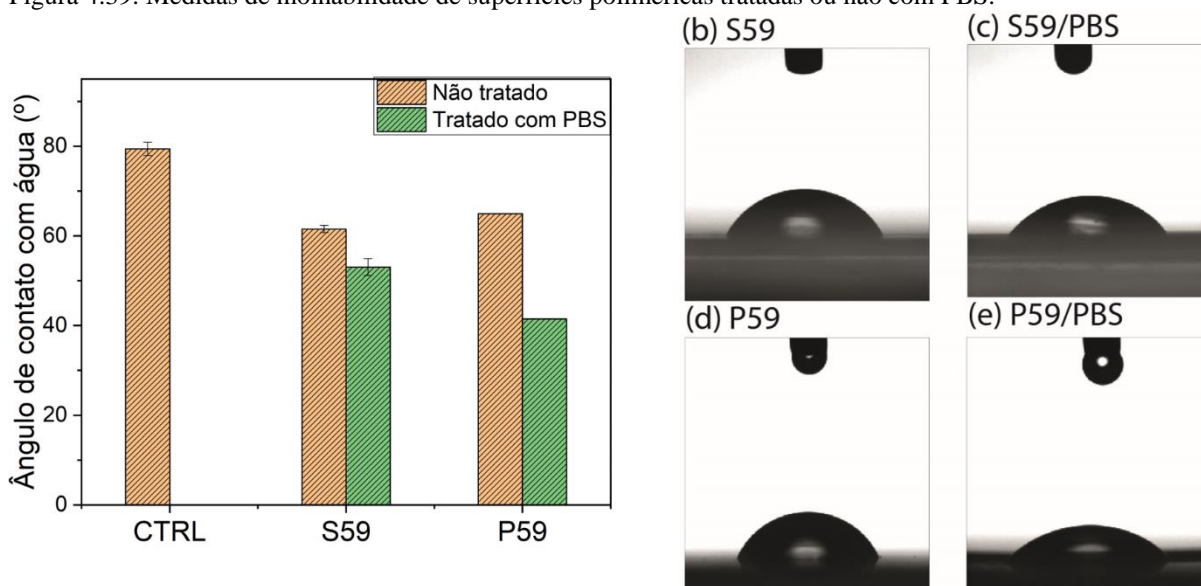
As interações entre sólido e líquido são fundamentais em diversos processos, pois determinam a adesão entre as fases. Essas interações sólido-líquido são determinadas pela Energia Livre Superficial (ELS) do sólido e pela tensão superficial do líquido aplicado. O modelo de Owes, Wendt, Rabel e Kaelble foi utilizado neste trabalho para calcular a ELS. Esse modelo usa a média geométrica para tratar as interações moleculares, dividindo a ELS em componentes individuais. Neste estudo, utilizamos apenas a interação polar com filmes. O líquido polar escolhido foi a água, devido ao seu grande componente polar, disponibilidade e natureza não tóxica. A ELS polar (γ_p) foi calculada usando a equação dada como:

$$\gamma_p = 0.5 \cdot \gamma_{lv}(1 + \cos\theta), \quad (25)$$

onde γ_{lv} é a tensão superficial do líquido polar, neste caso, a água (72,8 mJm⁻²) e θ é o ângulo de contato medido.

Figura 4.39 mostra os resultados das medições de molhabilidade da água, realizadas antes e depois do tratamento com PBS. Todas as amostras eram hidrofílicas ($\theta < 90^\circ$) e devido ao tratamento com PBS, o ângulo de contato de todas as amostras apresentou uma redução de aproximadamente 20%, indicando um aumento na hidrofilicidade. Notavelmente, as amostras P59 demonstraram uma maior diminuição no ângulo de contato, passando de $64,93^\circ$ para $41,48^\circ$ após o tratamento com PBS (Figura 4.39(d)-(e)).

Figura 4.39: Medidas de molhabilidade de superfícies poliméricas tratadas ou não com PBS.



Fonte: Elaborado pela autora.

De fato, a relação entre o comportamento celular e a molhabilidade das superfícies poliméricas tem sido amplamente investigada na literatura, especialmente em estudos relacionados à aderência celular [100]. Embora diversos estudos tenham sugerido uma melhoria na adesão celular em superfícies hidrofílicas, existem outros fatores que devem ser considerados para uma compreensão completa do comportamento celular, como a energia superficial, rugosidade e porosidade das superfícies poliméricas [101-104].

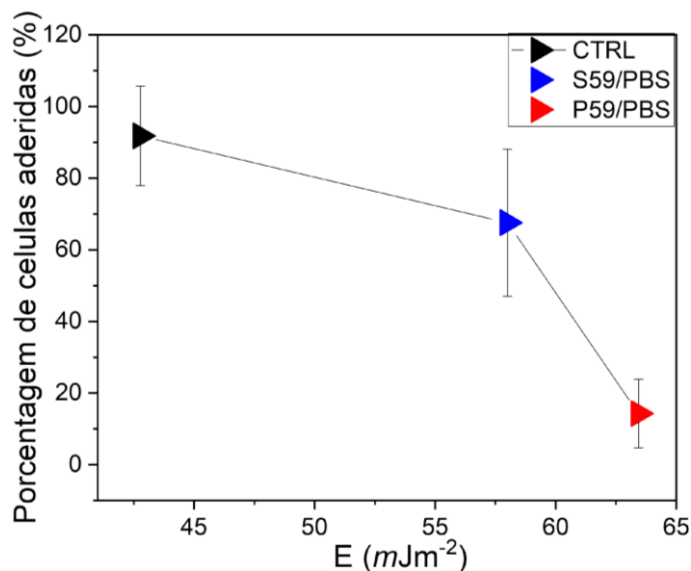
A energia livre de superfície foi calculada através da equação (1) e correlacionada à adesão celular, conforme mostrado na Figura 4.40. Observa-se que há uma correspondência entre o componente polar da energia livre de superfície e a aderência da célula ao substrato. Vale ressaltar que os substratos CTRL utilizados neste estudo são placas poliméricas comerciais tratadas para promover a adesão celular.

O substrato CTRL apresentou o menor valor de ELS polar, com $E = 42,78 \text{ mJ/m}^2$, indicando a melhor aderência celular em torno de 99%. O substrato S59/PBS apresentou uma ELS polar de $\sim 57 \text{ mJ/m}^2$, o que também promoveu uma adesão celular de 65%. No entanto, um

valor de ELS maior (64 mJ/m^2), como observado no substrato P59/PBS, resultou em uma menor adesão celular de 19%. Esses resultados sugerem que a ELS polar desempenha um papel significativo na adesão celular. Para valores de energia livre próximos ao do substrato CTRL, a porcentagem de adesão celular aumenta.

Além disso, sabe-se que o ajuste da energia livre de superfície pode influenciar a adesão celular [105, 106]. Este resultado está fortemente ligado ao fato de que a energia de superfície controla a molhabilidade do material, o que, por sua vez, pode afetar o número de proteínas adsorvidas durante a interação entre as células e o substrato polimérico [107, 108].

Figura 4.40: Energia livre de superfície em função da porcentagem de células aderidas nas amostras CTRL, S59/PBS e P59/PBS.



Fonte: Elaborado pela autora.

Como a topografia da superfície é uma característica crucial do substrato capaz de influenciar a adesão celular, o foco deste estudo foi avaliar a rugosidade das superfícies poliméricas tratadas ou não com a solução salina, a fim de regular a adesão celular.

Para atingir esse objetivo, todas as medidas foram obtidas utilizando uma configuração AFM padrão (Multiview 4000™, Nanonics, Israel), combinada a um microscópio óptico (BXFM, Olympus, Japão) para observar as topografias dos substratos poliméricos e investigar a rugosidade superficial.

A topografia dos substratos foi fotografada (256×256 pixels) no modo de toque, com uma taxa de varredura de 0,3-1,0 Hz em uma área de $15 \times 15 \mu\text{m}^2$. Cerca de nove regiões foram analisadas para cada substrato. A rugosidade das amostras CTRL, S59, P59 e tratadas com PBS foi analisada através do software WSxM, com base nos parâmetros médios da rugosidade de cada amostra. Para cada imagem, foram selecionadas duas áreas de $7,5 \times 7,5 \mu\text{m}^2$, nas quais

foram analisados a rugosidade média (R_a) e o parâmetro razão de rugosidade (r). A média da rugosidade foi calculada como a média absoluta das alturas das irregularidades ao longo do perfil.

$$R_a = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |z_i - \bar{z}|, \quad (26)$$

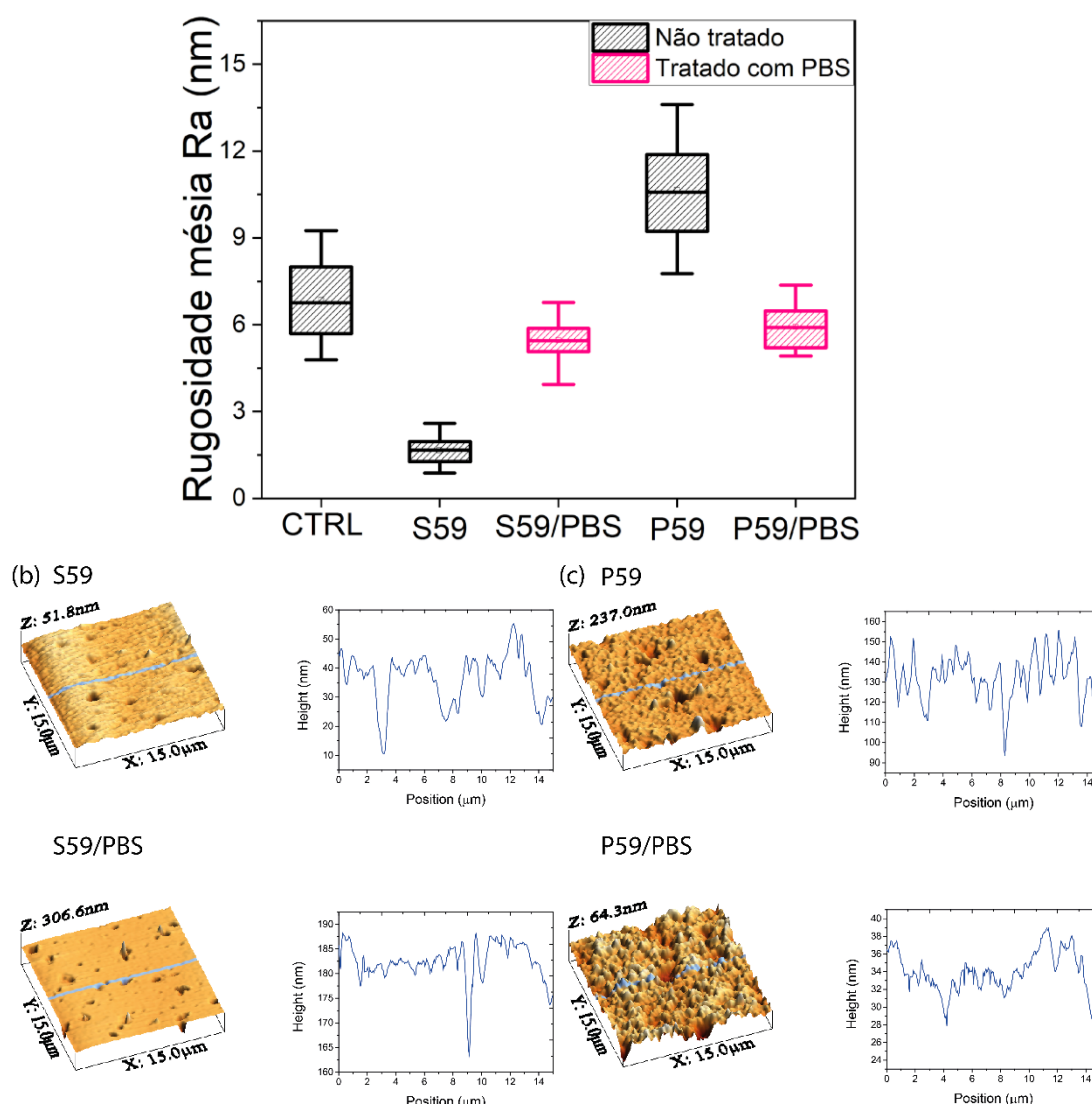
onde N é o número de pontos amostrais, z_i é a altura de cada ponto amostral e \bar{z} é a altura média dos pontos amostrais. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão (DP). Para mostrar que todos os dados estavam normalmente distribuídos, foram realizados os testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk no nível de 0,05, com população normal.

A Figura 4.41(a) mostra que o tratamento com PBS modificou os valores de R_a das amostras, reduzindo a rugosidade das amostras P59 e aumentando a rugosidade das amostras S59. Curiosamente, o PBS ajustou a rugosidade média de todas as superfícies para cerca de 5,30 nm. O teste de normalidade indicou que as médias populacionais são significativamente diferentes, com nível 0,05.

Estudos anteriores investigaram a modificação da rugosidade superficial de polímeros pelo PBS combinado com tratamento térmico [109]. No entanto, neste estudo, realizamos o tratamento com PBS nas superfícies poliméricas S59 e P59 sem a necessidade de aquecimento adicional, o que teve um efeito dominante na adesão de células epiteliais pulmonares. Esse resultado pode ser atribuído à modificações das propriedades físico-químicas das superfícies, como molhabilidade, energia superficial e rugosidade, após a interação com o PBS, sendo características bem conhecidas por influenciarem a morfologia e a adesão celular [85, 110, 111].

Analizamos cortes transversais dos substratos poliméricos (Fig. 4.41(b) e (c)), onde foi possível observar que os substratos S59/PBS apresentaram uma superfície notavelmente menos enrugada em comparação com a amostra P59/PBS. Assim, surge a necessidade de utilizar o parâmetro razão de rugosidade (r) da superfície, definido como a razão entre a área superficial real (A_r) e a área superficial sólida projetada ($A_p = 15\mu\text{m} \times 15\mu\text{m} = 255 \mu\text{m}^2$), que pode fornecer um entendimento mais preciso sobre o comportamento das células em cada substrato.

Figure 4.41: (a) Os valores da rugosidade média (R_a) das amostras. Imagens topográficas detectadas através do AFM nos substratos (b) S59, S59/PBS, (c) P59 e P59/PBS.



Fonte: Elaborado pela autora.

