UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

ORIANA INES AVILA SALAS

Fabricação de microambientes para crescimento celular utilizando
polimerização via absorção de dois fótons

São Carlos
2013

ORIANA INES AVILA SALAS

Fabricação de microambientes para crescimento celular utilizando
polimerização via absorção de dois fótons

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Física do Instituto de
Física de São Carlos da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção Física Biomolecular

Orientador: Prof. Dr. Cleber Renato
Mendonça

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo serviço de Biblioteca e Informação do IFSC, com os dados fornecidos pelo (a) autor (a)

Avila Salas, Oriana Ines

Fabricação de microambientes para crescimento celular utilizando polimerização via absorção de dois fótons / Oriana Ines Avila Salas; orientador Cleber Renato Mendonça – versão corrigida -- São Carlos, 2013. 85 p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada - Opção: Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2013.

1. Polimerização. 2. Absorção de dois fótons. 3. Microestruturas poliméricas. 4. Células MCF7. I. Mendonça, Cleber Renato, orientador. II. Título.

*Dedico este trabalho aos meus pais pelo amor e sacrifícios,
as minhas irmãs, Yulibeth e Wendy,
ao Ruben por todo o amor e apoio
e principalmente a minha filha Thais Sofia
que é minha maior inspiração.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por estar sempre ao meu lado.

Agradeço em especial ao meu orientador, Prof. Dr. Cleber Renato Mendonça, pela orientação e infinita dedicação durante todos os anos em que foi meu orientador. Agradeço muito mais pelos seus valiosos conselhos, paciência e ensinamentos ao longo destes anos de mestrado.

A Prof^a. Dr^a. Carla R. Fontana, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP – Araraquara. Agradeço, pelos ensinamentos, pela ajuda na realização dos testes biológicos feitos nesse trabalho e por todo o apoio na realização deste trabalho.

Aos colegas, Otuka e Vinícius pelos ensinamentos, dedicação, dicas, ajuda, e por todo o apoio na realização deste trabalho.

Ao colega Bruno, que acompanhou a fase inicial do meu trabalho e pela amizade.

A toda a equipe do grupo de Fotônica pelo apoio; aos professores Dr. Lino Misoguti Dr Leonardo de Boni e o Dr. Sergio Carlos Zílio, aos técnicos André Romero e Marcos Roberto Cardoso e ao secretario Daniel Pereira.

Aos meus amigos do grupo de Fotônica: Emerson, Marcelo, Jonathas, Regina, Thiago, Paulo, Gustavo, Anderson, Renato, Caio, Juliana, Luís Felipe, Tarcísio, Nathália.

Agradeço a minha família, a minhas irmãs Yulibeth e Wendy, a meus pais, Rumaldo e Yulia, pelo apoio e amor.

A meu marido Ruben, por todo o amor e apoio e especialmente a minha bebê com a qual aprendi que se tem que lutar por o que realmente se quer.

A CAPES pelo suporte financeiro.

Por fim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

“Se eu soubesse o que eu estava fazendo, não seria chamada pesquisa”.

Albert Einstein

RESUMO

AVILA, S. O. **Fabricação de microambientes para crescimento celular utilizando polimerização via absorção de dois fótons**. 2013. 85 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

Neste trabalho, demonstramos a fabricação de microambientes tridimensionais para investigar o crescimento celular. Inicialmente, desenvolvemos um sistema de microfabricação que utiliza fotopolimerização via absorção de dois fótons, com o qual se pode fabricar um conjunto de microestruturas com formas e espaçamentos pré-determinados. Este sistema de fabricação utiliza pulsos de femtossegundos, provenientes de um laser de Ti:safira operando em 790 nm. A intensidade destes pulsos é alta o bastante para induzir a absorção de dois fótons no fotoiniciador, o qual é responsável por promover a polimerização em uma resina acrílica. A natureza não linear da absorção de dois fótons confina a excitação ao volume focal, permitindo a fabricação de estruturas tridimensionais com alta resolução espacial. Para a obtenção dos microambientes, foi necessário o desenvolvimento de um sistema opto-mecânico de movimentação, tanto do feixe quando do substrato da amostra. Com esta técnica, fabricamos microambientes compostos de estruturas com diferentes formas (paralelepípedos, cilindros e cones) e espaçamentos, os quais foram caracterizados através de microscopia óptica e eletrônica. Para demonstrar a viabilidade destes microambientes para a investigação do crescimento celular, estes foram utilizados para monitorar o desenvolvimento da célula Michigan Cancer Foundation-7 (MCF-7), uma linhagem celular de adenocarcinoma de mama que apresenta fenótipo tumoral amplamente utilizada como modelo de estudo para câncer de mama. Observamos, via microscopia óptica de transmissão e fluorescência, o desenvolvimento das células MCF-7 nos distintos microambientes. Nossos resultados indicam uma melhor aderência e, portanto, desenvolvimento celular nas microestruturas cilíndricas. Observamos ainda uma maior densidade de células nos microambientes com estruturas separadas de 12 μm , a qual diminui com o aumento do espaçamento, de tal forma que para o microambiente com 30 μm , por exemplo, poucas células são observadas. Portanto, nossos resultados demonstram que os microambientes desenvolvidos são viáveis para estudos mais aprofundados em biologia celular, com potenciais aplicações em engenharia de tecido.

Palavras-chave: Polimerização. Absorção de dois fótons. Microestruturas poliméricas. Células MCF7.

ABSTRACT

AVILA, S. O. **Fabrication of micro-environments to study cell growth by two-photon absorption polymerization.** 2013. 85 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

In this work we have demonstrated the fabrication of tridimensional microenvironments for the investigation of cell growth. Initially we have developed a two-photon absorption photopolymerization microfabrication system, which allows producing a set of microstructures with predetermined forms and spacing. This fabrication system uses femtosecond pulses from a Ti: sapphire laser operating at 790 nm. These pulses are intense enough to induce two-photon absorption by the photoinitiator, that is responsible for promoting the polymerization in an acrylic resin. The nonlinear nature of the two-photon absorption confines the excitation to the focal volume, allowing the fabrication of tridimensional structures with high spatial resolution. In order to obtain the microenvironments, it was necessary to develop a movement system for both the laser beam and the sample substrate. With this technique we have fabricated microenvironments composed by structures with different geometries (parallelepipeds, cylinders and cones) and spacing, which were characterized by optical and scanning electron microscopes. To demonstrate the feasibility of the microenvironments for the investigation of cell growth, the samples were used to monitor the development of the Michigan Cancer Foundation-7 cell (MCF-7), a lineage of breast adenocarcinoma that has a tumoral phenotype and is highly used as a model in breast cancer studies. We have observed, through conventional optical and fluorescence microscopy, the growth of the MCF-7 cells in the various microenvironments. Our results indicate a better adhesion and, therefore, better development of cells on the cylindrical microstructures. We also observe a higher cell density in the microenvironments with microstructures having a spacing of 12 μm , which reduces as the distance between microstructures increases, in such a way that for the microenvironment with 30 μm spacing, for example, just a few cells are observed. Thus, our results demonstrate that the produced microenvironments are applicable in deeper studies in microbiology, with potential application in tissue engineering.

Keywords: Polymerization. Two-photon absorption. Polymeric microstructures. MCF7 cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - (a) Micro-engrenagem (7), (b) microbomba (8), (c) microestrutura mecânica (9) e (d) cristal fotônico (10).....	23
Figura 1.2 - Exemplos de dispositivos biomédicos fabricados via fotopolimerização por absorção de dois fótons. (a) micro-agulha fabricada para aplicações biológicas (14), (b) micro-molde produzido para estudar o processo de migração celular tridimensional (15). (c) Matriz de microestruturas produzidas para estudar o desenvolvimento da bactéria <i>E. coli</i> . (16).....	24
Figura 2.1 - Processo de absorção linear (esquerda) e por dois fótons (direita). O último leva ao confinamento espacial da excitação.....	30
Figura 2.2 - Resposta óptica de um limitador óptico ideal (curva vermelha). A transmissão é de 100% quando a intensidade de excitação é menor que um dado limiar. Acima deste valor, a intensidade transmitida permanece constante, sendo, portanto limitada (35).	31
Figura 2.3 - Princípio básico de um disco óptico volumétrico baseado em A2F. (a) Escrevendo: sob a excitação por A2F o cromóforo modifica sua estrutura através de uma foto-reação, por exemplo, reação fotocrômica. (b) Leitura: A A2F por parte do cromóforo na sua forma B resulta em uma fluorescência que é coletada por uma lente. O espelho dicróico (ED) reflete a fluorescência para o fotodetector (FD) (42).....	33
Figura 2.4 - Imagem de microscopia de fluorescência por A2F de um vaso sanguíneo utilizando pulsos de 100 fs (49).....	34
Figura 2.5 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de um dragão (a) e de um moinho de vento fabricados por fotopolimerização via A2F em cerâmicas modificadas organicamente (62).....	36
Figura 3.1 - Esquema simplificado do processo de microfabricação.....	37
Figura 3.2 - As curvas A, B e C denotam, respectivamente, intensidades de pico menor, igual e maior que o limiar de polimerização por absorção de dois fótons (linha pontilhada). A curva C mostra uma intensidade que permite a obtenção de voxel com resolução melhor do limite de difração.	38
Figura 3.3 - Aparato experimental utilizado no processo de fotopolimerização via absorção de dois fótons (65).....	39

Figura 3.4 - Cavidade do oscilador laser Ti: Safira.	40
Figura 3.5 - Laser de bombeio e oscilador de Ti:Safira.	41
Figura 3.6 - Espectro do oscilador laser Ti:safira operando em modo pulsado (65).....	42
Figura 3.7 - (a) Espelhos acoplados a motores galvanométricos. (b) Estágio de translação.	43
Figura 3.8 - Ilustrações de lentes objetivas com diferentes aberturas numéricas, Imagem retirada da referencia (64)	44
Figura 3.9 - Posicionamento da lente objetiva no sistema de microfabricação.....	45
Figura 3.10 - Monômeros SR-368 e SR-499.....	46
Figura 3.11 - Fórmula estrutural do Lucirin TPO-L.....	47
Figura 3.12 - Reação de criação de radicais livres, Tipo I e Tipo II.	48
Figura 3.13 - Amostra preparada para fotopolimerização.....	49
Figura 3.14 - Posicionamento da amostra no sistema de microfabricação.....	50
Figura 3.15 - Sistema mecânico engrenagem coroa sem fim.	52
Figura 3.16 - Sistema mecânico com cabo de velocímetro.	52
Figura 3.17 - Imagens das rotinas sequenciais que controlam os motores de passo.....	54
Figura 3.19 - Microscópio eletrônico de varredura (MEV) TM300 – Hitachi.....	56
Figura 4. 1 - Celula Michigan Cancer Foundation-7 (MCF7).	60
Figura 4.2 - Imagem fluorescente de células MCF-7 codificadas com GFP.	61
Figura 5.1 - Imagens de MEV das microestruturas.....	63
Figura 5.2 - Ilustração da rotina adaptada, utilizada para fabricar os microambientes com estruturas alinhadas.	64
Figura 5.3 - Imagens de MEV das microestruturas depois das modificações.....	65
Figura 5.4 - (a) Imagem de MEV de micro-ambientes com diferentes forma (cones, cilindros e paralelepípedos). Um detalhe de cada tipo de microestrutura é apresentado em (b), (c) e (d).	66

