UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

ADRIANO JOSÉ GALVANI OTUKA

**Fabricação de microestruturas com múltiplas dopagens
via fotopolimerização por absorção de dois fótons**

São Carlos

2012

ADRIANO JOSÉ GALVANI OTUKA

**Fabricação de microestruturas com múltiplas dopagens
via fotopolimerização por absorção de dois fótons**

VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Ciência e Engenharia de Materiais, da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.

Área de Concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais.

Orientação: Prof. Dr. Cleber Renato Mendonça.

São Carlos

2012

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 preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

O89f Otuka, Adriano José Galvani
 Fabricação de microestruturas com múltiplas dopagens
 via fotopolimerização por absorção de dois fótons. /
 Adriano José Galvani Otuka; orientador Cleber Renato
 Mendonça. -- São Carlos, 2012.

 Dissertação (Mestrado-Programa de Pós-Graduação de
 Interunidades em Ciência e Engenharia de Materiais e
 Área de Concentração em Desenvolvimento, Caracterização e
 Aplicação de Materiais) - Instituto de Física de São
 Carlos - Instituto de Química de São Carlos - Escola de
 Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo,
 2012.

 1. Microestruturas poliméricas com múltiplas dopagens.
 2. Fotopolimerização. 3. Absorção de dois fótons. 4.
 Corantes fluorescentes. I. Título.

Este exemplar foi revisado e alterado em relação ao original seguindo as orientações da comissão julgadora, sob a exclusiva responsabilidade do autor.

São Carlos, março de 2012.

Adriano José Galvani Otuka

Aos meus pais, Terezinha Aparecida e Osvaldo Otuka, por todo o amor e dedicação, além de seus valiosos ensinamentos.

Aos meus avós Toninho e Dona Cida e também ao querido “Tio João”, pois sem vocês, nada disso teria acontecido...

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus por tudo que conquistei até aqui.

Agradeço em especial ao Prof. Dr. Cleber Renato Mendonça, por sua infinita paciência e dedicação durante a construção desse trabalho. Agradeço muito mais por sua amizade, compreensão, por seus valiosos ensinamentos e nossas construtivas conversas.

Ao Prof. Dr. Lino Misoguti, por estar sempre disposto a me ajudar. Agradeço seu enorme apoio no laboratório e principalmente por sua amizade.

Ao Prof. Dr. Sérgio Carlos Zilio, por suas opiniões e fundamentais ensinamentos, pela amizade e atenção durante esses anos de trabalho.

A Prof^a. Dr^a. Carla R. Fontana, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP – Araraquara. Agradeço, não só pela ajuda na realização dos testes biológicos feitos nesse trabalho, mas principalmente por sua paciência e dedicação.

Os agradecimentos para o Dr. Daniel Souza Corrêa e para o Vinicius Tribuzi são intermináveis! Obrigado pela paciência, dedicação, inúmeras contribuições e acima de tudo pela amizade.

Aos Doutores Leonardo de Boni e Marcos Roberto Cardoso. Agradeço pela amizade e pelas importantes discussões que tivemos durante esse tempo de mestrado.

Ao meu “mestre” André Romero por todo auxílio e paciência durante esse trabalho e também por sua amizade.

Ao Daniel Foschini, pela amizade e constante ajuda durante esse tempo todo.

Um agradecimento também especial para o pessoal do Grupo de Fotônica: Anderson, Caio, Renato, Gustavão, Nathália, Emerson, Regina, Marcelo Vivas, Jonathas, PH, Oriana, Ruben, Luís Felipe, Juliana e Bruno.

Agradeço em especial a FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo suporte financeiro durante esse trabalho – Processo FAPESP n° 2009/10897-2.

Agradeço também as outras agências de fomento CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico).

Ao serviço de Pós-graduação do Programa Interunidades em Ciência e Engenharia de Materiais, USP – São Carlos, em especial para o Vitor Barioto, por toda ajuda e paciência durante esses anos de trabalho.

Ao pessoal do serviço de gráfica do IFSC – USP – São Carlos, por toda ajuda durante esses anos.

A minha irmã Danielli pelo apoio incondicional mesmo que a distância!

A Josiani, por sua compreensão e carinho durante esses anos de convivência.

Por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente colaboraram com esse trabalho!

“Uma vida sem desafios não vale a pena ser vivida.”

Sócrates – Filósofo grego

RESUMO

OTUKA, A.J.G. **Fabricação de microestruturas com múltiplas dopagens via fotopolimerização por absorção de dois fótons.** 113p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação de Interunidades em Ciência e Engenharia de Materiais, Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

Microestruturas poliméricas dopadas despertam grande interesse nas áreas de óptica, fotônica e biologia, pois viabilizam a produção de dispositivos com propriedades específicas. Contudo, a dopagem de microestruturas com mais de um dopante é pouco explorada na literatura. Nesse contexto, o presente trabalho propõe o desenvolvimento de uma metodologia para fabricar microestruturas poliméricas com múltiplas dopagens, através de fotopolimerização por absorção de dois fótons. Esta técnica de microfabricação faz uso de um feixe laser pulsado (Ti:safira, 780 nm, 100 fs) que é focalizado, através de lentes de microscópio, no volume de uma resina polimérica contendo fotoiniciador – composto orgânico responsável por iniciar o processo de polimerização. A intensidade dos pulsos de femtossegundos é alta o bastante para que processos não lineares absorcivos, nesse caso absorção de dois fótons, ocorram apenas no volume focal, induzindo a polimerização apenas ao seu redor. Como dopantes utilizamos os corantes fluorescentes Rodamina e Fluoresceína. Para averiguar a eficácia do sistema de fabricação desenvolvido, produzimos estruturas com apenas um dopante, e as caracterizamos utilizando microscopia óptica e eletrônica. Microestruturas contendo mais de um dopante, em regiões distintas, foram produzidas através da fabricação sequencial de estruturas dopadas. Essa metodologia permite a produção de estruturas com dupla dopagem, as quais apresentam boa integridade estrutural e preservam as propriedades ópticas dos dopantes. Por fim, visando aplicações em biologia, empregamos a metodologia desenvolvida para fabricar microambientes dopados, em sítios específicos, com o antibiótico cloridrato de ciprofloxacino. Estudos iniciais do desenvolvimento da bactéria *Escherichia coli* nestes microambientes foram feitos, com o objetivo de demonstrar a viabilidade para este tipo de aplicação.

Palavras-Chave: Microestruturas poliméricas com múltiplas dopagens. Fotopolimerização. Absorção de dois fótons. Corantes fluorescentes.

ABSTRACT

OTUKA, A.J.G. **Fabrication of multi-doped microstructures by two-photon absorption photopolymerization.** 113p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação de Interunidades em Ciência e Engenharia de Materiais, Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

Doped microstructures have attracted interest in optics, photonics and biology, because they allow the production of devices with specific proprieties. However, doping microstructures with more than one dopant is not much exploited in the literature. In this work we demonstrate the development of a method to fabricate multi-doped microstructures by two-photon absorption polymerization. For the microfabrication we used a femtosecond laser (Ti:sapphire laser, 780 nm, 100 fs) that is focused, by a microscope objective, in the volume of a polymeric resin containing a photoinitiator – organic compound responsible to initiate the polymerization. The intensity of the femtosecond pulses is high enough to induced two-photon absorption, and consequently polymerization, only around the focal volume. As dopants we employed the fluorescent dyes Rhodamine and Fluorescein. In order to verify the microfabrication system, we have initially fabricated microstructures with only one dopant, which were characterized using optical and electron microscopies. Microstructures containing more than one dopant, in distinct regions, were produced by sequential fabrication of single doped structures. Such method allowed the fabrication of double doped structures, which presents good structural integrity and maintain the characteristic optical properties of the dyes. Finally, aiming at biological applications, we employed the developed method to fabricate micro-environments doped, in specific sites, with the antibiotics ciprofloxacin hydrochloride. Initial studies on the growth of the bacterium *Escherichia coli*, on such microstructures, were carried out to demonstrate the feasibility for such type of application.

Keywords: Multi-doped microstructures. Photopolymerization. Two-photon absorption. Fluorescents dyes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Microestruturas fabricadas via polimerização por absorção de dois fótons. (a) Micro-engrenagem (10); (b) Micro manipuladores (10); (c) Micro moinhos de ventos móveis (11).	25
Figura 1.2 – Microestruturas fabricadas via polimerização por absorção de dois fótons para aplicações diversas. (a) Micro-prismas (11); (b) Cristal Fotônico (11); (c) Micro-agulhas para entrega de fármacos (11); (d) Micro molde para estudar o processo de migração celular tridimensional (12).	26
Figura 2. 1 – Absorção de um e dois fótons (degenerada).....	31
Figura 2. 2 – Processo linear e por dois fótons. Confinamento espacial da excitação.	32
Figura 2.3 – Resposta óptica de um limitador óptico ideal. A intensidade transmitida é de 100% quando a intensidade de bombeio é menor que o limiar. No entanto, acima deste valor, a intensidade transmitida permanece constante, limitando a intensidade transmitida.....	33
Figura 2.4 – Comparação entre a fluorescência obtida em uma amostra (hipotética) de tecido neural utilizando microscopia confocal via absorção de um fóton (CLSM – <i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i>) e microscopia via absorção de dois fótons (TPLSM – <i>Two Photon Laser Scanning Microscopy</i>). O detalhe em vermelho na análise TPLSM evidencia a fluorescência apenas na região focal. Imagem retirada da Ref. (34).	35
Figura 2. 5 – Microestruturas fabricadas via polimerização por absorção de dois fótons. (a) Micro-touro (8); (b) Microescultura de Vênus (44); (c) Micro-dragão (11); (d) Elos interconectados (45).	37
Figura 3. 1 – Esquema simplificado do processo de microfabricação.....	39
Figura 3.2 – Distribuição da intensidade de luz no foco. As curvas A, B e C denotam, respectivamente intensidades menor, igual e maior que o limiar de polimerização (linha pontilhada) A2F. A curva C mostra uma intensidade que permite a obtenção de voxel com resolução abaixo do limite de difração.	40
Figura 3.3 – Montagem experimental utilizada no processo de fotopolimerização via absorção de dois fótons de resinas acrílicas.....	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.4 – (a) Vista geral do sistema utilizado para microfabricação via polimerização por dois fótons. (b) Detalhe interno do sistema.	42
Figura 3.5 – Cavidade do oscilador laser Ti: Safira.....	43
Figura 3.6 – Espectro do oscilador laser Ti:safira operando em modo pulsado.	43
Figura 3.7 – Laser de bombeio e o sistema oscilador.	44
Figura 3.8 – Detalhe do sistema oscilador. Em destaque, o cristal de Ti:safira.	44
Figura 3.9 – (a) Espelhos acoplados a motores galvanométricos. (b) Estágio de translação.	45
Figura 3.10 – Ilustração de lentes objetivas com diferentes aberturas numéricas.	47
Figura 3.11 – Diferentes aberturas numéricas e profundidade de campo.	47
Figura 3.12 – Posicionamento da lente objetiva no sistema de microfabricação.	49
Figura 3.13 – Amostra preparada para fotopolimerização.....	50
Figura 3.14 – Ilustração da metodologia de múltipla-dopagem das microestruturas.	51
Figura 3.15 – Monômeros SR-368 e SR-499.	52
Figura 3.16 – Fórmula estrutural do Lucirin TPO-L.	53
Figura 3.17 – Reação de criação de radicais livres, Tipo I e Tipo II.	54
Figura 3.18 – Espectro de absorção normalizado da resina sem corante. No detalhe uma resina preparada.	55
Figura 3.19 – Sistema de iluminação.	57
Figura 4.1 – Metodologia para fabricação de microestruturas com uma dopagem.	60
Figura 4.2 – Estrutura química da Rodamina 610	62
Figura 4.3 – Espectro de absorção da Rodamina 610 dissolvida em etanol (linha vermelha) e espectro de absorção de um filme fino produzido com resina dopada com Rodamina (linha roxa). No detalhe uma amostra da solução de Rodamina 610. Espectros de absorção normalizados.	62

Figura 4.4 – Espectro de emissão da Rodamina 610 dissolvida em etanol (linha vermelha) e espectro de emissão de um filme fino produzido com resina dopada com Rodamina (linha roxa). Espectros de emissão normalizados.	63
Figura 4.5 – Imagem de transmissão de microestruturas dopadas com Rodamina 610. ...	64
Figura 4.6 – Microestruturas dopadas com Rodamina 610. (a) Cascas cônicas. (b) Cone.	65
Figura 4.7 – Imagens confocal das estruturas dopada com Rodamina 610 (a) Cascas cônicas. (b) Cones.	66
Figura 4.8 – Microestrutura dopada com Rodamina (a) Imagem obtida no plano inferior da microestrutura. (b) Imagem obtida numa altura de 4 μ m da microestrutura. (c) Imagem obtida numa altura de 8 μ m da microestrutura. (d) Imagem obtida no plano superior da microestrutura - 16 μ m.	66
Figura 4.9 – Imagem fluorescência das microestruturas dopadas com Rodamina 610.	67
Figura 4.10 – Espectro de emissão normalizado das microestruturas dopadas com Rodamina 610, excitada com LED centrado em 470nm.	68
Figura 4.11 – Estrutura química da Fluoresceína Dissódica.	69
Figura 4.12 – Espectro de absorção da Fluoresceína Dissódica dissolvida em etanol. No detalhe uma foto da solução medida.	69
Figura 4.13 – Espectros de absorção normalizados de filmes finos de resina dopada com diferentes concentrações de Fluoresceína Dissódica. No detalhe evidenciamos a presença do dopante na matriz polimérica.	70
Figura 4.14 – Espectro de emissão normalizados da Fluoresceína Dissódica dissolvida em etanol (linha verde claro) e de um filme fino produzido com resina dopada com Fluoresceína Dissódica (linha verde escura).	71
Figura 4.15 – Imagem de microscopia óptica de transmissão de microestruturas dopadas com Fluoresceína Dissódica.	72
Figura 4.16 – Imagem de MEV de microestruturas dopadas com Fluoresceína Dissódica.	73
Figura 4.17 – Imagens confocal das estruturas paralelepípedicas dopadas com Fluoresceína Dissódica.	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.18 – Imagem fluorescência de microestruturas cilíndricas dopadas com Fluoresceína Dissódica.	74
Figura 4.19 – Espectro de emissão normalizado das microestruturas dopadas com Fluoresceína Dissódica, excitada com LED centrado em 470 nm.....	75
Figura 4.20 – Estrutura química do Estilbeno 420.	76
Figura 4.21 – Espectro de absorção Estilbeno 420 dissolvido em metanol. No detalhe uma foto da solução medida.	76
Figura 4.22 – Resina dopada com Estilbeno 420 dissolvido em metanol. Os detalhes evidenciam os aglomerados de corante.....	77
Figura 4.23 – Espectro de emissão de uma solução de Estilbeno 420 dissolvido em metanol (linha azul claro) e espectro de emissão de uma resina dopada com Estilbeno 420 (linha azul escuro).....	78
Figura 4.24 – Microestruturas dopadas com Estilbeno 420.....	79
Figura 4.25 – Imagem confocal das estruturas paralelepípedicas dopadas com Estilbeno 420.	79
Figura 5.1 – Metodologia para fabricação de microestruturas com múltiplas dopagens...	81
Figura 5.2 – Primeiro modelo para fabricar microestruturas com dupla dopagem. (a) Visualização lateral. (b) Visualização de topo. (c) Visualização tridimensional.	82
Figura 5.3 – Imagens de MEV de microestruturas com dupla dopagem. (a) Vista geral das microestruturas produzidas. (b) Detalhe de uma microestrutura.	83
Figura 5.4 – Imagem confocal de uma microestrutura com dupla dopagem. Semi-cones concêntricos.	84
Figura 5.5 – Microestruturas cilíndricas com dupla dopagem. (a) O foco está ajustado sobre os cilindros externos, contendo Fluoresceína Dissódica. (b) O foco está ajustado sobre os cilindros centrais, contendo Rodamina 610.....	85
Figura 5.6 – Imagem confocal de uma microestrutura cilíndrica com dupla dopagem.....	86
Figura 5.7 – Segundo modelo para fabricar microestruturas com dupla dopagem: estruturas retangulares.	86

