

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

JONATHAS QUEIROZ RIBEIRO MORAES

**Fabricação de microambientes 3D para o
desenvolvimento de micro-organismos**

São Carlos

2023

JONATHAS QUEIROZ RIBEIRO MORAES

**Fabricação de microambientes 3D para o
desenvolvimento de micro-organismos**

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

Área de Concentração: Física Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Cleber Renato Mendonça.

Versão Corrigida
(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2023

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.

Moraes, Jonathas Queiroz Ribeiro

Fabricação de microambientes 3D para o desenvolvimento de micro-organismos / Jonathas Queiroz Ribeiro Moraes; orientador Cleber Renato Mendonça - versão corrigida -- São Carlos, 2023.

68 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Teórica e Experimental) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2023.

1. Probióticos. 2. Microambientes. 3. Polimerização via absorção de dois fótons. 4. Biofilmes. I. Mendonça, Cleber Renato, orient. II. Título.

À minha esposa, Giulia, que tem sido cada vez mais importante na minha vida e me feito ser mais de Deus em mim.

Aos meus pais, Enoque e Sonia Moraes, que me legaram a fé e me impulsionaram na minha formação.

Sem a sua parte nessa história, isso não teria acontecido...

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, autor e consumidor da minha fé. Sem Sua vontade não seria possível haver cosmos a ser estudado, matéria a ser manipulada, vida a ser conduzida.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Prof. Dr. Cleber Renato Mendonça. Seu profissionalismo me constrange e sua paciência me fez ver como um professor e profissional deve agir. Se em minha carreira profissional acadêmica me tornar apenas parte do pesquisador que é, me darei por muito satisfeito. Tanto nas primeiras disciplinas, como na orientação na Iniciação Científica, no Trabalho de Conclusão de Curso na Graduação e especialmente na orientação do Mestrado, sua instrução foi primordial.

Agradeço aos Professores Dr. Lino Misoguti e Dr. Leonardo de Boni, e ao Técnico do Grupo de Fotônica, Me. André Romero, pelo socorro prestado tantas vezes no laboratório, além das conversas de corredor que tornaram a pesquisa muito mais agradável.

Na pessoa da Prof^a Dr^a Carla Raquel Fontana, agradeço todo o grupo de pesquisa do Laboratório de Microbiologia Clínica da UNESP – Araraquara, que teve parte primordial na execução desse trabalho. Sem sua ajuda, esse trabalho não seria possível.

Agradeço imensamente o Dr. Adriano José Galvani Otuka, por todo acompanhamento, direcionamento e instrução. Tanto na operação do sistema laser, no manuseio e preparo das amostras desse trabalho e em toda a práxis correlata a esse trabalho, as dicas e mensagens respondidas de última hora foram indispensáveis.

Agradeço aos demais colegas e amigos do Grupo de Fotônica, pela partilha do espaço, pelas histórias e risadas. Kelly, Link, João, André, Kauê, Luís, Jorjão, Moisés, Dani, Júlia, Konaka e todos que não caberiam numa lista sucinta como essa.

Agradeço ao Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo, por fornecer a infraestrutura necessária para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço de modo especial à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo importante suporte financeiro ao longo deste trabalho, diretamente vindo por meio do Processo FAPESP nº 2020/15736-6.

Agradeço também as outras agências de fomento à pesquisa, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio à infraestrutura do nosso Laboratório.

À Giulia, esposa, auxiliadora, companheira e amiga. Ter a graça de contar com seu incentivo nos momentos que me senti mais pra baixo e incapaz é um presente de Deus.

A meus pais, Enoque e Sonia, novamente, por todo o incentivo que desde o início da minha formação acadêmica prezaram pela excelência e nunca me privaram de alçar voos mais altos. Que com a graça de Deus eu seja um pai assim como vocês foram e têm sido para mim.

Ao meu irmão, Matheus, que foi um dos motivos para que viesse para São Carlos, fazendo com que essa jornada pudesse ser trilhada. Sua amizade vai além dos laços de sangue.

Aos irmãos da Igreja Presbiteriana de São Carlos, por serem família quando estava longe da minha. Especialmente aos colegas de IFSC, Pedro, Wilson e Caio, mas também a todos os outros, a quem agradeço na pessoa do Jayro.

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

*“Como são grandes as riquezas, a sabedoria e o conhecimento de Deus!
É impossível entendermos suas decisões e seus caminhos!
Pois todas as coisas vêm dele, existem por meio dele e são para ele.
A ele seja toda a glória para sempre! Amém.”*

Romanos 11.33,36

RESUMO

MORAES, J. Q. R. **Fabricação de microambientes 3D para o desenvolvimento de micro-organismos.** 2023. 68 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023.