Figura 5.5 - Ilustração dos diferentes espaçamentos que podem ser gerados para estruturas cônicas, caso o substrato não seja perfeitamente plano.	67
Figura 5.6 - Imagem de MEV (vista inclinada) de um microambiente fabricado para o estudo de crescimento celular. Para este microambiente a separação entre as microestruturas é de 18 µm.	68
Figura 5.7 - Matriz microestruturas cilíndricas para investigação do desenvolvimento após 48 horas de monitoramento.....	69
Figura 5.8 - Microambientes com uma concentração de células de 2×10^5 células/ml.....	69
Figura 5.9 - Imagens de microscopia óptica de transmissão e fluorescência do crescimento celular nos microambientes (cilíndricos com espaçamento 12 µm) para tempos de incubação de 24, 48 e 72 horas.	70
Figura 5. 10 - Imagens de microscopia (transmissão e fluorescência) mostrando o desenvolvimento das células MCF-7 em microambientes com estruturas cilíndrica, com diferentes espaçamentos, para períodos de monitoramento de 24 e 48 horas.	72
Figura 5.11 - Imagens de microscopia (transmissão e fluorescência) mostrando o desenvolvimento das células MCF-7 em microambientes com estruturas do tipo paralelepípedos, com diferentes espaçamentos, para períodos de monitoramento de 24 e 48 horas.	73
Figura 5.12 - Imagens de microscopia de transmissão e fluorescência mostrando o desenvolvimento de células MCF-7 ao redor e entre microestruturas de microambientes distintos.....	74

SUMÁRIO

1 Introdução.....	23
2 Introdução á óptica não linear	27
2.1 Alguns aspectos da óptica não linear.....	27
2.2 Absorção de dois fótons.....	28
2.2.1 Histórico	28
2.2.2. Conceitos básicos da absorção de dois fótons (A2F)	29
2.3. Aplicações envolvendo a absorção de dois fótons.....	31
2.3.1. Limitação de potência óptica	31
2.3.2. Armazenamento óptico tri-dimensional.....	32
2.3.3. Microscopia de fluorescência via absorção de dois fótons	33
2.3.4. Terapia fotodinâmica ou PDT	35
2.3.5. Polimerização induzida por absorção de dois fótons (PA2F).....	36
3 Microfabricação via polimerização por absorção de dois fótons	37
3.1 Sistema experimental de microfabricação	37
3.1.1 Oscilador laser Ti:Safira.....	40
3.1.2 Espelhos e estágio de translação	42
3.1.3 Objetivas de microscópio.....	43
3.1.4 Sistema de iluminação e câmera CCD	45
3.2 Resina e fotoiniciador.....	46
3.3 Preparação das amostras para microfabricação.....	49
3.4 Programação para confecção das microestruturas.....	50
3.5 Automatização do sistema para reposicionamento da amostra	51
3.5.1 Sistema mecânico.....	51
3.5.2 Programação para reposicionamento da amostra	53
3.6 Metodologia para fabricação das microestruturas.....	54
3.7 Técnicas de caracterização.....	55
3.7.1 Microscópio eletrônico de varredura (MEV)	55
3.7.2 Microscopia óptica	56
4 Célula MCF7 (Michigan Cancer Foundation-7)	59
4.1 Introdução	59
4.2 Cultura das células MCF7	60
5 Resultados	63
5.1 Fabricação e caracterização dos microambientes	63

5.2 Estudo do crescimento de células MCF-7 em microambientes	68
6 Conclusões e perspectivas.....	75
 REFERÊNCIAS	 77

1 Introdução

Existe uma crescente demanda por dispositivos micrométricos cada vez mais versáteis e com propriedades variadas, visando aplicações em óptica, fotônica (1), biologia (2), microfluídica (3), microsistemas mecânicos (4), etc. Entre as várias técnicas de fabricação em escala microscópica, a microfabricação via polimerização por absorção de dois fótons, primeiramente proposta na literatura em 1965 (5), tem sido bastante estudada devido às inúmeras vantagens que esta propicia (6). Na Fig. 1.1 são apresentados alguns microdispositivos produzidos via fotopolimerização por dois fótons por alguns grupos de pesquisa (7-10).

Figura 1.1 - (a) Micro-engrenagem (7), (b) microbomba (8), (c) microestrutura mecânica (9) e (d) cristal fotônico (10).

Nesta técnica, de maneira semelhante a foto-litografia convencional (11), utiliza-se luz para produzir a excitação de um fotoiniciador que, conseqüentemente, induz a polimerização de uma resina (12). Contudo, ao contrário da fotolitografia convencional, na qual o fotoiniciador é excitado por absorção de um único fóton, na técnica de polimerização por absorção de dois fótons a excitação ocorre via absorção multifotônica. A excitação por dois fótons possui uma dependência quadrática com a intensidade, o que permite um alto confinamento da excitação e,

portanto, uma alta seletividade espacial no processo de fotopolimerização (11). Graças a esta seletividade espacial, a microfabricação via polimerização por absorção de dois fótons possibilita a confecção de estruturas tridimensionais sem limitação quanto à forma, permitindo ainda partes móveis nas estruturas ou dispositivos (11).

A fabricação de microestruturas vem sendo utilizada no desenvolvimento de dispositivos biomédicos que vão desde o desenvolvimento de plataformas para engenharia de tecidos até sistemas de entrega de fármacos (13). Como ilustração deste tipo de aplicação, na Fig. 1.2 apresentamos: (a) micro-agulha fabricada via polimerização por dois fótons (14), (b) um micro-molde utilizado para estudar migração celular tridimensional (15) e, finalmente na Fig. 1.2c um microambiente produzido para avaliar o desenvolvimento da bactéria *Escherichia coli*. (16).

Figura 1.2 - Exemplos de dispositivos biomédicos fabricados via fotopolimerização por absorção de dois fótons. (a) micro-agulha fabricada para aplicações biológicas (14), (b) micro-molde produzido para estudar o processo de migração celular tridimensional (15). (c) Matriz de microestruturas produzidas para estudar o desenvolvimento da bactéria *Escherichia coli* (16).

Contudo, a fabricação de microambientes é ainda pouco explorada na literatura, um dos primeiros trabalhos foi o artigo já citado de Tayalia, P. et al (15). Sendo assim o estudo dos microambientes apresentado aqui é um dos poucos presentes na literatura. Por se tratar de uma técnica bastante promissora e ainda pouco explorada na literatura, nesse trabalho desenvolvemos uma metodologia capaz de produzir microambientes com diferentes geometrias, para estudar o desenvolvimento celular. Sendo assim, inicialmente desenvolvemos um sistema de microfabricação que utiliza fotopolimerização via absorção de dois fótons para fabricar diversos conjuntos de microestruturas poliméricas (resina acrílica), com geometria definida. Visando demonstrar a viabilidade destes microambientes para o

estudo de células, os mesmos foram utilizados para monitorar o desenvolvimento da célula Michigan Cancer Foundation-7 (MCF-7). A célula MCF-7 é uma linhagem celular de adenocarcinoma de mama que apresenta fenótipo tumoral, a qual é amplamente utilizada como modelo de estudo para câncer de mama. Microambientes com distintas características geométricas (formas e espaçamentos) foram utilizados para investigar o desenvolvimento celular, através de microscopia óptica de transmissão e fluorescência. Nossos resultados indicam a viabilidade do uso desses microambientes para estudos mais aprofundados em microbiologia, com potenciais aplicações em engenharia de tecido.

Nos capítulos que seguem, o trabalho está organizado da seguinte forma: No Capítulo 2 apresentamos alguns conceitos básicos da óptica não linear, onde fazemos uma breve fundamentação a respeito da absorção de dois fótons. No Capítulo 3 descrevemos a técnica de microfabricação via polimerização por absorção de dois fótons, apresentando detalhadamente o sistema experimental bem como os materiais utilizados. Apresentamos ainda uma breve introdução às técnicas utilizadas para caracterizar as microestruturas produzidas. No Capítulo 4 descrevemos a célula MCF-7 bem como alguns detalhes a respeito de sua obtenção, preparação e cultivo. No Capítulo 5 apresentamos as microestruturas produzidas bem como sua caracterização, e os resultados do desenvolvimento nos microambientes fabricados. Finalmente, no Capítulo 6 apresentamos as conclusões finais do trabalho e algumas perspectivas para trabalhos futuros.

2 Introdução à óptica não linear

Neste capítulo abordaremos alguns fundamentos da óptica não linear, dando ênfase ao processo de absorção de dois fótons (A2F), explorando seu funcionamento básico, características mais importantes e principais aplicações.

2.1 Alguns aspectos da óptica não linear

Devido à necessidade de alta intensidade para a observação do processo de A2F, este só pôde ser observado experimentalmente com o advento do laser (14). A luz emitida por um laser pulsado é suficientemente intensa para modificar as propriedades ópticas de um meio material como, por exemplo, seu índice de refração e coeficiente de absorção. A óptica não linear é o ramo da óptica responsável pelo estudo dos fenômenos físicos que ocorrem como consequência destas modificações. Mais especificamente, marca-se o nascimento da óptica não linear pelo experimento de geração de segundo harmônico por Franken *et al.* em 1961, no qual se incidiu um feixe laser em 694,2 nm em um cristal de quartzo, e observou-se a emissão de radiação ultravioleta (347,1 nm) pelo cristal. Após esse experimento, muitos outros fenômenos da óptica não linear foram observados (17).

Na óptica linear, a polarização induzida em um meio devido ao campo elétrico aplicado (com magnitude muito menor do que o campo inter-atômico) depende linearmente com o campo (18-19), sendo expressa por:

$$P(\omega) = \epsilon_0 \chi^{(1)}(\omega) E(\omega) \quad (2.1),$$

na qual a constante de proporcionalidade $\chi^{(1)}$ é conhecida como susceptibilidade elétrica de primeira ordem.

Para observar efeitos ópticos não lineares, o campo elétrico da luz incidente deve ser suficientemente alto, da ordem dos campos elétricos que mantêm os

elétrons presos aos átomos $\sim 10^8$ V/cm. Neste caso, a relação entre a polarização induzida e o campo incidente já não é mais linear, e pode ser escrita como (18,20,21):

$$\begin{aligned} P(\omega) &= \epsilon_0 (\chi^{(1)} E + \chi^{(2)} E^{(2)} + \chi^{(3)} E^{(3)} + \dots) \\ &\equiv P^{(1)} + P^{(2)} + P^{(3)} + \dots \end{aligned} \quad (2.2).$$

Nessa expressão, $\chi^{(2)}, \chi^{(3)}, \dots, \chi^{(n)}$ são tensores denominados de susceptibilidade não lineares, sendo caracterizados pelas propriedades de simetria do meio. Por exemplo, a susceptibilidade $\chi^{(3)}$ é um tensor de quarta ordem que relaciona a polarização ao cubo do campo, e sua magnitude descreve a intensidade dos processos ópticos não lineares de terceira ordem, como o índice de refração não linear e a absorção de dois fótons (22).

2.2 Absorção de dois fótons

2.2.1 Histórico

O fenômeno de absorção de dois fótons (A2F) foi originalmente proposto por Maria Göppert-Mayer em sua tese de doutorado em 1931(23-24). Göppert-Mayer previu, a partir do uso da teoria de perturbação em um modelo semi-clássico, que um átomo ou molécula poderia sofrer uma transição eletrônica, através da absorção simultânea de dois fótons (A2F), de um estado de energia mais baixo para outro mais alto. Ela calculou a probabilidade de transição, que se mostrou muito pequena para que o fenômeno pudesse ser observado através da excitação com fontes de luz convencionais. Portanto, apenas após a invenção do laser o processo de absorção de dois fótons foi observado experimentalmente, em 1961 por Kaiser e Garret (25). Naquele trabalho, eles confirmaram as previsões teóricas de Göppert-Mayer,

observando a fluorescência induzida via A2F em uma amostra de cristal de fluoreto de cálcio dopado com íon európio ($\text{CaF}_2:\text{Eu}^{+2}$). Neste experimento utilizou-se um laser de rubi de comprimento de onda $\lambda = 694,3 \text{ nm}$ (25).