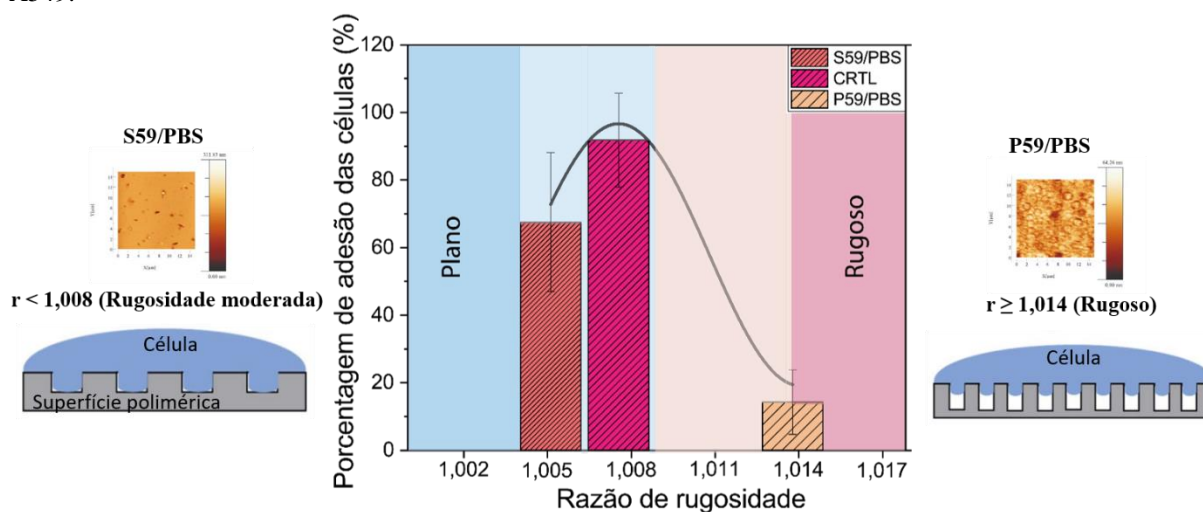
A Figura 4.42 relaciona o parâmetro r com a porcentagem de células aderidas em cada substrato, evidenciando como as alterações morfológicas das superfícies poliméricas influenciaram a adesão celular. Esse parâmetro é crucial para determinar a eficácia da adesão celular, pois descreve a interação real entre a célula e a superfície rugosa [112]. Mais uma vez, S59/PBS ($r = 1,0075$) e CTRL ($r = 1,0052$) coincidiram e apresentaram uma razão de rugosidade moderada ($1,005 \leq r \leq 1,008$), o que permitiu à membrana citoplasmática celular adaptar-se aos sulcos da superfície rugosa. Essa adaptação promoveu uma interação e estabilidade máximas entre célula e substrato, resultando em melhor adesão celular.

Por outro lado, o substrato P59/PBS ($r = 1.0138$) apresentou uma maior razão de rugosidade ($r \geq 1,014$), dificultando a adaptação da membrana citoplasmática celular às irregularidades e impedindo o contato completo com todos os sulcos. Como resultado, as células se posicionaram no topo das saliências do substrato áspero, sem alcançar as ranhuras

inferiores. Essa redução no contato célula-substrato levou a uma diminuição significativa na adesão celular, um fenômeno que encontra suporte em trabalhos anteriores [86].

A razão de rugosidade mostrou ser um parâmetro mais relevante que a rugosidade média para quantificar a interação celular com a nanorugosidade do substrato. Esse parâmetro reflete diretamente a capacidade de fixação celular ao substrato e subseqüentes alterações morfológicas.

Figura 4.42: Efeito da razão de rugosidade de filmes poliméricos tratados com PBS no comportamento da célula A549.



Fonte: Elaborado pela autora.

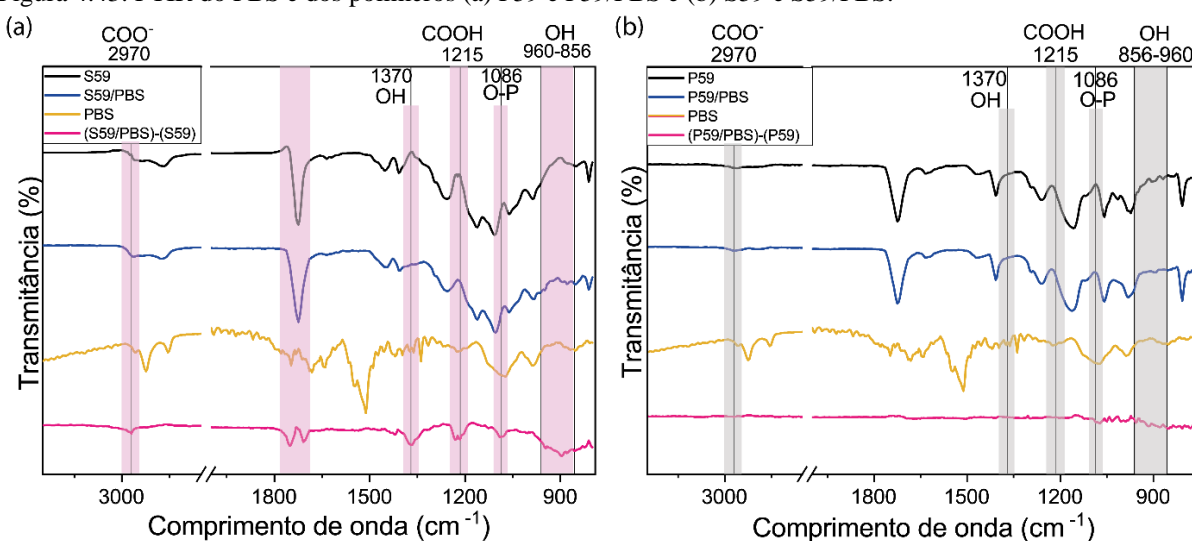
Em seguida, a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi empregada para identificar as alterações químicas ocorridas nos grupos funcionais das superfícies dos substratos poliméricos após tratamento com PBS. A Figura 4.43 mostra os espectros registrados: as amostras poliméricas não tratadas (linha preta), tratadas com PBS (linha azul), o espectro do PBS (linha amarela) e o espectro de diferença (linha rosa) entre as superfícies antes e depois do tratamento.

É notório que as amostras S59/PBS foram afetadas pelo tratamento com PBS, ao contrário das amostras P59/PBS. Ao observar as linhas rosa (Figura 4.43), identificamos bandas vibracionais importantes que foram excitadas pelo tratamento no substrato S59, mas que não foram detectadas no substrato P59.

Nos espectros de FTIR, foram observadas bandas que indicam formação de grupos hidroxilados atribuídos em 1418 cm^{-1} . Os picos em 1760 cm^{-1} e 1714 cm^{-1} representam a formação dos grupos funcionais carbonato de alquila e ácido carboxílico, respectivamente.

O pico 1232 cm^{-1} deve-se às vibrações de estiramento do aril-O, enquanto o pico 2972 cm^{-1} está relacionado ao metileno. Chama a atenção os modos vibracionais centrados em 1370 cm^{-1} , que indicam a presença de ligações hidroxila ($-\text{OH}$), e em 1086 cm^{-1} , associados ao estiramento P-O dos íons fosfato. Este último pico sugere especificamente a formação de uma fina camada de fosfato, possivelmente H_2PO_4^- ou HPO_4^{2-} , na superfície do S59 após o processo de adsorção.

Figura 4.43: FTIR do PBS e dos polímeros (a) P59 e P59/PBS e (b) S59 e S59/PBS.



Fonte: Elaborado pela autora.

Análise por FTIR demonstrou que o tratamento com PBS foi eficiente na funcionalização do substrato polimérico S59. O espectro FTIR revelou a presença de grupos funcionais hidroxila ($-\text{OH}$) e ácido carboxílico ($-\text{COOH}$), conhecidos por serem essenciais para promover a adesão celular. Diversos estudos focados na atividade biológica de polímeros indicam que os grupos carboxila e hidroxila, juntamente com a rugosidade superficial promovida no substrato, têm grande potencial para proporcionar uma afinidade celular elevada [83, 113-115].

A análise quantitativa da morfologia celular foi realizada para compreender melhor as mudanças na forma celular induzidas pela adesão. Para isso, foram calculados parâmetros como o fator de forma e a razão de aspecto. O fator de forma ϕ , que varia de 0 a 1) relaciona a razão entre a área da superfície celular e o perímetro celular [116, 117].

A razão de aspecto celular corresponde aproximadamente a razão entre o eixo menor (largura) e o eixo maior (comprimento) de uma elipse ajustada à célula [58, 118]. Portanto, esses parâmetros permitem avaliar o grau de circularidade das células. Isso significa que, para células mais arredondadas, a relação entre área e perímetro aumenta, assim como a relação entre

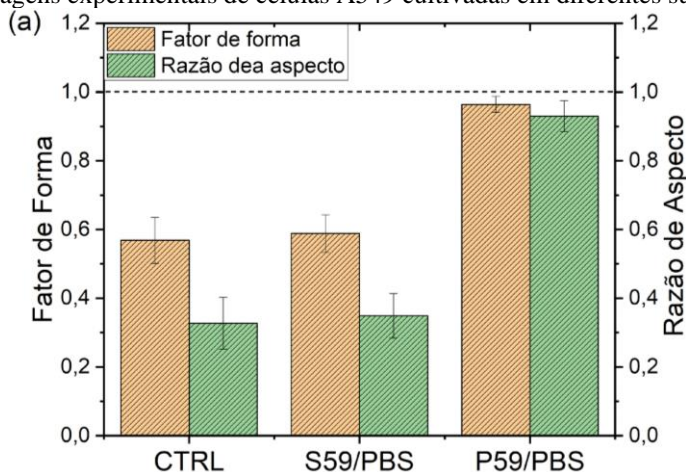
os eixos celulares, tornando os índices de fator de forma e razão de aspecto mais próximos de 1. Por outro lado, células aderidas ao substrato tendem a adquirir um formato alongado, apresentando parâmetros menores que 1. Os parâmetros morfológicos celulares foram calculados para pelo menos 60 células marcadas manualmente em cada condição experimental. Os dados experimentais foram expressos como média \pm desvio padrão.

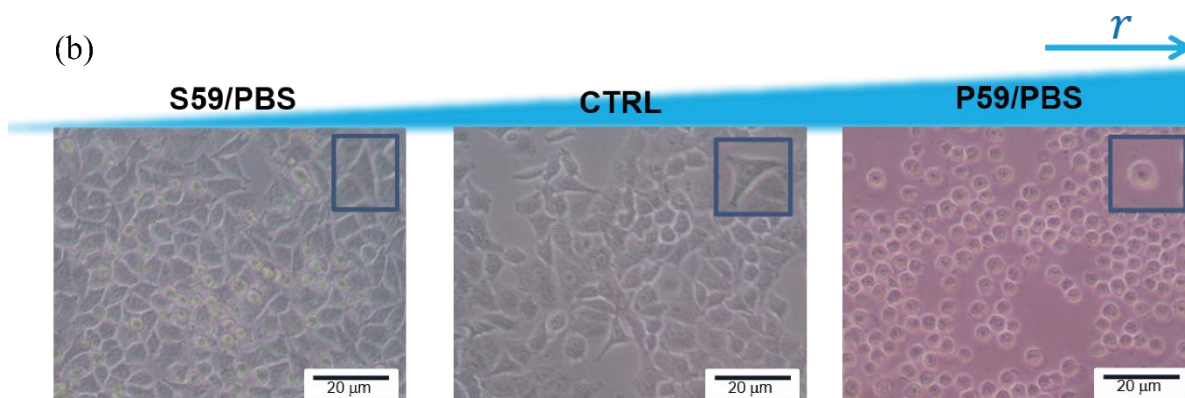
A Figura 4.44(a) apresenta os valores dos parâmetros morfológicos medidos para uma análise mais detalhada da adesão celular às superfícies tratadas com PBS. Nas amostras CTRL, as células exibiram um formato alongado e uma área celular maior, o que resultou em um fator de forma de $0,56 \pm 0,06$ e razão de aspecto de $0,32 \pm 0,07$, que indica alta adesão celular.

A análise revelou que o substrato S59 tratado com PBS aumentou a adesão das células A549. Os valores do fator de forma e da razão de aspecto para essa amostra foram de $0,58 \pm 0,05$ e $0,34 \pm 0,06$, respectivamente, sendo os mais próximos dos valores das amostras CTRL.

Nas amostras P59/PBS, os valores desses parâmetros se aproximaram de 1. Isso indica uma menor adesão celular à superfície. Esse comportamento celular foi mostrado na Figura 4.38 e está refletido na Figura 4.44(b), que apresenta a análise da morfologia celular. Observou-se claramente que os substratos S59 e CTRL favorecem tanto a adesão quanto a proliferação celular.

Figura 4.44: (a) O valor do fator de forma e da proporção das células A549 após a modificação da superfície com PBS e CTRL. (b) As imagens experimentais de células A549 cultivadas em diferentes superfícies por 24 h.



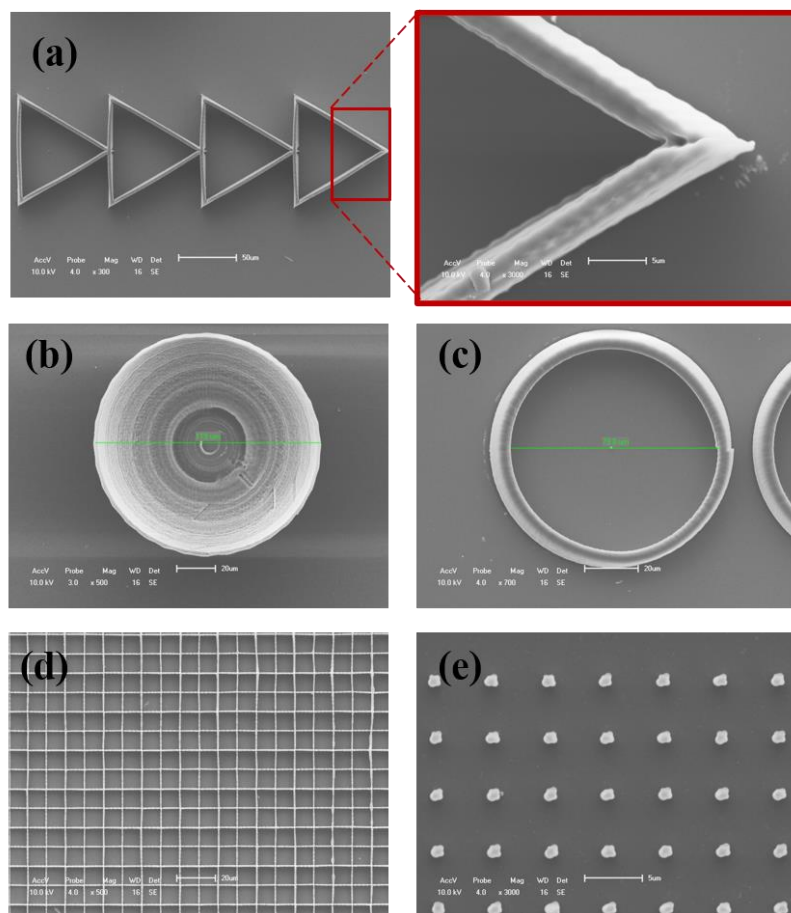


Fonte: Elaborado pela autora.