Probióticos são micro-organismos que trazem benefícios ao seu hospedeiro, podendo apresentar efeitos imunológicos positivos ao estimular o aumento de bactérias benéficas na microbiota intestinal. Alguns estudos têm mostrado que cepas específicas de probióticos têm a capacidade de amenizar sintomas de condições médicas como Alzheimer, reduzir a ação de agentes cariogênicos e controlar diversos marcadores em mulheres na primeira metade da gravidez. Nesta direção, é importante determinar aspectos fundamentais da formação de biofilmes de probióticos, visando elaborar mecanismos de entrega mais eficientes em fármacos ou alimentos. Para tanto, intentamos fabricar plataformas tridimensionais biocompatíveis, utilizando a técnica de polimerização via absorção de dois fótons (P2F), para estudar o crescimento de filmes biológicos de *Lactobacillus sp.* e *Bifidobacterium sp.*, utilizados em probióticos comerciais. As microestruturas foram confeccionadas em resina acrílica composta por monômeros SR368, SR399 e SR499 e pelo fotoiniciador Irgacure TPO-L que, sensibilizado por feixes laser de pulso ultracurto, promove a polimerização dos monômeros acrílicos. Nesse trabalho, empregou-se um sistema laser de Ti:safira centrado em 790 nm, com largura de banda à meia-altura em torno de 50 nm, potência em torno de 250 mW, pulsos de 100 fs e taxa de repetição de 86 MHz. Fabricadas as estruturas, estudou-se primeiro a biocompatibilidade desses arcabouços com *Escherichia coli* para somente então caracterizar o desenvolvimento do biofilme. Foi possível fabricar estruturas biocompatíveis para o desenvolvimento de probióticos que demonstram antes de tudo que as microestruturas são ambientes aceleradores do desenvolvimento bacteriano. Ademais, nota-se que as bactérias têm preferência para o desenvolvimento de agregados em ambientes parcialmente abertos, em que pode haver fluxo de nutrientes, pois ambientes fechados estão mais suscetíveis à saturação populacional. Vê-se também um novo comportamento, em que as bactérias tendem a se aglomerar formando uma ligação estrutural entre paredes da estrutura, numa espécie de cortina.

Palavras-chave: Probióticos. Microambientes. Polimerização via absorção de dois fótons. Biofilmes.

ABSTRACT

MORAES, J. Q. R. **Fabrication of 3D microenvironments for the development of microorganisms.** 2023. 68 p. Dissertation (Master in Science) - São Carlos Institute of Physics, University of São Paulo, São Carlos, 2023.

Probiotics are microorganisms that bring benefits to their host and may have positive immunologic effects by stimulating the increase of beneficial bacteria of the gastrointestinal microbiota. Some studies have been showing that specific probiotic cultures can lessen symptoms of medical conditions such as Alzheimer's disease, reduce cariogenic action, and control various biomarkers in women in the first half of pregnancy diabetes. Therefore, it is important to determine fundamental aspects about the formation of probiotic biofilms, in order to create more efficient delivery mechanisms in pharmaceutical and food applications. Hence, we aim to fabricate biocompatible tridimensional platforms using the two-photon polymerization (2PP) technique in order to study the growth of biological films of *Lactobacillus sp.* and *Bifidobacterium sp.*, bacteria largely utilized in commercial probiotics. The microstructures were made of an acrylic resin composed of SR368, SR399 and SR499 monomers and the photoinitiator Irgacure TPO-L, sensitized by ultra-short laser pulses in order to promote the polymerization of acrylic monomers. In this work, a Ti:sapphire laser system centered at 790 nm, with full width at half maximum around 50 nm, 250 mW medium power, 100 fs pulses and a 86 MHz repetition rate was applied. Once the structures were fabricated, their biocompatibility was first studied with *Escherichia coli* first, characterizing the biofilm development only afterwards. Biocompatible structures were fabricated, showcasing that probiotic growth in such framework accelerates bacterial development. Furthermore, bacteria lean to originate the formation of aggregates in partially open environments, in which nutrient flux is allowed, opposed to closed environments that are susceptible to population saturation. Also, a new behavior is shown, in which the bacteria tend to agglomerate forming a structural connection between the walls of the structure, in the likeness of a curtain.