Figura 5.8 – Imagem de MEV de microestruturas com dupla dopagem produzidas a partir do segundo modelo.	87
Figura 5.9 – Microestruturas produzidas com resina dopada com Rodamina e com resina pura.	87
Figura 5.10 – Imagem confocal de uma microestrutura paralelepipedica com dupla dopagem. As cores nesta imagem foram colocadas artificialmente, sendo que o amarelo refere-se a parte dopada com Fluoresceína enquanto a vermelha com Rodamina.	88
Figura 5.11 – Microestruturas dopadas com Fluoresceína Dissódica e Rodamina 610. (a) Imagem de transmitância da microestrutura (b) e (c) Excitação das microestruturas com banda centrada em 450nm. (d) Excitação das microestruturas com banda centrada em 550 nm.	89
Figura 5.12 – Espectro de emissão normalizado de microestruturas dopadas com Fluoresceína Dissódica e Rodamina 610	90
Figura 5.13 – Imagem de MEV de uma microestrutura em formato de anel.	91
Figura 5.14 – (a) Imagem de transmissão dos microanéis. (b) Fluorescência da microestrutura após excitação com LED centrado em 450 nm.	92
Figura 6.1 – <i>Escherichia coli</i> . Imagem retirada da Ref. (75).	93
Figura 6.2 – Fórmula estrutural da ciprofloxacina.....	94
Figura 6.3 – Placa onde as bactérias <i>E. coli</i> foram inoculadas em diferentes concentrações de cloridrato de ciprofloxacino.	95
Figura 6.4 – Absorbância das soluções de cloridrato de ciprofloxacino após as 24 horas de inoculação com a bactéria <i>E. coli</i> . O ponto em vermelho representa a absorbância obtida para na ausência de antibiótico.	96
Figura 6.5 – Microambiente para estudos biológicos.	97
Figura 6.6 – Imagem de MEV de microambientes para estudos biológicos.	98
Figura 6.7 – Microambientes produzidos para avaliar o desenvolvimento da bactéria <i>E. coli</i> . Os ambientes da parte superior não são dopados, enquanto os da parte inferior são dopados com cloridrato de ciprofloxacino.....	98
Figura 6.8 – Bactérias em microambiente (a) sem antibiótico e (b) dopado com antibiótico.	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 6.9 – Microambientes com específicas regiões dopadas. Os paralelepípedos são estruturas dopadas com cloridrato de ciprofloxacino.	100
Figura 6.10 – Bactérias em um microambiente sem nenhum dopante biológico após três horas de monitoramento.....	100
Figura 6.11 – Bactérias em um microambiente com uma região dopada com o antibiótico cloridrato de ciprofloxacino (paralelepípedo). Monitoramento após três horas de incubação.	101
Figura 6.12 – Matriz de microestruturas para investigação do desenvolvimento bacteriano. A região destacada representa a única microestrutura dopada com antibiótico cloridrato de ciprofloxacino existente na matriz.....	101
Figura 6.13 – Matriz de microestruturas após 24 horas monitoramento. Ao redor do cilindro dopado (centro) há inibição do desenvolvimento da bactéria <i>E. coli</i>	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 3. 1 – Abertura numérica e distância de trabalho das objetivas utilizadas.....	46
Tabela 4. 1 – Valores dos máximos de emissão e absorção dos compostos orgânicos fluorescentes a serem utilizados.....	60
Tabela 6. 1 – Concentrações utilizadas na determinação de CIM.	95

SUMÁRIO

Capítulo 1 Introdução.....	25
 Capítulo 2 Absorção de dois fótons (A2F): Contexto histórico, fundamentos teóricos e aplicações	29
2.1. Contexto histórico.....	29
2.2. Teoria fundamental da A2F	29
2.3. Aplicações envolvendo a absorção de dois fótons.....	32
2.3.1. Limitação óptica	33
2.3.2. Armazenamento óptico.....	34
2.3.3. Microscopia de fluorescência via absorção de dois fótons.....	34
2.3.4. Terapia fotodinâmica ou PDT	36
2.3.5. Microfabricação via fotopolimerização por absorção de dois fótons.....	37
 Capítulo 3 Microfabricação via fotopolimerização por absorção de dois fótons.....	39
3.1. Visão geral da fotopolimerização por absorção de dois fótons	39
3.2. Oscilador laser Ti:Safira	42
3.3. Espelhos e estágio de translação	45
3.4. Objetivas de microscópio.....	46
3.5. Preparação e posicionamento da amostra no sistema de microfabricação	50
3.6. Resinas poliméricas	51
3.6.1 Monômeros SR-368 e SR-499.....	52
3.6.2. Fotoiniciador Lucirin TPO-L.....	53
3.7. Preparação das resinas poliméricas.....	55
3.8. Programação para confecção das microestruturas	56
3.9. Acompanhamento em tempo real da microfabricação.....	56
 Capítulo 4 Fabricação de microestruturas dopadas.....	59
4.1. Dopagem das resinas poliméricas com corantes fluorescentes.....	59
4.2. Metodologia para fabricação das microestruturas com uma dopagem.....	60
4.3. Microestruturas dopadas com Rodamina 610.....	61
4.3.1. Rodamina 610.....	61

SUMÁRIO

4.3.2. Fabricação de microestruturas dopadas com Rodamina 610.....	64
4.4. Microestruturas dopadas com Fluoresceína Dissódica	68
4.4.1. Fluoresceína Dissódica	68
4.4.2. Fabricação de microestruturas dopadas com Fluoresceína Dissódica.....	72
4.5. Microestruturas dopadas com Estilbeno 420	75
4.5.1. Estilbeno 420	75
4.5.2. Fabricação de microestruturas dopadas com Estilbeno 420	78
 Capítulo 5 Microestruturas com múltiplas dopagens.....	81
5.1. Metodologia para fabricação de microestruturas com múltiplas dopagens	81
5.2. Fabricação de microestruturas com múltiplas dopagens	82
 Capítulo 6 Microestruturas dopadas com compostos biológicos.....	93
6.1. Determinação da CIM do antibiótico cloridrato de ciprofloxacino capaz de inibir o crescimento da bactéria <i>E. coli</i>	95
6.2. Fabricação dos microambientes e avaliação do crescimento bacteriano nessas estruturas	97
 Capítulo 7 Conclusões e perspectivas.....	103
 Referências.....	105
 Apêndice A Microscopia Confocal	111

Capítulo 1 Introdução

Microestruturas poliméricas são bastante exploradas tanto em pesquisas fundamentais quanto de potencial tecnológico. Nos últimos anos, diversas técnicas têm sido propostas para produzir microestruturas poliméricas visando à fabricação de microdispositivos. Entre as várias técnicas de fabricação, podemos citar a fotolitografia (1,2), a microfabricação por moldagem (3) e a ablação a laser (4,5). Entretanto, nos últimos anos, a *polimerização via absorção de dois fótons* vem se destacando como uma técnica bastante promissora para fabricação de microdispositivos, devido às inúmeras vantagens que esta propicia. Apresentada pela primeira vez na literatura em 1965 (6), a polimerização via absorção de dois fótons se destacou no meio científico quando foi proposta como uma tecnologia para microfabricação de dispositivos, devido à seletividade espacial na polimerização (7), possibilitando a confecção de estruturas tridimensionais sem limitação quanto à forma e a quantidade, permitindo ainda, partes móveis nas estruturas ou dispositivos.

Inicialmente, a técnica de polimerização via absorção de dois fótons foi empregada na confecção de estruturas micro e submicrométricas visando aplicações em microfluídica e microdispositivos mecânicos (8,9). Na Fig. 1.1, são apresentadas algumas microestruturas produzidas pela comunidade científica, para as aplicações anteriormente citadas.

Figura 1.1 – Microestruturas fabricadas via polimerização por absorção de dois fótons. (a) Micro-engrenagem (10); (b) Micro manipuladores (10); (c) Micro moinhos de ventos móveis (11).

A fabricação de microestruturas almejando aplicações em óptica, fotônica e até mesmo biomedicina, também vem sendo bastante explorada nas pesquisas tecnológicas. Na Fig. 1.2 apresentamos alguns exemplos de microestruturas confeccionadas via polimerização por absorção de dois fótons para diferentes aplicações em óptica, fotônica e biomedicina.

Figura 1.2 – Microestruturas fabricadas via polimerização por absorção de dois fótons para aplicações diversas. (a) Micro-prismas (11); (b) Cristal Fotônico (11); (c) Micro-agulhas para entrega de fármacos (11); (d) Micro molde para estudar o processo de migração celular tridimensional (12).

Nos últimos anos, a dopagem dessas microestruturas com compostos de interesse vem sendo investigada. Por exemplo, em óptica e fotônica, a dopagem dessas microestruturas é interessante para o desenvolvimento de dispositivos optoeletrônicos ou memórias ópticas (13,14). Essas estruturas possuem características específicas, e são confeccionadas de acordo com a necessidade de aplicação. Para aplicações biológicas, microestruturas dopadas com compostos biológicos têm sido usadas em estudos de engenharia de tecido e sistemas inteligentes para entrega de fármacos (15).

Apesar dos recentes avanços sobre as técnicas de dopagens, microestruturas dopadas com dois ou mais compostos de interesse ainda são pouco difundidas no meio científico. Microestruturas produzidas com mais de um dopante foram apresentadas na literatura pela primeira vez no trabalho de Žukauskas *et. al.*, no ano de 2010 (16). Neste trabalho, os autores doparam matrizes poliméricas com diferentes corantes orgânicos e investigaram a influência desses na produção das microestruturas.

Microestruturas com múltiplas dopagens podem ser interessantes para produção de dispositivos opticamente ativos, pois apresentarão fluorescência em diferentes comprimentos de onda. Do ponto de vista biológico, sistemas inteligentes para entrega de fármaco podem ser facilmente contaminados por agentes externos. Com a técnica de múltiplas dopagens, por exemplo, é possível confeccionar uma estrutura semelhante à apresentada na Fig. 1.2 (c), dopada com dois compostos distintos: um composto que evita a contaminação da estrutura (por exemplo, um composto antimicrobiano) e o outro, o fármaco de interesse.

Por se tratar de uma técnica bastante promissora e ainda pouco explorada na literatura, nesse trabalho desenvolvemos uma metodologia que viabiliza a fabricação de microestruturas com dois ou mais dopantes, possibilitando futuras aplicações em óptica, fotônica e biomedicina. Esse trabalho está organizado da seguinte forma: no Capítulo 2, fazemos uma breve fundamentação a respeito da absorção de dois fótons e suas aplicações. No Capítulo 3 damos ênfase a microfabricação via polimerização por absorção de dois fótons, descrevendo detalhadamente o sistema experimental utilizado. No Capítulo 4, apresentamos diferentes microestruturas produzidas com apenas uma dopagem, onde usamos como dopantes a Rodamina 610, a Fluoresceína Dissódica e o Estilbeno 420, corantes fluorescentes com propriedades ópticas bem conhecidas. Essa etapa do trabalho, além de servir para averiguação do sistema de microfabricação desenvolvido, permite explorar a técnica de dopagem das resinas. Ainda no quarto capítulo, fazemos a caracterização dos corantes em solução e das resinas dopadas, utilizando amostras macroscópicas. Com auxílio de técnicas microscópicas, investigamos a qualidade das estruturas produzidas, bem como a distribuição dos dopantes no interior das mesmas. No Capítulo 5, primeiramente, detalhamos a metodologia desenvolvida para fabricar as microestruturas com múltiplas dopagens. Em seguida apresentamos algumas estruturas com dupla dopagem produzidas via polimerização por absorção de dois fótons.

Essas estruturas também são caracterizadas através de técnicas de microscopia. No Capítulo 6, produzimos microambientes para estudos biológicos com dopagem em sítios específicos. Fundamentalmente, nossa intenção é usar microambientes dopados com o antibiótico cloridrato de ciprofloxacino para investigar o desenvolvimento da bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*). Esse antibiótico é um medicamento comumente utilizado no tratamento de infecções ocasionadas pela *E. coli*. Por fim, no Capítulo 7 tecemos algumas das conclusões deste trabalho, enunciando ainda nossas intenções para trabalhos futuros.

Capítulo 2 Absorção de dois fótons (A2F): Contexto histórico, fundamentos teóricos e aplicações

2.1. Contexto histórico

O fenômeno de absorção de dois fótons foi teoricamente proposto em 1931 (17), por Maria Göppert-Mayer, durante sua tese de doutorado na *Göttingen University*. Göppert-Mayer previu, a partir das teorias quânticas, que um átomo ou molécula poderia sofrer uma transição eletrônica através do processo de absorção de dois fótons (A2F). Seu argumento estava baseado na introdução do conceito de um estado intermediário virtual. Baseado neste conceito, Göppert-Mayer derivou uma expressão para a probabilidade de A2F que envolve a soma sobre todos os auto-estados do sistema atômico ou molecular. Observou que essa probabilidade era muito pequena para ser medida pela excitação com luz convencional (18). Devido à necessidade de alta intensidade para a observação do processo de A2F, este processo só pôde ser observado experimentalmente com o advento do laser. O primeiro trabalho experimental foi apresentado por Kaiser *et al.*, em 1961. Neste trabalho, eles reportaram a primeira observação experimental de fluorescência induzida via A2F em uma amostra de cristal de $\text{CaF}_2\text{:Eu}^{+2}$ (19).

2.2. Teoria fundamental da A2F

De maneira geral, a interação de sistemas moleculares com campos ópticos se dá de duas formas: através de processos *paramétricos* (onde energia e momento são trocados entre diferentes modos de vibração do campo eletromagnético, porém sem troca de energia entre a luz e as moléculas do meio) ou processos *dissipativos* (20,21,22) (onde o meio troca energia com a radiação incidente através da absorção e emissão de fótons).

Um material orgânico interagindo com uma fonte luminosa pode ser tratado no contexto de um dielétrico sob a ação de um campo elétrico (22). 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 (21,23), sendo expressa por (cgs):

$$\mathbf{P}_{ind}(E) = \chi^{(1)} E \quad (2.1)$$

onde $\chi^{(1)}$ é a susceptibilidade elétrica e está relacionada à constante dielétrica por:

$$\varepsilon = 1 + 4\pi\chi^{(1)} \quad (2.2)$$

No entanto, para visualizar efeitos ópticos *não lineares*, o campo elétrico da luz incidente deve ser considerado suficientemente alto (da ordem dos campos elétricos que mantêm os elétrons presos aos átomos – aproximadamente 10^{10} V/m). Neste caso, a polarização induzida no meio pode ser descrita como (24,25):

$$\mathbf{P}_{ind}(E) = \chi^{(1)} E + \chi^{(2)} E^2 + \chi^{(3)} E^3 + \dots + \chi^{(n)} E^n \quad (2.3)$$

onde $\chi^{(2)}$ é chamado de tensor de susceptibilidade de segunda ordem, $\chi^{(3)}$ o tensor de susceptibilidade de terceira ordem, $\chi^{(n)}$ o tensor de susceptibilidade de ordem n . O tensor $\chi^{(3)}$ está relacionado a efeitos não lineares de terceira ordem, como o índice de refração não linear e a absorção de dois fótons.

De maneira geral, quando exposto à luz de alta intensidade os materiais podem ser excitados por processos *multifotônicos*. Em um processo de absorção de dois fótons, dois fótons são absorvidos simultaneamente durante a transição entre níveis de energia, como ilustram os diagramas da Fig. 2.1.

Figura 2. 1 – Absorção de um e dois fótons (degenerada).

Um estado excitado pode ser populado pela absorção simultânea de dois fótons, cada um tendo metade da energia necessária para a transição, considerando-se o regime de absorção linear. Nesse caso, o processo é chamado de A2F degenerada. Quando esses fótons não têm a mesma energia, dizemos que se trata de um processo não degenerado. Adotaremos, por simplicidade, a aplicação do caso degenerado em nosso trabalho.

A secção de choque da A2F da maioria das moléculas é, em geral, da ordem de $10^{-50} \text{cm}^4 \cdot \text{s} \cdot \text{foton}^{-1}$ (definido como 1 GM em homenagem a Göppert-Mayer) (17). Dessa forma, a A2F é um fenômeno de baixa probabilidade que necessita de luz bastante intensa para que seja observado.