A interação célula-substrato é fortemente influenciada por propriedades físico-químicas, incluindo molhabilidade, rugosidade e energia livre de superfície. Consequentemente, controlar estas características permite prever e otimizar as atividades biológicas, como a adesão celular. Os polímeros têm sido amplamente utilizados como substratos para o cultivo de células 2D e na fabricação de estruturas celulares em 3D [119-121]. Embora os polímeros à base de acrilato ofereçam inúmeras vantagens, são materiais com características físico-químicas que podem inibir a adesão celular [122, 123]. Como cada tipo de célula possui propriedades de adesão específicas, por isso, é necessário ajustar os parâmetros presentes no substrato ao comportamento celular.

A partir do polímero S59, foram fabricados diversos arcabouços com potencial para o estudo de diferentes tipos celulares em seu interior. As microestruturas incluem geometrias triangulares e circulares com raio de 40 µm, micropoço circular com diâmetro de 119 µm e altura 80 µm, malhas com poros de 10 µm e paredes com largura de 625 nm, além de micropilares com altura de 6,5 µm e diâmetro de ~1,5 µm.

Figura 4.45: (a) Arcabouço triangular, (b) micropoço, (c) arcabouço circular, (d) malha quadrada 10x10 µm e (e) micropilares.



Fonte: Elaborado pela autora.

Esses resultados indicam que é possível projetar e desenvolver microestruturas celulares 3D e ajustar as condições ambientais através do tratamento com PBS para promover a adesão celular. Essa otimização aprimora o processo de microfabricação e facilita o estudo do comportamento celular, pois podemos seguir os protocolos básicos de ensaios biológicos, que incluem: fabricação de arcações pela técnica P2F, remoção de resina não polimerizada, tratamento com PBS, esterilização e cultivo celular.

4.5 NANOCOMPÓSITOS À BASE DE PRÓPOLIS VERMELHA BRASILEIRA MICROESTRUTURADOS POR POLIMERIZAÇÃO POR ABSORÇÃO POR DOIS FÓTONS COMO ESTRATÉGIA PARA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

4.5.1 Resinas antibacterianas adequadas ao tratamento de feridas

O processo de cicatrização de feridas pode ser mais lento do que o habitual devido a infecções ou complicações de condições patológicas. Uma estratégia promissora para otimizar curativos convencionais é o uso de curativos feitos a partir de nanocompósitos

microestruturados e incorporados com nanomateriais que aceleram a cicatrização e oferecem proteção contra agentes externos, incluindo bactérias.

As nanopartículas de própolis vermelha brasileira (NPs PV) exibem várias propriedades biológicas, incluindo cicatrizantes, antibacterianas e anti-inflamatórias, entre outras. A principal vantagem de usar esses nanocompósitos para curativos está na possibilidade de criar microambientes em 3D que mimetizam as condições *in vivo* através de um sistema de microfabricação a laser. Essa otimização facilita a proliferação e a adesão celular para a regeneração completa de tecidos, auxiliada pelas propriedades antibacterianas das NPs PV e pela microfabricação.

Neste trabalho, a técnica P2F foi empregada para fabricar padrões de microgrooves (circulares e retangulares) com largura de groove de 40 μm , usando dois nanocompósitos biocompatíveis incorporados com NPs PV, designados como P59.2+P e S59.2+P (síntese descrita na seção 4.1.4).

Estudos anteriores já demonstraram que os componentes dos polímeros P59.2 e S59.2 apresentam baixa citotoxicidade e alta biocompatibilidade, sendo amplamente utilizados na construção de microambientes para engenharia de tecidos [58]. As NPs PV foram preparadas conforme o protocolo descrito por Oliveira et al. [9], a partir do encapsulamento do Extrato de Própolis Vermelha (EPV) em NPs de Sílica Mesoporosa (SM), com arranjo dos poros na estrutura hexagonal.

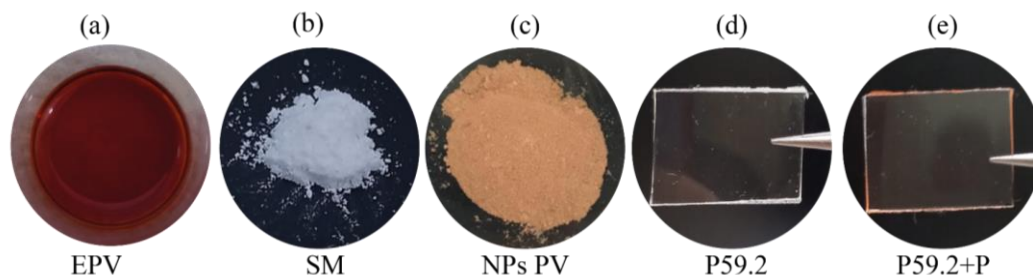
O tamanho das NPs PV foi determinado pelo microscópio eletrônico de transmissão (TEM). A absorção, luminescência e grupos químicos das amostras foram caracterizados pela técnica de UV-Vis, espectroscopia de fluorescência e espectroscopia de infravermelho, respectivamente. A atividade antibacteriana do EPV, SM, NPs PV, dos polímeros e dos nanocompósitos foi avaliada contra *Staphylococcus aureus* usando o teste de contato direto. A liberação *in vitro* das NPs PV a partir dos nanocompósitos, ao longo de um período de 4 dias em solução salina (pH 7,4, 37 °C) f,oi analisada pelo UV-VIS.

4.5.2 Caracterização de propriedades físico-químicas e espectroscópicas das amostras

As NPs PV são o resultado do encapsulamento do EPV em SM, como mostrado na Fig. 4.46(a-c). As NPs PV foram incorporadas nas resinas poliméricas P59.2 e S59.2 nas concentrações de 0% e 1,5% e suas propriedades ópticas foram avaliadas. Enquanto os polímeros P59.2 e S59.2 são transparentes e incolores, os nanocompósitos P59.2+P e S59.2+P exibiram uma coloração avermelhada devido à adição das NPs PV, conforme mostrado na Fig.

4.46(d-e). Observa-se que a transparência óptica diminuiu à medida que a concentração de NPs PV aumentou.

Figura 4.46: (a) Extrato de própolis vermelha (EPV); (b) sílica mesoporosa (SM); (c) NPs de própolis vermelha (NPs PV) (d) P59.2 puro; (e) P59.2 incorporado com 1.5% de NPs PV.

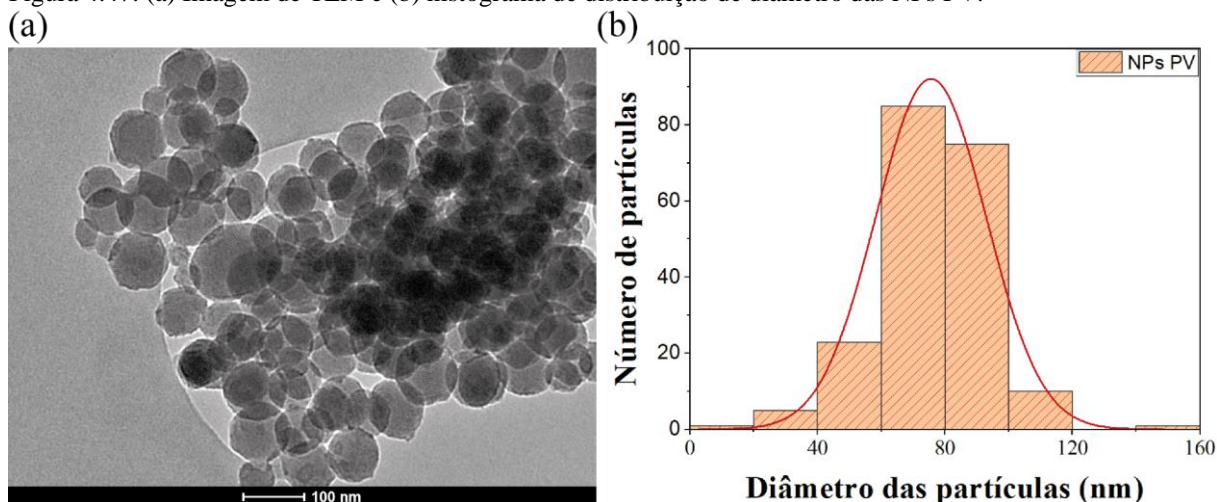


Fonte: Elaborado pela autora.

A estrutura morfológica e o tamanho das NPs PV foram identificados por um microscópio eletrônico de transmissão (TEM) Tecnai G2 Spirit Twin, operando a 120 kV. O diâmetro das NPs foi dimensionado usando o software ImageJ (NIH, Bethesda, MD) medindo mais de 100 NPs.

Na Figura 4.47a mostra os resultados obtidos por TEM, observa-se um formato hexagonal na maioria das partículas, uma estrutura característica das NPs SM. O histograma da distribuição do tamanho das partículas, apresentado na Figura 4.47b, evidencia uma uniformidade no tamanho, predominantemente em torno de 80 nm.

Figura 4.47: (a) Imagem de TEM e (b) histograma de distribuição de diâmetro das NPs PV.



Fonte: Elaborado pela autora.

Os espectros de absorção das nanopartículas SM, EPV e NPs PV, polímeros P59.2 e S59.2 e nanocompósitos P59.2+P e S59.2+P foram realizados por espectrofotômetro UV-3600 (Shimadzu, Kyoto, Japão), registrados na faixa de 300-700 nm.

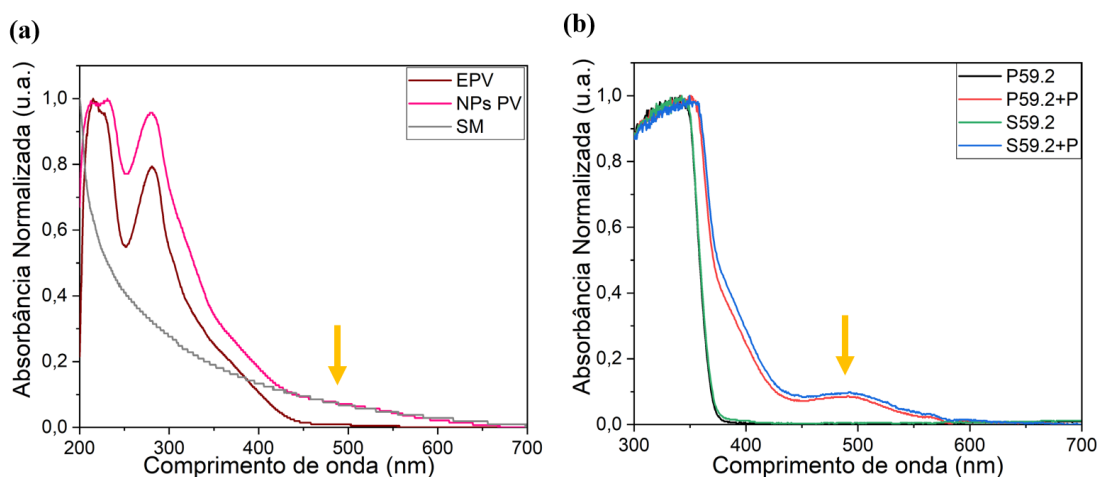
A Figura 4.48(a) apresenta os espectros de absorção no ultravioleta e visível para o EPV, SM e NPs PV. O EPV (curva em marrom) exibe um pico de absorbância na faixa de 205 a 240 nm, além de outro entre 250 e 400 nm que indicam a presença de ácidos fenólicos e seus derivados, como flavonas, flavonóis, flavanonas e flavonoides. Enquanto, a absorbância em torno de 280 nm e 320-330 nm sugere a presença de compostos químicos da classe dos flavanol [124, 125]. Alguns estudos anteriores relataram um pico de absorbância máxima em torno de 295 nm para o extrato etanólico de própolis [126]. Enquanto que, em regiões de comprimentos de onda menores foram atribuídos principalmente a dienos alifáticos e ácidos carboxílicos.

A amostra de SM (curva em cinza) apresenta uma absorção máxima em 200 nm que se estende até 600 nm. As NPs PV (curva em rosa) exibem os mesmos picos de absorbância encontrados no EPV e na SM.

Na figura 4.48(b) foram avaliados os espectros de absorção dos polímeros S59.2 e P59.2 e dos nanocompósitos S59.2+P e P59.2+P. As amostras S59.2 e P59.2 não possuem absorção na região do visível. Enquanto que, os nanocompósitos S59.2+P e P59.2+P apresentam absorção em uma ampla faixa de 380 nm a 450 nm, devido à adição das NPs PV. O pico de absorbância entre 450 a 580 nm é atribuído à presença da SM, e não ao EPV.

O pico máximo de absorção centrado em torno de 350 nm, observado nas amostras S59.2 e P59.2, permanece após a incorporação das NPs PV, com um pequeno deslocamento para 390 nm. Isso assegura que a eficiência do FI não foi comprometida pela funcionalização do polímero. Logo, os nanocompósitos S59.2+P e S59.2+P tornam-se excelentes candidatos para a microfabricação de ambientes biológicos 3D, usando métodos aditivos com lasers de pulsos ultracurtos [127, 128].

Figura 4.48: Espectro de absorção (a) do EPV, SM e NPs PV; e (b) dos polímeros S59.2 e P59.2 e dos nanocompósitos S59.2+P e P59.2+P.



Fonte: Elaborado pela autora.