Keywords: Probiotics. Microenvironments. Two-photon polymerization. Biofilms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Diagrama de energia para a absorção de dois fótons: (a) com a mesma energia (caso degenerado), (b) com energias diferentes (caso não degenerado).....	20
Figura 2.2 - Exemplo de polimerização por condensação: (a) reagem n mols de ácido hexanodióico com n mols de etanodiol; (b) forma-se a cadeia polimérica do poliéster, restando água como subproduto.....	29
Figura 2.3 - Exemplo de polimerização por adição: (a) iniciação, pela ação do centro ativo; (b) propagação, com destaque para a extremidade ativa; (c) terminação, com a formação do polímero por combinação e por desproporcionamento.....	30
Figura 2.4 - Fluorescência por incidência de: (a) radiação UV numa cubeta, com material fluorescendo em todo caminho óptico; (b) radiação IR intensa na cubeta, confinando a fluorescência ao volume focal.....	31
Figura 2.5 - Representação de um perfil de intensidade para lasers em configurações de energia de pulso distintas, com a linha tracejada representando o limiar de polimerização. Escala de intensidade arbitrária.....	32
Figura 3.1 - Cavidade do oscilador laser empregado no sistema.....	36
Figura 3.2 - Esquema da montagem experimental da microfabricação via fotopolimerização por A2F.....	36
Figura 3.3 - Fórmula estrutural dos monômeros (a) SR368; (b) SR399; e (c) SR499, comercializados pela Sartomer.....	38
Figura 3.4 - (a) Fórmula estrutural do Irgacure TPO-L; (b) indicação do rompimento fotoquímico da ligação entre carbono e fósforo; (c) estrutura química dos radicais formados.....	40
Figura 3.5 - Ilustração do preparo das amostras de resina acrílica preparadas para o processo de P2F.....	41
Figura 4.1 - Microscopia de varredura eletrônica das estruturas do tipo favo de mel (acima) e carpete (abaixo), fabricadas com objetiva 10x, NA 0.25, e potência de fabricação 75 mW.....	44
Figura 4.2 - Microscopia de varredura eletrônica das estruturas com sulcos concêntricos (acima) e paralelos (abaixo), fabricadas com objetiva 10x, NA 0.25, e potência de fabricação 75 mW.....	45
Figura 4.3 - Em sentido horário, partindo do topo à esquerda: estrutura favo de mel distante, próxima e com detalhe para a borda dos prismas ociosos. As barras têm 100 μm . Imagens feitas com microscopia óptica.....	47
Figura 4.4 - Crescimento de bactérias em estruturas favo de mel para 24h (topo à esquerda) e 32h (topo à direita e abaixo) em escala de cinza. As barras têm 100 μm . Imagens feitas com microscopia óptica.....	49
Figura 4.5 - Microscopia de fluorescência das estruturas favo de mel para 16h (esquerda) e 32h (direita), destacando bactérias aderidas em coloração avermelhada. As barras têm 100 μm	49
Figura 4.6 - MEV para estruturas do tipo favo de mel no tempo de crescimento de 24h (acima) e 32h (abaixo), com destaque para a região das bordas das estruturas.	50

Figura 4.7 - MEV para estruturas do tipo carpete no tempo de crescimento de 16h (acima) e 24h (abaixo).....	51
Figura 5.1 - MEV do pool de probióticos nas estruturas com sulcos concêntricos (acima) e paralelos (abaixo) para um tempo de 18h de crescimento.....	54
Figura 5.2 - MEV do pool de probióticos. Aproximações distintas para a mesma amostra, com 36h de crescimento.....	55
Figura 5.3 - MEV do pool de probióticos. Aproximações distintas para a mesma amostra, com 36h de crescimento.....	56
Figura 5.4 - MEV do pool de probióticos nas estruturas com sulcos concêntricos para 12 horas (esquerda) e 24 horas (direita).....	57
Figura 5.5 - MEV do pool de probióticos nas estruturas com sulcos paralelos para 12 horas (acima) e 24 horas (abaixo).....	58
Figura 5.6 - MEV do pool de probióticos para 12 horas (esquerda) e 24 horas (direita) de crescimento.....	59

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
2.1	Contextualização histórica.....	19
2.2	Fundamentos da interação da luz com a matéria.....	21
2.2.1	Absorção linear.....	25
2.2.2	Absorção de dois fótons.....	26
2.3	Aspectos gerais de fotopolimerização.....	28
2.4	Aspectos biológicos.....	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1	Aparato experimental.....	35
3.2	Monômeros acrílicos.....	38
3.3	Fotoiniciador Irgacure TPO-L.....	39
3.4	Preparo da amostra.....	40
3.5	Limpeza da amostra.....	41
4	ESTRUTURAS FABRICADAS E TESTES DE BIOCOMPATIBILIDADE.....	43
4.1	Plataformas confeccionadas.....	43
4.2	Testes de biocompatibilidade.....	46
5	CRESCIMENTO DE PROBIÓTICOS.....	53
5.1	Primeira fase de crescimento.....	53
5.2	Segunda fase de crescimento.....	54
5.3	Terceira fase de crescimento.....	57
5.4	Contraprova das hipóteses aventadas.....	58
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	61
	REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

Por anos a Fotônica tem permitido a criação de novas tecnologias nas mais diversas áreas, desde telecomunicações até a biologia.¹⁻² Sendo um ramo de pesquisa na Física Aplicada extremamente prolífico, a Fotônica está intimamente ligada à Óptica Não Linear (ONL), área da Física que estuda interações da luz com a matéria no regime de alta intensidade luminosa. Processos dessa natureza estão sendo explorados não somente na espectroscopia não linear,³ mas também no processamento de materiais a laser.⁴ Ademais, métodos de fabricação que utilizam lasers tem sido empregados na construção de diversos dispositivos graças à suas vantagens de processamento, uma vez que são técnicas diretas, sem a necessidade de empregar máscaras ou etapas intermediárias.⁵⁻¹⁰