Em um processo de A2F, o coeficiente de absorção da amostra pode ser descrito por:

$$\alpha(I) = \alpha_0 + \beta I \quad (2.4)$$

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 um feixe gaussiano sendo focalizado sobre a amostra, teremos a intensidade variando com o inverso do quadrado da distância ao plano focal no eixo óptico (eixo z), como ilustra a Fig. 2.2.

Figura 2. 2 – Processo linear e por dois fótons. Confinamento espacial da excitação.

Usando a *Lei de Beer* (26), vemos que a taxa com que a intensidade varia é proporcional à intensidade ao quadrado:

$$\frac{dI}{dz} = -\alpha(I).I = -\beta I^2 \quad (2.5)$$

onde consideramos que a irradiação se dá com luz fora do espectro de absorção linear da amostra ($\alpha_0 = 0$). Desta forma, a excitação fica confinada ao longo do eixo z .

Em nosso trabalho, a excitação fica confinada não somente no eixo z , mas também no plano xy , uma vez que o feixe é focalizado no volume da amostra.

2.3. Aplicações envolvendo a absorção de dois fótons

Nessa seção, apresentamos sucintamente alguns exemplos de aplicações tecnológicas onde a absorção de dois fótons pode ser utilizada.

2.3.1. Limitação óptica

O estudo da limitação óptica é importante, por exemplo, para aplicações em sensores ópticos visando o bloqueio de luz intensa (24). Um limitador óptico ideal é aquele que é perfeitamente transparente em baixas intensidades luminosas, mas com intensidades elevadas, a partir de um limiar específico, a intensidade transmitida permanece constante, como ilustrado na Fig. 2.3.

Figura 2.3 – Resposta óptica de um limitador óptico ideal. A intensidade transmitida é de 100% quando a intensidade de bombeio é menor que o limiar. No entanto, acima deste valor, a intensidade transmitida permanece constante, limitando a intensidade transmitida.

A absorção de dois fótons para limitação óptica tem sido bastante estudada em semicondutores, mas seu estudo também tem sido realizado com moléculas que apresentam alta seção de choque de absorção de dois fótons (27,28). Neste caso, ao incidir luz de alta intensidade (acima do limiar) em um material não linear, este passa a absorver a luz devido ao processo de absorção de dois fótons, diminuindo a intensidade transmitida.

2.3.2. Armazenamento óptico

O primeiro experimento de armazenamento óptico 3D foi proposto em 1989 por Parthenopoulos e Rentzepis (14), no qual eles usaram um polímero dopado com um corante orgânico fotocromico e induziram uma mudança de propriedade no meio através de irradiação laser via absorção de dois fótons. O armazenamento óptico 3D visa à gravação de informações em um sólido volumétrico por meios ópticos modificando, por exemplo, as propriedades do meio através de irradiação de luz focalizada, permitindo ainda que a informação armazenada possa ser lida posteriormente. Por isso, a absorção de dois fótons é um processo interessante 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. Na literatura (29), já foram demonstradas quantidades de dados armazenados, via absorção de dois fótons, de aproximadamente 1000 Gb/cm³. Como principais mecanismos utilizados para armazenamento de dados 3D via absorção de dois fótons podemos citar as reações fotorefrativas e fotocromicas, além das reações de fotoablação e fotopolimerização (30).

2.3.3. Microscopia de fluorescência via absorção de dois fótons

A microscopia de fluorescência via absorção de dois fótons (31,32), proposta inicialmente nos anos 90 por Webb *et al.* (33), vem sendo largamente utilizada principalmente em estudos biológicos, pois permite análises não invasivas em 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 melhores resoluções. 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 (18). 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 (Fig. 2.4, retirada da Ref. (34)). 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.

Figura 2.4 – Comparação entre a fluorescência obtida em uma amostra (hipotética) de tecido neural utilizando microscopia confocal via absorção de um fóton (CLSM – *Confocal Laser Scanning Microscopy*) e microscopia via absorção de dois fótons (TPLSM – *Two Photon Laser Scanning Microscopy*). O detalhe em vermelho na análise TPLSM evidencia a fluorescência apenas na região focal. Imagem retirada da Ref. (34).

A Fig 2.4, retirada da Ref. (34), ilustra uma análise hipotética comparando a fluorescência obtida em uma amostra de tecido neural utilizando microscopia confocal via absorção de um fóton (CLSM – *Confocal Laser Scanning Microscopy*) e microscopia via absorção de dois fótons (TPLSM – *Two Photon Laser Scanning Microscopy*). A fluorescência da amostra na análise CLSM é gerada ao longo de toda a região excitada (Fig. 2.4, regiões verdes) enquanto que na TPLSM, fica confinada apenas na região focal

(Fig. 2.4, destaque em vermelho). O dano tecidual no neurônio ilustrado é menor na segunda técnica (TPLSM), devido à região de excitação ser menor (e local). Na técnica de CLSM, o dano à amostra pode atingir toda a área excitada.

2.3.4. Terapia fotodinâmica ou PDT

Terapia fotodinâmica ou PDT (do inglês *Photodynamic Therapy*) é um tratamento clínico que envolve a combinação de luz, oxigênio e um fotossensibilizador para o tratamento de diversas patologias, entre elas de caráter oncológico (36), cardiovascular (37), dermatológico (38) e microbiano (39). 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 (40). 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 micro-organismo *paramecium* (41). Esse fenômeno foi posteriormente denominado de *efeito fotodinâmico*. Em linhas gerais, um processo fotodinâmico ocorre quando um fotossensibilizador absorve luz (fótons) e é levado para o estado excitado, que na presença de oxigênio, causa a destruição da célula hospedeira (doente) (42,43). Na presença de oxigênio molecular, que se encontra em seu estado tripleto, pode ocorrer uma reação de aniquilação tripleto-tripletto com o fotossensibilizador (24). Isto faz com que ele retorne ao estado fundamental, gerando oxigênio singleto, o qual é altamente reativo e causa danos irreversíveis ao tecido vivo. Os fotossensibilizadores mais utilizados para a PDT, como por exemplo, as porfirinas, apresentam pico de absorção entorno de 400nm. Como o tecido humano apresenta uma grande absorção nesta região espectral, a profundidade de penetração da luz é baixa, e o tratamento torna-se pouco eficiente. Por isso, o ideal é utilizar frequências de excitação mais deslocadas para o infravermelho próximo, de 800 a 1100 nm, que é a janela espectral de transmissão do tecido humano (“janela terapêutica”). Estes comprimentos de onda podem ser utilizados para excitar os fotossensibilizadores através de absorção de dois fótons. Porém, é necessária a descoberta de moléculas que apresentem alta seção de choque de A2F, visando à utilização de intensidades de luz que não prejudiquem o tecido humano (24).

2.3.5. Microfabricação via fotopolimerização por absorção de dois fótons

A técnica de fabricação baseada na polimerização por absorção de dois fótons vem merecendo bastante destaque entre as diversas técnicas de microfabricação citadas no Capítulo 1, pois oferece um conjunto amplo de vantagens, entre as quais podemos citar: i) resolução abaixo de limite de difração, devido à dependência quadrática com a intensidade; ii) não há limitações à forma das estruturas tridimensionais fabricadas, iii) possibilita estruturar componentes com partes móveis e iv) possibilita a confecção de micro e nanoestruturas devido à alta seletividade espacial da absorção de dois fótons.

A título de ilustração, mostramos na Fig. 2.5 algumas microestruturas produzidas via polimerização por A2F (8,11,44,45), onde é possível observar o alto grau de complexidade das estruturas produzidas.

Figura 2. 5 – Microestruturas fabricadas via polimerização por absorção de dois fótons. (a) Micro-touro (8); (b) Microescultura de Vênus (44); (c) Micro-dragão (11); (d) Elos interconectados (45).

No Capítulo 3 abordamos em detalhes a técnica de polimerização via absorção de dois fótons, além do sistema experimental e dos materiais utilizados na fabricação das microestruturas.

Capítulo 3 Microfabricação via fotopolimerização por absorção de dois fótons

3.1. Visão geral da fotopolimerização por absorção de dois fótons

Na técnica de fotopolimerização via absorção de dois fótons, um feixe laser pulsado (femtosegundos) é focalizado, através de lentes de microscópio, no volume da resina polimérica (monômeros) contendo um fotoiniciador (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 a polimerização ocorra apenas no volume focal. O fotoiniciador da reação de polimerização é excitado via absorção de dois fótons. A taxa de excitação em um processo de A2F tem dependência quadrática com a intensidade de luz incidente, permitindo a localização espacial da excitação, o que leva a indução do processo de polimerização apenas no volume focal. Controlando a varredura do feixe, é possível a confecção de estruturas tridimensionais para determinadas aplicações tecnológicas.

Na microfabricação através da polimerização via A2F, utilizamos objetivas para atingir resoluções micro e sub-micrométricas, impondo um limite físico ao tamanho da cintura do feixe. Entretanto, este valor representa apenas o *limite de difração*, ou seja, o tamanho físico mínimo da cintura do feixe no foco. Porém, o limite de difração não impede que *voxels* (elementos tridimensionais) menores que este tamanho mínimo da

cintura do feixe possam ser polimerizados. O motivo está no fato deste processo ter um limiar de polimerização, a qual se inicia apenas se a intensidade atinge um valor mínimo. A Fig. 3.2 ilustra este fato, a qual mostra a distribuição da intensidade de luz no ponto focal para três níveis de intensidades diferentes. As curvas A, B e C na Fig. 3.2 denotam respectivamente intensidades menor, igual e maior que o limiar de polimerização (linha pontilhada) para A2F. A curva C mostra uma intensidade que permite a obtenção de voxel com resolução abaixo do limite de difração, uma vez que apenas a região central do perfil transversal terá intensidade suficiente para induzir a polimerização. Desta forma, a polimerização estará limitada a esta região, cuja dimensão é bastante inferior ao limite de difração.

Figura 3.2 – Distribuição da intensidade de luz no foco. As curvas A, B e C denotam, respectivamente, intensidades menor, igual e maior que o limiar de polimerização (linha pontilhada) A2F. A curva C mostra uma intensidade que permite a obtenção de voxel com resolução abaixo do limite de difração.

Na Fig. 3.3 ilustramos o esquema do sistema experimental utilizado para microfabricação das estruturas tridimensionais. O processo de fotopolimerização via absorção de dois fótons faz uso de um oscilador laser de Ti:safira (780 nm, 100 fs e taxa de repetição de 82 MHz), operando em modo pulsado (*mode-locking*), e um laser de bombeio (Verdi 5W – *Coherent* – 532 nm). Utilizamos também um sistema que move o feixe laser

no plano xy e a amostra perpendicularmente a este plano (direção z). O movimento no plano xy é feito através de espelhos galvanométricos. Para movimentar a amostra na direção z , perpendicular ao feixe de excitação, utilizamos um estágio de translação acionado por um motor de passos (*Thorlabs*). Todo o sistema é automatizado e controlado por computador. A amostra que será fotopolimerizada, preparada conforme a descrição na seção 3.5, é colocada sobre um suporte, permanecendo acima da objetiva. A polimerização pode ser observada em tempo real através da câmera CCD acoplada ao aparato experimental.

Figura 3.3 – Montagem experimental utilizada no processo de fotopolimerização via absorção de dois fótons de resinas acrílicas.

Tendo em vista que este trabalho propõe a fabricação de estruturas dopadas com distintos compostos, a maneira mais viável é a realizar a fabricação em partes. Para isso, é necessário um sistema mecânico/computacional que permite o re-posicionamento da amostra. Este sistema de posicionamento basicamente utiliza pontos fixos para posicionar a amostra, de acordo com o alinhamento inicial do sistema, garantindo assim a fabricação adequada em cada etapa do processo. Na Fig. 3.4 apresentamos fotos do sistema utilizado neste trabalho.

Para um melhor controle do processo de fabricação utilizamos uma potência de aproximadamente 50 mW e velocidades de varredura do feixe, controlada por *software* dedicado, entre 10 e 25 $\mu\text{m/s}$.

Figura 3.4 – (a) Vista geral do sistema utilizado para microfabricação via polimerização por dois fótons. (b) Detalhe interno do sistema.

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

3.2. Oscilador laser Ti:Safira

O oscilador laser de Ti:Safira pode operar tanto em modo contínuo (CW) quanto modo pulsado, *mode-locking* (travamento de modos). A Fig. 3.5 esquematiza a cavidade do sistema laser utilizada.

Figura 3.5 – Cavidade do oscilador laser Ti: Safira.

O laser de bombeio opera com potência média em torno de 4,5W, o que resulta em potência média de saída do laser de Ti:Safira na ordem de 400 mW. O oscilador laser de Ti:Safira opera a uma taxa de repetição de 82 MHz, com pulsos de duração em torno de 100 fs, com largura de banda espectral à meia altura de aproximadamente 50 nm (*largura à meia altura*) e banda centrada em 780 nm. A Fig. 3.6 mostra um espectro característico do laser quando opera em modo pulsado.

Figura 3.6 – Espectro do oscilador laser Ti:safira operando em modo pulsado.

A Fig. 3.7 mostra fotos do laser de bombeio e do oscilador de Ti:safira, utilizado na microfabricação via polimerização por absorção de dois fótons. A Fig. 3.8 destaca o cristal de Ti:safira dentro da cavidade do oscilador.

Figura 3.7 – Laser de bombeio e o sistema oscilador.

Figura 3.8 – Detalhe do sistema oscilador. Em destaque, o cristal de Ti:safira.

3.3. Espelhos e estágio de translação

Para controlar os dois espelhos acoplados a motores galvanométricos, Fig.3.9 (a), utilizamos uma placa de aquisição da *National Instruments*, programa através da plataforma *LabVIEW*. Cada espelho é movido de forma independente, e em direções perpendiculares (x e y). O movimento destes espelhos deflete o feixe laser antes que este incida sobre a objetiva. Contudo, esse movimento deve ser limitado, pois se existir uma deflexão muito grande, o feixe pode incidir fora da entrada da objetiva, interrompendo o processo de fabricação.

O estágio de translação, Fig. 3.9 (b), é movido através de um motor de passo. Ele move a amostra na direção z , dando a terceira dimensão para o processo de fabricação. Durante a movimentação da amostra, um obturador de feixe *shutter* pode ser acionado, evitando que a polimerização ocorra em regiões não desejadas.

Figura 3.9 – (a) Espelhos acoplados a motores galvanométricos. (b) Estágio de translação.

3.4. Objetivos de microscópio

Nesse trabalho utilizamos lente objetivas com aumento de 10× e 60×. A Tab. 3.1 apresenta os valores das aberturas numéricas das objetivas e suas respectivas distâncias de trabalho (*work distance* – w.d.).

Tabela 3. 1 – Abertura numérica e distância de trabalho das objetivas utilizadas.

<i>Aumento</i>	<i>Abertura Numérica</i>	<i>Distância de Trabalho (mm)</i>
10×	0.25	6
60×	0.85	1

As lentes objetivas são responsáveis pela focalização do feixe na resina e, portanto, são fatores determinantes na resolução espacial e na qualidade final das microestruturas fabricadas. Para microfabricação por absorção de dois fótons, algumas especificações destas objetivas são importantes, tais como: abertura numérica, distância de trabalho, profundidade de campo, entre outras.

A abertura numérica é um valor originalmente definido por Abbe (46,47) para objetivas de microscópio e é dada pela expressão:

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

onde n representa o índice de refração do meio entre a lente e o objeto, e θ o ângulo de abertura da lente. Esse valor é uma medida da habilidade da lente de captar luz. A Fig. 3.10 mostra algumas objetivas com diferentes aberturas numéricas.

Figura 3.10 – Ilustração de lentes objetivas com diferentes aberturas numéricas.

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 um feixe luz pode incidir sobre a lente e ainda assim ser refratado para o plano da imagem. As objetivas de menor abertura numérica permitem a confecção de estruturas com superfícies mais lisas, porém com menor resolução espacial.

A resolução de uma lente objetiva está associada à resolução lateral, no plano perpendicular ao eixo de propagação da luz (46). Entretanto, outro aspecto importante é o poder de resolução *axial* (longitudinal) da objetiva, a *profundidade de campo*. A Fig. 3.11 exemplifica diferentes aberturas numéricas e diferentes profundidades de campo.

Figura 3.11 – Diferentes aberturas numéricas e profundidade de campo.