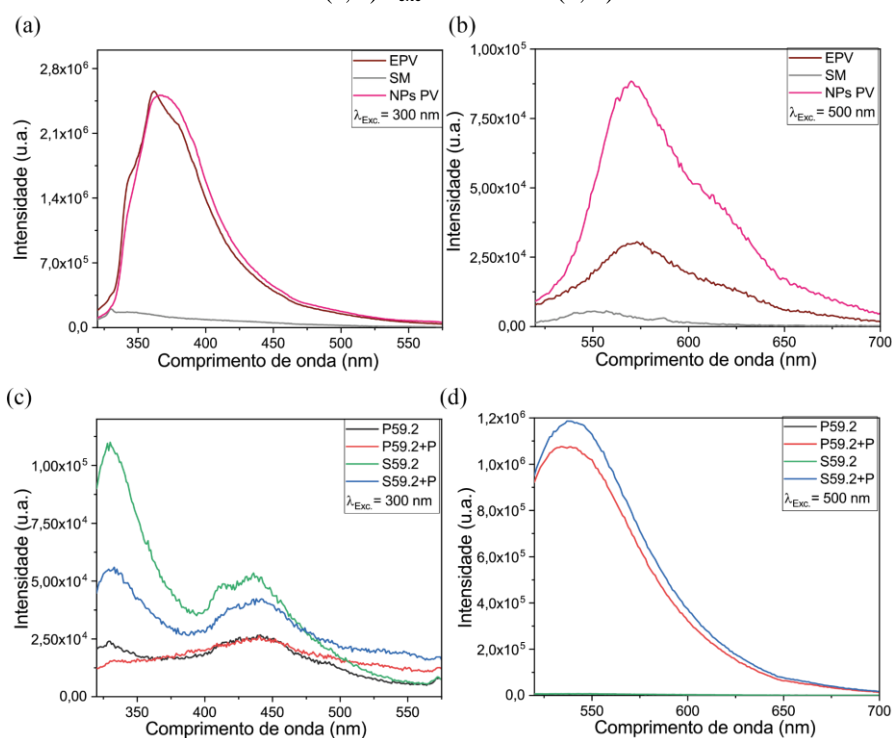
A fluorescência das amostras foi analisada utilizando um espectrofluorímetro FluoroLog®-3 (HORIBA, Kyoto, Japão), equipado com uma lâmpada Xenon (CW 450 W) e um detector fotomultiplicador (modelo R928P), variando o comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) entre 300 e 500 nm.

As propriedades ópticas das amostras dos poliméricos e dos nanocompósitos foram analisadas por espectros de fotoluminescência (FL). A luminescência das NPs PV foi atribuída ao EPV, e não à SM, independente do λ_{exc} excitação, com pico de emissão em 370 nm e 570 nm para λ_{exc} de 300 nm e 500 nm, respectivamente (Fig. 4.49a-b).

Os polímeros P59.2 e S59.2 exibem FL com duas bandas principais de emissão, com picos centrados em 330 nm e 430 nm de baixa intensidade, quando excitados em 300 nm (Fig. 4.49c). Embora as NPs PV exibam luminescência máxima em 360 nm, a fluorescência dos nanocompósitos P59.2+P e S59.2+P permaneceu inalterada após a incorporação das NPs, sugerindo uma provável supressão de fluorescência causada pela interação entre as NPs PV e os polímeros.

Quando os nanocompósitos foram excitados em 500 nm, observa-se uma larga banda de emissão com pico em 540 nm, atribuída às NPs PV, uma vez que os polímeros puros não apresentam luminescência (figura 4.49d).

Figura 4.49: Espectros de fluorescência das nanopartículas de SM, EPV e NPs PV; dos polímeros S59.2 e P59.2 e dos nanocompósitos S59.2+P e P59.2+P em (a, c) λ_{exc} = 300 nm e (b, d) 500 nm.



Fonte: Elaborado pela autora.

A investigação dos grupos funcionais e das ligações químicas presentes nos materiais foi realizada através de um espectrômetro de FTIR (Modelo IRPretige-21, Shimadzu, Kyoto, Japão), operando na faixa de $520 - 4000 \text{ cm}^{-1}$, com resolução de 4 cm^{-1} e 120 medidas no modo de transmitância, à temperatura ambiente. As análises foram realizadas utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr) para os materiais em pó e o método de reflectância total atenuada (ATR) para os demais materiais. Cada caracterização foi obtida para SM, EPV e NPs PV na concentração de $100 \mu\text{m/ml}$ e para os polímeros S59.2, P59.2 e os nanocompósitos S59.2+P e S59.2+P.

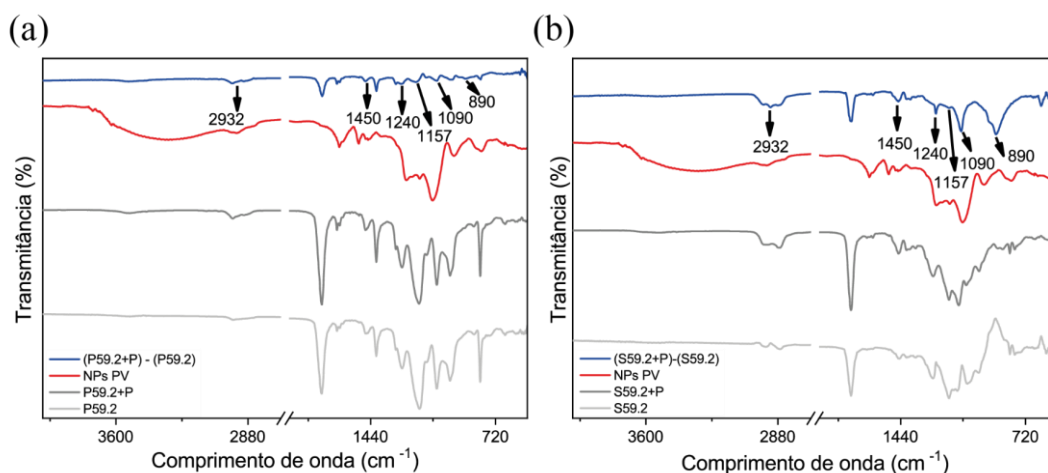
A Figura 4.50 apresenta os espectros de FTIR das amostras de NPs PV e das poliméricas, com e sem própolis incorporada. O espectro das NPs PV (linha vermelha) exibe bandas de absorção características dos compostos presentes no EPV e na SM. As bandas de absorção em 2970 cm^{-1} , 2932 cm^{-1} , 1627 cm^{-1} , 1508 cm^{-1} , 1450 cm^{-1} e 1157 cm^{-1} são características dos compostos fenólicos moleculares presentes no EPV [129], enquanto a ampla banda de absorção entre 3200 cm^{-1} e 3700 cm^{-1} está associada à assinatura vibracional dos grupos hidroxila (-OH) na estrutura molecular da SM [130]. Observou-se que alguns picos apresentaram deslocamentos sutis, devido à formação de interações intermoleculares, como ligações de hidrogênio, entre os componentes das NPs PV e da cadeia polimérica.

O espectro de diferença entre os polímeros e os nanocompósitos (linha azul escura) indica que algumas bandas de absorção específicas da própolis vermelha exibiram forte vibração molecular, apesar da baixa concentração de NPs PV incorporadas na cadeia polimérica. Esse efeito foi mais pronunciado nas resinas contendo o monômero SR 499 (S59.2+P).

Em particular, as bandas de absorção centradas em 2932 cm^{-1} , 1450 cm^{-1} , 1240 cm^{-1} , 1090 cm^{-1} e 890 cm^{-1} são características dos compostos fenólicos e aromáticos C-H presentes na própolis vermelha, além da assinatura vibracional do grupo Si-O-Si (siloxano) na SM, ambos presentes nas NPs PV [131, 132].

A análise FTIR dos nanocompósitos confirmou a presença de compostos fenólicos, comumente encontrados na própolis vermelha do Nordeste brasileiro, que são conhecidos por causar danos funcionais e estruturais às membranas citoplasmáticas bacterianas [133, 134].

Figura 4.50: Espectros de infravermelho por transformada de Fourier de polímeros, nanocompósitos e NPs PV: (A) P59.2, P59.2+P e (B) S59.2 e S59.2+P.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.5.3 Comportamento flexural dos polímeros e nanocompósitos

As propriedades mecânicas dos polímeros e nanocompósitos foram avaliadas pelo Teste de Resistência à Flexão de Três Pontos [135], usando a máquina de teste semi-universal Microtensile OM100 (Odeme Dental Research, SC, BRA).

Os corpos de prova foram preparados para cada grupo experimental ($n = 5$) em uma matriz de aço inoxidável com dimensões de 2 mm × 2 mm × 25 mm. Após 40 minutos de polimerização sob lâmpada UV, as amostras foram lavadas com etanol (99,8% PA, Neon). O teste de flexão de três pontos foi realizado à temperatura ambiente, com uma taxa de carga de 50 N/min e uma velocidade de $0,75 \pm 0,25$ mm/min até a fratura da amostra. A curva tensão-deformação resultante foi registrada para cada teste. O módulo de elasticidade para flexão (E_B) é descrito por:

$$\sigma = E_B \varepsilon, \quad (27)$$

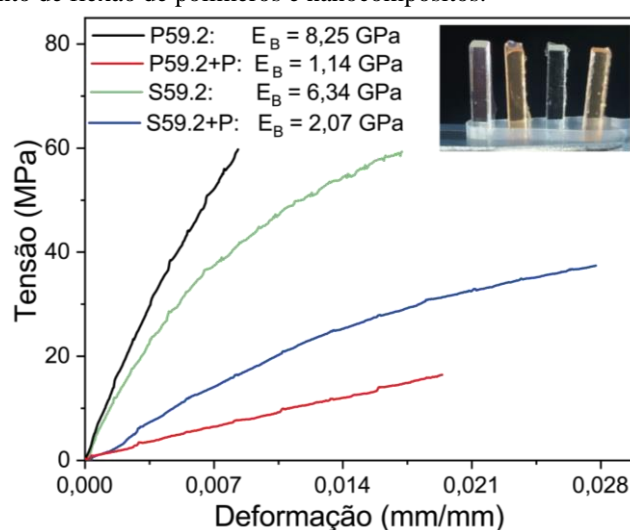
onde σ é a Tensão Flexural (MPa) e ε é a Deformação Flexural (mm/mm). O módulo de elasticidade (E_B) é calculado pela tangente, dentro do limite elástico, da curva tensão-deformação. Esse cálculo permite avaliar a rigidez e a capacidade de deformação dos polímeros e nanocompósitos sob esforço mecânico.

As propriedades mecânicas das amostras são parâmetros críticos na engenharia de tecidos. O ajuste da elasticidade dos nanocompósitos, por exemplo, é essencial para promover de maneira eficiente os processos de cura, regulando a fixação celular, disseminação, sinalização e proliferação [136, 137].

A Figura 4.51 mostra os resultados dos testes de flexão de três pontos dos polímeros e nanocompósitos. Com base na análise das curvas de tensão-deformação flexural, os polímeros

P59.2 e S59.2 demonstraram um módulo elástico (E_B) de $8,25 \pm 0,05$ GPa e $6,34 \pm 0,05$ GPa, respectivamente. Além disso, a incorporação de NPs PV nas matrizes poliméricas P59.2 e S59.2 resultou em uma redução significativa do E_B , com valores de $1,14 \pm 0,01$ GPa (P59.2+P) e $2,07 \pm 0,01$ GPa (S59.2+P). O aumento notável do alongamento na ruptura e a redução do E_B dos nanocompósitos indicam que as NPs PV modificaram mecanicamente os polímeros, para torná-los mais flexíveis e resistentes. Isso indica que esses nanocompósitos podem ser efetivamente adaptados para desempenhar as propriedades mecânicas desejadas, reforçando sua importância como candidatos para curativos destinados à cicatrização de feridas.

Figura 4.51: Comportamento de flexão de polímeros e nanocompósitos.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.5.4 Liberação *in vitro* de nanopartículas de própolis vermelha a partir dos nanocompósitos

A liberação de própolis vermelha foi realizada em 10 mL de solução salina tamponada com fosfato 0,01 M (PBS, pH 7,4) sob condições *in vitro*, a 37°C, durante 4 dias com agitação contínua. Amostras poliméricas medindo 10 mm x 7 mm (espessura x diâmetro) foram preparadas para cada resina. Alíquotas do tampão foram coletadas em intervalos de tempo pré-definidos e submetidas à análise quantitativa por espectrometria UV-Vis (espectrofotômetro UV-3600) para estimar a quantidade de NPs PV liberada dos nanocompósitos P59.2+P e S59.2+P.

Para isso, foi obtida uma curva de calibração por espectrometria UV-Vis, utilizando a naringenina como padrão analítico, devido à sua presença significativa na composição do EPV. A curva de calibração foi construída observando a intensidade de absorção em 291 nm,

característica da naringenina, e correlacionando-a com a concentração da própolis vermelha na amostra em solução, conforme o protocolo descrito por Nascimento et al. [138, 139].

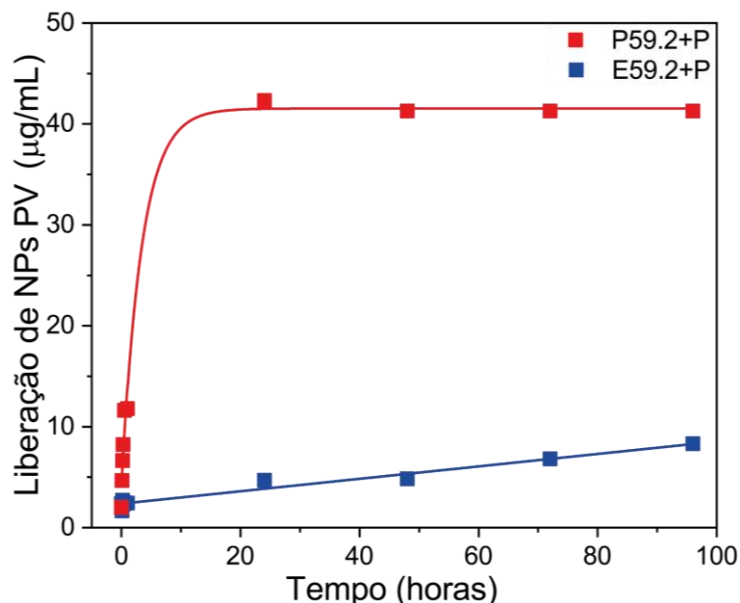
A Figura 4.52 mostra a dinâmica de liberação das NPs PV nos nanocompósitos S59.2+P e P59.2+P. O estudo de liberação *in vitro* demonstrou que a composição da matriz polimérica é um fator determinante na liberação de NPs PV. Interessante observar que as amostras P59.2+P liberaram rapidamente uma quantidade significativa de NPs PV em 1 hora. Nesse estágio, toda a superfície do espécime está em contato direto com a solução, facilitando a liberação de NPs para o meio aquoso circundante. A liberação máxima das NPs ocorreu em 24 horas, atingindo uma concentração de 42 µg/ml, que se manteve aproximadamente constante nas horas seguintes.