Em geral, técnicas de polimerização multifotônica começam com uma amostra líquida, isto é, uma resina polimérica,¹¹ para a partir daí construir os dispositivos desejados. A essa resina costuma-se adicionar um fotoiniciador, que nada mais é do que um composto químico responsável por absorver a energia da luz e dar início ao processo de polimerização. Para tanto, a intensidade do pulso de laser de femtosegundos deve ser alta o suficiente para que a polimerização ocorra no volume focal do feixe de luz posicionado sobre a amostra.

Técnicas de polimerização por absorção de dois fótons (P2F) estão sendo empregadas com vistas a fabricar aparatos com aplicações numa plethora de áreas do conhecimento, tendo adquirido relevância nos anos mais recentes. Sua utilização tornou-se notável na produção de microdispositivos biomédicos, tais quais microagulhas¹² e microválvulas.¹³ Além disso, plataformas biocompatíveis destinadas a estudos biológicos tem sido construídas para investigar o desenvolvimento de organismos eucariontes e procariontes nos ambientes microfabricados.¹⁴⁻²³ Plataformas foram criadas para avaliar o desenvolvimento de bactérias,²⁴ de células²⁵ e até mesmo de nematódeos *Caenorhabditis elegans*.²⁶ O Grupo de Fotônica do IFSC/USP estudou o desenvolvimento de células tumorais (MCF-7) em estruturas poliméricas de geometrias diversas,²⁷ bem como o desenvolvimento de *Escherichia coli* em microambientes funcionalizados com o antibiótico ciprofloxacina.²⁸

Recentemente, bactérias probióticas tem chamado a atenção, em virtude de serem microorganismos quem implicam em efeitos imunológicos positivos em seu hospedeiro, se administradas corretamente^[29]. Sua importância reside em, entre outras ações, influir imunologicamente ao estimular o aumento de bactérias benéficas na microbiota intestinal, em detrimento da presença de microorganismos potencialmente maléficos, conseqüentemente reforçando o sistema imune do hospedeiro.²⁹ Tais bactérias probióticas secretam compostos

antibióticos à medida em que prevalecem na flora intestinal, inibindo a ação de patógenos no trato digestivo humano, um reflexo do amensalismo e da competição intraespecífica.

Bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são comumente usadas como probióticos, ocorrendo naturalmente na microbiota intestinal humana.²⁹ Estudos têm mostrado que o consumo de cepas específicas desses probióticos ajudam a controlar níveis de insulina e triglicérides e a suprimir biomarcadores inflamatórios e de estresse oxidativo em mulheres na primeira metade da gravidez,³⁰ ajudam a reduzir a presença de agentes cariogênicos,³¹ e possivelmente ajudam a melhorar a cognição em pacientes com Alzheimer.³²

Vários mecanismos biológicos têm sido apontados como os que os probióticos tomam parte e que porventura viriam a ter efeitos positivos associados. Pode-se nomear alguns, tais quais: melhor digestibilidade, em virtude da degradação parcial de proteínas, lipídeos e carboidratos pelos probióticos; melhor valor nutricional, com maiores níveis de vitaminas do complexo B e aminoácidos metionina, lisina e triptofano; ação anticancerígena, devido tanto ao estímulo do sistema imunológico como à quebra de compostos potencialmente cancerígenos; ação hipocolesterolêmica, com a produção de inibidores da síntese de colesterol.³³

Com vistas no vasto potencial para o desenvolvimento de microorganismos em microambientes biocompatíveis fabricados via P2F, nessa dissertação, objetivamos estudar o comportamento de bactérias probióticas nesses ambientes. Mais precisamente, almejamos produzir microestruturas poliméricas, fabricadas via polimerização por absorção de dois fótons, que nos ajudem a compreender a formação de biofilmes de probióticos *Lactobacillus sp*, pretendendo avaliar seu desenvolvimento e porventura propor novos métodos de entrega.