A profundidade de campo é a espessura, no plano do objeto, que continua com sua imagem resolvida, ou seja, é a distância entre o plano mais próximo do objeto que está em foco até o plano mais distante que está simultaneamente em foco. Por outro lado, a profundidade de foco é a distância na qual o plano da imagem pode ser movido e ainda assim manter a imagem em foco.

A profundidade de campo (resolução axial), assim como a resolução lateral, é determinada apenas pela abertura numérica. A profundidade de foco é determinada pela NA e pela magnificação da objetiva. Sistemas com grandes aberturas numéricas têm menor profundidade de campo.

As objetivas utilizadas nesse trabalho são desenhadas com pequenas distâncias de trabalho, que é definida como a distância entre a parte frontal da lente até a superfície do objeto. A qualidade da estrutura produzida através da microfabricação por absorção de dois fótons é fortemente limitada pela objetiva utilizada, a qual determina o tamanho mínimo do elemento de volume polimerizado. É a sobreposição destes elementos de volume que, ao final do processo, produzem a estrutura com o formato desejado. O tamanho dos elementos de volume está diretamente relacionado com o tamanho da região focal que pode ser alcançada pelo sistema, dado pelo limite de difração, por sua vez, dependente da objetiva e do comprimento de onda da excitação.

Considerando o perfil de intensidade idealmente gaussiano, a imagem do feixe focalizado também segue um perfil gaussiano. Para um feixe gaussiano definimos o diâmetro desse feixe como sendo aquele para o qual a intensidade de luz cai para 13.5% do valor no centro (46) (razão de $1/e^2$). O raio da cintura de um feixe gaussiano no plano focal é dado aproximadamente por (46,47):

$$w_0 = \frac{\lambda f}{\pi w} \quad (3.2)$$

onde λ é o comprimento de onda do laser, f a distância focal da lente, e w o raio do feixe na entrada da lente. Se a NA obedece a Eq. 3.1, o foco do sistema óptico é dado por:

$$f = \frac{w}{NA} \sqrt{1 - NA^2} \quad (3.3)$$

Combinando as Eqs. 3.2 e 3.3, obtemos a expressão para o raio mínimo do feixe no plano focal:

$$w_0 = \frac{\lambda}{\pi NA} \sqrt{1 - NA^2} \quad (3.4)$$

É importante observar que a Eq. 3.4 não é necessariamente o menor tamanho da região fotopolimerizada, mas sim o menor tamanho da região focal da objetiva para a focalização de um feixe gaussiano. O menor elemento de volume polimerizado pode ser menor que o valor dado na Eq. 3.4, dependendo apenas da potência de limiar e da potência que está sendo utilizada na fabricação das microestruturas (Seção 3.1).

O posicionamento da lente objetiva no sistema de microfabricação é mostrado em detalhe na Fig. 3.12.

Figura 3.12 – Posicionamento da lente objetiva no sistema de microfabricação.

3.5. Preparação e posicionamento da amostra no sistema de microfabricação

A preparação das amostras que serão fotopolimerizadas via A2F é uma etapa relativamente simples. Inicialmente, devemos preparar o substrato onde as microestruturas ficarão fixadas após a polimerização. Esse substrato é chamado de substrato base. Para fazer o substrato base, cortamos uma lâmina de microscópio convencional em pequenos pedaços, com uma área útil de aproximadamente 1 cm². Após a finalização dos cortes, limpamos esses substratos com etanol puro e secamos com papel macio. Para eliminar possíveis resíduos, passamos sobre os substratos um leve jato de nitrogênio. Vale ressaltar que o procedimento de limpeza desse substrato deve ser bastante rigoroso, pois impurezas dificultarão as posteriores caracterizações. O substrato limpo é então posicionado sobre outra lâmina de microscópio inteira, também limpa com etanol. A fixação do substrato base sobre a outra lâmina é feita com fitas adesivas. Essas fitas adesivas são colocadas nas extremidades do substrato e servem também como espaçadores – a espessura dessas fitas delimitará a altura máxima das microestruturas. Nesse momento, é possível a colocação da resina polimérica sobre o substrato base. Para evitar que a resina se espalhe sobre o equipamento, cobrimos a região com o material a ser polimerizado com uma lamínula de vidro, e novamente fixamos os vidros com fitas adesivas. Um esquema da amostra preparada é apresentado na Fig. 3.13.

Figura 3.13 – Amostra preparada para fotopolimerização.

Devido às curtas distâncias de trabalho das objetivas, as amostras que serão fotopolimerizadas devem ser colocadas com a lamínula voltada para baixo, como ilustra a Fig. 3.14.

Figura 3.14 – Ilustração da metodologia de múltipla-dopagem das microestruturas.

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 no mesmo. Estruturas que não estão perfeitamente aderidas ao substrato base são perdidas durante o processo de lavagem.

3.6. Resinas poliméricas

As resinas poliméricas que serão utilizadas na fabricação das microestruturas são preparadas a partir de três componentes principais: dois *monômeros acrílicos* (48) e um *fotoiniciador* (49). Essas resinas podem ser posteriormente dopadas com corantes fluorescentes, de acordo com o interesse. Para produção de microdispositivos, geralmente é necessário à combinação de propriedades físicas e químicas dos componentes que o compõem (48-52). Nessa seção, vamos discutir sobre as propriedades dos monômeros e do fotoiniciador que utilizamos.

3.6.1 Monômeros SR-368 e SR-499

Os dois monômeros utilizados na preparação da resina são: *etoxilated(6)trimethylolpropane triacrylate* (vendido comercialmente como “SR-499”) e *tris(2-hydroxy ethyl)isocyanurate triacrylate* (vendido comercialmente como “SR-368”), ambos disponíveis comercialmente pela empresa *Sartomer*. A Fig. 3.15 ilustra a estrutura molecular dos monômeros utilizados no preparo das resinas:

Figura 3.15 – Monômeros SR-368 e SR-499.

As microestruturas que fabricaremos devem ser suficientemente rígidas para manterem sua geometria tridimensional e resistir ao processo de lavagem (feito para remover o material não polimerizado). É conhecido na literatura que o aumento no número de grupos funcionais do monômero acelera a reação de polimerização e aumenta a dureza final do polímero (48). Contudo, nesses casos, as taxas de conversão dos monômeros são consideradas baixas. Os monômeros triacrilatos que utilizamos equilibram a densidade de entrelaçamentos (associada à dureza) e a taxa de conversão total do polímero final. A estrutura cíclica (anel aromático) do monômero SR-368 fornece

rigidez ao polímero, enquanto os grupos etoxilados no monômero SR-499 diminuem o encolhimento que ocorre durante o processo de polimerização, preservando a estrutura da microestrutura produzida, evitando assim, que o material se torne quebradiço (48).

3.6.2. Fotoiniciador Lucirin TPO-L

Como fotoiniciador, utilizamos o *2,4,6-trimetilbenzoiletoxifenil phosphine oxide*, vendido comercialmente como “Lucirin TPO-L”. A Fig. 3.16 ilustra a estrutura molecular do fotoiniciador utilizado.

Figura 3.16 – Fórmula estrutural do Lucirin TPO-L.

O fotoiniciador, quando excitado, é o componente responsável por iniciar a reação de polimerização. Existem dois mecanismos diferentes através dos quais o fotoiniciador pode desencadear a reação de polimerização ao ser excitado (53):

- i) Polimerização por radicais livres e
- ii) Polimerização catiônica.

O fotoiniciador Lucirin TPO-L desencadeia a polimerização por radicais livres. As espécies ativas na polimerização por radicais livres são neutras. Como consequência, suas propriedades de adição com os monômeros não são influenciadas pela polaridade do monômero nem do solvente. O único fator que pode limitar a atuação dos radicais livres é algum impedimento volumétrico.

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 que sofrem reação *unimolecular* e Tipo II – quando os fotoiniciadores que sofrem uma reação *bimolecular* com um co-iniciador para criar radicais. Nesses iniciadores, uma ligação se quebra *homoliticamente*, depois da excitação, para formar dois radicais onde pelo menos um destes irá iniciar a reação de polimerização (54). As reações são apresentadas na Fig. 3.17:

Figura 3.17 – 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 (53): *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.

Em geral, os fotoiniciadores são fortemente inibidos pela presença de oxigênio molecular. Esta propriedade é uma interessante vantagem no processo de fotopolimerização por absorção de dois fótons (FA2F). O oxigênio contribui para a

existência de uma intensidade limiar abaixo da qual a fabricação não ocorre (8). É a presença desse limiar que permite a quebra do limite de difração, tornando possível a fabricação de estruturas com resolução sub-micrométrica.

3.7. Preparação das resinas poliméricas

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% (geralmente chamado de 3% em excesso). 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. Para facilitar a homogeneidade da solução, adicionamos etanol junto aos materiais durante o período de agitação. Após a solução estar homogênea, ela é colocada em uma placa de Petri, também em ambiente sem luz, para que o solvente evapore totalmente, por um período de até 48 horas. Após a evaporação do solvente, obtemos um líquido viscoso, levemente amarelado. Na Fig. 3.18 apresentamos o espectro de absorção desse material, e no detalhe mostramos o aspecto visual da resina preparada sem corante.

Figura 3.18 – Espectro de absorção normalizado da resina sem corante. No detalhe uma resina preparada.

3.8. Programação para confecção das microestruturas

A programação para confecção das estruturas tridimensionais foi feita utilizando a plataforma *LabVIEW*. Buscamos a programação de estruturas relativamente simples como, por exemplo, paralelepípedos, cilindros (ocos ou maciços) e cones, uma vez que o objetivo maior deste trabalho é demonstrar a fabricação de estruturas com duas ou mais dopagens.

Em geral, o que fazemos na programação é desenvolver rotinas sequenciais que controlam os motores galvanométricos, responsáveis pelo movimento dos espelhos e, conseqüentemente, o movimento do feixe laser na amostra. O estágio de translação, a abertura e o fechamento do obturador também são controlados via *software*. A dificuldade maior está em fazer a parte da estrutura no plano xy . Por exemplo, para produzir uma estrutura cúbica, a base dessa estrutura é produzida fotopolimerizando algumas linhas paralelas, uma ao lado da outra, até obtermos o tamanho desejado. Vencida essa etapa, basta deslocar a amostra no eixo z , reposicionar o feixe (também com auxílio do *software*) e repetir o procedimento anterior.

3.9. Acompanhamento em tempo real da microfabricação

O processo de polimerização pode ser acompanhado em tempo real utilizando um sistema de captura de imagem, através de uma fonte de iluminação a LED e uma câmera CCD. A fonte de iluminação possui intensidade ajustável e é direcionada em sentido oposto à propagação do laser. Cabe ressaltar que o LED utilizado emite na região do vermelho (~ 650 nm), de forma que ele não induz a excitação do fotoiniciador. Em geral, o sistema de iluminação fica a maior parte do tempo desligado, porém, na hora do alinhamento da amostra, este é fundamental. A Fig. 3.19 mostra o sistema de iluminação.

Figura 3.19 – Sistema de iluminação.

Essa luz incide sobre um divisor de feixe, localizado depois da objetiva, 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.

Capítulo 4 Fabricação de microestruturas dopadas

Para averiguar o sistema experimental, bem como a metodologia desenvolvida para dopar as resinas poliméricas, inicialmente produzimos estruturas dopadas com apenas um corante fluorescente. Antes de iniciarmos a fabricação das microestruturas, realizamos a caracterização dos corantes e também de amostras macroscópicas das resinas dopadas. As amostras macroscópicas eram filmes finos produzidos com as resinas dopadas, fotopolimerizados utilizando luz UV. As microestruturas aqui confeccionadas foram caracterizadas utilizando técnicas de microscopia. Utilizamos a microscopia eletrônica de varredura (MEV) para verificar a integridade estrutural das microestruturas após a lavagem. Microestruturas dopadas também foram caracterizadas com microscopia de transmitância e fluorescência. A distribuição dos corantes no interior das microestruturas foi analisada com auxílio da microscopia confocal. Nesse capítulo, apresentaremos brevemente a técnica de dopagem das resinas e a metodologia para fabricação das microestruturas. Por fim, discutiremos os resultados das caracterizações dos corantes, das resinas e das microestruturas confeccionadas.

4.1. Dopagem das resinas poliméricas com corantes fluorescentes

Nesse trabalho, optamos por utilizar os seguintes corantes fluorescentes: Rodamina 610, Fluoresceína Dissódica e Estilbeno 420. Esses corantes são comercialmente vendidos, na forma de pó, pela empresa Exciton. A Tab. 4.1 mostra os valores dos máximos de absorção e emissão dos corantes orgânicos utilizados, em solução nos solventes citados na última coluna. Cabe dizer, que os valores apresentados na Tab. 4.1 são dados fornecidos pelo fabricante.

Tabela 4.1 – Valores dos máximos de emissão e absorção dos compostos orgânicos fluorescentes a serem utilizados.

<i>Composto</i>	$\lambda_{abs} (nm)$	$\lambda_{fluor}(nm)$	<i>Solvente</i>
Estilbeno 420	350	425	Metanol
Fluoresceína Dissódica	500	530	Etanol
Rodamina 610	550	580	Etanol

Em geral, os corantes são adicionados aos solventes e ficam em agitação por aproximadamente 1 hora. Finalizada a dissolução dos corantes, o líquido obtido é adicionado a uma resina pura e novamente fica em agitação constante por um período de mais 1 hora. Após essa etapa, deixamos o solvente evaporar em ambiente escuro por até 48 horas. A concentração dos corantes junto à resina pura pode variar de 0,5 – 5,0% em massa de resina.

4.2. Metodologia para fabricação das microestruturas com uma dopagem

A fabricação das microestruturas, sejam elas puras ou dopadas, é sempre feita em etapas. A Fig. 4.1 ilustra simplificada, os passos mais importantes do processo de microfabricação:

Figura 4.1 – Metodologia para fabricação de microestruturas com uma dopagem.

Após um cuidadoso alinhamento do feixe laser no sistema experimental, além do ajuste do foco da objetiva no substrato base, escolhemos a estrutura 3D a ser fotopolimerizada e iniciamos a microfabricação (Fig. 4.1 i). Após fabricarmos a primeira estrutura, o posicionamento da amostra para fabricar as estruturas seguintes é feito manualmente, utilizando os dois micrômetros acoplados no suporte da objetiva. É importante dizer que esse novo posicionamento é feito também com o obturador fechado, com intuito de evitar uma polimerização indevida na amostra. Produzida a quantidade desejada de estruturas, desligamos o laser (Fig. 4.1 ii) e retiramos a amostra do aparato experimental. O substrato contendo as estruturas fabricadas é então imerso em uma placa de Petri contendo etanol puro para remover a resina não fotopolimerizada (Fig. 4.1 iii). As estruturas ficam em geral de 10 a 20 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. 4.1 iv). É importante ressaltar que não existem restrições sobre a quantidade de estruturas que podem ser produzidas em um mesmo substrato base.

4.3. Microestruturas dopadas com Rodamina 610

4.3.1. Rodamina 610

A Rodamina 610, conhecida também como *N*-[9-(2-carboxifenil)-6-(dietilamino)-3*H*-xanteno-3-ilidina]-*N*-etil-etanamina perclorato ou simplesmente Rodamina B, é um composto vastamente aplicado como meio ativo para lasers e tem suas propriedades de fluorescência muito bem conhecidas (55,56). A Fig. 4.2 mostra a estrutura química da Rodamina 610:

Figura 4.2 – Estrutura química da Rodamina 610

Quando dissolvida em etanol, obtemos uma solução rosada bastante intensa, conforme pode ser observado no detalhe da Fig. 4.3. Para caracterizar a solução e a amostra macroscópica feita com a resina dopada, coletamos os espectros de absorção e de fluorescência dessas amostras. A Fig. 4.3 mostra o espectro de absorção normalizado da solução de Rodamina dissolvida em etanol (linha vermelha) e o espectro de absorção, também normalizado, do filme fino feito de resina dopada (linha roxa).

Figura 4.3 – Espectro de absorção da Rodamina 610 dissolvida em etanol (linha vermelha) e espectro de absorção de um filme fino produzido com resina dopada com Rodamina (linha roxa). No detalhe uma amostra da solução de Rodamina 610. Espectros de absorção normalizados.