Em contraste, as amostras S59.2+P exibiram um processo de liberação mais lento, porém gradual e contínuo. Após 96 horas, a concentração liberada atingiu 8 µg/ml, sem atingir um platô. Assim, a liberação de NPs PV nas amostras P59.2+P, contendo o monômero PETA, foi significativamente mais rápida, atingindo um platô de liberação em menos de 24 horas. Por outro lado, as amostras S59.2+P, contendo o monômero SR499, apresentaram uma liberação mais lenta e controlada.

Assim, a capacidade observada de controlar a quantidade de liberação de NPs PV, dependendo do tipo de polímero, permite diferentes aplicações para cada material [140]. Aplicações de administração de fármacos podem ser beneficiadas, uma vez que, a liberação precisa e programada de compostos bioativos é essencial para a eficácia terapêutica. Por exemplo, a cinética de liberação mais lenta de nanocompósitos poliméricos S59.2+P é benéfica para a cicatrização de uma queimadura comum, posto que a liberação constante e crescente do fármaco no local é essencial para o sucesso dos processos de reparo, epitelização e maturação da cicatriz. Em outras situações, como um local lesionado, é necessário um tratamento mais intensivo com liberação rápida da substância, tornando o uso de nanocompósitos P59.2+P mais apropriado [141].

Isso sugere que, ao alterar a composição monomérica dos nanocompósitos, é possível modificar a taxa de liberação do fármaco, aumentando assim a eficiência da atividade antibacteriana. A capacidade de liberação do fármaco de NPs PV em nossos nanocompósitos foi comparável aos achados relatados em outros estudos na literatura [142, 143, 144].

Figura 4.52: Dinâmica de liberação *in vitro* das NPs PV em nanocompósitos de P59.2+P e S59.2+P.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.5.5 Atividade antibacteriana das nanopartículas, polímeros e nanocompósitos

Os ensaios de atividade antibacteriana foram realizados contra *S. aureus* (cepa ATCC 25923). Para as NPs de SM, EPV e NPs PV, foi realizado através do teste de microdiluição em caldo para determinar a concentração inibitória mínima (MIC), seguindo as diretrizes do Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018) para bactérias (M07-A10) [145].

O ensaio foi conduzido em microplacas estéreis de 96 poços. A MIC foi definida como a menor concentração dos produtos testados capazes de inibir visualmente o crescimento observado nos poços em comparação com o crescimento do controle. Uma solução de 2,3,5-triphenyltetrazolium bromide (0,5% em peso) foi usada como indicador de crescimento microbiano. Todo o experimento foi conduzido em triplicata.

A eficácia antibacteriana das amostras poliméricas foi avaliada pelo Teste de Contato Direto (DCT) [146, 147, 148, 149], empregando cinco espécimes medindo 1,0 mm x 5,0 mm (espessura x diâmetro) para cada grupo experimental. A cepa bacteriana foi ativada em caldo de infusão de cérebro e coração (heart infusion broth - BHI) estéril por 24 h a 37 °C, então semeada em placas Petri contendo ágar infusão de cérebro e coração (heart infusion agar - BHA) incubado a 37 °C por 24 h. Após a incubação, colônias isoladas foram transferidas para tubos contendo 5 mL de solução fisiológica estéril até que a concentração padrão da suspensão bacteriana de 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) fosse alcançada. O ajuste da concentração foi confirmado espectrofotometricamente a 625 nm, dentro da faixa de absorbância de 0,08 a 0,1.

A diluição serial da suspensão bacteriana foi conduzida para obter uma concentração de inóculo de 10^6 UFC/mL. Os espécimes do grupo experimental (n=5) foram colocados em tubos

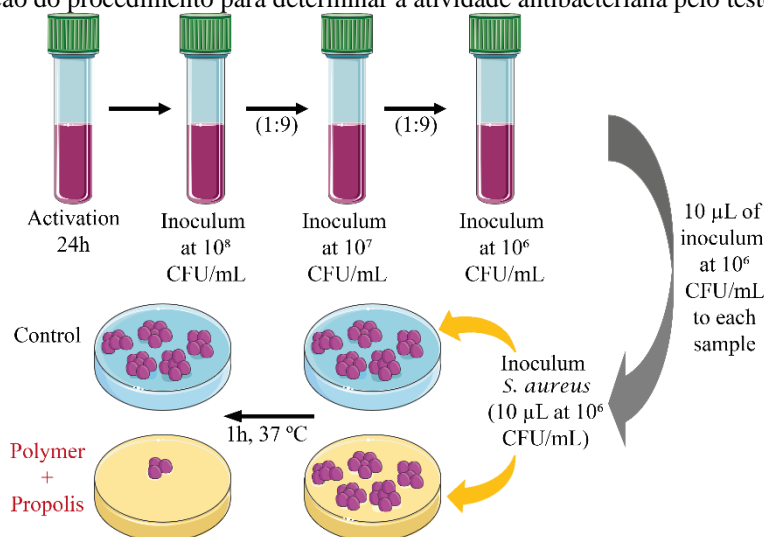
criogênicos pré-esterilizados, e 10 µL do inóculo a 10⁶ UFC/mL foram aplicados em sua superfície superior. As amostras foram então expostas ao fluxo laminar por 1 hora. Posteriormente, 200 µL de solução fisiológica estéril foram adicionados aos tubos, seguidos de homogeneização por vórtice. Diluições seriadas da suspensão homogeneizada para obter diluições de 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³ foram inoculadas (n=5) em placas de BHA, conforme ilustrado na figura 4.53.

Após incubação por 24 h sob condições previamente descritas, a contagem de colônias e a determinação de UFC/mL foram realizadas, onde UFC/mL é igual ao número de colônias x 40 x fator de diluição. A razão da atividade antibacteriana (r%) foi determinada do seguinte modo:

$$r(\%) = \frac{(b-c)}{b} \times 100 \quad (4)$$

onde r(%) é a razão de atividade antibacteriana; b é a média de UFC/mL recuperada para o grupo controle; c é a média de UFC/mL recuperada para os respectivos grupos em análise. A análise estatística foi realizada usando o teste de Mann-Whitney, com um nível de significância definido em $p < 0,05$, comparando materiais sem própolis com seus respectivos equivalentes contendo própolis.

Figura 4.53: Ilustração do procedimento para determinar a atividade antibacteriana pelo teste de contato direto.



Fonte: Elaborado pela autora.

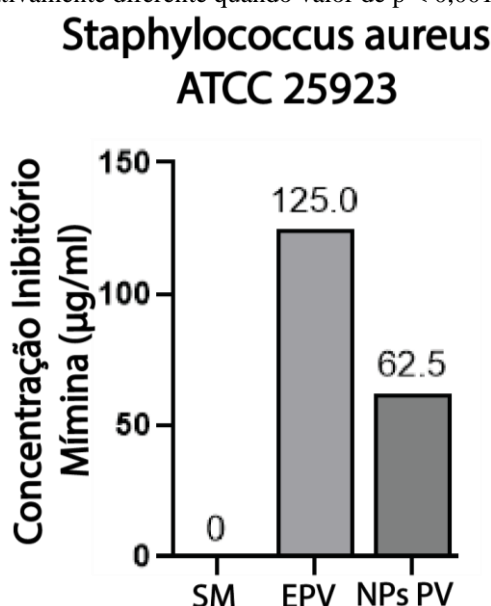
Os resultados da atividade antibacteriana, investigados pelo método de microdiluição, indicaram que a SM isolada não apresentou atividade antimicrobiana contra a cepa *S. aureus* ATCC 25923. Enquanto o EPV apresentou uma concentração inibitória mínima (CIM) de 125 µg/ml, as NPs PV apresentaram uma CIM significativamente menor de 62,5 µg/ml (Fig. 4.54).

As diferenças observadas na CIM entre os três grupos (SM, EPV e NPs PV) foram estatisticamente significativas, com um valor de $p < 0,001$. Esse resultado sugere que a

incorporação das NPs de SM com EPV não apenas conferiu atividade antimicrobiana, mas também a aumentou quando comparada ao extrato isolado [150].

A significância estatística da atividade antibacteriana sugere que a interação entre as NPs de SM e o EPV cria um efeito sinérgico, aumentando a eficácia antimicrobiana contra a cepa testada. Esse fenômeno pode ser atribuído à capacidade das NPs de facilitar a penetração do extrato nas células bacterianas, aumentando sua concentração no local de ação e, conseqüentemente, sua atividade antibacteriana. Com base nessas descobertas, o desenvolvimento de nanocompósitos envolvendo NPs PV e resinas poliméricas foi incentivado, formando um filme com potencial aplicação terapêutica [133].

Figura 4.54: Atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 de SM, EPV e NPs PV, pelo método de microdiluição. Significativamente diferente quando valor de $p < 0,001$.



Fonte: Elaborado pela autora.

Os resultados da atividade antibacteriana, avaliados pelo DCT por 1 h, revelaram diferenças significativas na eficácia antimicrobiana dos nanocompósitos P59.2+P e S59.2+P contra *S. aureus* (Fig. 4.55).

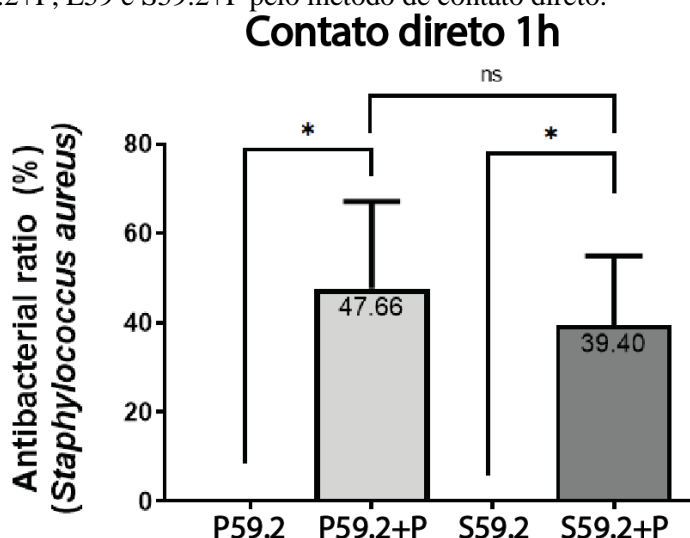
O polímero P59.2, quando avaliado isoladamente, não demonstrou atividade antibacteriana detectável. Entretanto, a amostra P59.2+P apresentou inibição significativa de aproximadamente 47,66% da viabilidade bacteriana, com valor de $p = 0,0056$. Analisando o segundo grupo, observou-se que o polímero S59.2 também não apresentou atividade antibacteriana significativa contra *S. aureus*.

Entretanto, S59.2+P apresentou inibição de 39,4% da viabilidade bacteriana, com valor de $p = 0,0411$, indicando significância estatística em relação ao S59.2. Os dados estatísticos

analisados com nível de significância de $p < 0,05$ indicam que a adição de NPs PV tanto ao P59.2 quanto ao S59.2 potencializou a atividade antibacteriana dos nanocompósitos. Não foi observada diferença estatística na viabilidade celular entre as formulações P59.2+P e S59.2+P, sugerindo que a incorporação de NPs PV otimizou a eficácia antimicrobiana em ambas as matrizes.

A maior porcentagem de inibição alcançada pelo nanocompósito P59.2+P pode ser atribuída à cinética de liberação dos compostos ativos. Enquanto o nanocompósito S59.2+P demonstrou um perfil de liberação lenta e controlada no ensaio *in vitro*, o P59.2+P demonstrou uma liberação mais rápida. Essa cinética de liberação acelerada pode ter contribuído para uma resposta antibacteriana ligeiramente mais pronunciada, indicando sua adequação para inibir patógenos em locais de feridas [151, 152]. Esses materiais são capazes de acelerar a cicatrização de feridas, combater infecções bacterianas de amplo espectro e processos inflamatórios bacterianos voltados para aplicações biomédicas [153].

Figura 4.55: Atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* dos polímeros P59.2 e S59.2 e nanocompósitos P59.2+P, E59 e S59.2+P pelo método de contato direto.



Fonte: Elaborado pela autora.

Significantly different when p value $< 0,05$.

* p value = 0,0411

** p value = 0,0056

4.5.6 Arcabouços fabricados via polimerização por absorção de dois fótons

Buscando aumentar a área de contato do substrato com as bactérias e sua eficiência em inibir seu crescimento, foi proposto produzir superfícies microgrooves. Um sistema comercial de microfabricação tridimensional (μ Fab Workstation - NEWPORT) pela técnica P2F foi usado para construir superfícies de microgrooves em dois padrões geométricos diferentes, paralelas (MGP) e circulares (MGC) na resina P59.2 sobre o substrato polimérico. Um laser pulsado de

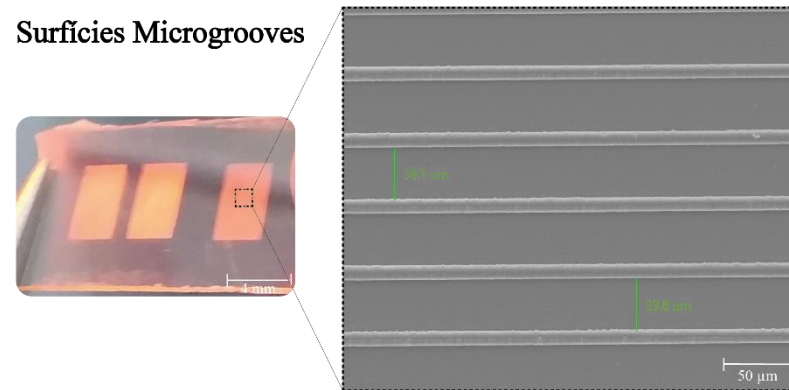
femtosssegundos (Chameleon Ultra - COHERENT), sintonizado em 720 nm, com potência do laser de 62 mW, e uma lente objetiva (100, NA = 0,70, Nikon) foram utilizados como fonte de radiação e dispositivo de foco, respectivamente.