Os capítulos seguintes dessa dissertação tem a seu encargo elaborar em maior detalhe a fundamentação teórica do fenômeno físico compreendido nesse trabalho (2), bem como discutir mais a fundo as minúcias do procedimento experimental, descrevendo o aparato utilizado, as substâncias químicas e técnicas de preparo, fabricação e análise das amostras (3). Em seguida, as estruturas confeccionadas e as análises preliminares de biocompatibilidade serão exibidas e discutidas (4), detalhando em capítulo seguinte o crescimento de bactérias probióticas propriamente ditas (5). Por fim, são apresentadas as conclusões e perspectivas que se podem derivar desse trabalho (6).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O fascínio oriundo da capacidade de modificar compostos e criar novos materiais e novas técnicas tem sido o motor para o desenvolvimento de novas tecnologias ao longo de toda a história. E não seria diferente com o processamento de materiais a laser, haja vista a ampla gama de aplicações, técnicas e materiais que tem sido empregados e criados com base nesta técnica que é tão precisa, rápida e versátil. Sua aplicabilidade se estende desde os ramos da biomedicina, passando a óptica e telecomunicações e chegando até nanorrobótica.³⁴ Tal vastidão de aplicações baseia-se justamente na capacidade que o processamento de materiais a laser ter alternativas disponíveis conforme o propósito da aplicação que se deseja fabricar, os materiais que serão a base da estrutura fabricada, o processo empregado na fabricação propriamente dita ou ainda o pós-processamento das estruturas.

O desenvolvimento de dispositivos miniaturizados, em escala micrométrica ou nanométrica, tem a polimerização via absorção de dois fótons (PDF), ou *two-photon polymerization*, bem como a microestruturação direta a laser, ou *direct-write laser micromachining* como umas das principais técnicas. Neste sentido, o intuito deste Capítulo é o de apresentar os aspectos fundamentais, tanto teóricos quanto experimentais dessas técnicas, abordando aspectos históricos, físicos, químicos e biológicos.

2.1 Contextualização histórica

Desde a descoberta e subsequente estudo da natureza eletromagnética da luz, muitas têm sido suas aplicações em usos cotidianos. Ademais, a descoberta da natureza quântica fez com que ainda mais fenômenos da interação da luz com a matéria fossem descritos, alguns sem precedentes. Uma dessas tantas interações descritas foi a da absorção da luz por um elétron ligado a um átomo.

Albert Einstein foi pioneiro ao descrever de forma rigorosa como operam as taxas de transição entre níveis eletrônicos de um átomo em situações de absorção e emissão.³⁵ Contudo, essa ainda era uma descrição de um fenômeno mais palpável, que apesar de abstrato ainda estava próximo da realidade. Anos depois, Maria Göppert-Mayer descreve a possibilidade de dois fótons serem absorvidos simultaneamente por um mesmo átomo em sua tese de doutorado, em 1931.³⁶

Tal fato, porém, permaneceu teorizado por anos até que somente após a criação do laser por Theodore Maiman, em 1960,³⁷ foi possível obter uma fonte de luz com intensidade

luminosa suficiente para observar a absorção de dois fótons (A2F). Tal feito se deu no ano seguinte à invenção do laser, por Kaiser e Garret³⁸ que induziram a fluorescência em um cristal de $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{+2}$ por um processo de absorção de dois fótons.

Conforme sugerido pelo nome, a absorção de dois fótons ocorre quando há transição eletrônica entre estados eletrônicos distintos devido à absorção quase simultânea de dois fótons, com energia idêntica ou não. Mais detalhadamente, aquilo que ordinariamente se denomina absorção simultânea é, na verdade, um processo que se dá dentro de um curto intervalo de tempo governado pelo princípio de incerteza de Heisenberg. Dois fótons que interagem com o elétron no átomo têm um intervalo de tempo de $\hbar/2\Delta E$, em que \hbar é a constante de Planck e ΔE é a diferença de energia entre o estado virtual e o estado excitado mais próximo do material, para promover a transição eletrônica.³⁹