A concentração da solução de Rodamina 610 em etanol é de aproximadamente 0.067 mg/mL, enquanto que a concentração do corante junto à resina é de 5% em massa de resina. Analisando a Fig. 4.3, vemos que o máximo de absorção da solução de Rodamina (linha vermelha) é em torno de 550 nm, de acordo com as informações do fabricante. É interessante notar que quando o corante está agregado a matriz polimérica (linha roxa), o máximo de absorção se desloca para direita, sendo de aproximadamente 570 nm. Notemos ainda que é possível identificar apenas a absorção proveniente da resina, ou seja, o pico de absorção em 380 nm é muito semelhante ao mostrado no Capítulo 3 (Fig. 3.18), quando apresentamos o espectro de absorção normalizado da resina pura.

Na Fig. 4.4 mostramos os espectros de emissão normalizados da solução de Rodamina dissolvida em etanol (linha vermelha) e da amostra de resina macroscópica (linha roxa).

Figura 4.4 – Espectro de emissão da Rodamina 610 dissolvida em etanol (linha vermelha) e espectro de emissão de um filme fino produzido com resina dopada com Rodamina (linha roxa). Espectros de emissão normalizados.

Observado a Fig. 4.4, vemos que o máximo de emissão da solução de Rodamina (linha vermelha) também confere com as informações do fabricante, sendo em torno de 580 nm. Vemos que o máximo de emissão da amostra macroscópica (linha roxa) também se desloca para maiores comprimentos de onda, quando comparado com o espectro de emissão da solução. Esse deslocamento se deve a agregação e concentração do dopante na matriz polimérica. Por exemplo, o máximo de emissão da resina dopada com 0.5% em massa de Rodamina é aproximadamente 580 nm, enquanto que na resina dopada com 5.0% do corante, esse pico se desloca para 600 nm (Fig. 4.4 – linha roxa).

4.3.2. Fabricação de microestruturas dopadas com Rodamina 610

As resinas dopadas com Rodamina 610 foram facilmente polimerizadas. As microestruturas apresentadas nessa seção foram produzidas com resinas feitas na proporção de 50% – 50% dos monômeros SR-368 e SR-499 e com 3% do fotoiniciador Lucirin TPO-L. A título de ilustração, na Fig. 4.5 mostramos uma imagem de microscopia óptica por transmissão de algumas microestruturas dopadas com Rodamina 610. Essas estruturas foram fabricadas utilizando uma objetiva de abertura numérica igual a 0.25.

Figura 4.5 – Imagem de transmissão de microestruturas dopadas com Rodamina 610.

Utilizando a microscopia eletrônica de varredura (MEV), foi possível verificar a integridade estruturas das microestruturas produzidas. Na Fig. 4.6 mostramos outras estruturas produzidas, também com objetiva de abertura numérica igual 0.25. A potência utilizada na fotopolimerização dessas microestruturas é de aproximadamente 50 mW, com velocidade de varredura do feixe laser por volta de $17 \mu\text{m/s}$.

Figura 4.6 – Microestruturas dopadas com Rodamina 610. (a) Cascas cônicas. (b) Cone.

As microestruturas apresentadas na Fig. 4.6 mantiveram suas características estruturais mesmo após a lavagem. Nas cascas cônicas, Fig. 4.6 (a), o interior das estruturas apresenta-se bastante límpido, mostrando que o procedimento de lavagem é eficiente para remover a resina não polimerizada inclusive no interior da microestrutura. O cone apresentado na Fig. 4.6 (b) possui altura aproximada de $40 \mu\text{m}$ e o seu pico tem diâmetro aproximadamente $6 \mu\text{m}$.

Para investigar se a distribuição do corante no interior das microestruturas é uniforme, realizamos análises utilizando microscopia confocal de fluorescência. Detalhes adicionais sobre a técnica de microscopia confocal são abordados no Apêndice A. Na Fig. 4.7 mostramos algumas imagens de microscopia confocal das estruturas dopadas com Rodamina 610.

Figura 4.7 – Imagens confocal das estruturas dopada com Rodamina 610 (a) Cascas cônicas. (b) Cones.

Através dos resultados de microscopia confocal foi possível verificar que a Rodamina 610 fica distribuída uniformemente pelo interior das microestruturas, independente do formato das mesmas. Esse resultado esta de acordo com outros obtidos para microestruturas dopadas com polímeros eletroluminescentes (MEH-PPV : *poly* (2-methoxy-5-(2'-ethylhexyloxy)-1,4-phenylenevinylene) (57).

Utilizando a técnica *Z-stack*, que consiste na obtenção de várias imagens em diferentes planos, também podemos confirmar a distribuição do dopante pela estrutura. Na Fig. 4.9 apresentamos imagens de fluorescência em diferentes planos das microestruturas, onde observamos uma distribuição relativamente homogênea do corante no interior das mesmas. Ainda na Fig. 4.9, a altura das microestruturas é de 16μm.

Figura 4. 8 – Microestrutura dopada com Rodamina (a) Imagem obtida no plano inferior da microestrutura. (b) Imagem obtida numa altura de 4μm da microestrutura. (c) Imagem obtida numa altura de 8μm da microestrutura. (d) Imagem obtida no plano superior da microestrutura - 16μm.

Uma imagem de fluorescência das microestruturas produzidas com Rodamina 610 é apresentada na Fig. 4.9.

Figura 4.9 – Imagem fluorescência das microestruturas dopadas com Rodamina 610.

O espectro de emissão das microestruturas foi coletado utilizando um sistema desenvolvido em nosso laboratório. Esse sistema faz uso de um microscópio óptico com duas oculares, um LED de excitação, uma fibra óptica, um espectrofotômetro operando na faixa de 350 – 1200 nm e um microcomputador. No lugar de uma das oculares do microscópio, colocamos o LED de excitação. Em geral, utilizamos um LED azul, centrado em 470 nm. Através da outra ocular focalizamos as microestruturas. Uma vez feita a focalização, substituímos essa ocular pela fibra óptica, acoplada ao espectrofotômetro. Quando ligamos o LED, as microestruturas começam a emitir em seu comprimento de onda correspondente e podemos captar esse sinal através da fibra. Esse LED de excitação pode ser facilmente substituído por um laser com banda centrada em 325 nm, porém nesse caso, a excitação é feita pela lateral na base da amostra. O espectro característico pode ser acompanhado em tempo real, através de um *software* dedicado. A Fig. 4.10 mostra o espectro de emissão das estruturas dopadas com Rodamina 610.

Figura 4.10 – Espectro de emissão normalizado das microestruturas dopadas com Rodamina 610, excitada com LED centrado em 470nm.

Comparando esse espectro de emissão (Fig. 4.10) com o espectro apresentado na Fig. 4.4 (linha roxa), podemos ver que os máximos de absorção das microestruturas e da macroestrutura (filme fino) são muito próximos, estando em torno de 600 nm. Esse resultado é bastante interessante, pois mostra que a ação do laser durante a fotopolimerização não degrada a resina nem o corante, mantendo suas características inalteradas mesmo após o procedimento de fabricação.

4.4. Microestruturas dopadas com Fluoresceína Dissódica

4.4.1. Fluoresceína Dissódica

A Fluoresceína Dissódica ou ainda *3',6'-dihidroxi-spiro[isobenzofurano-1(3H),9'-[9H]xanteno]-3-one*, também tem suas propriedades ópticas bem conhecidas. Em geral, compostos a base de Fluoresceína são utilizados como sinalizadores de sistemas biológicos como, por exemplo, para marcar estruturas utilizadas em pesquisas sobre o

desenvolvimento celular ou biosensores, sem prejudicar o agente vivo (58,59). Na Fig. 4.11 apresentamos a estrutura química do corante em questão:

Figura 4.11 – Estrutura química da Fluoresceína Dissódica.

A fluoresceína dissódica dissolvida em etanol é fortemente amarelada, como pode ser visto no detalhe da Fig. 4.12. Novamente fizemos a caracterização do corante em solução e na resina dopada. Na Fig. 4.12 apresentamos o espectro de absorção normalizado da Fluoresceína Dissódica em solução.

Figura 4.12 – Espectro de absorção da Fluoresceína Dissódica dissolvida em etanol. No detalhe uma foto da solução medida.

A concentração da solução de Fluoresceína Dissódica em etanol é de aproximadamente 0.13 mg/mL. O máximo de absorção da solução de Fluoresceína (Fig. 4.12) é em torno de 503 nm, estando coerente com as informações do fabricante ($\lambda_{abs} = 500$ nm).

A Fig. 4.13 mostra alguns espectros de absorção normalizados de filmes finos feitos com resinas dopadas com Fluoresceína. Inicialmente fizemos um filme fino de resina dopada com Fluoresceína, em uma concentração de 0.5% em massa, conforme o procedimento realizado para Rodamina 610. No entanto, observamos que o sinal da absorção desse filme (Fig. 4.13 – linha verde claro) estava na ordem do ruído do aparelho. Sendo assim, não poderíamos garantir a presença do corante na matriz polimérica. Fizemos então mais filmes finos variando a concentração em massa do dopante em até 5%. Com concentrações superiores de dopante, as resinas não ficavam homogêneas. Mesmo com uma alta concentração de Fluoresceína Dissódica, o sinal obtido no espectro de absorção, associado à presença do corante, era muito baixo. No detalhe da Fig. 4.13 evidenciamos a presença do corante agregado na matriz da resina.

Figura 4.13 – Espectros de absorção normalizados de filmes finos de resina dopada com diferentes concentrações de Fluoresceína Dissódica. No detalhe evidenciamos a presença do dopante na matriz polimérica.

Ainda analisando a Fig. 4.13, podemos novamente ver um pico de absorção semelhante ao da resina pura, em torno de 380 nm (Capítulo 3, Fig. 3.18). É importante observar que o máximo de absorção da resina dopada com Fluoresceína Dissódica é bem deslocado para o azul, quando comparado com o máximo de absorção da solução do corante em etanol (Fig. 4.12). Agregado a matriz polimérica, o corante tem seu pico de absorção máximo em aproximadamente 455 nm, sendo que em solução de etanol, esse valor corresponde a 503 nm. Uma possível explicação para essa diferença pode estar relacionada a uma forte interação entre o corante e a matriz polimérica, ou mesmo a agregação do corante na estrutura polimérica. Contudo, essas afirmações são apenas hipóteses, sendo necessários estudos mais elaborados sobre o assunto.

Na Fig. 4.14 apresentamos os espectros de emissão normalizados da solução de Fluoresceína em etanol e do filme fino dopado com 5% do corante.

Figura 4.14 – Espectro de emissão normalizados da Fluoresceína Dissódica dissolvida em etanol (linha verde claro) e de um filme fino produzido com resina dopada com Fluoresceína Dissódica (linha verde escura).

Na Fig. 4.14, vemos que o máximo de emissão da solução de Fluoresceína (linha verde claro) está em torno de 575 nm. Esse valor é diferente do fornecido pelo fabricante (aproximadamente 530 nm). A diferença entre os valores aqui obtidos e os encontrados na literatura também pode estar associada às diferentes concentrações do corante nas soluções. O espectro de emissão da resina dopada, Fig. 4.14 linha verde escura, tem seu máximo em torno de 535 nm. Vemos então que o máximo de emissão da amostra macroscópica (linha verde escura) também se desloca para o azul, em comparação com o espectro de emissão da solução.

4.4.2. Fabricação de microestruturas dopadas com Fluoresceína Dissódica

As resinas dopadas com 5% de Fluoresceína Dissódica também foram preparadas na proporção de 50% – 50% dos monômeros SR-368 e SR-499 e com 3% de fotoiniciador (Lucirin TPO-L). Na Fig. 4.15 mostramos uma imagem de microscopia óptica de transmissão de algumas microestruturas dopadas com Fluoresceína Dissódica. Essas estruturas também foram fabricadas utilizando uma objetiva de abertura numérica 0.25, utilizando uma potência média de aproximadamente 50 mW para fotopolimerização das microestruturas. A velocidade de varredura do feixe laser utilizada foi de aproximadamente 15 $\mu\text{m/s}$.

Figura 4.15 – Imagem de microscopia óptica de transmissão de microestruturas dopadas com Fluoresceína Dissódica.

Na imagem de microscopia óptica de transmissão mostrada na Fig. 4.15 não é possível notar a presença do corante nas microestruturas, pois elas parecem transparentes. Novamente, para avaliar a qualidade das microestruturas e ver a distribuição do corante no interior delas, realizamos MEV e microscopia confocal.

A Fig. 4.16 mostra uma imagem de MEV de estruturas paralelepípedicas dopadas com Fluoresceína Dissódica.

Figura 4.16 – Imagem de MEV de microestruturas dopadas com Fluoresceína Dissódica.

Podemos observar que as microestruturas apresentadas na Fig. 4.16 também mantiveram integras suas características estruturais após a lavagem. Vemos também que essas estruturas são bastante simétricas. Através da microscopia confocal (Apêndice A), analisamos a distribuição do corante no interior das microestruturas produzidas. A Fig. 4.17 mostra imagens de microscopia confocal das estruturas dopadas Fluoresceína Dissódica. Verificamos que o dopante fica distribuído por todo o interior das microestruturas.

Figura 4.17 – Imagens confocal das estruturas paralelepípedicas dopadas com Fluoresceína Dissódica.

Na Fig. 4.18 mostramos uma imagem de fluorescência de microestruturas cilíndricas dopadas com Fluoresceína Dissódica.

Figura 4.18 – Imagem fluorescência de microestruturas cilíndricas dopadas com Fluoresceína Dissódica.

O espectro de emissão dessas microestruturas também foi coletado utilizando o sistema descrito anteriormente na seção 4.3.2. A Fig. 4.19 mostra o espectro de emissão correspondente dessas microestruturas dopadas com Fluoresceína Dissódica.

Figura 4.19 – Espectro de emissão normalizado das microestruturas dopadas com Fluoresceína Dissódica, excitada com LED centrado em 470 nm.

Nessa análise, também utilizamos o LED azul centrado em 470 nm como fonte de excitação. Vemos, através do espectro mostrado na Fig. 4.19, que o valor máximo da emissão dessas microestruturas está por volta de 540 nm, sendo um resultado bastante coerente com o valor obtido na análise feita com a amostra macroscópica ($\lambda_{fluo} = 535$ nm).

4.5. Microestruturas dopadas com Estilbeno 420

4.5.1. Estilbeno 420

O último dopante que utilizamos nesse trabalho foi o Estilbeno 420. Esse corante também é conhecido como *2,2''-([1,1'-bifenil]-4,4'-diidil-2,1-etenodiil)bis-benzenosulfônico ácido dissódico* ou simplesmente *Stilbene 3*. Em pesquisas recentes,

suas propriedades ópticas vem sendo exploradas para aplicação em lasers de corante (60). O Estilbeno 420 também vem sendo utilizado na dopagem de matrizes vítreas visando a investigação de suas propriedades fluorescentes (61). Quando na forma de pó, apresenta uma coloração levemente amarelada. Sua estrutura química é mostrada na Fig.4.20.

Figura 4.20 – Estrutura química do Estilbeno 420.

Dissolvemos o Estilbeno em álcool metílico, seguindo as orientações do fabricante. Sua aparência após dissolução é transparente e levemente azulada, dependendo do ângulo de incidência da luz. Uma amostra típica da solução de Estilbeno em metanol é apresentada no detalhe da Fig. 4.21.

Figura 4.21 – Espectro de absorção Estilbeno 420 dissolvido em metanol. No detalhe uma foto da solução medida.

Como pode ser observado na Fig. 4.21 – linha azul claro, o espectro de absorção do Estilbeno 420 apresenta uma banda em torno de 350 nm sendo transparente na região do visível. No espectro de absorção da resina dopada com Estilbeno, também apresentado na Fig. 4.20 (linha azul escura), não é possível identificar as contribuições separadas da resina e do corante, uma vez que essas elas se superpõem, devido as bandas de absorção estarem na mesma região espectral.

Em geral, as resinas dopadas com Estilbeno 420 não apresentavam um aspecto homogêneo. Mesmo aumentando o tempo de agitação, as resinas sempre apresentavam aglomerados do corante. Tentamos também dissolver o corante em etanol, porém o problema persistia. A utilização de concentrações inferiores a 0.5% em massa do corante nas resinas também não evitava a formação dos aglomerados. Na Fig. 4.22 mostramos uma foto da resina dopada com Estilbeno, em uma concentração de 0.5%. As regiões em destaque evidenciam os aglomerados de corante.