Inicialmente, uma lâmpada UV foi usada para polimerizar um filme plano de cada amostra polimérica. Um conjunto de linhas paralelas, com 5 mm de comprimento e separação de 50 μm , foi construído com velocidade 250 $\mu\text{m/s}$ e aceleração de 10 mm/s^2 . Enquanto que, o conjunto de círculos concêntricos, com 2 mm de diâmetro externo e separação de 50 μm , foi construído com $P = 100 \text{ mW}$, $V_{\text{scan}} = 100 \mu\text{m/s}$ e aceleração de 0.5 mm/s^2 . Finalmente, as amostras foram imersas em álcool etílico (99.8% PA, Neon) por 20 min para retirar a resina não polimerizada e deixar apenas os microambientes sobre o substrato.

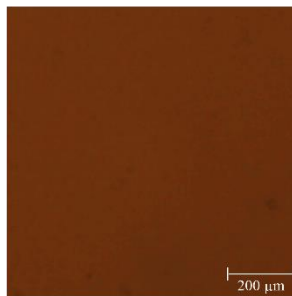
A principal característica distintiva desses curativos feitos a partir desses nanocompósitos está na capacidade de construir arcabouços celulares via P2F, permitindo a criação de geometrias e arquiteturas que melhor se adaptam às lesões cutâneas, promovendo assim um comportamento celular aprimorado, enquanto protege o local contra a proliferação bacteriana [58].

Para esse propósito, foram escritos microgrooves paralelos e circulares na superfície de filmes dos nanocompósitos S59.2+P e P59.2+P, usando a técnica P2F, conforme ilustrado na figura 4.56. As superfícies dos microgrooves foram caracterizadas por MEV e microscópio óptico (10X, NA = 0,25, Newport) e mostraram paredes estáveis, com largura do groove de 39,45 μm e largura de coluna de 13,3 μm . As células podem ser consideradas sensores inteligentes capazes de ajustar seu comportamento em resposta a estímulos externos [154]. Esta abordagem fornece uma plataforma altamente precisa e personalizável, permitindo a geração de uma variedade de estímulos às células, a fim de aumentar sua proliferação, diferenciação e adesão celular [155, 156].

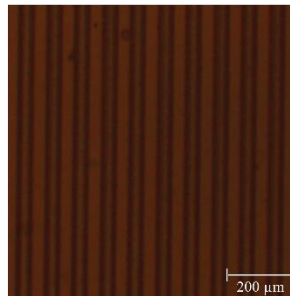
Figura 4.56: Imagens de MEV e microscópio óptico das superfícies planas e superfícies de microgrooves paralelas (MGP) e circulares (MGC) feitas dos nanocompósitos pela técnica P2F.



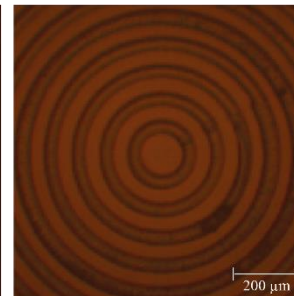
Superfície plana



MGP



MGC



Fonte: Elaborado pela autora.

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/(TiO₂) 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] SILVA, Laís Vanessa de Azevedo Teles da. Antioxidant and antimicrobial activity of red propolis embedded mesoporous silica nanoparticles. 2023. 10 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) - Instituto de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2023.
- [10] JAGGESSAR, A. et al. Bacteria Death and Osteoblast Metabolic Activity Correlated to Hydrothermally Synthesised TiO₂ Surface Properties. **Molecules**. v. 24, n. 7, p. 1-18, 2019.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] SUN, Z.B., et al. Multicolor polymer nanocomposites: In situ synthesis and fabrication of 3D microstructures. **Advanced Materials**. v. 20, p. 914-919, 2008.
- [15] SAKELLARI, Ioanna. Quantum dot based 3D printed woodpile photonic crystals tuned for the visible. **Nanoscale Adv**. v. 1, p. 3413-3423, 2019.
- [16] 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 nontumorigenic cells. **BBA - Biomembranes**. v. 858, n.7, p. 1533–1540, 2016.
- [17] SILVA, A. C., et al. Shell Thickness Modulation in Ultrasmall CdSe/CdS_xSe_{1-x}/CdS Core/Shell Quantum Dots via 1-Thioglycerol. **ACS Nano**. v. 8, n. 2, p. 1913-1922, 2014.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] MARTELLI, A. et al. Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals. **Biochimie**. v. 88, n. 11, p. 1807-1814, 2006.
- [21] 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.
- [22] STAMPFL, Jürgen; LISKA, Robert; OVSIANIKOV, Aleksandr. **Multiphoton Lithography: Techniques, Materials and Applications**. ed. 1, Wiley-VCH, 2016.

- [23] 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
- [24] GUINIER, André. X-ray diffraction in crystals, imperfect crystals, and amorphous bodies. Courier Corporation, 1994.
- [25] KOO, Bonil et al. Simultaneous phase- and size-controlled synthesis of TiO₂ nanorods via non-hydrolytic sol-gel reaction of syringe pump delivered precursors. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 48, p. 24318-24323, 2006.
- [26] GUPTA, S.; M. Tripathi. A review of TiO₂ nanoparticles. **Chinese Sci Bull**. v. 56, p. 1639-1657, 2011.
- [27] EL-SHAFAI, 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.
- [28] VERCELLINO, M. et al. Nanostructured TiO₂ Surfaces Promote Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Differentiation to Osteoblasts. **Nanomaterials**. v. 6, n. 7, p. 124, 2016
- [29] 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.
- [30] HUANG, Shuai et al. Recent advances in the chemical composition of propolis. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 19610-19632, 2014.
- [31] PASUPULETI, Visweswara Rao et al. Honey, propolis, and royal jelly: a comprehensive review of their biological actions and health benefits. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, 2017.
- [32] CAMPOS, Jessica Valéria de; ASSIS, Odílio Benedito Garrido; BERNARDES-FILHO, Rubens. Atomic force microscopy evidences of bacterial cell damage caused by propolis extracts on *E. coli* and *S. aureus*. **Food Science and Technology**, v. 40, p. 55-61, 2019.
- [33] MORENO, Ana Isabel et al. Effects of Propolis Impregnation on Polylactic Acid (PLA) Scaffolds Loaded with Wollastonite Particles against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, and Their Coculture for Potential Medical Devices. **Polymers**, v. 15, n. 12, p. 2629, 2023.
- [34] ROVERI, Veridiana Z. et al. Desenvolvimento e caracterização de filmes de TiO₂ para aplicação como fotocatalisadores em processos oxidativos avançados. **Comunicado Técnico**. v. 114, n.1, 2010.
- [35] CHANG, Wenkai, et al. Preparation of titanium dioxide porous thin films via photopolymerization of the colloidal TiO₂ dispersion. **Materials Chemistry and Physics**. v. 140. p. 665-673, 2013.
- [36] 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.
- [37] NGUYEN, A. K.; NARAYAN, R. J. Two-photon polymerization for biological applications. **Materials Today**. v. 20, n. 6, p. 314-322, 2017.
- [38] 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.
- [39] JINGA, Sorin-Ion, et al. PCL-ZnO/TiO₂/HAp Electrospun Composite Fibers with Applications in Tissue Engineering. **Polymers**. v. 11, n. 11, p. 1-12, 2019.
- [40] ANSARI, M. Bone tissue regeneration: biology, strategies and interface studies. **Prog Biomater**. v. 8, p. 223-237, 2019.
- [41] 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.
- [42] ZUEV, Dmitry M. et al. 3D printing and bioprinting using multiphoton lithography. **Bioprinting**, v. 20, p. e00090, 2020.
- [43] BALDACCHINI, T. **Three-Dimensional Microfabrication Using Two-Photon Polymerization: Fundamentals, Technology, and Applications**; William Andrew: Oxford, U.K., 2015.
- [44] 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.

- [45] 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.
- [46] 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.
- [47] 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.
- [48] 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.
- [49] CHATTERJEE, D. et al. Osseointegration – An Overview. **Int. J. Prev. Clin. Dent. Res.** v. 5, n. 1, p. 131-136, 2018.
- [50] LI, M. et al. Regulation of an osteon-like concentric microgrooved surface on osteogenesis and osteoclastogenesis. **Biomaterials.** v. 216, p. 1-11, 2019.
- [51] SUN, L. et al. Controlling Growth and Osteogenic Differentiation of Osteoblasts on Microgrooved Polystyrene Surfaces. **PLOS ONE.** v. 11, n. 8, 2016.
- [52] 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.
- [53] CHOTARD-GHODSNIA, Roxana et al. Morphological analysis of tumor cell/endothelial cell interactions under shear flow. **Journal of biomechanics,** v. 40, n. 2, p. 335-344, 2007.
- [54] REFAAQ, F. M.; CHEN, X.; PANG, S. W. Effects of topographical guidance cues on osteoblast cell migration. **Scientific reports,** v. 10, n. 1, p. 20003, 2020.
- [55] 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.
- [56] 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.
- [57] 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.
- [58] SANTOS, LAURA M. S. et al. Mechanical and morphological responses of osteoblast-like cells to two-photon polymerized microgrooved surfaces. **Journal of biomedical materials research part A,** v. 110, p. 1-11, 2022.
- [59] 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.
- [60] KUZNETSOVA, T. G. et al. Atomic force microscopy probing of cell elasticity. **Micron. PMID.** v. 38, n. 8, p. 824-833, 2007.
- [61] 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.
- [62] 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.
- [63] 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.
- [64] HAASE K.; Pelling AE. Investigating cell mechanics with atomic force microscopy. **J. R. Soc. Interface.** v. 12, p. 1-16, 2015.
- [65] LI, Mengjie et al. Regulation of an osteon-like concentric microgrooved surface on osteogenesis and osteoclastogenesis. **Biomaterials,** v. 216, p. 119269, 2019.
- [66] AKASAKA, Tsukasa et al. Osteoclast formation from mouse bone marrow cells on micro/nano-scale patterned surfaces. **Journal of Oral Biosciences,** v. 64, n. 2, p. 237-244, 2022.
- [67] HORCAS, Ignacio et al. WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. **Review of scientific instruments,** v. 78, n. 1, 2007.
- [68] ROSELLINI, Elisabetta; CASCONI, Maria Grazia. Microfluidic Fabrication of Natural Polymer-Based Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review. **Biomimetics,** v. 8, n. 1, p. 74, 2023.

- [69] ZHANG, Xiao et al. 3D bioprinting of biomimetic bilayered scaffold consisting of decellularized extracellular matrix and silk fibroin for osteochondral repair. **International journal of bioprinting**, v. 7, n. 4, 2021.
- [70] COLLINS, Maurice N. et al. Scaffold fabrication technologies and structure/function properties in bone tissue engineering. **Advanced functional materials**, v. 31, n. 21, p. 2010609, 2021.
- [71] SAMADIAN, Hadi et al. Bioengineered 3D nanocomposite based on gold nanoparticles and gelatin nanofibers for bone regeneration: In vitro and in vivo study. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 13877, 2021.
- [72] YADID, Moran; FEINER, Ron; DVIR, Tal. Gold nanoparticle-integrated scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. **Nano letters**, v. 19, n. 4, p. 2198-2206, 2019.
- [73] WU, Zhen-Lin et al. Polymer-based device fabrication and applications using direct laser writing technology. **Polymers**, v. 11, n. 3, p. 553, 2019.
- [74] HIPPLER, Marc et al. 3D scaffolds to study basic cell biology. **Advanced Materials**, v. 31, n. 26, p. 1808110, 2019.
- [75] SONG, Jiaxi et al. From simple to architecturally complex hydrogel scaffolds for cell and tissue engineering applications: Opportunities presented by two-photon polymerization. **Advanced healthcare materials**, v. 9, n. 1, p. 1901217, 2020.
- [76] KIRILLOVA, Alina et al. Fabrication of biomedical scaffolds using biodegradable polymers. **Chemical reviews**, v. 121, n. 18, p. 11238-11304, 2021.
- [77] SOUSA, Inês et al. Collagen surface modified poly (ϵ -caprolactone) scaffolds with improved hydrophilicity and cell adhesion properties. **Materials Letters**, v. 134, p. 263-267, 2014.
- [78] ALI, Md Azahar et al. Recent advances in 3D printing of biomedical sensing devices. **Advanced functional materials**, v. 32, n. 9, p. 2107671, 2022.
- [79] JODEIRI, Keyvan et al. Additively Manufactured 3D Micro-bioelectrodes for Enhanced Bioelectrocatalytic Operation. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 15, n. 11, p. 14914-14924, 2023.
- [80] RANDHAWA, Aayushi et al. Recent Advances in 3D Printing of Photocurable Polymers: Types, Mechanism, and Tissue Engineering Application. **Macromolecular Bioscience**, v. 23, n. 1, p. 2200278, 2023.
- [81] WANG, Lin et al. Chemical and physical modifications to poly (dimethylsiloxane) surfaces affect adhesion of Caco-2 cells. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 93, n. 4, p. 1260-1271, 2010.
- [82] YAO, Xiang; PENG, Rong; DING, Jiandong. Cell-material interactions revealed via material techniques of surface patterning. **Advanced materials**, v. 25, n. 37, p. 5257-5286, 2013.
- [83] MAJHY, B.; PRIYADARSHINI, P.; SEN, A. K. Effect of surface energy and roughness on cell adhesion and growth-facile surface modification for enhanced cell culture. **RSC advances**, v. 11, n. 25, p. 15467-15476, 2021.
- [84] AYALA, Ramses et al. Engineering the cell-material interface for controlling stem cell adhesion, migration, and differentiation. **Biomaterials**, v. 32, n. 15, p. 3700-3711, 2011.
- [85] CAI, Shuxiang et al. Recent advance in surface modification for regulating cell adhesion and behaviors. **Nanotechnology Reviews**, v. 9, n. 1, p. 971-989, 2020.
- [86] AMANI, Hamed et al. Controlling cell behavior through the design of biomaterial surfaces: a focus on surface modification techniques. **Advanced materials interfaces**, v. 6, n. 13, p. 1900572, 2019.
- [87] ZHAO, Xinlian et al. Recent advances of designing dynamic surfaces to regulate cell adhesion. **Colloid and Interface Science Communications**, v. 35, p. 100249, 2020.
- [88] KESELOWSKY, Benjamin G.; COLLARD, David M.; GARCÍA, Andrés J. Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 66, n. 2, p. 247-259, 2003.
- [89] XU, Chengyu et al. In vitro study of human vascular endothelial cell function on materials with various surface roughness. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 71, n. 1, p. 154-161, 2004.
- [90] NEDĚLA, Oldřich; SLEPIČKA, Petr; ŠVORČÍK, Václav. Surface modification of polymer substrates for biomedical applications. **Materials**, v. 10, n. 10, p. 1115, 2017.
- [91] TOBISZEWSKI, Marek; MECHLIŃSKA, Agata; NAMIESŃNIK, Jacek. Green analytical chemistry—theory and practice. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 8, p. 2869-2878, 2010.