2.2.2. Conceitos básicos da absorção de dois fótons (A2F)

Em princípio, todos os materiais podem ser excitados por processos multifotônicos ao serem expostos à luz de alta intensidade. Consideraremos aqui, mais especificamente, o processo de absorção de dois fótons, que foi o fenômeno usado para o processo de fabricação explorado neste trabalho.

Num processo de absorção de dois fótons, o material absorve dois fótons em um mesmo ato quântico (26-27), de tal forma que a soma da energia dos fótons iguala a diferença de energia entre os estados envolvidos na transição. Quando esses fótons têm a mesma energia, o processo de A2F é denominado degenerado, senão chamado de não degenerado quando os fótons envolvidos não tem a mesma energia. Em nosso trabalho, por simplicidade, consideraremos apenas o caso degenerado.

Em um processo de A2F, a absorção do material passa a ser descrita por um novo termo que só aparecem quando a densidade de fótons por unidade de tempo (intensidade) é extremadamente alta (isto é na região focal, onde a intensidade é da ordem GW/cm^2), o que pode ser obtido através da focalização de pulsos ultracurtos. Ou seja, além do coeficiente de absorção linear, α_0 , surge o coeficiente de absorção de dois fótons conhecido como β . Dessa forma, o coeficiente de absorção do material pode ser descrito por um termo não linear, dependente da intensidade, βI somado ao termo de absorção linear α_0 (18). A Eq. 2.3 expressa o coeficiente de absorção total de um material que exhibe absorção de dois fótons:

$$\alpha = \alpha_0 + \beta I \quad (2.3),$$

onde α_0 é o coeficiente de absorção linear da amostra, β o coeficiente de absorção de dois fótons e I a intensidade da luz.

Considerando que um feixe Gaussiano está sendo focalizado sobre a amostra, temos que a intensidade varia com o inverso do quadrado da distância ao plano focal no eixo óptico (eixo z). Utilizando a Lei de Beer (28), vemos que a taxa com que a intensidade varia é proporcional à intensidade ao quadrado (29):

$$\frac{dI}{dz} = -\alpha(I)I = -\beta I^2 \quad (2.4),$$

onde se considera que a irradiação se dá com luz fora da região de absorção linear da amostra, ou seja, $\alpha_0 = 0$. Deste modo, a excitação fica confinada ao longo do eixo z como ilustra a Fig. 2.1. É importante notar que a excitação ficará confinada não só na direção z , mas também no plano xy , uma vez que o feixe é focalizado no volume da amostra.

Figura 2.1 - Processo de absorção linear (esquerda) e por dois fótons (direita). O último leva ao confinamento espacial da excitação.

2.3. Aplicações envolvendo a absorção de dois fótons

Existem diversas aplicações envolvendo os processos de absorção de dois ou mais fótons, as quais requerem algumas condições: (i) fonte luminosa de alta intensidade, (ii) relação não linear entre a resposta do material e a intensidade de luz e (iii) ausência de absorção linear do material no comprimento de onda utilizado.

A seguir, apresentamos alguns exemplos de aplicações tecnológicas onde a absorção de dois fótons pode ser utilizada.

2.3.1. Limitação de potência óptica

A limitação óptica tem aplicação, por exemplo, na proteção de sensores ópticos da incidência de luz intensa (30-34,20). Um limitador óptico ideal é aquele que reduz fortemente a transmissão de luz acima de um certo limiar, mantendo-a constante, como ilustrado na Fig 2.2.

Figura 2.2 - Resposta óptica de um limitador óptico ideal (curva vermelha). A transmissão é de 100% quando a intensidade de excitação é menor que um dado limiar. Acima deste valor, a intensidade transmitida permanece constante, sendo, portanto limitada. Fonte: Adaptada de SKALA et al. (35).

A absorção de dois fótons para limitação óptica tem sido bastante explorada em semicondutores, mas seu estudo também tem sido realizado com moléculas que apresentam alta seção de choque de absorção de dois fótons (37-38). Neste caso, ao incidir luz de alta intensidade (acima do limiar) em um material inicialmente transparente, este passa a absorver a luz devido ao processo de absorção de dois fótons, diminuindo a intensidade transmitida.

2.3.2. Armazenamento óptico tri-dimensional

Há uma crescente demanda pelo desenvolvimento de dispositivos de armazenamento óptico volumétrico regravável, que possam substituir os discos ópticos convencionais. Este tipo de armazenamento leva vantagem devido à natureza do armazenamento tridimensional, que aumenta de 100 a 1000 vezes a capacidade máxima dos discos ópticos comercializados hoje em dia (38-39). O princípio fundamental desse tipo de aplicação consiste em focalizar a luz através de uma objetiva com grande abertura numérica e concentrar eficientemente a potência da luz laser incidente em um pequeno volume (*voxel*). Como a taxa de transição por absorção de dois fótons, por exemplo, aumenta com o quadrado da intensidade, a absorção ocorrerá apenas no volume focal. O princípio básico de um dispositivo deste tipo é ilustrado na Fig. 2.3.

O processo de absorção de dois fótons é um processo ideal para o armazenamento óptico 3D, uma vez que seu efeito está restrito apenas a região focal do laser. Além disso, com o armazenamento óptico 3D é possível aumentar substancialmente a quantidade de dados armazenados. Como principais mecanismos utilizados para armazenamento de dados 3D via absorção de dois fótons podemos citar as reações de ablação e fotopolimerização (40-41).

Figura 2.3 - Princípio básico de um disco óptico volumétrico baseado em A2F. (a) Escrivendo: sob a excitação por A2F o cromóforo modifica sua estrutura através de uma foto-reação, por exemplo, reação fotocromática. (b) Leitura: A A2F por parte do cromóforo na sua forma B resulta em uma fluorescência que é coletada por uma lente. O espelho dicróico (ED) reflete a fluorescência para o fotodetector (FD). Fonte: Adaptada de MAKAROV (42).

2.3.3. Microscopia de fluorescência via absorção de dois fótons

A microscopia de fluorescência via absorção de dois fótons (43-44), proposta inicialmente nos anos 90 por Webb et al. (45), vem sendo largamente utilizada principalmente em estudos biológicos, já que permite analisar de forma não invasiva amostras tridimensionais, com resolução submicrométrica, sem grandes danos a amostra durante a excitação. Quando comparada com outras técnicas microscópicas, a técnica envolvendo a absorção de dois fótons possibilita a obtenção de imagens com resoluções semelhantes à confocal e profundidade tecidual maior. Na microscopia fluorescente via absorção de um fóton, a intensidade do sinal de fluorescência é linearmente proporcional à intensidade local de excitação. Contudo, se os sinais da excitação e da emissão de luz estão na região espectral do visível, pode haver um grande espalhamento de luz, gerando ruído na imagem obtida. Outra limitação da técnica fluorescente via absorção de um fóton está no fato de que se a amostra possui absorção linear na mesma frequência de excitação, há uma significativa diminuição da resolução longitudinal (ao longo do caminho óptico da luz), impedindo aquisição de imagens de qualidade da estrutura

interna da amostra (48). Apesar da microscopia fluorescência via absorção de dois fótons e da confocal serem muito semelhantes, a primeira técnica apresenta algumas vantagens. Na microscopia de fluorescência via absorção de dois fótons a frequência de excitação está na região transparente da amostra, o que permite uma maior penetração do feixe. Quanto maior a diferença entre os comprimentos de onda de excitação e emissão, mais fácil é a detecção do sinal. Além disto, devido à dependência quadrática do sinal com a intensidade de excitação, o sinal de fluorescência origina-se apenas em uma pequena região focal, onde na literatura (35) já foram apresentadas imagens de volumes menores que um femtolitro. A Fig. 2.4 mostra imagens de microscopia de fluorescência por A2F de um vaso sanguíneo vivo e intacto, no qual os núcleos das células foram marcados com um corante específico de tal forma que as mesmas eram seletivamente excitadas com pulsos de 100 fs e uma potência média de 20 mW (49).

Figura 2.4 - Imagem de microscopia de fluorescência por A2F de um vaso sanguíneo utilizando pulsos de 100 fs. Fonte: Adaptada de TWO-PHOTON (49).

2.3.4. Terapia fotodinâmica ou PDT

Terapia fotodinâmica ou PDT (do inglês *Photodynamic Therapy*) é um tratamento clínico que envolve o uso de um fotossensibilizador para o tratamento de diversas patologias, dentre elas aquelas de caráter oncológico (50), cardiovascular (51), dermatológico (52) e microbiano (53). A PDT teve seu reconhecimento como alternativa de tratamento para casos oncológicos no final da década de 70, a partir dos trabalhos de Thomas Dougherty e seus colaboradores (54). Contudo, no ano de 1900, Oscar Raab, em seu trabalho de doutorado, já havia observado que a combinação de luz com o corante acridina era letal para o micro-organismo *Paramecium* (55). Esse fenômeno foi posteriormente denominado de *efeito fotodinâmico*. Esta técnica requer a utilização de três componentes básicos: fotossensibilizador, oxigênio e luz. O processo fotodinâmico ocorre quando, ao absorver a luz, o fotossensibilizador é excitado para um estado singleto, podendo então sofrer um cruzamento intersistema (do inglês: *intersystem crossing* - ISC) para o estado tripleto (56). Uma vez no estado tripleto e na presença de oxigênio molecular, que se encontra em seu estado tripleto, pode ocorrer uma reação de aniquilação tripleto-tripletto com o fotossensibilizador. Isto faz com que o fotossensibilizador retorne ao estado fundamental, gerando oxigênio singleto, o qual é altamente reativo e causa danos irreversíveis ao tecido vivo (57). Os fotossensibilizadores mais utilizados para o PDT apresentam absorção entre 400 – 500 nm. Como o tecido humano apresenta grande absorção nesta região espectral, a profundidade de penetração da luz é baixa, tornando o tratamento pouco eficiente. Assim, o ideal é utilizar frequências de excitação mais deslocadas para o infravermelho próximo, de 800 a 1100 nm, que é a janela de transmissão do tecido humano (57). Estes comprimentos de onda podem ser utilizados para excitar os fotossensibilizadores através da absorção de dois fótons. Porém, para que isto seja possível, os cromóforos devem apresentar alta seção de choque de A2F (20).

2.3.5. Polimerização induzida por absorção de dois fótons (PA2F).

A PA2F é um método de microfabricação promissor, que tem chamado consideravelmente a atenção por parte da comunidade científica devido à possibilidade de construir microestruturas com resolução melhor que o limite de difração da luz (58-61). Neste tipo de técnica, um pulso laser de femtossegundos é focalizado sobre o volume de um material fotossensível que absorve dois fótons, promovendo o processo de polimerização. Assim, microestruturas 3D podem ser construídas através da varredura do feixe laser nas direções xyz. Este tipo de técnica permite a fabricação de estruturas 3D complexas, como pode ser observado na Fig. 2.5.

Figura 2.5 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de um dragão (a) e de um moinho de vento fabricados por fotopolimerização via A2F em cerâmicas modificadas organicamente. Fonte: Adaptadas de OSTENDORF (62).

3 Microfabricação via polimerização por absorção de dois fótons

Neste capítulo, apresentamos em detalhes a técnica de microfabricação via PA2F, bem como as técnicas utilizadas para a caracterização das microestruturas fabricadas, além do sistema experimental e dos compostos utilizados (resinas e fotoiniciador).