Figura 4.22 – Resina dopada com Estilbeno 420 dissolvido em metanol. Os detalhes evidenciam os aglomerados de corante.

Na Fig. 4.23 apresentamos o espectro de emissão de uma solução de Estilbeno 420 dissolvido em metanol (linha azul clara) e também de uma resina dopada com essa solução (linha azul escuro). Nesse caso, as amostras foram excitadas com um laser centrado em 325 nm. Notamos então que os valores máximos de emissão da solução e da resina coincidem e estão em torno de 420 nm.

Figura 4.23 – Espectro de emissão de uma solução de Estilbeno 420 dissolvido em metanol (linha azul claro) e espectro de emissão de uma resina dopada com Estilbeno 420 (linha azul escuro).

4.5.2. Fabricação de microestruturas dopadas com Estilbeno 420

As resinas dopadas com Estilbeno seguiram a proporção de 50% – 50% dos monômeros SR-368 e SR-499 e 3% de Lucirin TPO-L. Para fabricar as microestruturas com Estilbeno, também utilizamos objetiva de abertura numérica igual a 0.25, com uma potência de aproximadamente 50 mW para fotopolimerização das microestruturas. A velocidade de varredura do feixe laser utilizada foi de aproximadamente 15 $\mu\text{m/s}$. Essas resinas foram muito difíceis de polimerizar. Mesmo aumentando a concentração do fotoiniciador, ou até mesmo a potência do laser na fabricação, a polimerização das microestruturas ficava comprometida. A Fig. 4.24 mostra algumas microestruturas dopadas com Estilbeno 420.

Figura 4.24 – Microestruturas dopadas com Estilbeno 420.

As microestruturas com Estilbeno 420 não são muito resistentes à lavagem. Apesar de não quebrarem, elas dificilmente ficam aderidas ao substrato base. Na Fig. 4.24 podemos notar que ocorreu uma desordem no posicionamento das estruturas após a lavagem. Acreditamos que essa aderência ruim ao substrato se deva a não homogeneidade da resina, ou seja, os pequenos aglomerados do corante dificultam (ou até mesmo impedem) a fixação da estrutura no substrato.

Uma imagem de microscopia confocal (3D) das estruturas dopadas com Estilbeno 420 é apresentada na Fig. 4.25.

Figura 4.25 – Imagem confocal das estruturas paralelepípedicas dopadas com Estilbeno 420.

Na imagem confocal mostrada na Fig. 4.25, observamos que a estrutura (paralelepípedos) está bastante irregular. Claramente notamos que em algumas partes dessas estruturas o dopante parece não estar homogeneamente distribuído.

Infelizmente, não foi possível realizar a análise da integridade estrutural das estruturas dopadas com Estilbeno 420 utilizando MEV. Como as amostras estavam soltas no substrato, elas se perdiam durante as tentativas. A obtenção dos espectros de emissão da solução e da resina também não foi possível nesse trabalho.

Devido ao ruim aspecto das resinas dopadas com Estilbeno 420 e a má qualidade das estruturas obtidas com esse dopante, optamos por não utilizar essas resinas na produção de microestruturas com múltiplas dopagens.

Capítulo 5 Microestruturas com múltiplas dopagens

Após a caracterização de estruturas dopadas com um único composto, iniciamos nossos estudos para produção de microestruturas com múltiplas dopagens. Nesse capítulo, discutimos sobre a metodologia que permite fabricar microestruturas com múltiplas dopagens, apresentando os primeiros resultados obtidos. Essas microestruturas também foram caracterizadas utilizando técnicas de microscopia (MEV, transmissão, fluorescência e confocal).

5.1. Metodologia para fabricação de microestruturas com múltiplas dopagens

A metodologia para fabricação de estruturas com vários dopantes é muito semelhante à metodologia para fabricar estruturas com única dopagem (Capítulo 4, seção 4.2), porém com algumas adaptações. A Fig. 5.1 esquematiza a metodologia desenvolvida para fabricação de microestruturas com múltiplas dopagens.

Figura 5.1 – Metodologia para fabricação de microestruturas com múltiplas dopagens.

As quatro primeiras etapas ilustradas na Fig. 5.1 são idênticas as descritas no Capítulo 4, seção 4.2. Porém, como nessa etapa do trabalho visamos a fabricação de outra estrutura dopada com um segundo composto, o que fazemos de diferente é preparar a segunda amostra a ser fotopolimerizada no mesmo substrato base, contendo as primeiras microestruturas produzidas (Fig. 5.1 v). Devido à diferença do índice de refração das resinas, podemos localizar as primeiras estruturas e iniciar a polimerização da segunda parte dopada, seguindo os mesmos procedimentos descritos anteriormente (Fig. 5.1 vi). Ao final da lavagem, obtemos uma microestrutura com dupla dopagem. (Fig. 5.1 vii). É interessante ressaltar que essa técnica não limita a quantidade de estruturas e nem mesmo a quantidade de partes dopadas, ou seja, é possível fabricar estruturas com três, quatro ou até mais dopagens (Fig. 5.1 viii).

5.2. Fabricação de microestruturas com múltiplas dopagens

Para confecção de estruturas com mais de uma dopagem, inicialmente propomos dois modelos. O primeiro modelo de microestruturas com dupla dopagem consiste na fabricação de duas estruturas semi-cônicas concêntricas, conforme ilustra a Fig. 5.2.

Figura 5.2 – Primeiro modelo para fabricar microestruturas com dupla dopagem. (a) Visualização lateral. (b) Visualização de topo. (c) Visualização tridimensional.

As microestruturas, semelhantes ao modelo apresentado na Fig. 5.2, são fabricadas da seguinte forma: inicialmente estruturamos um semi-cone maciço, de altura H_1 e raio da base R_1 , utilizando uma resina dopada com, por exemplo, Rodamina 610. Após o

procedimento de lavagem para remover a resina não polimerizada, iniciamos em sequência a estruturação de um semi-cone oco ao redor da primeira estrutura, com outra resina dopada com, por exemplo, Fluoresceína Dissódica. O semi-cone oco possui altura H_2 e raio da base R_2 , sendo $H_2 < H_1$ e $R_2 > R_1$.

Para confecção desse tipo de estrutura, tivemos que adaptar em nosso sistema mecanismos para o reposicionamento da amostra, uma vez que precisamos que os eixos z das duas partes (maciço e oco) coincidam. Basicamente, para assegurar o correto reposicionamento da amostra usamos pontos fixos de alinhamento, isto é, durante a fotopolimerização da primeira parte da estrutura marcávamos, com o auxílio da CCD, pontos críticos da fabricação, como por exemplo, centro e contornos de borda da microestrutura. Nas rotinas de programação, os dados da primeira microfabricação (raio ou comprimento da estrutura, altura, velocidade de varredura) também ficavam gravados, auxiliando a segunda etapa da microfabricação com dupla dopagem.

A Fig. 5.3 mostra imagens de MEV das microestruturas produzidas seguindo o primeiro modelo proposto.

Figura 5.3 – Imagens de MEV de microestruturas com dupla dopagem. (a) Vista geral das microestruturas produzidas. (b) Detalhe de uma microestrutura.

Cabe dizer que, todas as microestruturas apresentadas nesse capítulo também foram fotopolimerizadas com uma potência média em torno de 50 mW e velocidade de

varredura do feixe laser de 20 $\mu\text{m/s}$. Utilizamos nessa etapa apenas a objetiva de abertura numérica igual a 0.25.

Nas microestruturas mostradas na Fig. 5.3, os semi-cones internos foram produzidos com altura aproximada de 50 μm e o raio da base era igual a 10 μm . As estruturas externas tinham altura de 30 μm e raio da base de 20 μm . Essas estruturas foram produzidas a partir de resinas dopadas com Rodamina 610 (parte interna), na concentração de 0.5% em massa e também com resinas dopadas com Fluoresceína Dissódica (parte externa), em uma concentração de 5% em massa. Essa grande diferença entre as concentrações dos dopantes se deve ao fato da fluorescência da Rodamina ser muito mais intensa do que a da Fluoresceína, e como pretendíamos ver a fluorescência dos dois compostos, foi necessário ajustar a concentração dos dopantes.

É possível notar na Fig. 5.3 que as microestruturas apresentadas possuem um bom grau de simetria. Vemos também que as estruturas se mantiveram rígidas mesmo após dois procedimentos de lavagem.

Para verificar a distribuição dos dopantes na microestrutura com dupla dopagem, utilizamos microscopia confocal. Uma imagem confocal da microestrutura correspondente é mostrada na Fig. 5.4. Cabe dizer, que todas as imagens de confocal aqui apresentadas são coloridas artificialmente.

Figura 5.4 – Imagem confocal de uma microestrutura com dupla dopagem. Semi-cones concêntricos.

Observamos na Fig. 5.4 que os corantes também ficam uniformemente distribuídos na microestrutura com dupla dopagem, conferindo com os resultados obtidos para as estruturas dopadas com apenas um composto (Capítulo 4). Ainda é possível notar a distinção entre a parte dopada com Rodamina 610 e a parte dopada com Fluoresceína Dissódica. Esse resultado é bastante interessante, pois mostra que não existe mistura dos dopantes durante a fabricação e nem mesmo a contaminação das estruturas após a segunda lavagem.

Partindo do modelo apresentado na Fig. 5.2 podemos também produzir estruturas cilíndricas concêntricas. A única diferença é que agora as estruturas são cilindros concêntricos e não mais semi-cones concêntricos. A confecção desse tipo de estrutura (cilindros concêntricos) é facilmente obtida, apenas alterando a rotina da programação em *LabVIEW*. Novamente as estruturas foram produzidas a partir de resinas dopadas com Rodamina 610 (parte interna) e resinas dopadas com Fluoresceína Dissódica (parte externa). Na Fig. 5.5 mostramos imagens obtidas por microscopia de transmissão das microestruturas cilíndricas com duas dopagens. Na Fig. 5.5 (a), vemos o foco do microscópio ajustado sobre os cilindros externos, contendo Fluoresceína. Contudo, também é possível observar (apenas fora de foco) a estrutura dopada com Rodamina (ao centro). Na Fig. 5.5 (b), o foco está ajustado para permitir a visualização do cilindro interno, o qual foi dopado com Rodamina. A diferença de altura das partes dopadas é de aproximadamente 7 μm .

Figura 5. 5 – Microestruturas cilíndricas com dupla dopagem. (a) O foco está ajustado sobre os cilindros externos, contendo Fluoresceína Dissódica. (b) O foco está ajustado sobre os cilindros centrais, contendo Rodamina 610.

Uma imagem confocal de uma típica microestrutura cilíndrica com dupla dopagem é mostrada na Fig. 5.6. Novamente observamos que os corantes ficam uniformemente distribuídos no interior das microestruturas com dupla dopagem, independente da forma das mesmas, e que eles não se misturam durante o processo de microfabricação.

Figura 5.6 – Imagem confocal de uma microestrutura cilíndrica com dupla dopagem.

Apresentaremos agora, na Fig. 5.7, o segundo modelo proposto neste trabalho para fabricar estruturas com dupla dopagem.

Figura 5.7 – Segundo modelo para fabricar microestruturas com dupla dopagem: estruturas retangulares.

Esse modelo é simplesmente a confecção de estruturas paralelepípedicas unidas. Nessa etapa, novamente utilizamos resinas dopadas com Rodamina 610 e Fluoresceína

Dissódica. Na Fig. 5.8 apresentamos uma imagem de MEV de estruturas produzidas a partir desse modelo proposto.

Figura 5.8 – Imagem de MEV de microestruturas com dupla dopagem produzidas a partir do segundo modelo.

As microestruturas mostradas na Fig. 5.8 possuem as seguintes dimensões (comprimento $\times$ largura $\times$ altura): $30\mu\text{m} \times 20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$. Na confecção da segunda parte dopada, iniciamos a fabricação garantindo uma sobreposição da segunda parte com a primeira estrutura. Novamente é possível observar que as microestruturas apresentadas na Fig. 5.8 estão bastante simétricas e relativamente bem alinhadas. Ainda na Fig. 5.8, chamamos a atenção para a interface das duas partes dopadas. Aparentemente, vemos que as estruturas estão aderidas uma a outra.

Outras estruturas na forma de paralelepípedos foram produzidas utilizando resina dopada Rodamina 610 e resina não dopada (pura). Microestruturas com partes dopadas e não dopadas são apresentados na Fig. 5.9.

Figura 5.9 – Microestruturas produzidas com resina dopada com Rodamina e com resina pura.

Na Fig. 5.9 (a) mostramos uma imagem de microscopia de transmissão das estruturas. Nessa etapa do trabalho, queremos investigar se existe acoplamento de luz, devido à emissão da estrutura dopada, na estrutura pura. Utilizando uma fonte de luz com intensidade de excitação controlada, variamos a intensidade, e observamos que a emissão da estrutura dopada era parcialmente transmitida para a microestrutura não dopada, como pode ser visto na Fig. 5.9 (b). Como mostrado no Capítulo 4, as microestruturas contendo Rodamina 610, quando excitadas, fluorescem e emitem luz em torno de 600 nm. Esse resultado é bastante interessante do ponto de vista óptico, pois pode favorecer a confecção de sensores opticamente ativos.

Na Fig. 5.10 apresentamos uma imagem confocal de uma microestrutura confeccionada a partir de resinas dopadas com Rodamina e Fluoresceína Dissódica.

Figura 5.10 – Imagem confocal de uma microestrutura paralelepípedica com dupla dopagem. As cores nesta imagem foram colocadas artificialmente, sendo que o amarelo refere-se a parte dopada com Fluoresceína enquanto a vermelha com Rodamina.

Estamos agora interessados em analisar a fluorescência dessas microestruturas. Essa análise serve como verificação de que os dopantes não se misturam durante os procedimentos de fabricação nem que tenham sido degradados durante o processo de microfabricação. Na Fig. 5.11 mostramos as microestruturas utilizadas nessa análise. Essas microestruturas foram analisadas utilizando microscopia óptica e de fluorescência.

Figura 5.11 – Microestruturas dopadas com Fluoresceína Dissódica e Rodamina 610. (a) Imagem de transmitância da microestrutura (b) e (c) Excitação das microestruturas com banda centrada em 450nm. (d) Excitação das microestruturas com banda centrada em 550nm.

A Fig. 5.11 mostra uma imagem de transmitância das microestruturas dopadas. Inicialmente, utilizando luz em 450 nm, excitamos as amostras com dupla dopagem, com o objetivo de observar a fluorescência das duas partes dopadas, uma vez que a Fluoresceína, quando agregada à resina, emite em torno de 535 nm e a Rodamina, também quando agregada à resina emite em aproximadamente 630 nm. Na Fig. 5.11 (b) e (c) mostramos imagens das microestruturas emitindo luz nos seus respectivos comprimentos de onda. A única diferença entre as Fig. 5.11 (b) e (c) é a intensidade da excitação utilizada. A diferenciação de cor nas imagens se deve a limitação da câmera fotográfica utilizada. Para verificar se realmente não existia mistura entre os dopantes, resolvemos fazer excitação das estruturas utilizando luz centrada em 550 nm. O resultado dessa excitação é mostrado na Fig. 5.11 (d), onde observamos apenas a excitação da Rodamina, uma vez que estávamos excitando as microestruturas fora da região de absorção da Fluoresceína.

A Fig. 5.12 apresenta o espectro de emissão das microestruturas com dupla dopagem. É possível observar na Fig. 5.12 que o espectro de emissão dessas estruturas é composto pela contribuição dos dois corantes utilizados. Ainda na Fig. 5.12, a curva em vermelho representa o espectro de emissão de uma microestrutura dopada com Rodamina 610 e Fluoresceína Dissódica. A curva em preto é um ajuste do espectro feito com auxílio

de um *software* matemático. As curvas em verde e roxo representam respectivamente as contribuições das Fluoresceína e Rodamina.