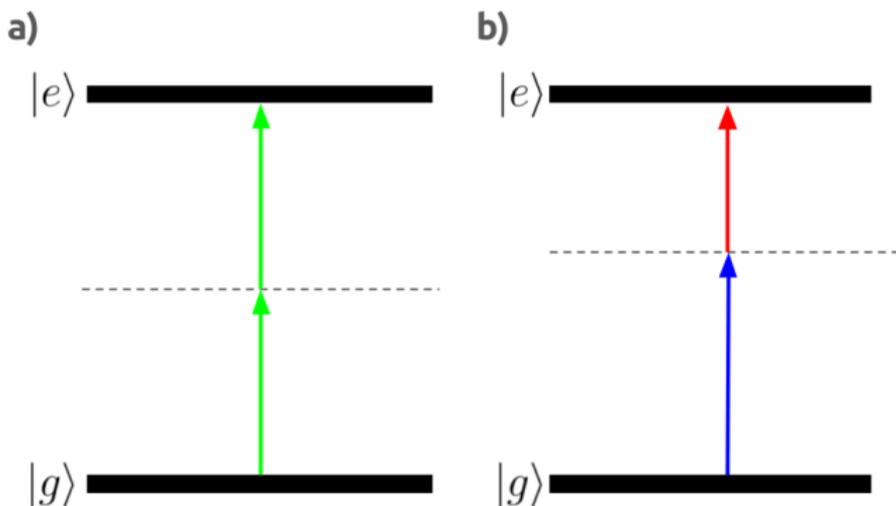


Figura 2.1 - Diagrama de energia para a absorção de dois fótons: (a) com a mesma energia (caso degenerado), (b) com energias diferentes (caso não degenerado).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nesse sentido, a absorção dos dois fótons não necessita ser estritamente simultânea, desde que ocorra no intervalo dado, e depende da energia do primeiro fóton que chega no átomo ou molécula, pois é ele que determinará o estado virtual do elétron. Valores típicos para o intervalo de tempo são da ordem de femtossegundos e, portanto, por simplicidade e para os efeitos desse trabalho, consideraremos esse tipo de evento como sendo simultâneo.⁴⁰ A Figura 2.1 ilustra os casos degenerado e não degenerado da A2F, mostrando o gap energético entre o estado fundamental $|g\rangle$ e o estado excitado $|e\rangle$, com as setas indicando a energia de cada fóton, cada cor sendo associada a uma energia diferente. A linha tracejada indica o estado virtual que o elétron ocupa momentaneamente.

2.2 Fundamentos da interação da luz com a matéria

De modo a fundamentar melhor o aspecto físico do fenômeno da A2F, partiremos das equações de Maxwell na matéria, conforme apresentadas por Griffiths⁴¹, e expressas como:

$$\nabla \cdot \mathbf{D} = \rho \quad \nabla \times \mathbf{E} = -\frac{\partial \mathbf{B}}{\partial t} \quad \nabla \cdot \mathbf{B} = 0 \quad \nabla \times \mathbf{H} = \mathbf{J} + \frac{\partial \mathbf{D}}{\partial t}, \quad (2.1)$$

em que

$$\mathbf{D} = \epsilon \mathbf{E} + \mathbf{P} \quad \mathbf{H} = \frac{\mathbf{B}}{\mu} - \mathbf{M}, \quad (2.2)$$

com \mathbf{E} sendo o campo elétrico, \mathbf{D} o campo de deslocamento, \mathbf{H} o campo magnético, \mathbf{B} a densidade de fluxo magnético, \mathbf{J} a densidade de corrente elétrica, \mathbf{M} a magnetização, \mathbf{P} a polarização, ρ a densidade de cargas na matéria, e ϵ e μ são a permitividade elétrica e a permeabilidade magnética do meio, respectivamente.

Para o caso de um meio material sem cargas ou correntes, obtemos as expressões simplificadas

$$\nabla \cdot \mathbf{E} = 0 \quad \nabla \times \mathbf{E} = -\frac{\partial \mathbf{B}}{\partial t} \quad \nabla \cdot \mathbf{B} = 0 \quad \nabla \times \mathbf{B} = \mu_0 \epsilon_0 \frac{\partial \mathbf{E}}{\partial t}, \quad (2.3)$$

em que ϵ_0 e μ_0 são, respectivamente, a permitividade elétrica e a permeabilidade magnética do vácuo. Tomando o rotacional de $\nabla \times \mathbf{E}$, por exemplo, nos concede a equação de onda, que por fim dá a expressão para a velocidade da luz, da forma $c = 1/\sqrt{\mu_0 \epsilon_0}$.

Em mecânica quântica, porém, é mais conveniente trabalhar com potenciais. Para tanto, usaremos os potenciais vetor e escalar do eletromagnetismo, $\mathbf{A}(\mathbf{r}, t)$ e $\phi(\mathbf{r}, t)$ respectivamente.

Dizemos que

$$\mathbf{B} = \nabla \times \mathbf{A} \quad \mathbf{E} = -\nabla \phi - \frac{\partial \mathbf{A}}{\partial t}, \quad (2.4)$$

apenas destacando que essa definição é não unívoca por invariância de calibre. Para nossos cálculos, escolheremos o calibre de Coulomb com $\nabla \cdot \mathbf{A} = 0$ e $\phi = 0$. Essa é uma escolha peculiar uma vez que a partir das equações de Maxwell, temos apenas o potencial vetor nos é desconhecido.

Lançando mão do calibre de Coulomb e combinando as equações em (2.3) e última das equações de Maxwell em (2.4), obtemos

$$\nabla \times (\nabla \times \mathbf{A}) = -\frac{1}{c^2} \frac{\partial}{\partial t} \left(\frac{\partial \mathbf{A}}{\partial t} \right) \quad (2.5)$$

Matematicamente, o rotacional de um rotacional é dado por

$$\nabla \times (\nabla \times \mathbf{A}) = \nabla(\nabla \cdot \mathbf{A}) - \nabla^2 \mathbf{A} \quad (2.6)$$

e como do calibre de Coulomb, por definição, $\nabla \cdot \mathbf{A} = 0$, as equações (2.5) e (2.6) combinadas fornecem a equação de onda.

$$\nabla^2 \mathbf{A} = \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 \mathbf{A}}{\partial t^2} \quad (2.7)$$