3.1 Sistema experimental de microfabricação

A técnica de microfabricação oferece uma série de vantagens sobre outras técnicas convencionais, a destacar, sua capacidade para produzir estruturas tridimensionais sem limitações topológicas e sua alta resolução espacial, que pode exceder o limite de difração. Na técnica de PA2F, um feixe laser pulsado (femtosssegundos) é focalizado, através de lentes de microscópico, no volume de uma resina polimérica (monômeros) contendo um fotoiniciador (64) (composto orgânico responsável por iniciar o processo de fotopolimerização), como ilustra a Fig 3.1.

Figura 3.1- Esquema simplificado do processo de microfabricação.

A intensidade dos pulsos de femtossegundos é alta o bastante para que haja A2F por parte do fotoiniciador, de tal forma que a polimerização ocorre apenas no volume focal. Controlando a varredura do feixe, é possível a confecção de estruturas tridimensionais para determinadas aplicações tecnológicas.

A utilização de objetivas de microscópio impõe um limite físico ao tamanho da cintura do feixe (limite de difração). Porém, o limite de difração não impede que voxels (elementos volumétricos tridimensionais) menores que este limite possam ser polimerizados, graças a dependência quadrática da fotopolimerização com a intensidade, bem como a presença da intensidade limiar para a polimerização (intensidade mínima abaixo da qual, mesmo irradiando a amostra, não haverá polimerização), que permitem que o tamanho da região fotopolimerizada seja menor que o próprio tamanho da região focal.

A Fig. 3.2 ilustra este fato, a qual mostra a distribuição radial da intensidade de luz no ponto focal para três níveis de intensidades diferentes. Nesta figura, as curvas A, B e C denotam, respectivamente, intensidades de pico menor, igual e maior que o limiar de polimerização (linha pontilhada) para A2F. A curva C mostra uma intensidade que permite a obtenção de um voxel com resolução melhor do limite de difração (só a parte da gaussiana que está acima do limiar irá polimerizar a amostra) (64).

Figura 3.2 - As curvas A, B e C denotam, respectivamente, intensidades de pico menor, igual e maior que o limiar de polimerização por absorção de dois fótons (linha pontilhada). A curva C mostra uma intensidade que permite a obtenção de voxel com resolução melhor do limite de difração. Fonte: CORRÊA (64).

Devido ao perfil de intensidade gaussiano do laser, quanto mais a intensidade da região central do feixe se aproxima da intensidade do limiar de fotopolimerização, menor é a região de fato excitada. Este confinamento, ao contrário do limite de difração do sistema de focalização (dado pela objetiva de microscópio e do comprimento de onda do laser), depende apenas da potência de limiar de fotopolimerização e da potência utilizada. Neste trabalho, o limiar de fotopolimerização, para o caso de uma objetiva de 0,65, foi de 0,06 nJ por pulso.

Na Fig. 3.3, ilustramos o esquema do sistema experimental utilizado para microfabricação das estruturas tridimensionais (65). A polimerização induzida via absorção de dois fótons foi realizada com um oscilador laser de Ti:safira, um par de espelhos, acoplados a motores galvanométricos fazem com que o feixe percorra a amostra no plano XY, permitindo o controle sobre as regiões que serão fotopolimerizadas. Um estágio de translação, acionado por um motor de passos (MODELO - *Thorlabs*), movimenta a amostra na direção z, perpendicular ao feixe de excitação. Todo o sistema é automatizado e controlado por computador.

Figura 3.3 - Aparato experimental utilizado no processo de fotopolimerização via absorção de dois fótons. Fonte: FONSECA (65).

O material polimerizado apresenta um índice de refração um pouco mais elevado do que a resina, de maneira que o processo de fotopolimerização pode ser observado em tempo real através de uma câmera CCD e uma fonte de iluminação acoplada ao aparato experimental.

Nas seções seguintes, detalharemos os principais componentes desse sistema, além dos compostos utilizados (monômeros e fotoiniciador) na fotopolimerização.

3.1.1 Oscilador laser Ti:Safira

Neste trabalho utilizamos um sistema laser constituído por um oscilador laser de Ti:safira e um laser de bombeio *cw* (Verdi 5W- Coherent) que opera em 532 nm. O oscilador laser Ti:safira (marca Kmlabs, modelo TS) pode operar tanto em modo contínuo (*cw*) quanto em modo pulsado, *mode-locking* (travamento de modos). A Fig. 3.4 esquematiza a cavidade do sistema laser utilizada (65). Este sistema laser fornece pulsos ultracurtos sintonizáveis em torno de 790 nm, com largura de banda espectral à meia altura de aproximadamente 50 nm e com uma potência média de saída na ordem de 400 mW, operando a uma taxa de repetição de 82 MHz, com pulsos de duração em torno de 120 fs (limitados por Transformada de Fourier).

Figura 3. 4 - Cavidade do oscilador laser Ti: Safira. Fonte: FONSECA (65)

Na Fig. 3.5 mostramos uma foto do laser de bombeio e do oscilador de Ti:safira utilizado na microfabricação via polimerização por absorção de dois fótons.

Figura 3.5 – Laser de bombeio e oscilador de Ti:Safira.

A potência média fornecida e o espectro de emissão podem ser modificados conforme o alinhamento da cavidade, e são ajustados de acordo com a necessidade dos experimentos. Na Fig. 3.6 mostramos o espectro de emissão do sistema na condição de *mode-locking* (65).

Figura 3.6 - Espectro do oscilador laser Ti:safira operando em modo pulsado Fonte: FONSECA (65).

3.1.2 Espelhos e estágio de translação

Um par de espelhos acoplados a motores galvanométricos é responsável pelo movimento no plano xy . Para fazer o controle dos espelhos, utilizamos uma placa de aquisição da *National Instruments*, programada através da plataforma *LabVIEW*. Os espelhos são movidos de forma independente e em direções perpendiculares (x e y) um em relação ao outro. O movimento destes espelhos deflete o feixe laser antes que este incida sobre a objetiva, sendo esse movimento limitado para evitar uma deflexão muito grande, de tal forma que o feixe incida fora da entrada da objetiva, interrompendo o processo de fabricação. Para mover a amostra na direção z , com o objetivo de dar a terceira dimensão para o processo de fabricação, utilizamos um estágio de translação, o qual é movido através de um motor de passo. Durante a movimentação da amostra, um obturador (shutter) pode ser acionado, evitando que a polimerização ocorra em regiões não desejadas. A Fig 3.7 ilustra os espelhos e o estágio de translação utilizados.

Figura 3.7 – (a) Espelhos acoplados a motores galvanométricos. (b) Estágio de translação.

3.1.3 Objetivas de microscópio

A lente objetiva é um dos fatores que determinam a resolução espacial e a qualidade final das microestruturas fabricadas, por ser a responsável pela focalização do feixe na resina. O poder de focalização de uma lente pode ser expresso em função da abertura numérica.

A abertura numérica (NA) é uma medida da quantidade de luz que é efetivamente acoplada na objetiva, sendo dada pela expressão (66-67):

$$NA = n \sin \theta \quad (3.1),$$

onde n representa o índice de refração do meio, e θ o ângulo de abertura da lente. Quanto maior a abertura numérica de uma lente, mais luz ela é capaz de captar, ou seja, maior é o ângulo (em relação à normal da lente) com que o feixe de luz pode

incidir sobre a lente e ainda assim ser refratado para o plano da imagem. A Fig. 3.8 ilustra algumas objetivas com diferentes aberturas numéricas (63).

Figura 3.8 - Ilustrações de lentes objetivas com diferentes aberturas numéricas, Fonte: CORREA et al. (68).

As microestruturas fabricadas neste trabalho foram feitas usando objetivas com aumento de 10x e 60x, aberturas numéricas de 0,25 e 0,85, e distância de trabalho de 6 mm e 1 mm, respectivamente. Considerando o limiar de polimerização (0,06 nJ) e as objetivas utilizadas obtemos, para o nosso sistema, uma resolução de 0,7 μm e com isso conseguimos fabricar estruturas com no mínimo 5 μm de tamanho.

O posicionamento da lente objetiva no sistema de microfabricação é mostrado em detalhe na Fig. 3.9.

Figura 3.9 – Posicionamento da lente objetiva no sistema de microfabricação.

3.1.4 Sistema de iluminação e câmera CCD

Através de um sistema de iluminação e uma câmera CCD acoplados ao aparato experimental, pode-se acompanhar o processo de polimerização em tempo real. A fonte de iluminação (LED) possui intensidade ajustável e é direcionada em sentido oposto à propagação do laser. Cabe ressaltar que o LED utilizado na iluminação emite em torno de 650 nm e apresenta uma potência baixa, de forma que ele não induz a excitação no fotoiniciador. O sistema de iluminação fica a maior parte do tempo desligado, sendo utilizado basicamente durante o alinhamento da amostra. Essa luz incide sobre um divisor de feixe, localizado depois da objetiva (ver Figura 3.3), e é desviada para a câmera CCD, onde a fotopolimerização pode ser monitorada em tempo real devido à diferença de índices de refração entre a resina não polimerizada e o polímero final.

3.2 Resina e fotoiniciador

A composição básica da resina polimérica que será utilizada na fabricação das microestruturas é feita a partir de uma mistura das resinas triacrilato de trimetilolpropano stoxilado (6) (SR-499) e *triacrilato de tris (2-hidroxietil) isocianurato* (SR-368), ambas disponíveis comercialmente pela empresa *Sartomer*. A Fig 3.10 mostra a estrutura química dessas resinas.

Figura 3.10 – Monômeros SR-368 e SR-499.

As microestruturas fabricadas devem ser rígidas o suficiente para manter sua geometria tridimensional, mesmo depois do processo de lavagem para a remoção do material não polimerizado. A estrutura cíclica (anel aromático) do monômero SR-368 fornece dureza ao polímero (69), enquanto os grupos etoxilados no monômero

SR-499 contribuem para aumentar a flexibilidade do polímero final, preservando a estrutura da microestrutura produzida, evitando assim que o material se torne quebradiço (69).

O óxido de bis-(2,4,6-trimetilbenzoil)-4-etoxifenil fosfina (Lucirin TPO-L), age como fotoiniciador para a polimerização (70-71). Fig. 3.11 ilustra a estrutura molecular do fotoiniciador utilizado.

Figura 3. 11 – Fórmula estrutural do Lucirin TPO-L.

O fotoiniciador cumpre a função crítica de iniciar a reação de polimerização. Existem dois mecanismos diferentes através dos quais o fotoiniciador pode desencadear a reação de polimerização ao ser excitado: por radicais livres e por reações catiônicas (72). O fotoiniciador Lucirin TPO-L desencadeia a polimerização por radicais livres (73). Na polimerização por radicais livres, os fotoiniciadores são divididos em dois grupos principais, de acordo com o mecanismo de formação dos radicais: Tipo I – quando os fotoiniciadores sofrem reação *unimolecular* e Tipo II – quando os fotoiniciadores sofrem uma reação *bimolecular* com um co-iniciador para criar radicais. Nesses iniciadores, uma ligação se quebra, depois da excitação, para formar dois radicais onde pelo menos um destes irá iniciar a reação de polimerização (73). As reações são apresentadas na Fig. 3.12:

Figura 3. 12 – Reação de criação de radicais livres, Tipo I e Tipo II.