- [92] KALJURAND, Mihkel; KOEL, Mihkel. Recent advancements on greening analytical separation. **Critical reviews in analytical chemistry**, v. 41, n. 1, p. 2-20, 2011.
- [93] CHA, Paul et al. Interfacial energetics of protein adsorption from aqueous buffer to surfaces with varying hydrophilicity. **Langmuir**, v. 24, n. 6, p. 2553-2563, 2008.
- [94] HOOGVLIET, J. C. et al. Electrochemical pretreatment of polycrystalline gold electrodes to produce a reproducible surface roughness for self-assembly: a study in phosphate buffer pH 7.4. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 9, p. 2016-2021, 2000.
- [95] LORETO, Stefano et al. The effect of the buffer solution on the adsorption and stability of horse heart myoglobin on commercial mesoporous titanium dioxide: a matter of the right choice. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 19, n. 21, p. 13503-13514, 2017.
- [96] WEI, Tao; KAEWTATHIP, Sarawut; SHING, Katherine. Buffer effect on protein adsorption at liquid/solid interface. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 6, p. 2053-2062, 2009.
- [97] MOULTON, S. E. et al. ATR-IR spectroscopic studies of the influence of phosphate buffer on adsorption of immunoglobulin G to TiO₂. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 220, n. 1-3, p. 159-167, 2003.
- [98] GUPTA, Bhupender S.; CHEN, Bo-Ren; LEE, Ming-Jer. Solvation consequences of polymer PVP with biological buffers MES, MOPS, and MOPSO in aqueous solutions. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 91, p. 62-72, 2015.
- [99] DUMUR, Frédéric. Recent advances on water-soluble photoinitiators of polymerization. **European Polymer Journal**, p. 111942, 2023.
- [100] GUO, Shanshan et al. Parallel control over surface charge and wettability using polyelectrolyte architecture: effect on protein adsorption and cell adhesion. **ACS applied materials & interfaces**, v. 8, n. 44, p. 30552-30563, 2016.
- [101] DECUZZI, Paolo; FERRARI, Mauro. Modulating cellular adhesion through nanotopography. **Biomaterials**, v. 31, n. 1, p. 173-179, 2010.
- [102] CRAWFORD, Russell J. et al. Surface topographical factors influencing bacterial attachment. **Advances in colloid and interface science**, v. 179, p. 142-149, 2012.
- [103] GENTILE, Francesco et al. Cells preferentially grow on rough substrates. **Biomaterials**, v. 31, n. 28, p. 7205-7212, 2010.
- [104] GENTILE, Francesco et al. Differential cell adhesion on mesoporous silicon substrates. **ACS applied materials & interfaces**, v. 4, n. 6, p. 2903-2911, 2012.
- [105] YONGABI, Derick et al. QCM-D study of time-resolved cell adhesion and detachment: Effect of surface free energy on eukaryotes and prokaryotes. **ACS applied materials & interfaces**, v. 12, n. 16, p. 18258-18272, 2020.
- [106] WAN, Yuqing et al. Cell adhesion on gaseous plasma modified poly-(L-lactide) surface under shear stress field. **Biomaterials**, v. 24, n. 21, p. 3757-3764, 2003.
- [107] SYROMOTINA, D. S. et al. Surface wettability and energy effects on the biological performance of poly-3-hydroxybutyrate films treated with RF plasma. **Materials Science and Engineering: C**, v. 62, p. 450-457, 2016.
- [108] CANULLO, Luigi et al. Plasma of argon enhances the adhesion of murine osteoblasts on different graft materials. **Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger**, v. 218, p. 265-270, 2018.
- [109] MURAKAMI, Daiki; KOBAYASHI, Shingo; TANAKA, Masaru. Interfacial structures and fibrinogen adsorption at blood-compatible polymer/water interfaces. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 2, n. 12, p. 2122-2126, 2016.
- [110] MENG, Jie et al. Enhancing the bioactivity of melt electrowritten PLLA scaffold by convenient, green, and effective hydrophilic surface modification. **Biomaterials Advances**, v. 135, p. 112686, 2022.
- [111] BACAKOVA, Lucie et al. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 6, p. 739-767, 2011.
- [112] RANELLA, A. et al. Tuning cell adhesion by controlling the roughness and wettability of 3D micro/nano silicon structures. **Acta biomaterialia**, v. 6, n. 7, p. 2711-2720, 2010.
- [113] ZUCHOWSKA, Agnieszka et al. Adhesion of MRC-5 and A549 cells on poly (dimethylsiloxane) surface modified by proteins. **Electrophoresis**, v. 37, n. 3, p. 536-544, 2016.
- [114] YANG, Jian et al. Enhancing the cell affinity of macroporous poly (L-lactide) cell scaffold by a convenient surface modification method. **Polymer international**, v. 52, n. 12, p. 1892-1899, 2003.

- [115] AKILA, R. M.; JANANI, M. Scaffolds-an advanced drug carrier for wound healing: a review. **World J. Pharm. Res.**, 10, 9, 382-405, 2021.
- [116] THROM QUINLAN, Angela M. et al. Combining dynamic stretch and tunable stiffness to probe cell mechanobiology in vitro. **PloS one**, v. 6, n. 8, p. e23272, 2011.
- [117] LAFORGUE, Laure et al. Efficient deformation mechanisms enable invasive cancer cells to migrate faster in 3D collagen networks. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 7867, 2022.
- [118] NGO, Thi Kim Ngan et al. A deep learning-based pipeline for analyzing the influences of interfacial mechanochemical microenvironments on spheroid invasion using differential interference contrast microscopic images. **Materials Today Bio**, v. 23, p. 100820, 2023.
- [119] SUNDARAKRISHNAN, Aswin et al. Engineered cell and tissue models of pulmonary fibrosis. **Advanced drug delivery reviews**, v. 129, p. 78-94, 2018.
- [120] PIIRONEN, Kati et al. Cell adhesion and proliferation on common 3D printing materials used in stereolithography of microfluidic devices. **Lab on a Chip**, v. 20, n. 13, p. 2372-2382, 2020.
- [121] O'HALLORAN, Seán et al. Two-Photon Polymerization: Fundamentals, Materials, and Chemical Modification Strategies. **Advanced Science**, v. 10, n. 7, p. 2204072, 2023.
- [122] JOHN, A. A. et al. Physico-chemical modification as a versatile strategy for the biocompatibility enhancement of biomaterials. **Rsc Advances**, v. 5, n. 49, p. 39232-39244, 2015.
- [123] OKANO, Teruo et al. Mechanism of cell detachment from temperature-modulated, hydrophilic-hydrophobic polymer surfaces. **Biomaterials**, v. 16, n. 4, p. 297-303, 1995.
- [124] ADAŠKEVIČIŪTĖ, Vaida et al. Comparison of physicochemical properties of bee pollen with other bee products. **Biomolecules**, v. 9, n. 12, p. 819, 2019.
- [125] CAVALU, Simona et al. Novel Formulation Based on Chitosan-Arabic Gum Nanoparticles Entrapping Propolis Extract. **Rev. Chim**, v. 69, p. 3756-3760, 2018.
- [126] DE LIMA, Gabriel G. et al. Extraction method plays critical role in antibacterial activity of propolis-loaded hydrogels. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 105, n. 3, p. 1248-1257, 2016.
- [127] BILGINER, Rumeysa et al. Biocomposite scaffolds for 3D cell culture: Propolis enriched polyvinyl alcohol nanofibers favoring cell adhesion. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 138, n. 17, p. 50287, 2021.
- [128] SUTJARITTANGTHAM, Krit et al. Bactericidal effects of propolis/poly(lactic acid) (PLA) nanofibres obtained via electrospinning. **Journal of Apicultural Research**, v. 53, n. 1, p. 109-115, 2014.
- [129] AZEVEDO, Lais F. et al. Polymeric nanoparticle systems loaded with red propolis extract: a comparative study of the encapsulating systems, PCL-Pluronic versus Eudragit® E100-Pluronic. **Journal of Apicultural Research**, v. 57, n. 2, p. 255-270, 2018.
- [130] SHARMA, Raju Kumar et al. Influence of chemical and bio-surfactants on physicochemical properties in mesoporous silica nanoparticles synthesis. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 24, p. 2629-2639, 2023.
- [131] HUANG, Lina et al. Mesoporous silica nanoparticles-loaded methyl 3-(3, 5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl) propanoate as a smart antioxidant of synthetic ester oil. **Tribology international**, v. 121, p. 114-120, 2018.
- [132] KMIOTEK, Magdalena; BIELIŃSKI, Dariusz; PIOTROWSKA, Małgorzata. Propolis as an antidegradant and biocidal agent for natural rubber. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 135, n. 9, p. 45911, 2018.
- [133] DE MÉLO SILVA, Isabelle Souza et al. Encapsulation of red propolis in polymer nanoparticles for the destruction of pathogenic biofilms. **Aaps Pharmscitech**, v. 21, p. 1-9, 2020.
- [134] DO NASCIMENTO, Ticiano G. et al. Modified release microcapsules loaded with red propolis extract obtained by spray-dryer technique: Phytochemical, thermal and physicochemical characterizations. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 138, p. 3559-3569, 2019.
- [135] STANDARD, A. S. T. M. Standard test methods for flexural properties of unreinforced and reinforced plastics and electrical insulating materials. ASTM D790. **Annual book of ASTM standards**, 1997.
- [136] SAGHEBASL, Solmaz et al. Sandwich-like electro-conductive polyurethane-based gelatin/soybean oil nanofibrous scaffolds with a targeted release of simvastatin for cardiac tissue engineering. **Journal of Biological Engineering**, v. 17, n. 1, p. 42, 2023.
- [137] ULAG, Songul et al. Propolis-based nanofiber patches to repair corneal microbial keratitis. **Molecules**, v. 26, n. 9, p. 2577, 2021.

- [138] DO NASCIMENTO, Ticiano Gomes et al. Preparation and characterization of chitosanates loaded with Brazilian red propolis extract. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, p. 1-12, 2022.
- [139] OLIVEIRA, Laís F. et al. Antioxidant and antimicrobial activity of red propolis embedded mesoporous silica nanoparticles. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 46, n. 7, p. 1199-1208, 2020.
- [140] YANG, Juan et al. Therapeutic effect of propolis nanoparticles on wound healing. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 82, p. 104284, 2023.
- [141] STOJKO, Mateusz et al. Biodegradable electrospun nonwovens releasing propolis as a promising dressing material for burn wound treatment. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 9, p. 883, 2020.
- [142] RAJCZAK, Ewa et al. Preparation and characterization of UV-curable acrylic membranes embedding natural antioxidants. **Polymers**, v. 12, n. 2, p. 358, 2020.
- [143] ZANCANELA, Daniela Cervelle et al. Physical, chemical and antimicrobial implications of the association of propolis with a natural rubber latex membrane. **Materials Letters**, v. 209, p. 39-42, 2017.
- [144] DOODMANI, Seyed Mohammad et al. Electrospinning-netting of spider-inspired polycaprolactone/collagen nanofiber-nets incorporated with Propolis extract for enhanced wound healing applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 267, p. 131452, 2024.
- [145] RUFATTO, Luciane Corbellini et al. Brazilian red propolis: Chemical composition and antibacterial activity determined using bioguided fractionation. **Microbiological research**, v. 214, p. 74-82, 2018.
- [146] OLIVEIRA, J. M. D. S. et al. Propolis in Oral Healthcare: Antibacterial Activity of a Composite Resin Enriched With Brazilian Red Propolis. **Switzerland: Frontiers in pharmacology**, v. 12, p. 787633, 2021.
- [147] DIAS, H. B. et al. Titanium dioxide and modified titanium dioxide by silver nanoparticles as an anti biofilm filler content for composite resins. **Dental Materials**, v. 35, n. 2, p. e36–e46, 2019.
- [148] TAVASSOLI, S. H. et al. Antibacterial, physical and mechanical properties of flowable resin composites containing zinc oxide nanoparticles. **Dental Materials**, v. 29, n. 5, p. 495–505, 2013.
- [149] ZHANG, Y. et al. The antifungal effects and mechanical properties of silver bromide/cationic polymer nano-composite-modified Poly-methyl methacrylate-based dental resin. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.
- [150] DO NASCIMENTO, Ticiano Gomes et al. Polymeric nanoparticles of Brazilian red propolis extract: preparation, characterization, antioxidant and leishmanicidal activity. **Nanoscale research letters**, v. 11, p. 1-16, 2016.
- [151] ZHANG, Qingya et al. Development, physicochemical properties, and antibacterial activity of propolis microcapsules. **Foods**, v. 12, n. 17, p. 3191, 2023.
- [152] MOUSELI, Shabnam et al. Physicochemical and biological characterization of propolis-loaded composite polyamide-6/soybean protein nanofibers for wound healing applications. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 694, p. 134172, 2024.
- [153] KATIYAR, Deepti. Propolis: A natural biomaterial. **Materials Today: Proceedings**, 2023.
- [154] WANG, Wei et al. Two-photon polymerization-based 3D micro-scaffolds toward biomedical devices. **Chemical Engineering Journal**, p. 152469, 2024.
- [155] KUFELT, Olga et al. Water-soluble photopolymerizable chitosan hydrogels for biofabrication via two-photon polymerization. **Acta biomaterialia**, v. 18, p. 186-195, 2015.
- [156] JING, Xian et al. Two-photon polymerization for 3D biomedical scaffolds: Overview and updates. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 10, p. 994355, 2022.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Neste projeto de pesquisa, propôs-se a síntese de resinas funcionalizadas com nanopartículas e nanocristais para desempenhar biocompatibilidade e ação antibacteriana. Essas resinas foram desenvolvidas para aplicação na microfabricação de arcabouços celulares por escrita direta a laser de pulsos ultracurtos via polimerização por absorção de dois fótons destinados a aplicações biológicas.