Figura 5.12 – Espectro de emissão normalizado de microestruturas dopadas com Fluoresceína Dissódica e Rodamina 610

Nessa etapa do trabalho, também produzimos estruturas compostas por dois cilindros ocos concêntricos, que chamaremos de micro-anéis. A motivação para confecção dessas estruturas visa futuras aplicações em dispositivos ópticos como, por exemplo, microcavidades ópticas. Microcavidades ópticas tem sido estudada ao longo dos últimos anos (62,63,64) devido a sua potencial aplicabilidade em sistemas ópticos, principalmente nos setores de comunicação óptica. Entre as inúmeras formas possíveis de se obter uma microcavidade, destacamos as estruturas em formato de microdiscos ou micro-anéis. Cavidades em formato circulares são de grande importância para aplicações como, por exemplo, em cavidades lasers (65,66), biosensores (67), filtros espectrais (68), entre outras (69,70). Essas microcavidades ópticas permitem capturar, liberar e armazenar fótons seletivamente, além de promoverem suas interações. Como exemplo, micro-anéis proporcionam tempos de vidas extremamente longos, que podem ser utilizados para diversas interações de fótons com alta eficiência não linear.

Os micro-anéis confeccionados são feitos da seguinte forma: o cilindro interno é polimerizado a partir de uma resina dopada com Rodamina 610 e o cilindro externo é feito com resina pura (não dopada). A Fig. 5.13 mostra uma imagem MEV dos micro-anéis confeccionados.

Figura 5.13 – Imagem de MEV de uma microestrutura em formato de anel.

No MEV apresentado na Fig. 5.13 podemos observar que os anéis não estão perfeitamente circulares e apresentam uma rugosidade periódica. O formato elipsoide pode estar associado a um mau alinhamento do sistema. Já a rugosidade deve estar associada aos elementos de volume fotopolimerizados durante a microfabricação. Contudo, a interface entre os anéis é claramente observada na Fig. 5.13.

A Fig. 5.14 mostra os primeiros testes realizados com essas estruturas. Na Fig. 5.14 (a), onde apresentamos uma imagem de microscopia de transmissão dessas estruturas cilíndricas, conseguimos observar claramente as duas partes fabricadas: ao centro, o anel dopado com Rodamina 610 e externamente, o anel confeccionado com resina pura. Utilizando um LED centrado em 450 nm, excitamos as microestruturas da Fig. 5.14. Na Fig. 5.14 (b) vemos a intensa fluorescência da estrutura dopada com Rodamina. Também é possível observar que a maior parte da luz emitida fica confinada ao cilindro interno (dopado). Porém, não passam despercebidos alguns espalhamentos para a região não dopada. Contudo, esse resultado é coerente com o apresentado na Fig. 5.9, onde mostramos o confinamento de luz na microestrutura não dopada, devido à aderência entre as partes polimerizadas. Mesmo assim, a intenção de utilizar essas

estruturas para possíveis microcavidades ópticas é bastante válida. Porém, ainda são necessários avanços no processo de fabricação das microestruturas, principalmente em relação à diminuição da rugosidade superficial.

Figura 5.14 – (a) Imagem de transmissão dos microanéis. (b) Fluorescência da microestrutura após excitação com LED centrado em 450 nm.

Como mencionado na seção 5.1, a metodologia para fabricar microestruturas com múltiplas dopagens não limita a quantidade de partes que podem ser dopadas com diferentes corantes. Entretanto, nossas tentativas de produzir microestruturas com mais de dois dopantes não foram satisfatórias. Em geral, as microestruturas dopadas com três dopantes distintos sempre se desprendiam do substrato base ou até mesmo quebravam durante a lavagem. Os repetidos processos de lavagem e a movimentação do substrato base durante o preparo da amostra são os principais causadores de danos às estruturas. Nesse trabalho não conseguimos produzir microestruturas com mais de duas dopagens. É importante ressaltar que a metodologia não se limita a fabricação de microestruturas com dupla dopagem e sim que nossos procedimentos de lavagem ou até mesmo de fabricação não permitiram a obtenção de microestruturas com três ou mais dopantes. Com isso, vemos que é necessário o desenvolvimento de novas técnicas de lavagem ou simplesmente o aperfeiçoamento do processo por nós utilizado, para então conseguirmos microestruturas com múltiplas dopagens.

Capítulo 6 Microestruturas dopadas com compostos biológicos

Demonstrada a técnica para fabricação de estruturas com pelo menos duas dopagens, decidimos empregá-la em um estudo biológico, onde avaliamos o desenvolvimento de bactérias em microambientes produzidos via polimerização por absorção de dois fótons. Nesse capítulo, mostramos microestruturas dopadas com agentes biológicos (por exemplo, um antibiótico) fabricadas para avaliar o desenvolvimento da bactéria *Escherichia coli* (*E. coli* – ATCC 25922). Essas estruturas são denominadas microambientes. A *E. coli* é uma bactéria que tem sua epidemiologia e características morfológicas bastante conhecidas na literatura (71,72,73). Possuem a forma de bacilo e múltiplos flagelos dispostos em volta da célula (Fig. 6.1). Seu tamanho aproximado é de 1 a 3 μm . Em geral, se fixam na parede do intestino dos seres humanos e de animais ruminantes, graças à presença de fibrinas ou adesinas (complexos proteicos). Nesse trabalho, as bactérias *E. coli* foram incubadas em caldo BHI (do inglês, *Brain Heart Infusion*), meio de cultura composto por nutrientes de cérebro e coração de gado, além de peptona e dextrose (74).

Figura 6.1 – *Escherichia coli*. Imagem retirada da Ref. (75).

Escolhemos como dopante para as microestruturas aqui produzidas o antibiótico cloridrato de ciprofloxacino. Esse antibiótico é muito utilizado no combate de infecções ocasionadas pela *E. coli*. Seu princípio ativo, a *ciprofloxacina*, possui um amplo espectro antimicrobiano e é comumente empregada no tratamento de doenças do sistema respiratório, urinário ou trato gastrointestinal. Sua fórmula estrutural é apresentada na Fig. 6.2.

Figura 6.2 – Fórmula estrutural da ciprofloxacina.

O primeiro passo desse estudo biológico foi verificar a eficiência do cloridrato de ciprofloxacino na inibição do crescimento da *E. coli*. Esse teste biológico, chamado de determinação da *concentração inibitória mínima* (CIM), é feito para determinar qual a concentração mínima necessária para que um composto seja capaz de inibir o crescimento de um dado microrganismo. Seguindo os padrões do NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) o meio de cultura utilizado para os testes de diluição em caldo (CIM) foi o Mueller-Hinton (76). 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.

Nas seções seguintes, discutimos em detalhes o teste realizado para determinar a concentração mínima do antibiótico capaz de inibir o crescimento da bactéria *E. coli*. Além disso, apresentaremos os microambientes fabricados para investigar o desenvolvimento dessa bactéria.

6.1. Determinação da CIM do antibiótico cloridrato de ciprofloxacino capaz de inibir o crescimento da bactéria *E. coli*

A Fig. 6.3 mostra a placa onde a *E. coli* foi inoculada em diferentes concentrações de cloridrato de ciprofloxacino (linhas A, B e C). As concentrações utilizadas nesse teste são apresentadas na Tab. 6.1.

Figura 6.3 – Placa onde as bactérias *E. coli* foram inoculadas em diferentes concentrações de cloridrato de ciprofloxacino.

Tabela 6.1 – Concentrações utilizadas na determinação de CIM.

<i>Coluna</i>	<i>Concentração de ciprofloxacina (µg/mL)</i>
1	Somente o meio
2	0.125
3	0.0625
4	0.03125
5	0.015625
6	0.007
7	0.004
8	0.002
9	0.001
10	0.0005
11	0.00025
12	Somente a bactéria <i>E. Coli</i>

As bactérias foram incubadas por 24 horas, em condições favoráveis para seu desenvolvimento (aerobiose a 36 ± 1 °C). O gráfico na Fig. 6.4 mostra a absorbância das soluções de cloridrato de ciprofloxacino, após 24 horas de incubação com a *E. coli*.

Figura 6.4 – Absorbância das soluções de cloridrato de ciprofloxacino após as 24 horas de inoculação com a bactéria *E. coli*. O ponto em vermelho representa a absorbância obtida para na ausência de antibiótico.

Nestes resultados, a absorbância da amostra de referência, contendo apenas o meio de cultura, foi subtraída. O ponto vermelho no gráfico representa a absorbância obtida sem a presença do antibiótico. Pelo gráfico apresentado na Fig. 6.4, observamos que a partir da concentração de 0.007 µg/mL (coluna 6, da Tab. 6.1) a absorbância da solução é praticamente nula, indicando que atingimos a CIM de cloridrato de ciprofloxacino a partir desse valor.

Com base nesses resultados, propomos então a fabricação de microambientes dopados com o antibiótico cloridrato de ciprofloxacino. As resinas poliméricas produzidas a partir dos monômeros SR368 e SR499 (proporção de 50-50%) foram dopadas com uma concentração de antibiótico relativa a 5% em massa da resina, uma concentração de antibiótico de aproximadamente 0.125 mg/mL, sendo uma concentração

bastante superior a da CIM encontrada. Descreveremos, na seção seguinte, a fabricação dos microambientes e a investigação do desenvolvimento da *E. coli* nessas estruturas.

6.2. Fabricação dos microambientes e avaliação do crescimento bacteriano nessas estruturas

Nessa etapa do trabalho, os primeiros microambientes fabricados são semelhantes ao modelo apresentado na Fig. 6.5.

Figura 6.5 – Microambiente para estudos biológicos.

Os microambientes semelhantes ao mostrado na Fig. 6.5, normalmente são confeccionados somente com resina pura ou somente com resina dopada. Em geral, eles possuem as seguintes dimensões: largura de 100 μm , comprimento de 150 μm e altura de aproximadamente 100 μm . Essas estruturas, semelhantes a paredes, servem como armadilhas para as bactérias. Na Fig. 6.6 mostramos uma imagem de MEV de microambientes característicos. Esses microambientes também foram fotopolimerizados com uma potência em torno de 50 mW e velocidade de varredura do feixe laser de 20 $\mu\text{m/s}$. Novamente utilizamos a objetiva de abertura numérica igual a 0.85.

Figura 6.6 – Imagem de MEV de microambientes para estudos biológicos.

Observando as microestruturas apresentadas na Fig. 6.6, claramente vemos distorções nos quatro lados das armadilhas, podendo ser notada em todas as estruturas. Como as armadilhas são da ordem de dezenas de micrometros, durante a fotopolimerização o feixe laser pode incidir fora da objetiva utilizada e causar a fabricação de estruturas distorcidas. No entanto, as estruturas se mostraram rígidas após a lavagem e puderam ser utilizadas em nossas análises.

A Fig. 6.7 mostra uma imagem de microscopia óptica de microambientes sem dopantes (parte superior) e de microambientes dopados com antibiótico cloridrato de ciprofloxacino (parte inferior).

Figura 6.7 – Microambientes produzidos para avaliar o desenvolvimento da bactéria *E. coli*. Os ambientes da parte superior não são dopados, enquanto os da parte inferior são dopados com cloridrato de ciprofloxacino.

As estruturas apresentadas na Fig. 6.7 têm dimensão (comprimento $\times$ largura $\times$ altura) de: $100\ \mu\text{m} \times 150\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$. Como primeiro teste, depositamos as bactérias inoculadas em caldo BHI sobre os dois tipos de microambientes produzidos. As bactérias foram mantidas nesses ambientes por 24 horas, sendo fornecidas todas as condições necessárias para seu desenvolvimento. Os resultados da análise após o período de 24 horas são apresentados na Fig. 6.8 (microscopia óptica).

Figura 6.8 – Bactérias em microambiente (a) sem antibiótico e (b) dopado com antibiótico.

O microambiente mostrado na Fig. 6.8 (a) foi produzido sem nenhum dopante, enquanto o microambiente mostrado na Fig 6.8 (b) é produzido inteiramente com resina dopada com o antibiótico, na concentração de $0.125\ \text{mg/mL}$. Podemos observar que no microambiente sem antibiótico (Fig. 6.8 a), após o período de inoculação, as bactérias formaram um biofilme bastante visível. Por outro lado, no microambiente produzido com a resina dopada (Fig. 6.8 b) houve a formação de apenas uma pequena porção de biofilme, principalmente em regiões distantes da microestrutura. A formação de biofilme em regiões afastadas da estrutura dopada indica que existe um alcance máximo de ação do antibiótico.

Utilizando a metodologia para fabricar microestruturas com múltiplas dopagens, fizemos algumas alterações nos microambientes sem antibiótico, semelhantes aos mostrados na Fig. 6.5. As alterações nesses microambientes são simplesmente a confecção de uma segunda microestrutura dopada com cloridrato de ciprofloxacino, em regiões específicas do microambiente puro. Em geral, confeccionamos estruturas dopadas com o formato de paralelepípedos, dentro ou fora dos microambientes. Os novos microambientes, com regiões dopadas e não dopadas, são apresentados na Fig. 6.9.

Figura 6.9 – Microambientes com específicas regiões dopadas. Os paralelepípedos são estruturas dopadas com cloridrato de ciprofloxacino.

Os paralelepípedos confeccionados tem dimensão aproximada de: $50\text{ }\mu\text{m} \times 25\text{ }\mu\text{m} \times 100\text{ }\mu\text{m}$ (comprimento $\times$ largura $\times$ altura). Novamente, depositamos as bactérias inoculadas em caldo BHI sobre os microambientes e monitoramos por 24 horas. A Fig. 6.10 mostra as bactérias em um microambiente sem antibiótico após 3 horas. Neste caso, notamos que a distribuição de bactérias dentro e fora do microambiente é relativamente uniforme.

Figura 6.10 – Bactérias em um microambiente sem nenhum dopante biológico após três horas de monitoramento.

Na Fig. 6.11 mostramos o resultado para as bactérias depositadas nos microambiente com as regiões dopadas (Fig. 6.9), também após 3 horas de incubação. Nesse resultado, podemos verificar que existe uma maior densidade de bactérias em

regiões distantes das estruturas dopadas com o antibiótico (paralelepípedo), em acordo com os resultados mostrados na Fig. 6.8.

Figura 6.11 – Bactérias em um microambiente com uma região dopada com o antibiótico cloridrato de ciprofloxacino (paralelepípedo). Monitoramento após três horas de incubação.

O esquema do último microambiente produzido para avaliação do desenvolvimento bacteriano é apresentado na Fig. 6.12. Esse microambiente é composto por uma matriz de 25 cilindros de raio igual a 15 μm com altura de 60 μm . A distância entre os cilindros é de 30 μm . Apenas o cilindro central, em destaque na Fig. 6.12, foi dopado com cloridrato de ciprofloxacino.

Figura 6.12 – Matriz de microestruturas para investigação do desenvolvimento bacteriano. A região destacada representa a única microestrutura dopada com antibiótico cloridrato de ciprofloxacino existente na matriz.

Novamente repetimos a inoculação das bactérias sobre as microestruturas e mantivemos em análise por 24 horas, fornecendo todas as condições necessárias para seu desenvolvimento. Na Fig. 6.13, mostramos o microambiente após as 24 horas de monitoramento. É possível notar uma distribuição uniforme de bactérias sobre o microambiente. Porém, ao redor do cilindro dopado (central), pode-se ver que uma pequena área radial tem quantidades mínimas de bactérias. Esse resultado mostra que nas regiões próximas às estruturas dopadas com antibiótico, as bactérias *E. coli* não se desenvolvem. Pelos resultados da Fig. 6.13 pudemos comprovar que existe uma região de alcance máximo onde o antibiótico consegue inibir o crescimento dessas bactérias.

Figura 6.13 – Matriz de microestruturas após 24 horas monitoramento. Ao redor do cilindro dopado (centro) há inibição do desenvolvimento da bactéria *E. coli*.

Nossos resultados indicam que os microambientes confeccionados com partes puras e dopadas com antibiótico são viáveis para estudar o desenvolvimento de bactérias, conforme demonstrado para a *E. coli*. Porém, a confecção das armadilhas deve ser mais bem estudada, visando à obtenção de estruturas mais uniformes.

Capítulo 7 Conclusões e perspectivas

A técnica de fotopolimerização por absorção de dois fótons oferece interessantes vantagens para a confecção de microestruturas tridimensionais, tais como resolução abaixo do limite de difração e não limitação quanto à forma das estruturas. Neste trabalho, iniciamos o desenvolvimento de uma metodologia para a fabricação de microestruturas com múltiplas dopagens. Este tipo de microestrutura é de grande interesse para o desenvolvimento de dispositivos ópticos, além de viabilizar a produção de sistemas para estudos em biologia.