O Lucirin TPO-L é um fotoiniciador do Tipo I. O radical fosfinoil tem uma estrutura tetraédrica com um único elétron no átomo de fósforo. Este radical inicia a polimerização de forma eficiente e com pouca limitação espacial. As principais etapas de uma reação de polimerização radicalar são (74): iniciação, propagação e terminação. A iniciação ocorre quando os fotoiniciadores se quebram em partes devido à excitação por luz, e essas partes reagem com monômeros das vizinhanças gerando centros ativos (radicais formados a partir de monômeros). Na fase de propagação, o centro ativo se combina com novos monômeros ainda não reagidos, aumentando o tamanho da cadeia. A cada monômero recombinado ou adicionado à cadeia polimérica cria-se um novo centro ativo, promovendo assim, o crescimento da cadeia. Na última etapa da polimerização radicalar, a terminação, os centros ativos das cadeias não conseguem mais reagir com outros centros ativos. O Lucirin TPO-L exibe absorção na região UV-visível do espectro. A ligação que sofre a quebra é a ligação C-P. Este fotoiniciador é líquido a temperatura ambiente, uma das características importante já que a os monômeros utilizados são altamente viscosos, mas podem facilmente formar soluções homogêneas com Lucirin TPO-L.

As resinas que utilizamos são preparadas numa proporção de 50% SR-368 e 50% SR-499 (resina 50%-50%). Em geral, o fotoiniciador é adicionado aos monômeros numa proporção de até 3%. Os componentes são misturados por aproximadamente duas horas em um Becker mantido na ausência de luz, a fim de evitar polimerização induzida por luz visível.

3.3 Preparação das amostras para microfabricação

Antes da preparação da amostra, limpamos com etanol um substrato base (lâmina de microscópio convencional cortada em uma área útil de aproximadamente 1 cm^2), onde as microestruturas irão permanecer após a fabricação e uma lâmina de microscópio inteira, que servirá de suporte para o posicionamento da amostra no sistema experimental. Após essa limpeza, secamos o substrato e a lâmina com papel macio e passamos sobre eles um leve jato de nitrogênio, para remover impurezas. O substrato base limpo é posicionado sobre a lâmina de microscópio, sendo fixado com fitas adesivas. Essas fitas adesivas são colocadas nas extremidades do substrato, funcionando também como espaçadores, ou seja, a espessura dessas fitas determina o limite superior das microestruturas a serem fabricadas. Depois de posicionar o substrato base na lâmina, colocamos a resina polimérica sobre o substrato base, o qual é coberto com uma lamínula de vidro fixada com outras fitas adesivas. Na Fig. 3.13 mostramos um esquema da amostra preparada.

Figura 3. 13 – Amostra preparada para fotopolimerização.

As amostras devem ser posicionadas no sistema experimental com a lamínula voltada para abaixo, devido às curtas distâncias de trabalho das objetivas, como ilustra a Fig. 3.14. Dessa forma, o feixe precisa atravessar apenas a lamínula, possibilitando uma maior liberdade de fabricação no eixo z. O ajuste do foco da objetiva na amostra deve coincidir com a superfície do substrato base. Isso é necessário para que o início da polimerização ocorra diretamente no substrato base, deixando a estrutura produzida aderida ao mesmo. Estruturas que não estão perfeitamente aderidas ao substrato base são perdidas durante o processo de lavagem.

Figura 3. 14 – Posicionamento da amostra no sistema de microfabricação.

3.4 Programação para confecção das microestruturas

Para a confecção das microestruturas tridimensionais utilizamos a plataforma de programação *LabVIEW*. Esse programa atua no controle dos dois espelhos galvanométricos, do estágio de deslocamento da amostra e do obturador.

Para construir cilindros, cones e paralelepípedos, utilizamos algoritmos desenvolvendo rotinas sequenciais que controlam os motores galvanométricos, responsáveis pelo movimento dos espelhos e, conseqüentemente, o movimento do feixe laser na amostra no plano xy (63). Em seguida, o programa movimenta a

amostra na direção z através do estágio de translação, fazendo as estruturas tridimensionais.

Para fazer um cubo ou um paralelepípedo, fabricamos retângulos e movemos a amostra no eixo z, repetindo todo o procedimento. Em nossos programas, um retângulo é feito utilizando um algoritmo que desenha linhas paralelas adjacentes (uma ao lado da outra). Já para fazer um cone, programamos rotinas que fazem círculos concêntricos cujos raios diminuem gradativamente. Nos cilindros, a programação garante o mesmo raio para todas as camadas.

O obturador deve ser controlado de forma a bloquear o feixe laser quando estiver se deslocando, apenas para redirecionar o ponto focal para a posição desejada, porém sem polimerizar o material.

3.5 Automatização do sistema para reposicionamento da amostra

Tendo em vista que este trabalho propõe a fabricação de várias matrizes (microambientes) com diferentes distâncias entre as microestruturas, a maneira mais viável de realizar a fabricação é utilizando um sistema mecânico/computacional que permite o reposicionamento da amostra de maneira rápida e precisa. Este sistema basicamente utiliza pontos fixos para posicionar a amostra, de acordo com o alinhamento inicial do sistema, garantindo assim a fabricação dos microambientes com distâncias fixas entre as microestruturas. Nas seções seguintes, detalharemos o sistema mecânico/computacional desenvolvido para o reposicionamento da amostra.

3.5.1 Sistema mecânico

Utilizando um sistema mecânico acoplado aos micrômetros que movimentam a amostra no plano xy, é possível posicionar a amostra via *software* e não manualmente. Neste trabalho, foram testados dois tipos diferentes de sistemas

mecânicos para a movimentação bidimensional da amostra. O primeiro sistema utilizado consistiu de um parafuso acoplado com uma engrenagem coroa, os quais eram conectados a um motor de passos e a um micrômetro, respectivamente, conforme ilustra a Fig 3.15.

Figura 3.15 – Sistema mecânico engrenagem coroa sem fim.

O segundo sistema mecânico utilizado era composto por dois suportes mecânicos nas extremidades de um cabo. Os suportes são acoplados a um micrômetro e a um motor de passos. A Fig 3.16 ilustra o sistema mecânico utilizado.

Figura 3. 16 – Sistema mecânico com cabo de velocímetro.

Via *software*, controlamos o motor de passo, que através do cabo ou parafuso, transmite o movimento do micrômetro acoplado no suporte da amostra. Observamos que o segundo sistema, que utiliza um cabo para acionar o micrometro, proporcionava um melhor desempenho, uma vez que ele permite maior reprodutibilidade e menor vibração durante a movimentação da amostra.

3.5.2 Programação para reposicionamento da amostra

A programação para o reposicionamento da amostra também foi feita utilizando a plataforma *LabVIEW*. O que se faz na programação é desenvolver rotinas sequenciais que controlam os motores de passo, os quais indiretamente são os responsáveis pelo movimento e posicionamento da amostra no plano xy.

Para fazer os microambientes com distâncias específicas entre as microestruturas, usamos um algoritmo que roda o programa descrito na seção 3.4, no qual se faz uma microestrutura, e então move a amostra na direção y, (através do motor de passo atomizado). Nesse programa, estipula-se um tempo de espera e novamente repetem-se os passos anteriores para fazer outra microestrutura e mover a amostra. O programa repete esses passos até que o número de microestruturas desejado por linha seja atingido. Uma vez se tem a uma linha com o número de microestruturas desejada, o programa move amostra na direção x para que se inicie o processo novamente, mas agora em sentido contrario. Este procedimento é ilustrado na Fig. 3.17. A precisão de movimentação do sistema é de aproximadamente 1 μm . Nesse programa também é possível gerenciar o tamanho da matriz, isto é, o tamanho do microambiente.

Figura 3.17 Imagens das rotinas sequenciais que controlam os motores de passo.

3.6 Metodologia para fabricação das microestruturas

Para a fabricação dos microambientes, alguns ajustes ao sistema experimental são feitos inicialmente, tais como o alinhamento do feixe laser, ajuste do foco da objetiva no substrato base e a escolha de qual estrutura será fotopolimerizada (paralelepípedos, cilindro ou cone). A Fig 3.18 ilustra, simplificada, os passos mais importantes do processo de fabricação das microestruturas (65).

Figura 3.18 – Metodologia para fabricação de microestruturas.

Com a amostra preparada, conforme descrito na seção 3.3, o processo de microfabricação pode ser iniciado (Fig. 3.18 i). Primeiramente é preciso posicionar a amostra e garantir que o início da polimerização ocorra coincidindo com o substrato base. O posicionamento para fabricação da primeira microestrutura é feito manualmente, utilizando os dois micrômetros acoplados no suporte da objetiva. Esse posicionamento é feito também com o obturador fechado, com intuito de evitar uma polimerização indevida na amostra. Após a fabricação da primeira microestrutura, todo o reposicionamento da amostra é feito utilizando o sistema de automação descrito na seção 3.5. Produzida a quantidade desejada de estruturas, desligamos o laser (Fig. 3.18 ii) e retiramos a amostra do aparato experimental. O substrato contendo as estruturas fabricadas é então imerso em uma placa de Petri contendo etanol para remover a resina não polimerizada (Fig. 3.18 iii). As estruturas ficam, em geral, de 30 a 40 minutos nesse banho de etanol. Após esse período, retiramos as microestruturas da placa de Petri e deixamos secar em temperatura ambiente para que os resíduos do álcool que ficam sobre o substrato base evaporem. Finalizada essas etapas, dizemos que a fabricação das microestruturas está concluída (Fig. 3.18 iv).

3.7 Técnicas de caracterização

3.7.1 Microscópio eletrônico de varredura (MEV)

O MEV é um dos mais versáteis instrumentos disponíveis para a observação e análise de características microestruturais de objetos sólidos. A principal razão de sua utilidade é a alta resolução, que pode ser obtida quando as amostras são observadas (75-76).

Outra característica importante do MEV é a aparência tridimensional da imagem das amostras, resultado direto da grande profundidade de campo. Esse tipo de medida permite, também, o exame com pequenos aumentos e com grande profundidade de foco, o que é extremamente útil, pois a imagem eletrônica complementa a informação dada pela imagem óptica.

Neste trabalho, para caracterizar nossas microestruturas, utilizamos um Microscópio MEV da marca Hitachi, modelo TM3000 (Figura 3.19). Este MEV, por se tratar de um sistema de bancada, tem sua resolução limitada a aproximadamente 100 nm.

Figura 3.18 - Microscópio eletrônico de varredura (MEV) TM300 – Hitachi.

3.7.2 Microscopia óptica

A microscopia de transmissão é uma ferramenta bastante utilizada em pesquisas científicas, principalmente para análises biológicas. Nesse trabalho, utilizamos essa técnica microscópica para avaliar tanto a integridade das microestruturas produzidas quando o crescimento celular nas microestruturas.

Outra técnica complementar à microscopia de transmissão é a microscopia de fluorescência. O microscópio de fluorescência é utilizado para examinar amostras com propriedades luminescentes, tirando proveito dessa propriedade, a partir da excitação das amostras com luz de comprimento de onda, geralmente, no ultravioleta. A luz de excitação é focalizada na amostra, que passa a florescer. Com o uso de espelhos dicróicos, a luz de excitação é separada da fluorescência da amostra, permitindo observar claramente sua luminescência.

O microscópio utilizado nesse trabalho é da marca Carl Zeiss, modelo LSM 700, cuja foto é apresentada na Fig. 3.20.

Figura 3.20 - Microscópio Confocal LSM 700 - Carl Zeiss

Esse microscópio possui lentes objetivas de 10×, 20×, 40× e 63×. Com o auxílio de um *software* dedicado, controlamos os parâmetros de análise. Nesse equipamento, podemos fazer análises de microscopia de transmissão, reflexão e fluorescência, além de microscopia confocal de fluorescência. Uma câmera acoplada ao equipamento permite o monitoramento em tempo real das imagens (77-79).