A partir do *ansatz* geral

$$\mathbf{A}(\mathbf{r}, t) = \sum_m \left(\frac{\hbar}{2\omega_m \epsilon_0} \right)^{1/2} [a_m(t) \mathbf{u}_m(\mathbf{r}) + a_m^*(t) \mathbf{u}_m^*(\mathbf{r})], \quad (2.8)$$

em que m é o número do modo de vibração, \hbar é a constante de Planck reduzida, ω_m é a frequência angular do modo m , e $a_m(t)$ e $\mathbf{u}_m(\mathbf{r})$ são funções que separam a dependência temporal e espacial de $\mathbf{A}(\mathbf{r}, t)$, respectivamente. Este *ansatz* aplicado à equação de onda (2.7) nos dá

$$\nabla^2 \mathbf{u}_m(\mathbf{r}) + \frac{\omega_m^2}{c^2} \mathbf{u}_m(\mathbf{r}) = 0 \quad (2.9)$$

$$\frac{\partial^2}{\partial t^2} a_m(t) + \omega_m^2 a_m(t) = 0 \quad (2.10)$$

que tem por soluções

$$\mathbf{u}_m(\mathbf{r}) = \frac{1}{\sqrt{V}} e^{i \mathbf{k}_m \cdot \mathbf{r}} \hat{e}_m \quad (2.11)$$

$$a_m(t) = a_m e^{-i\omega_m t} \quad (2.12)$$

com a_m sendo um operador, melhor discutido adiante, V sendo o volume do modo, \mathbf{k}_m sendo o vetor de onda do modo m , e \hat{e}_m sendo o versor polarização do modo m .

Uma propriedade particular que surge dessa solução, e particularmente da equação (2.11) é a de que

$$\int_V \mathbf{u}_m^*(\mathbf{r}) \mathbf{u}_n(\mathbf{r}) d\mathbf{r}^3 = \delta_{mn} \quad (2.13)$$

com δ_{mn} sendo o delta de Kronecker. Vale notar que a função $\mathbf{u}_m(\mathbf{r})$ é determinada com base nas condições de contorno do problema, com solução senoidal para o caso de cavidades e um decaimento exponencial para o espaço livre.

Considerando duas polarizações ortogonais no plano $\hat{e}_m \cdot \hat{k}_m = 0$, determinado pelo campo elétrico e o vetor de onda, e dois modos de oscilação para cada frequência, as condições de contorno nos fornecerão

$$\mathbf{A}(\mathbf{r}, t) = \sum_m \left(\frac{\hbar}{2\omega_m \varepsilon_0 V} \right)^{1/2} [a_m e^{i[\mathbf{k}_m \cdot \mathbf{r} - \omega_m t]} + a_m^\dagger e^{-i[\mathbf{k}_m \cdot \mathbf{r} - \omega_m t]}]. \quad (2.14)$$

Dadas as relações do potencial vetor com o campo elétrico e o campo magnético, evocadas na equação (2.4), temos

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}, t) = i \sum_m \left(\frac{\hbar \omega_m}{2\varepsilon_0 V} \right)^{1/2} [a_m e^{i[\mathbf{k}_m \cdot \mathbf{r} - \omega_m t]} - a_m^\dagger e^{-i[\mathbf{k}_m \cdot \mathbf{r} - \omega_m t]}] \hat{e}_m, \quad (2.15)$$

$$\mathbf{B}(\mathbf{r}, t) = -\frac{i}{c} \sum_m \left(\frac{\hbar \omega_m}{2\varepsilon_0 V} \right)^{1/2} [a_m e^{i[\mathbf{k}_m \cdot \mathbf{r} - \omega_m t]} - a_m^\dagger e^{-i[\mathbf{k}_m \cdot \mathbf{r} - \omega_m t]}] \hat{e}_m \times \hat{k}_m \quad (2.16)$$

Relacionando a energia encontrada pelo operador Hamiltoniano H com a definição clássica da energia eletromagnética, obtemos

$$H = \frac{1}{2} \int \epsilon_0 \mathbf{E}^2 + \frac{1}{\mu_0} \mathbf{B}^2 dV. \quad (2.17)$$

que dos resultados obtidos em (2.15) e (2.16) fornece

$$H_{EM} = \sum_m^\infty \hbar \omega_m (a_m a_m^\dagger + a_m^\dagger a_m). \quad (2.18)$$

É possível verificar que a_m e a_m^\dagger são os operadores de aniquilação e criação, conhecidos conjuntamente como operadores escada, no que chamamos de quantização do campo eletromagnético, apontando para o fato de que a luz tem natureza oscilatória harmônica. Tais operadores são peculiares e seu comutador é da forma $[a_m, a_n^\dagger] = \delta_{mn}$. O Hamiltoniano, nesse caso, pode ser dado por:

$$H_{EM} = \sum_m^\infty \hbar \omega_m (a_m^\dagger a_m + \frac{1}{2}). \quad (2.19)$$