A investigação do impacto da incorporação de NPs semicondutoras de CdSe/CdS e NCs de TiO₂ em resinas à base do monômero PETA e FI I369, demonstrou que não houve alteração no pico da banda de absorção das resinas com adição das NPs e dos NCs. Pelos espectros de fluorescência ($\lambda_{\text{Exc}} = 400 \text{ nm}$), constatou-se que o aumento da concentração de TiO₂ nas resinas levou a um aumento da fotoluminescência, acompanhado por um alargamento da banda. Enquanto, a incorporação de CdSe/CdS reduz a fotoluminescência das amostras.

Foi possível determinar os parâmetros de escrita que proporcionaram uma resolução submicrométrica para as microestruturas, sendo importantes para o sucesso da microfabricação a laser. Pelo método de exclusão do azul de tripan, verificou-se que todas as resinas sintetizadas não oferecem citotoxicidade elevada, isso sugere que o meio é adequado para a cultura celular. Em destaque a resina P369/TiO₂ demonstrou ter uma viabilidade celular superior à do CTRL durante 48 h, por isso, ela foi escolhida para a construção dos arcabouços.

A técnica P2F foi utilizada para a fabricação de superfícies com microgrooves paralelas e circulares em polímero de acrilato biocompatível com NCs de TiO₂. Claramente, os resultados demonstraram que os microgrooves circulares feitos dos polímeros P59, P59/TiO₂ e P369/TiO₂, afetaram as células ósseas, tornando-as mais alongadas e rígidas, com um aumento significativo no módulo de elasticidade, independentemente do tipo de polímero analisado, o que confere maior confiabilidade ao resultado.

Foi demonstrado que os NCs de TiO₂, incorporadas ao polímero (P59/TiO₂), aumentaram o módulo de Young das células osteoblastos ao comparar com os grupos correspondentes do polímero P59. Este estudo *in vitro* estabelece parâmetros (geometria e composição química) a serem adotados para otimizar as microestruturas tridimensionais, como estratégia na regeneração óssea no campo da engenharia de tecido, além de adequar a superfície de implantes dentários e ortopédicos para permitir uma excelente osseointegração na interface do dispositivo implantado *in vivo*.

No segundo estudo desta pesquisa, o efeito do tratamento com PBS, como método de modificação das propriedades superficiais de filmes poliméricos feitos a partir do polímero S59, apresentou vantagens únicas aqui relatadas, como rugosidade moderada, aumento da

hidrofilicidade e surgimento de grupos funcionais. Isso o torna um excelente candidato para controlar as funções celulares e a regeneração dos tecidos.

Os resultados demonstram que é possível regular as propriedades físico-químicas do substrato polimérico com tratamento com PBS para melhorar as respostas celulares. Portanto, abre novas possibilidades para a inclusão do tratamento com PBS como método de adaptação de superfície para regular respostas celulares, entre as diversas técnicas de tratamento de superfície já conhecidas, devido à sua simplicidade, rapidez, ecologicamente correto e baixo custo.

A tendência de utilizar o tratamento com PBS para melhorar a adesão de células epiteliais pulmonares A549 ao polímero S59 é de grande relevância, pois permite a aplicabilidade de materiais poliméricos que, anteriormente, eram inadequados para o cultivo celular, pois não permitiam que as células exibissem seu comportamento celular. Nossas conclusões foram baseadas em observações ópticas, caracterizações espectroscópicas e análises mecânicas envolvendo as células e a superfície do substrato.

No terceiro estudo desta pesquisa, foi demonstrado que o polímero funcionalizado com NPs de própolis vermelha (P59.2+P) exibiu um efeito antibacteriano significativo contra *S. aureus*. Os compostos fenólicos encontrados nos polímeros incorporados com as NPs PV provocam esse efeito antibacteriano, como confirmado pelo FTIR. Os arcabouços microgrooves paralelos e circulares feitos a partir das resinas incorporadas com as NPs, permitem controlar a capacidade proliferativa das bactérias e funcionam como agentes antibacterianos eficazes em curativos. Estes resultados fornecem suporte para a utilização de polímeros incorporados com NPs PV no desenvolvimento de curativos com superfícies microestruturadas por P2F, com elevado potencial de aplicabilidade, uma vez que apresentam liberação controlada das NPs ao longo do processo de cicatrização.

Além disso, em trabalhos futuros, é proposto no primeiro estudo a utilização da técnica de espectroscopia Raman para detectar sinais químicos que indiquem se os osteoblastos MG-63 produziram proteínas, mas também para averiguar se houve diferença nos espectros Raman de cada um dos grupos, como foi observado em estudos anteriores.

As perspectivas futuras para o segundo trabalho envolvem o cultivo das células epiteliais pulmonares nos arcabouços fabricados a partir da resina S59, seguindo previamente o protocolo de modificação da superfície aqui demonstrado, por meio do tratamento com a solução salina tamponada com fosfato, a fim de otimizar o comportamento de adesão das células nas superfícies do arcabouço.

No terceiro trabalho desenvolvido nesta pesquisa, foi estabelecido como perspectiva futura a avaliação de um ensaio de migração celular *in vitro* em microgrooves paralelos e circulares, bem como em superfícies planas do polímero P59.2+P e do P59.2, já que, a topografia micropadronizada pode acelerar a migração celular para o espaço livre entre as células (simulando uma ferida *in vivo*), favorecendo o completo fechamento dessa região.

APÊNDICE A: Lista de Artigos Publicados e Submetidos

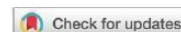
➤ Artigo Publicado:

SANTOS, LAURA M. S.; DE OLIVEIRA, JONATHAS M.; DA SILVA, ELAINE C. O.; FONSECA, VITOR M. L.; SILVA, JULIANE P.; BARRETO, EMILIANO; DANTAS, NOELIO OLIVEIRA; SILVA, ANIELLE C. A.; JESUS-SILVA, ALCENÍSIO J.; MENDONÇA, CLÉBER R.; FONSECA, EDUARDO J. S. Mechanical and morphological responses of osteoblast-like cells to two-photon polymerized microgrooved surfaces. **JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH PART A**, v. 110, p. 1-11, 2022.

➤ Artigo Submetido:

SANTOS, LAURA M. S.; OLIVEIRA, JONATHAS M.; NASCIMENTO, SENDY M. S.; SONSIN, ARTUR F.; FONSECA, VITOR M. L.; SILVA, JULIANE P.; BARRETO, EMILIANO; MENDONÇA, CLÉBER R.; JESUS-SILVA, ALCENÍSIO J.; FONSECA, EDUARDO J. S. Physical and chemical modifications of polymeric surface for enhanced epithelial cells adhesion.

SANTOS, LAURA M. S.; OLIVEIRA, JONATHAS M.; OLIVEIRA, LAÍS F. AZEVEDO DE M.; OLIVEIRA, JOSÉ M. S.; JESUS-SILVA, ALCENÍSIO J.; FONSECA, EDUARDO J. S. Two-Photon Polymerizable Resins incorporated with Brazilian Red Propolis Nanoparticles as strategy for wound healing.



Received: 14 June 2022 | Revised: 18 September 2022 | Accepted: 27 September 2022
DOI: 10.1002/jbma.37454

RESEARCH ARTICLE



Mechanical and morphological responses of osteoblast-like cells to two-photon polymerized microgrooved surfaces

Laura M. S. dos Santos¹ | Jonathas M. de Oliveira² | Elaine C. O. da Silva¹ |
Vitor M. L. Fonseca³ | Juliane P. Silva³ | Emiliano Barreto³ |
Noelio Oliveira Dantas⁴ | Anielle C. A. Silva⁴ | Alcenísio J. Jesus-Silva¹ |
Cléber R. Mendonça⁵ | Eduardo J. S. Fonseca¹

¹Optics and Nanoscopy Group, Institute of Physics, Federal University of Alagoas (UFAL), Maceió, Brazil

²Federal Institute of Alagoas (IFAL), Coruripe, Brazil

³Laboratory of Cell Biology, Institute of Biological Sciences and Health, Federal University of Alagoas (ICBS/UFAL), Maceió, Brazil

⁴Institute of Physics, Federal University of Alagoas (UFAL), Maceió, Brazil

⁵Institute of Physics of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, Brazil

Correspondence

Eduardo J. S. Fonseca, Optics and Nanoscopy Group, Institute of Physics, Federal University of Alagoas (UFAL), 57072-970, Maceió, Alagoas, Brazil.
Email: eduardo@fis.ufal.br

Emiliano Barreto, Laboratory of Cell Biology, Institute of Biological Sciences and Health, Federal University of Alagoas (ICBS/UFAL), Maceió, Brazil.
Email: emilianobarreto@icbs.ufal.br

Funding information

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq; Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior - CAPES, Grant/Award Number: 001; Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Alagoas - FAPAL, Grant/Award Number: APQ2019041000017; São Paulo Research Foundation - FAPESP, Grant/Award Numbers: 2019/25164-2, 2018/11283-7

Abstract

Microgrooved surfaces are recognized as an important strategy of tissue engineering to promote the alignment of bone cells. In this work, we have investigated the mechanical and morphological aspects of osteoblasts cells after interaction with different micro-structured polymeric surfaces. Femtosecond laser writing technique was used for the construction of circular and parallel microgrooved patterns in biocompatible polymeric surfaces based on *pentaerythritol triacrylate*. Additionally, we have studied the influence of the biocompatible TiO₂ nanocrystals (NCs) related to the cell behavior, when incorporated to the photoresin. The atomic force microscopy technique was used to investigate the biomechanical reaction of the human osteoblast-like MG-63 cells for the different microgroove. It was demonstrated that osteoblasts grown on circular microgrooved surfaces exhibited significantly larger Young's modulus compared to cells sown on flat films. Furthermore, we could observe that TiO₂ NCs improved the circular microgrooves effects, resulting in more populated sites, 34% more elongated cells, and increasing the cell stiffness by almost 160%. These results can guide the design and construction of effective scaffold surfaces with circular microgrooves for tissue engineering and bone regeneration.

KEYWORDS

cell adhesion, circular microgrooves, titanium dioxide nanocrystals, two-photon polymerization

1 | INTRODUCTION

A wide spectrum of strategies has been used to develop biological devices and three-dimensional scaffolds with chemical and physical biocompatible aspects, aiming to support various cell functions.^{1–4} The microfabrication processes are a powerful tool capable of

designing and implementing structures that mimic cells environments. A suitable interface between the scaffold and the cells provides structural support ideal for cell growth and drives some cell behaviors as the adhesion.^{5–8} For example, the adequate adaptation of the bone implants in vivo depends on the stable interaction of the device with the host tissue. It is desirable that the cells of the living organism

Physical and chemical modifications of polymeric surface for enhanced epithelial cells adhesion

Laura M. S. dos Santos¹, Jonathas M. de Oliveira², Sendy M. S. do Nascimento¹, Artur F. Sonsin^{1, 4}, Vitor M. L. Fonseca³, Juliane P. Silva³, Emiliano Barreto^{3*}, Cléber R. Mendonça⁵, Alcenísio J. Jesus-Silva¹, Eduardo J. S. Fonseca^{1*}

¹ Optics and Nanoscopy Group, Institute of Physics, Federal University of Alagoas (UFAL), 57072-970, Maceió, Alagoas, Brazil

² Federal Institute of Alagoas (IFAL), 57230-000, Coruripe, Alagoas, Brazil

³ Laboratory of Cell Biology, Institute of Biological Sciences and Health, Federal University of Alagoas (ICBS/UFAL), 57072-970, Maceió, Alagoas, Brazil

⁴ Federal University of Rondônia (UNIR), 76940-000, Rolim de Moura, Rondônia, Brazil

⁵ Institute of Physics of São Carlos, University of São Paulo, CP 369, 13560-970, São Carlos, São Paulo, Brazil

*Corresponding author: eduardo@fis.ufal.br; emilianobarreto@icbs.ufal.br

Abstract

In tissue engineering, 3D scaffolds and chemical treatments are often used for providing a cell-friendly surface for improving cell adhesion and tissue growth. Indeed, the cell adhesion degree can be controlled by physical-chemical changes in the surface of substrates, such as wettability, surface charges and roughness. In this work, we describe the synthesis, characterization and cytocompatibility of photoresins useful for construction of cell scaffolds via two-photon polymerization. Additionally, we have demonstrated a simple surface treatment method that promotes cell adhesion. This method alters the surface charge of the polymer and enhances the adhesion of epithelial cells. Our results indicate an efficient approach for modifying the surface of biocompatible polymer scaffolds with the purpose of enhances the performance of cell functions suitable for tissue engineering and regenerative medicine.

Keywords: biocompatible polymer, nanorough, surface modification, phosphate-buffered saline, cell adhesion.

1. Introduction

Polymeric materials are at the forefront of the development of biophotonic and biomedical devices. These materials have numerous applications, including biosensors for diagnosis, implants, and 3D environments suitable for cell culture [1-3]. The attractive features of polymers include ease of synthesis, large scale production, capacity for functionalization with nanoparticles and others chemical functional groups, as well as their interesting optical and mechanical properties [4, 5]. Furthermore, they can be synthesized to present adjustable flexibility, which makes them an excellent tool for drug delivery and as scaffolds for cells and

Two-Photon Polymerizable Nanocomposites Incorporating Brazilian Red Propolis for Tailored Wound Healing Applications

*Laura M. S. Santos[†], Jonathas M. Oliveira[‡], Laís F. A. M. Oliveira[†], José M. S. Oliveira[§], Ingrid
F. Leite[§], Alcenísio J. Jesus-Silva[†], Glauber T. Silva[§], Eduardo J. S. Fonseca^{*†}*

[†]Optics and Nanoscopy Group, Institute of Physics, Federal University of Alagoas (UFAL),
57072-970, Maceió, Alagoas, Brazil

[‡]Federal Institute of Alagoas (IFAL), 57230-000, Coruripe, Alagoas, Brazil

^{||} Postgraduate Program in Health Research, Cesmac University Center, Maceió, Brazil

[§] Physical Acoustics Group, Institute of Physics, Federal University of Alagoas, Maceió, Brazil

KEYWORDS: Polymers; Nanoparticles of Brazilian Red Propolis; Antibacterial Properties;
Scaffolds Microgrooves; Two Photon Polymerization.

ABSTRACT. This study introduces novel nanocomposites incorporating Brazilian red propolis
(RPNP) into acrylic resins, designed for advanced wound dressing applications. The