4 Célula MCF7 (Michigan Cancer Foundation-7)

4.1 Introdução

A maioria dos cânceres de mama são carcinomas, o que significa que são derivados de células epiteliais. A célula MCF-7 é uma linhagem de adenocarcinoma de mama que apresenta um fenótipo tumoral, tendo sido isoladas pela primeira vez em 1970 (80-82). O adenocarcinoma é um câncer (neoplasia maligna) que se origina em tecido glandular. Para ser classificado como um adenocarcinoma, as células não necessariamente precisam fazer parte de uma glândula, contanto que elas tenham características secretórias. O termo adenocarcinoma é derivado de 'adeno', que significa 'pertencente a uma glândula' e 'carcinoma', que descreve um câncer que se desenvolveu em células epiteliais. Ele pode se originar inicialmente como um adenoma, ou seja, um tumor glandular que é benigno.

O câncer de mama destaca-se entre outros tipos de neoplasias por ser o mais comum entre as mulheres, e por representar o segundo mais frequente no mundo. Na população mundial, a sobrevivência após cinco anos da doença é de 61% (83). No Brasil, excluídos os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama é o mais incidente em mulheres.

Células MCF-7 de adenocarcinoma mamário são amplamente utilizadas como modelo de estudo de câncer de mama. Estas células são bastante utilizadas, por exemplo, em testes de drogas e radioterapia. Estudos também demonstraram que as células de câncer mamário MCF-7 são resistentes às quimioterapias (84-85). Na literatura também encontramos relatos da baixa susceptibilidade das células MCF-7 às drogas convencionais, como doxorrubicina ou cisplatina (86-87). Geneticamente, a linhagem MCF-7 não foi mantida exatamente. Originalmente, ela foi descrita como tendo um cariótipo contendo 85 cromossomos, que desde então foi reduzido em 16 cromossomos. A linha celular de hoje tem um cariótipo contendo 69 cromossomos (80-82). Na Fig. 4.1 apresentamos uma imagem de microscopia óptica de células MCF-7.

Sendo assim, dada a relevância desta linhagem de células para o estudo de aspectos fundamentais relativos ao câncer de mama, neste trabalho elas serão

utilizadas para testar a adequação dos microambientes desenvolvidos como plataformas para investigar o desenvolvimento celular.

Figura 4.1 - Celula Michigan Cancer Foundation-7 (MCF7).

4.2 Cultura das células MCF7

Para os ensaios biológicos realizados neste trabalho, foram utilizadas linhagens celulares ATCC (American Type Culture Collection, USA) de adenocarcinoma de mama (MCF-7). As linhagens foram descongeladas e cultivadas em um meio de cultura conhecido como MEM (Meio Eagle mínimo essencial), acrescido de 0,01 mg/ml de insulina humana recombinante e soro fetal bovino (SFB, Cultilab) a uma concentração final de 10% (80-82).

As células foram cultivadas em garrafas e mantidas a 5% de CO₂ e a temperatura de 37 °C até a formação de monocamada celular. Posteriormente, as garrafas de células foram submetidas à tripsinização, para isso, as células foram lavadas com 5 ml Hanks que foi em seguida descartado, e as linhagens foram submetidas à 3 ml de tripsina 0,05% EDTA produzidas á partir de uma solução 10 vezes concentrada (Invitrogen, EUA) até o desprendimento das células do fundo das garrafas. A seguir, as células foram homogeneizadas com volumes variados do meio

de cultura acrescido de 10% de soro fetal bovino para a neutralização da tripsina. O volume da suspensão celular obtido em uma garrafa foi transferido para outras duas garrafas, de modo a obter quantidade celular adequada para os experimentos. Essa etapa do trabalho foi realizada com a colaboração da Prof^a. Dr^a. Carla R. Fontana, do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus Araraquara.

Cabe ressaltar ainda que a linhagem de células utilizada neste trabalho foi codificada com proteína verde fluorescente (88) (GFP: *green fluorescent protein*). Esta proteína emite fluorescência esverdeada (pico de emissão em torno de 510 nm), quando excitada na região azul do espectro eletromagnético. A GFP possui dois picos de excitação, um menor em 470 nm e outro em 395 nm (88). A Fig. 4.2 mostra uma imagem de microscopia de fluorescência (excitação centralizada entre 450-500 nm) para células MCF-7 codificadas com GFP.

Figura 4.2 – Imagem fluorescente de células MCF-7 codificadas com GFP.

5 Resultados

5.1 Fabricação e caracterização dos microambientes

Foram fabricados microambientes compostos de microestruturas com diferentes formas (paralelepípedos, cilindros e cones) e espaçamento. Todos os microambientes foram confeccionados com a resina acrílica pura, fotopolimerizados com uma potência de 50 mW, e utilizando uma objetiva de abertura numérica de 0,85 (60×).

Depois da fabricação, foi feita a caracterização das microestruturas por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV), com a qual verificamos, primeiramente, se as microestruturas permaneceram aderidas ao substrato após o processo de lavagem. Além disso, através das imagens de MEV podemos avaliar as características morfológicas e estruturais das microestruturas produzidas. Na Fig 5.1 são mostradas imagens de MEV de uma sequência de microestruturas fabricadas utilizando o sistema de movimentação com cabo flexível. Podemos observar que as microestruturas mantiveram suas características estruturais mesmo após a lavagem. Além disso, vemos que as estruturas apresentam-se bastante limpas, mostrando que o procedimento de lavagem é eficiente para remover a resina não polimerizada.

Figura 5.1 - Imagens de MEV das microestruturas cilíndricas

Pela imagem apresentada na Fig 5.1, observamos que as microestruturas não estão adequadamente alinhadas. Após uma análise deste resultado, vemos que há um padrão de deslocamento, de tal forma que as colunas de microestruturas estão alternadamente alinhadas, ou seja, a cada vez o sentido de fabricação é alterado (ver seção 3.5.2) ocorre um deslocamento na fabricação das microestruturas devido a uma folga no cabo que, portanto, não transmite o movimento adequadamente ao micrômetro. Para sanar este problema, fizemos algumas adaptações ao algoritmo descrito na seção 3.5.2. Basicamente, fazemos a fabricação de colunas de estruturas movendo a amostra em um único sentido (de baixo para cima, por exemplo). Desta forma, ao terminarmos uma coluna reposicionamos a amostra para que seja iniciada a fabricação da próxima coluna, sempre voltando um pouco abaixo do ponto inicial de fabricação, de tal forma a eliminar a folga do cabo do sistema mecânico. Este procedimento é ilustrado, esquematicamente, na Fig.5.2, o qual pode ser comparado ao procedimento original mostrado na Fig. 3.17.

Figura 5.2 – Ilustração da rotina adaptada, utilizada para fabricar os microambientes com estruturas alinhadas.

Utilizando esta nova rotina para a fabricação da sequência de estruturas, fomos capazes de obter microambiente com microestruturas satisfatoriamente alinhadas, conforme ilustra a imagem de MEV exibida na Fig 5.3.

Figura 5.3 - Imagens de MEV das microestruturas depois das modificações

O passo seguinte foi fabricar matrizes de microestruturas com diferentes formas e distintos espaçamentos. A essa matriz de microestruturas, por conveniência, denominamos de microambientes. Visando obter estruturas que apresentem melhor resolução, todos os microambientes foram fabricados usando uma objetiva com abertura numérica de 0.85 (60×).

Na Fig. 5.4 apresentamos microambientes fabricados após a realização de todas as correções necessárias no sistema experimental e no programa de deslocamento da amostra. A Fig. 5.4 (a) mostra três microambientes fabricados com diferentes formas (cilindros, cones e paralelepípedos). Na Fig. 5.4 (b), (c) e (d) mostramos uma microestrutura, em detalhe, para cada microambiente.

Figura 5.4 – (a) Imagem de MEV de microambientes com diferentes formas (cones, cilindros e paralelepípedos). Um detalhe de cada tipo de microestrutura é apresentado em (b), (c) e (d).

Como mencionado no Capítulo 3, o processo de fabricação de cada microestrutura deve sempre iniciar a partir do substrato base, de tal forma que as primeiras camadas fiquem a ele aderidas. Portanto, caso haja uma pequena inclinação no substrato base ou do suporte onde é posicionada a amostra, na medida em que a amostra é deslocada para a fabricação de uma nova estrutura, as estruturas poderão apresentar diferentes alturas. Para os cilindros e paralelepípedos, isso acarretará apenas em pequenas variações de suas alturas, sem afetar a distância relativa entre eles. Contudo, para as estruturas cônicas, esse problema pode levar não apenas a diferenças sem suas alturas, mas também a diferentes espaçamentos entre elas (que, portanto não será mantido fixo), conforme exemplificamos na Fig. 5.5. Uma vez que observamos esta situação para nossas amostras, optamos por apenas produzir microambientes contendo cilindros e paralelepípedo.

Figura 5.5 - Ilustração dos diferentes espaçamentos que podem ser gerados para estruturas cônicas, caso o substrato não seja perfeitamente plano.

Na Fig. 5.6 apresentamos, a título de ilustração, uma imagem de MEV para alguns uma amostra de microambientes fabricada neste trabalho. Para a realização dos estudos de crescimento celular, em um mesmo substrato foram preparados microambientes com estruturas (cilindros e paralelepípedos) separadas por diferentes espaçamentos (12, 18, 24 e 30 µm). Estes valores de espaçamento foram determinados levando-se em conta tanto o tamanho típico da célula MCF-7, quanto testes preliminares de crescimento que realizamos. Para todos os microambientes fabricados, os cilindros foram produzidos com um diâmetro de 20 µm e altura de 20 µm, enquanto os paralelepípedos tinham dimensões de 20×20×20 µm. Como pode ser observado na Fig. 5.6, há uma pequena variação nas alturas das microestruturas devido a não planicidade do substrato e do suporte onde é posicionada a amostra, como mencionado anteriormente.

Figura 5.6 - Imagem de MEV (vista inclinada) de um microambiente fabricado para o estudo de crescimento celular. Para este microambiente a separação entre as microestruturas é de 18 μm.

5.2 Estudo do crescimento de células MCF-7 em microambientes

Após a fabricação dos microambientes, passamos a estudar a viabilidade do seu uso para o crescimento celular, avaliando o desenvolvimento da célula MCF-7 marcada com GFP. Antes de todos os experimentos envolvendo células, os substratos contendo os microambientes foram esterilizados através de irradiação com luz UV (260 nm) por 30 minutos. Em seguida, estes substratos eram acondicionados em uma placa de Petri estéril, onde a solução (com meio de cultivo) contendo as células MCF-7 foi depositada. Estas amostras (microambientes com células) foram mantidas em estufa a 5% de CO₂ e a temperatura de 37 °C, sendo removidas apenas para a realização das imagens, retornando a estufa imediatamente após a conclusão dos experimentos.

Iniciamos os testes de viabilidade de crescimento celular nos microambientes utilizando para inoculação no microambiente (estruturas cilíndricas) uma solução com concentração de 1×10^4 células/ml. Esta amostra foi avaliada, via microscopia fluorescente (excitação centrada em 480 nm), após 48 horas de incubação. Na Fig. 5.7, apresentamos o resultado dessa análise.

Figura 5.7 - Matriz microestruturas cilíndricas para investigação do desenvolvimento após 48 horas de monitoramento.