A dopagem das resinas poliméricas com os corantes fluorescentes Rodamina 610 e Fluoresceína Dissódica foi obtida com êxito. No entanto, as resinas dopadas com Estilbeno 420 foram difíceis de homogeneizar e, quando polimerizadas, não forneciam microestruturas resistentes aos procedimentos de lavagem. Foi possível verificar que os dopantes se distribuem uniformemente no interior das microestruturas, independentemente da forma das mesmas.

A metodologia para fabricação de microestruturas com múltiplas dopagens mostrou-se bastante promissora. Porém, o procedimento de lavagem limita essa técnica para produção de microestruturas com apenas dois dopantes. Através de testes de fluorescência, foi possível verificar que os diferentes dopantes não se misturam no interior da microestrutura. Contudo, nas microestruturas com dupla dopagem, não foi possível quantificar a fluorescência da Fluoresceína Dissódica, uma vez que sua intensidade era bastante baixa quando comparada com a da Rodamina 610.

Do ponto de vista dos testes biológicos, os estudos de CIM mostraram que o antibiótico Cloridrato de Ciprofloxacino tem sua eficiência inibitória a partir de 0.007 $\mu\text{g/mL}$. Resinas dopadas com esse antibiótico se mostraram bastante homogêneas e de fácil polimerização. Os microambientes fabricados se mostraram viáveis para o estudo do crescimento (ou inibição) da bactéria *E. coli*. Produzimos um mesmo microambiente contendo partes dopadas e não dopadas com o antibiótico. De maneira geral, observamos que nas regiões dopadas há uma inibição no desenvolvimento da *E. coli*. Esse resultado mostra que microestruturas fabricadas via fotopolimerização por absorção de dois fótons

podem ser empregadas para estudos de sistemas de entrega de fármacos ou engenharia de tecido.

Dando continuidade a este trabalho, primeiramente pretendemos aprimorar a metodologia desenvolvida para fabricação das microestruturas com múltiplas dopagens, principalmente no que diz respeito aos procedimentos de realinhamento e lavagem. Pretendemos também otimizar o tempo de produção das microestruturas. Para isso, devemos automatizar o sistema de posicionamento da amostra, que além de permitir a fabricação mais rápida das microestruturas, permitirá um melhor alinhamento das diversas estruturas produzidas em um mesmo substrato. Por fim, daremos continuidade aos trabalhos de fabricação de microambientes biológicos, visando de fato estudar o processo de desenvolvimento das bactérias em estruturas com diferentes dopagens e morfologias.

Referências

1. MADOU, M J. *Fundamentals of Microfabrication: The Science of Miniaturization*. Boca Raton: CRC Press, 2002.
2. COLTRO, W. K. T. *et al.* Microsistemas de análises químicas. Introdução, tecnologias de fabricação, instrumentação e aplicações. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1986-2000, 2007.
3. QUIST, A. P., E. PAVLOVIC, *et al.* Recent advances in microcontact printing. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.381, n.3, p.591-600. 2005.
4. BECKER, H.; C. GARTNER. Polymer microfabrication methods for microfluidic analytical applications. **Electrophoresis**, v.21, n.1, p.12-26. 2000.
5. BECKER, H. E L. E. LOCASCIO. Polymer microfluidic devices. **Talanta**, v.56, n.2, p.267-287. 2002.
6. 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. 6, p. 93-95, 1965.
7. MARUO S, NAKAMURA O, KAWATA S, Three-dimensional microfabrication with two-photon-absorbed photopolymerization. **Optics Letters**, v. 22, n. 2, p. 132-134, 1997.
8. KAWATA S. *et al.* 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.
9. MARUO S.; KAWATA S. Two-photon-absorbed near-infrared photopolymerization for three-dimensional microfabrication. **Journal of Microelectromechanical Systems**, v. 7, n. 4, p. 411-415, 1998.
10. 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.
11. OSTENDORF, A.; CHICHKOV, B. N. Two-photon polymerization: A new approach to Micromachining. **Photonics Spectra**, 2006.
12. TAYALIA, P. *et al.* 3D Cell-Migration Studies using Two-Photon Engineered Polymer Scaffolds. **Advanced Materials**. n. 20, p. 4494-4498, 2008.
13. BELFIELD, K. D. *et al.* Multiphoton-absorbing organic materials for microfabrication, emerging optical applications and non-destructive three-

- dimensional imaging. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 13, n. 12, p. 837-849, 2000.
14. PARTHENOPOULOS, D. A. *et al.* 3-Dimensional optical storage memory. **Science**, v. 245, n. 4920, p. 843-845, 1989.
15. 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.
16. ŽUKAUSKAS, A. *et al.* Organic dye doped microstructures for optically active functional devices fabricated via two-photon polymerization technique. **Lithuanian Journal of Physics**. v. 50, n.1, p. 55-61, 2010.
17. GÖPPERT-MAYER M. Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. **Ann. Phys.** (Leipzig), p. 273-294, 1931. [Title translation: *About elementary events with two quantal jumps.*]
18. HE, G. S. *et al.* Multiphoton absorbing materials: Molecular designs, characterizations, and applications. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 4, p. 1245-1330, 2008.
19. KAISER W.; GARRET C. G. B. Two-photon excitation in CaF₂ - Eu²⁺. **Physical Review Letters**, v. 7, p. 229-231, 1961.
20. SHEN, Y. R. *The principles of nonlinear optics*. New York: John Wiley, 1984.
21. BOYD, R. W. *Nonlinear optics*. Boston: Academic Press, 2008.
22. PRASAD, P. N.; WILLIAMS, D. J. *Introduction to Nonlinear Optical Effects in Molecules and Polymers*. New York: Wiley-Interscience, 1991.
23. REITZ, J. R.; MILFORD, F. J. *Fundamentos da Teoria Eletromagnética*. Rio de Janeiro: Campus, 1991.
24. BHAWALKAR, J. D. *et al.* Nonlinear multiphoton processes in organic and polymeric materials. **Reports on Progress in Physics**, v. 59, n., p. 1041, 1996.
25. 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.
26. ATKINS, P. W. *Físico Química*. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2002.
27. 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.

28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. SO, P. T. C. *et al.* Two-photon Excitation Fluorescence Microscopy. **Annual Review of Biomedical Engineering** v. 2, p.399-429, 2000.
32. MULLIGAN, S. J. Two-Photon Fluorescence Microscopy: Basic Principles, Advantages and Risks em MÉNDEZ-VILAS, A.; DÍAZ, J. (Eds.) **Modern Research and Educational Topics in Microscopy**. Formatex.org, p.881-889, 2007.
33. DENK, W. *et al.* 2-photon laser scanning fluorescence microscopy. **Science**, v. 248, n. 4951, p. 73-76, 1990.
34. POTTER, S. M. Vital imaging: Two photons are better than one. **Current Biology**, v.6, n.12, p.1595-1598. 1996.
35. TOEROEK, P.; KAO, F. J. *Optical imaging and microscopy: techniques and advanced systems*. Berlin; New York: Springer, 2007.
36. MACDONALD, I. J.; DOUGHERTY, T. J. Basic principles of photodynamic therapy. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v.5, n.2, p.105-129. 2001.
37. LEVY, J. G. Photodynamic Therapy. **Trends in Biotechnology**, v.13, n.1, p.14-18. 1995.
38. BABILAS, P., S. KARRER, *et al.* Photodynamic therapy in dermatology - an update. **Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine**, v.21, n.3, p.142-149. 2005.
39. SEGALLA, A., BORSARELLI, C. D. *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.
40. DOUGHERTY, T. J. *et al.* Historical Perspective. em HENDERSON, B. W.; DOUGHERTY, T. J. (Eds.) *Photodynamic therapy: basic principles and clinical applications*. New York: M. Dekker, p. 1-18, 1992.
41. RAAB, O. Effect of fluorescent substances on Infusoria. **Zeitschrift Fur Biologie**, v.39, p.524-546. 1900.
42. BONNETT, R. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. **Chemical Society Reviews**, v.24, n.1, p.19-33. 1995.

43. OLEINICK, N. L.; MORRIS R. 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.
44. SERBIN, J., A. EGBERT, *et al.* Femtosecond laser-induced two-photon polymerization of inorganic-organic hybrid materials for applications in photonics. **Optics Letters**, v.28, n.5, p.301-303. 2003.
45. KUEBLER, S. M.; RUMI, M.; *et al.* Optimizing two-photon initiators and exposure conditions for three-dimensional lithographic microfabrication. **Journal of Photopolymer Science and Technology**. v. 14, n. 4, p. 657-668, 2001.
46. *Transformation and Magnification by Simple Lenses*. Disponível em: http://www.cvimellesgriot.com/products/Documents/TechnicalGuide/Transformation_Magnification_by_Simple_Lenses.pdf (Acesso em: 2011.).
47. ZILIO, S. C. *Desenho e Fabricação Óptica*. São Carlos: Instituto de Física de São Carlos, 2006.
48. BALDACCHINI, T. *et al.* Acrylic-based resin with favorable properties for three-dimensional two-photon polymerization. **Journal of Applied Physics**, v. 95, p. 6072-6076, 2004.
49. MENDONÇA, *et al.* Two-photon absorption spectrum of the photoinitiator Lucirin TPO-L. **Applied Physics a-Materials Science & Processing**, v. 90, p. 633-636, 2008.
50. SUN. H. B. *et al.* Two-photon photopolymerization and diagnosis of three-dimensional microstructures containing fluorescent dyes. **Applied Physics Letters**, v. 79, n.10, p. 1441-1413, 2001.
51. TONG. L. M. *et al.* Self-modulated taper drawing of silica nanowires. **Nanotechnology**, v. 16, n. 9, p. 1445-1448, 2005.
52. WOLFE D. B. *et al.* Customization of poli(dimethylsiloxane) stamps by micromaching using a femtosecond-pulsed laser. **Advanced Materials**, v. 15, n. 1, p. 62 →, 2003.
53. FLORY, P. J. *Principles of Polymer Chemistry*. Ithaca: Cornell University Press, 1953.
54. FOUASSIER, J. P. *Photoinitiation, Photopolymerization, and Photocuring: Fundamentals and Applications*. Munich, Viena, New York: Hanser, 1995.
55. BHAWALKAR, J. D. *et al.* Efficient, two-photon pumped green upconverted cavity lasing in a new dye. **Optics Communications**, v. 124, n. 1-2, p. 33-37, 1996.

56. MAKAROV, N. S. *et al.* Two-photon absorption standarts in the 550-1600 nm excitation wavelength range. **Optics Express**, v. 16, p. 4029-4047, 2008.
57. MENDONCA, C. R. *et al.* Three-dimensional fabrication of optically active microstructures containing an electroluminescent polymer. **Applied Physics Letters**, v. 95, n. 11, p. 113309, 2009.
58. CONSTANTINO, V. R. L. *et al.* Hidróxidos duplos lamelares: nanopartículas inorgânicas para armazenamento e liberação de espécies de interesse biológico e terapêutico. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 159-171, 2010.
59. CORREA, B. *et al.* Método fluorescente (diacetato de fluoresceína e brometo de etídeo) para o estudo da viabilidade de *Cryptococcus neoformans* em líquido. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo** [online], v.32, n.1, p. 46-50, 1990.
60. SHARMA, A. K. *et al.* Concentration-dependent energy transfer studies in ternary dye mixture of Stilbene-420, Coumarin-540 and Nile Blue. **Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.71, n.5, p.1631-1633. 2009.
61. HE, X. L. *et al.* Molecular aggregation and spectrum properties of stilbene 3 doped lead-tin-fluorophosphate glass. **Spectroscopy and Spectral Analysis**, v.28, n.3, p.485-489. 2008.
62. LIU, Z. P. *et al.* Direct laser writing of whispering gallery microcavities by two-photon polymerization. **Applied Physics Letters**, v. 97, n. 21, p. 21115-1, 2010.
63. DONG, C. H. *et al.* Fabrication of high-Q polydimethyl siloxane optical microspheres for thermal sensing. **Applied Physics Letters**, v.94, n.23, p.231179, 2009.
64. WANG, J. *et al.* Remote manipulation of micro-nanomachines containing magnetic nanoparticles. **Optics Letters**, v.34, n.5, p.581-583. 2009.
65. FRATESCHI, N. C. e LEVI, A. F. J. The spectrum of microdisk lasers. **Journal of Applied Physics**, v.80, n.2, p.644-653. 1996.
66. BAREA, L. A. M. *et al.* Low-roughness active microdisk resonators fabricated by focused ion beam. **Journal of Vacuum Science & Technology B**, v.27, n.6, p.2979-2981. 2009.
67. ARMANI, A. M., *et al.* Label-free, single-molecule detection with optical microcavities. **Science**, v.317, n.5839, p. 783-787. 2007.
68. MA, Y. *et al.* Improved optical filter responses in cascaded InGaAsP/InP microdisk resonators. **Electronics Letters**, v.37, n.9, p. 564-565. 2001.

69. MICHLER, P. *et al.* A quantum dot single-photon turnstile device. **Science**, v.290, n.5500, p.2282, 2000.
70. ROKHSARI, H. e VAHALA K. J. Ultralow loss, high Q, four port resonant couplers for quantum optics and photonics. **Physical Review Letters**, v.92, n.25, p. 253905, 2004.
71. MURRAY P. R. *Microbiologia Médica*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.
72. KARMALI, M. A. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.2, n.1, p.15-38. 1989.
73. BUTLER, D. L., *et al.* *Escherichia coli* ATCC 35218 as a quality control isolate for susceptibility testing of *Haemophilus influenzae* with haemophilus test medium. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.43, n.2, p. 283-286. 1999.
74. *Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos*. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_4_2004.pdf (Acesso em JAN/2012).
75. *Escherichia coli* Disponível em: <http://www.mdsau.de.com/2011/06/bacteria-escherichia-coli.html> (Acesso em NOV/2011).
76. *Controle Interno da Qualidade para Testes de Sensibilidade a antimicrobianos*. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/manual_testes_antimicrobianos.pdf (Acesso em JAN/2012).

Apêndice A Microscopia Confocal

A microscopia confocal é uma ferramenta bastante utilizada em pesquisas científicas, principalmente para análises biológicas. Nesse trabalho, utilizamos essa técnica microscópica para avaliar a distribuição dos dopantes no interior das microestruturas produzidas.

O microscópio utilizado nesse trabalho é da marca *Carl Zeiss*, modelo LSM 700. Na Fig. A.1 apresentamos uma imagem desse equipamento.

Figura A. 1 - Microscópio Confocal LSM 700 - Carl Zeiss

A rotina para operação desse microscópio confocal é relativamente simples. Inicialmente posicionamos a amostra na base do microscópio e ajustamos o foco. Esse microscópio possui lentes objetivas de 10×, 20× e 40×. Com auxílio de *software* dedicado controlamos os parâmetros da análise. Além da análise confocal, nesse equipamento

podemos ainda fazer análises de microscopia de transmissão, reflexão e fluorescência. Uma câmera acoplada ao equipamento permite o monitoramento em tempo real das análises.

Na Fig. A. 2 apresentamos um esquema do microscópio confocal LSM 700.

Figura A. 2 - Esquema do microscópio confocal LSM 700.

Uma fonte laser é focalizada no plano da amostra por uma objetiva de microscópio. Os fótons emitidos após a excitação são focalizados por uma segunda objetiva e coletados em um detector. É importante notar que os fótons que serão coletados pelo detector são apenas os fótons que estão sendo emitidos do plano focal da amostra. Espelhos galvanométricos permitem a movimentação do feixe no plano x - y . Um estágio de translação permite variar a análise na dimensão do eixo z .

Uma grande vantagem da microscopia confocal é o *seccionamento óptico*. No seccionamento óptico é possível obter várias imagens de diferentes planos, como apresentado no Capítulo 4, Fig. 4.8. Essa técnica é muito útil no caso de espécimes espessos ou, por exemplo, para investigar a distribuição de dopantes em amostras. O *software* desse equipamento permite a reconstrução desses planos em uma imagem tridimensional, reproduzindo fielmente os dados coletados.

Referências

- A. 1. YOUNG, M. *Óptica e lasers – Fibras e guias de ondas*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1998.
- A. 2. Carl Zeiss – Axio LSM 700 – *Confocal Microscopy*. Manual de Instruções.