Podemos observar na Fig 5.7 que os microambientes emitem fluorescência amarelada, resultante da emissão do próprio polímero acrílico, enquanto as células florescem no verde, como esperado, devido a GFP. Este resultado indica que os microambientes produzidos são compatíveis com o crescimento da célula MCF-7, uma vez que se pode observar o crescimento de algumas células próximas as estruturas. Contudo, o número de células no microambiente, mesmo após 48 h de incubação, é bastante baixo. Este resultado nos levou a testar uma maior concentração de células para este tipo de experimento. Na Fig. 5.8, apresentamos a imagem obtida utilizando uma concentração de 2×10^5 células/ml. Neste caso, observamos uma melhor distribuição de células sobre os microambientes, o que deve propiciar um melhor estudo do desenvolvimento celular nestes microambientes.

Figura 5.8 - Microambientes com uma concentração de células de 2×10^5 células/ml

Tendo demonstrado que os microambientes são viáveis ao crescimento celular, passamos ao estudo de como os diferentes microambientes (diferentes estruturas e espaçamento) afetam o desenvolvimento das células MCF7. Para estes estudos, as células foram mantidas nos microambientes por até 4 dias, sendo fornecidas todas as condições necessárias para seu desenvolvimento (atmosfera com 5 % de CO₂: e temperatura de 37°C) (80).

Na Fig. 5.9 apresentamos imagens de microscopia óptica de transmissão e fluorescência para microambientes (estruturas cilíndricas e separação de 12 µm) com células incubadas por 24, 48 e 72 horas. Embora tenhamos planejado inicialmente monitorar o desenvolvimento das células por um período de quatro dias consecutivos, como pode ser observado na Fig. 5.9, a partir do terceiro dia um número significativo de microestruturas se desprende do substrato base, impossibilitando a continuidade dos experimentos. Sendo assim, para efeito de comparação entre os diferentes microambientes só serão apresentados resultados obtidos nos dois primeiros dias (24 e 48 horas).

Figura 5.9 - Imagens de microscopia óptica de transmissão e fluorescência do crescimento celular nos microambientes (cilíndricos com espaçamento 12 µm) para tempos de incubação de 24, 48 e 72 horas.

Na Fig. 5.10 apresentamos imagens de microscopia de transmissão e fluorescência que ilustram o desenvolvimento celular em microambientes com estruturas cilíndricas com diferentes espaçamentos. Nesta figura, apresentamos os resultados obtidos após um período de 24 e 48 h de incubação. Observamos, primeiramente, uma maior densidade de células em 48 h, indicando que de fato os microambientes estão propiciando seu desenvolvimento. De certa forma, este resultado já era esperado uma vez que há necessidade de fixação das células nas estruturas para que elas possam se desenvolver o que deve estar ocorrendo nas primeiras 24 h. Esses resultados também revelam que para os ambientes com separação de 12 μm há uma maior densidade de células, a qual diminui com o aumento do espaçamento, de tal forma que para o microambiente com 30 μm , por exemplo, apenas poucas células são observadas.

Figura 5.10 - Imagens de microscopia (transmissão e fluorescência) mostrando o desenvolvimento das células MCF-7 em microambientes com estruturas cilíndrica, com diferentes espaçamentos, para períodos de monitoramento de 24 e 48 horas.

Os resultados do desenvolvimento celular em microambientes com estruturas do tipo paralelepípedos, com diferentes espaçamentos, são apresentados na Fig. 5.11, novamente para períodos de incubação de 24 e 48 h. De maneira geral, os resultados são semelhantes aos obtidos com estruturas cilíndricas (Fig. 5.10), ou seja, observa-se um crescimento celular no entorno das microestruturas, e a densidade de células diminui com o aumento da separação entre as estruturas.

Figura 5.11 - Imagens de microscopia (transmissão e fluorescência) mostrando o desenvolvimento das células MCF-7 em microambientes com estruturas do tipo paralelepípedos, com diferentes espaçamentos, para períodos de monitoramento de 24 e 48 horas.

Comparando os resultados das Fig. 5.10 e 5.11, parece haver uma tendência de melhor aderência e, portanto desenvolvimento celular, nas microestruturas cilíndricas, provavelmente devido a facilidade para a fixação da célula a este tipo de

geometria. Como pode ser observado em detalhe na Fig. 5.12, algumas células se desenvolvem ao redor das microestruturas, ou mesmo entre elas.

Figura 5.12 - Imagens de microscopia de transmissão e fluorescência mostrando o desenvolvimento de células MCF-7 ao redor e entre microestruturas de microambientes distintos.

Nossos resultados mostram que os microambientes confeccionados são viáveis para estudar o desenvolvimento das células, conforme demonstrado para a MCF-7. Além disso, os resultados obtidos neste trabalho indicam que características geométricas dos microambientes (forma e espaçamento) parecem influenciar o desenvolvimento celular, característica esta que pode ser explorado no desenho de ensaios estudos mais aprofundados com células.

6 Conclusões e perspectivas

Neste projeto, utilizamos a técnica de polimerização por absorção de dois fótons para produzir microambientes compostos por microestruturas de diferentes formas (cones, cilindros e paralelepípedo) e com distintos espaçamentos. Para isso, foi adaptado um sistema mecânico/computacional que permite o reposicionamento da amostra. Este sistema utiliza pontos fixos para posicionar a amostra, de acordo com o alinhamento inicial do sistema, garantindo a fabricação de microambientes com distâncias fixas entre as microestruturas. Microambientes com estruturas cônicas, cilíndricas e paralelepípedos foram confeccionados, com distintas separações (12, 18, 24 e 30 μm).

Estes microambientes foram usados, como prova de princípio de sua utilização em microbiologia, para avaliar o desenvolvimento. Para isso foram utilizadas células MCF-7, as quais foram inoculadas em meio de cultura sobre distintos microambientes. As amostras foram mantidas nesses ambientes por até 4 dias, sendo fornecidas todas as condições necessárias para seu desenvolvimento (atmosfera com 5% de CO_2 e temperatura de 37°C). O

Comparando o desenvolvimento da célula no primeiro e segundo dia em cada microambiente, observamos um aumento na densidade de células no segundo dia, que foi atribuído a adesão celular ao microambiente, que deve ocorrer nas primeiras 24 h, seguida de seu desenvolvimento. A densidade de células também é influenciada pela distância entre as estruturas no microambiente; quanto menor a distância entre as microestruturas, maior a densidade de células que crescem nos microambientes. Portanto, os microambientes fabricados se mostraram viáveis para o estudo do crescimento da célula MCF7, e podem ser explorados em estudos de microbiologia mais aprofundados como, por exemplo, para desenvolvimentos em engenharia de tecidos.

Como proposta de novos estudos, pretendemos aprimorar o sistema mecânico/computacional e a metodologia para avaliar o desenvolvimento das células. Para isso, devemos melhorar o processo de fabricação das microestruturas no substrato base (adesão das microestruturas no substrato) para tempo maior de observação/utilização dos microambientes. Por fim, daremos continuidade aos

Conclusões e perspectivas

trabalhos de fabricação de microambientes biológicos, visando de fato aplicar tais dispositivos para estudos em biologia celular.

REFERÊNCIAS

- 1 SHEN, Y. R. **The principles of nonlinear optics**. New York: John Wiley, 1984.
- 2 FFRANKEN, P. A.; WARD, J. F. Optical harmonics and nonlinear phenomena. **Reviews of Modern Physics**, v. 35, n. 1, p. 23-39, 1963.
- 3 MAZUMDAR, S.; GUO, F. Observation of 3 resonances in the 3rd-harmonic generation spectrum of conjugated polymers – evidence for the 4-level essential state model. **Journal of Chemical Physics**, v. 100, n. 2, p. 1665-1672, 1994.
- 4 MA, G., L. et al. Investigations of third-order nonlinear optical response of poly (p-phenylenevinylene) derivatives by femtosecond optical Kerr effect. **Physica B**, v. 305, n.2, p. 147-154, 2001.
- 5 PAO, Y. H.; RENTZEPI, P.M. Laser-induced production of free radicals in organic compounds (77 degrees K polymerization of styrene and P-Isobutylstyrene 2-photon absorption E). **Applied Physics Letters**, v. 6, n.5, p. 93-&, 1965.
- 6 MARUO, S et al. Three-dimensional microfabrication with two-photon-absorbed photopolymerization. **Optics Letters**, v. 22, n. 2, p. 132-134, 1997.
- 7 MARUO, S. et al. Force-controllable, optically driven micromachines fabricated by single-step two-photon micro stereolithography. **Journal of Microelectromechanical Systems**, v. 12, n. 5, p. 533-539, 2003.
- 8 MARUO, S.; H. INOUE,H. Optically driven micropump produced by three-dimensional two-photon microfabrication, **Applied Physics Letters**, v. 89, n. 14, p.144101, 2006.
- 9 LAFRATTA, C. N. et al. Soft-lithographic replication of 3D microstructures with closed loops. **Proceedings National Academy of Sciences**, v. 103, p 8589–8594, 2006.
- 10 DEUBEL, M. et al. Direct laser writing of three-dimensional photonic-crystal templates for telecommunications, **Nature Materials**. v 3, p 444–447, 2004.

-
- 11 GITTARD, S. D. et al. Fabrication of microscale medical devices by two-photon polymerization with multiple foci via a spatial light modulator. **Biomedical Optics Express**, v. 2, n.11, p. 3167-3178, 2011.
- 12 BÁRTOLO, P. **Stereolithography materials, processes and applications**: Leiria: Springer, 2011. 340p.
- 13 DORAISWAMY, A. et al. Two photon induced polymerization of organic-inorganic hybrid biomaterials for microstructured medical devices. **Acta Biomaterialia**, v. 2, p. 267-275, 2006.
- 14 OSTENDORF, A.; CHICHKOV, B. N. Two-photon polymerization: a new approach to micromachining. **Photonics Spectra**, v. 40, p. 72–79, 2006.
- 15 TAYALIA, P. et al. 3D Cell-Migration studies using two-photon engineered polymer scaffolds. **Advanced Materials**. v. 20, n.23, p. 4494-4498, 2008.
- 16 OTUKA, A. J. G. **Fabricação de microestruturas com múltiplas dopagens via fotopolimerização por absorção de dois fótons**. 2012. 113p. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.
- 17 FRANKEN, P. A. et al. Generation of optical harmonics. **Physical Review Letters**, v. 7, n.4, p. 118-&, 1961.
- 18 BOYD, R. W. **Nonlinear optics**. Boston: Academic Press, 2008.
- 19 PRASAD, P. N.; WILLIAMS, D. J. **Introduction to nonlinear optical effects in molecules and polymers**. New York: Wiley-Interscience, 1991.
- 20 BHAWALKAR, J. D. et al. Nonlinear multiphoton processes in organic and polymeric materials. **Reports on Progress in Physics**, v. 59, n. 9, p. 1041, 1996.
- 21 ORR, B. J.; WARD, J. F. Perturbation theory of the non-linear optical polarization of an isolated system. **Molecular Physics**, v. 20, n. 3, p. 513-526, 1971.
- 22 SHEN, Y. R. **The principles of nonlinear optics**. New York: John Wiley, 1984. 563p.

- 23 GÖPPERT-MAYER M. About elementary event with two quantal jumps. **Annals of Physics**, v.9, p. 273-294, 1931.
- 24 MASTERS, B. R. Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. **Annals of Physics**, v.9, p.273-294,1931.
- 25 KAISER W.; GARRET C. G. B. Two-photon excitation in CaF₂ - Eu²⁺. **Physical Review Letters**, v. 7, n. 6, p. 229-231, 1961.
- 26 BELFIELD, K. D. et al. Two-photon photochromism of an organic material for holographic recording. **Chemistry of Materials**, v. 14, n.9, p. 3663-3667, 2002.
- 27 DE BONI, L.; MISOGUTI. et al. Degenerate two-photon absorption spectra in azoaromatic compounds. **Chemphyschem**, v. 6, n.6, p. 1121-1125, 2005.
- 28 ATKINS, P. W. **Physical chemistry**. 5th ed. New York: W.H. Freeman, 1994.
- 29 HE, G. S. et al. New technique for degenerate two-photon absorption spectral measurements using femtosecond continuum generation. **Optics Express**, v. 10, n.13, p. 566-574, 2002.
- 30 CHEN, J. W, et al. Hyperbranched poly(phenylenesilolene)s: synthesis, thermal stability, electronic conjugation, optical power limiting, and cooling-enhanced light emission. **Macromolecules**, v. 36, n.12, p. 4319-4327, 2003.
- 31 LI, Z. et al. Synthesis of light emission from, and optical power limiting in soluble single-walled carbon nanotubes functionalized by disubstituted polyacetylenes. **Journal of Physical Chemistry**, v. 110, n.5, p. 2302-2309, 2006.
- 32 MOREL, Y. et al. Two-photon absorption and optical power limiting of bifluorene molecule. **Journal of Chemical Physics**, v. 114, n.12, p. 5391-5396, 2001.
- 33 SPANGLER, C. W. Recent development in the design of organic materials for optical power limiting. **Journal of Materials Chemistry**, v. 9, n.9, p. 2013-2020, 1999.
- 34 VESTBERG, R. et al. Dendron decorated platinum(II) acetylides for optical power limiting. **Macromolecules**, v. 39, n.6, p. 2238-2246, 2006.

- 35 SKALA, M. C. et al. Multiphoton microscopy of endogenous fluorescence differentiates normal, precancerous, and cancerous squamous epithelial tissues. **Cancer Research**, v. 65, n.4, p. 1180-1186, 2005.
- 36 OLIVEIRA, S. L. et al. Perylene derivatives with large two-photon-absorption crosssections for application in optical limiting and upconversion lasing. **Advanced Materials**, v. 17, n. 15, p. 1890-1893, 2005.
- 37 HE, G. S. et al. 2-Photon absorption and optical-limiting properties of novel organic-compounds. **Optics Letters**, v. 20, n. 5, p. 435-437, 1995.
- 38 KAWATA, S.; KAWATA, Y. Three-dimensional optical data storage using photochromic materials. **Chemical Reviews**, v. 100, n.5, p. 1777-1788, 2000.
- 39 MCPHAIL, D.; GU, M. Use of polarization sensitivity for three-dimensional optical data storage in polymer dispersed liquid crystals under two-photon illumination. **Applied Physics Letters**, v. 81, n.7, p. 1160-1162, 2002.
- 40 PUDAVAR, H. E. et al. High-density three-dimensional optical data storage in a stacked compact disk format with two-photon writing and single photon readout. **Applied Physics Letters**, v. 74, n. 9, p. 1338-1340, 1999.
- 41 MENDONCA, 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.
- 42 MAKAROV, N. S. **Ultrafast two-photon absorption in organic molecules: quantitative spectroscopy and applications**. 2010. PhD. Thesis (Physics) – Department of physics, State Montana . University, Bozeman, EUA, 2010.
- 43 SO, P. T. C. et al. Two-photon excitation fluorescence microscopy. **Annual Review of Biomedical Engineering** v. 2, p.399–429, 2000. doi: 10.1146/annurev.bioeng.2.1.399
- 44 MULLIGAN, S. J. Two-photon fluorescence microscopy: basic principles, advantages and risks. In: MÉNDEZ-VILAS, A.; DÍAZ, J. (Eds.) **Modern research and educational topics in microscopy**. Badajoz, Spain: Formatex. Research Center, 2007. p.881-889.

- 45 DENK, W. et al. 2-photon laser scanning fluorescence microscopy. **Science**, v. 248, n. 4951, p. 73-76, 1990.
- 46 HE, R. Y. et al. Surface plasmon-enhanced two-photon fluorescence microscopy for live cell membrane imaging. **Optics Express**, v. 17, n.8, p. 5987-5997, 2009.
- 47 MCCONNELL, G.; RIIS, E. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy using photonic crystal fiber. **Journal of Biomedical Optics**, v. 9, n.5, p. 922-927, 2004.
- 48 HE, G. S. et al. Multiphoton absorbing materials: molecular designs, characterizations, and applications. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 4, p. 1245-1330, 2008
- 49 TWO-PHOTON fluorescence imaging, Disponível em: <<http://phys.strath.ac.uk/postgrad/loP.php>>. Acesso em: maio/2011.
- 50 BABILAS, P., S. et al. Photodynamic therapy in dermatology - an update. **Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine**, v.21, n.3, p.142-149, 2005.
- 51 SEGALLA, A. et al. Photophysical, photochemical and antibacterial photosensitizing properties of a novel octacationic Zn(II)-phthalocyanine. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v.1, n.9, p.641-648. 2002.
- 52 DOUGHERTY, T. J. et al. Historical perspective. In: HENDERSON, B. W.; DOUGHERTY, T. J. (Ed.). **Photodynamic therapy**: basic principles and clinical applications. New York: M. Dekker, 1992. p. 1-18.
- 53 RAAB, O. Effect of fluorescent substances on Infusoria. **Zeitschrift Fur Biologie**, v.39, p.524-546. 1900.
- 54 BONNETT, R. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. **Chemical Society Reviews**, v.24, n.1, p.19-33. 1995.
- 55 OLEINICK, N. L. et al. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v.1, n.1, p.1-21. 2002.

- 56 MENDONÇA, C. R. **Desenvolvimento e aplicação da técnica de varredura-Z resolvida em frequência**. 1996. 117 p. Dissertação (Mestrado em Ciências)-Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1996.
- 57 HUANG, Z. A review of progress in clinical photodynamic therapy. **Technology in Cancer Research & Treatment**, v. 4, n.3, p. 283-293, 2005.
- 58 CORREA, D. S. et al. Two-photon polymerization for fabricating structures containing the biopolymer chitosan. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 9, n.10, p. 5845-5849, 2009.
- 59 CUMPSTON, B. H. et al. Two-photon polymerization initiators for three-dimensional optical data storage and microfabrication. **Nature**, v. 398, n.6722, p. 51-54, 1999.
- 60 MENDONÇA, C. R. et al. Reversible birefringence in microstructures fabricated by two-photon absorption polymerization. **Journal of Applied Physics**, v. 102, n.1, p. 013109-1, 2007.
- 61 KAWATA, S.; SUN, H. B.; TANAKA, T.; TAKADA, K. Finer features for functional microdevices - micromachines can be created with higher resolution using two-photon absorption. **Nature**, v. 412, n.6848, p. 697-698, 2001.
- 62 OSTENDORF, A.; CHICHKOV, B. N. Two-photon polymerization: a new approach to micromachining. **Photonics Spectra**, v. 1, n.1, p.220,2006.
- 63 GOMES, V. T. R. P. **Microfabricação por fotopolimerização via absorção de dois fótons**. 2009. 105p. Dissertação (Mestrado em Ciências)-Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.
- 64 CORRÊA, D. S. **Absorção de multi-fótons em polímeros e resinas poliméricas: espectroscopia não linear e microfabricação**. 2009. 175p. Tese (Doutorado em Ciências)-Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos, Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.
- 65 FONSECA, R. D. R. **Fabricação de microestruturas dopadas com nanofios de ZnO via fotopolimerização por absorção de dois fótons**. 2012. 98p. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

- 66 TRANSFORMATION and magnification by simple lenses. Disponível em: <http://www.cvimellesgriot.com/products/Documents/TechnicalGuide/Transformation_Magnification_by_Simple_Lenses.pdf>. Acesso em: 2011.
- 67 ZILIO, S. C. **Desenho e fabricação óptica**. São Carlos: Instituto de Física de São Carlos, 2006. 256 p. Apostila
- 68 CORREA, D. et al. Two-photon polymerization fabrication of doped microstructures. In: De SOUZA, A.(Ed.). **Polymerization**. Intech;2012 cap.15. Open access. Disponível em:< <http://www.intechopen.com/books/polymerization/two-photon-polymerization-fabrication-of-doped-microstructures>>. Acesso em: 08 out.2013.
- 69 BALDACCHINI, T. et al. Acrylic-based resin with favorable properties for three-dimensional two-photon polymerization. **Journal of Applied Physics**, v. 95, n.11, p. 6072-6076, 2004.
- 70 GOMES, V. T. R. P. **Microfabricação por fotopolimerização via absorção de dois fótons..** 2009. 105p. Dissertação (Mestrado em Ciências)-Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009
- 71 CORRÊA, D. S. **Absorção de multi-fótons em polímeros e resinas poliméricas:** espectroscopia não linear e microfabricação. 2009. 175p. Tese (Doutorado em Ciências)-Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.
- 72 FOUASSIER, J. P. **Photoinitiation, photopolymerization, and photocuring :** fundamentals and applications. Munich: Hanser/Gardner Publications, 1995. 275 p.
- 73 FOURKAS, J. T. MARUO, S, Recent progress in multiphoton microfabrication **Laser & Photonics Review**, v.2, n. 1-2, p. 100-111, 2008.
- 74 FLORY, P. J. **Principles of polymer chemistry**. Ithaca: Cornell University Press, 1953. 672p.
- 75 DEDAVID, B. et al. **Microscopia eletrônica varredura aplicações e preparação de amostras**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.
- 76 MALISKA. A. **Microscopia eletrônica de varredura**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2011. 97p. Apostila.

77 CARL ZEISS – Axio LSM 700 : confocal microscopy. Disponível em: < isu.technion.ac.il/ISU/SendFile.asp?DBID=1>. Acesso em: 09 out. 2013.

78 YOUNG, M. **Óptica e lasers – fibras e guias de ondas**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1998.

79 TOEROEK, P.; KAO, F. J. **Optical imaging and microscopy**: techniques and advanced systems. Berlin; New York: Springer, 2007.

80 MCF7 Disponível em: <<http://www.atcc.org/Products/All/HTB-22.aspx#85786B46AA23451B94BC5D45200673F7>>. Acesso em ; dez.2011.

81 LEVENSON, A. S.; JORDAN V. C. MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell lin. **Cancer Research**. v. 57, n. 17, p. 3071–3078, 1997.

82 THOMAZINE, T. B. **Influência de células epiteliais mamárias malignas na expressão gênica de células estromais originárias de linfonodo axilar comprometido ou não comprometido de pacientes com câncer de mama**. 2008. 149p. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

83 WHO. Disponível em: <[http:// www.who.int](http://www.who.int)>. Acesso em: dez.2011

84 HORTOBÁGYI, G. N. Anthracyclines in the treatment of cancer. **Drugs**,v.54, suppl.4,p.1-7,1997.

85 BOVEN, E. et al. Relationship between the tumour tissue pharmacokinetics and the antiproliferative effects of anthracyclines and their metabolites, **European Journal of Cancer**, v. 32A, p. 1382–1387, 1996.

86 DEL BUFALO, D. et al. Bcl-2 has differing effects on the sensitivity of breast cancer cells depending on the antineoplastic drug used, , **European Journal of Cancer**, v. 38, p. 2455– 2462, 2002.

87 WESIERSKA-GADEK, J. et al. Dual action of cyclindependent kinase inhibitors: induction of cell cycle arrest and apoptosis: a comparison of the effects exerted by roscovitine and cisplatin. **Polish Journal of Pharmacology**, v. 55, p. 895–902, 2003.

88 MYCEK, M. A.; POGUE. B. W. **Handbook of biomedical fluorescence**. New York: Marcel Dekker, 2003. 455p.