Na modelagem do nosso problema, é possível ir um passo além e modelar a teoria de perturbação, conforme feito por Boyd⁴². Separaremos o Hamiltoniano $H(t)$ como uma composição de uma parte temporalmente independente e outra dependente, isto é, o hamiltoniano do átomo livre H_{EM} e a perturbação $U(t)$, respectivamente. Isso se dá da forma:

$$H(t) = H_{EM} + U(t) \quad (2.20)$$

Para autofunções do tipo

$$|\psi\rangle(t) = \sum_n c_n(t) |n\rangle e^{-\frac{iE_n^{(0)}t}{\hbar}}, \quad (2.21)$$

com $|n\rangle$ sendo o n -ésimo estado de Fock, $c_n(t)$ o coeficiente da autofunção no estado n , e $E_n^{(0)}$ a energia do n -ésimo estado do Hamiltoniano não perturbado.

A equação de Schrödinger para autofunções desse tipo nos fornece

$$i\hbar \frac{d}{dt} c_k(t) = \sum_n c_n(t) U_{kn} e^{i\omega_{kn}t}, \quad (2.22)$$

em que $\omega_{kn} \equiv (E_k^{(0)} - E_n^{(0)})/\hbar$ é a frequência angular associada ao gap de energia entre os estados $|k\rangle$ e $|n\rangle$, e U_{kn} é o potencial associado a esses mesmos estados.

Temos então um sistema de equações diferenciais acopladas para o qual a solução geral será dada por intermédio de uma série de Dyson. Com vistas a facilitar os cálculos, é possível lançar mão de uma aproximação por teoria da perturbação. Para um parâmetro de expansão λ , variando entre 0 e 1, temos

$$c_k(t) = c_k^{(0)}(t) + \lambda c_k^{(1)}(t) + \lambda^2 c_k^{(2)}(t) + \dots \quad (2.23)$$

em que $c_k^{(j)}$ é o coeficiente de função de onda para o k -ésimo estado na j -ésima ordem.

Pela equação (2.22), essa aproximação resulta em

$$i\hbar \frac{d}{dt} c_k^{(N)}(t) = \sum_n c_k^{(N-1)}(t) V_{kn} e^{i\omega_{kn}t}. \quad (2.24)$$

com $N = 1, 2, 3, \dots$, cada N relacionado a uma ordem de perturbação e, no nosso caso, ao número de fótons absorvidos simultaneamente, conforme a distinção já mencionada acerca do princípio de incerteza de Heisenberg.

2.2.1 Absorção linear

Para o caso de absorção linear, temos $N = 1$, e fazemos algumas suposições. A primeira é a de que, na ausência de luz, o átomo se encontra no estado fundamental $|g\rangle$, o que implica $c_k^{(0)}(0) = \delta_{gk}$. A segunda é a de que o potencial perturbativo pode ser modelado em função do dipolo de momento elétrico μ_{kn} e do campo elétrico do fóton incidente, da forma

$$U_{kn} = -\mu_{kn}(Ee^{-i\omega t} + E^*e^{i\omega t}) \quad (2.25)$$

para uma fonte de luz monocromática com frequência ω e amplitude do campo elétrico E .

Assim, da Eq. (2.24), temos

$$c_k^{(1)}(t) = \frac{\mu_{kn}E}{\hbar(\omega_{kn}-\omega)} [e^{i(\omega_{kn}-\omega)t} - 1] + \frac{\mu_{kn}E^*}{\hbar(\omega_{kn}+\omega)} [e^{i(\omega_{kn}+\omega)t} - 1]. \quad (2.26)$$

O primeiro termo se trata de um termo ressonante, isto é, fica tão maior quanto mais a frequência ω_{kn} , associada ao gap energético entre os estados $|k\rangle$ e $|n\rangle$, se aproxima da frequência da luz incidente ω . O segundo termo se relaciona à emissão estimulada de luz e, para o propósito desse trabalho, pode ser negligenciado.

2.2.2 Absorção de dois fótons

Uma vez que partimos para a resolução do caso em que $N = 2$, na absorção de dois fótons, estaremos interessados apenas nos termos relacionados à absorção de luz. Sendo assim, em face do que foi visto anteriormente, passaremos a tratar o potencial perturbativo apenas como $U_{kn} \cong -\mu_{kn}Ee^{-i\omega t}$.

Destarte, pela equação (2.24), obtemos

$$\frac{d}{dt} c_k^{(2)}(t) = -\frac{i}{\hbar} \sum_n c_k^{(1)}(t) U_{kn} e^{i\omega_{kn}t} = \frac{i}{\hbar} \sum_n \frac{\mu_{kn}\mu_{ng}E^2}{\hbar(\omega_{ng}-\omega)} [e^{i(\omega_{kg}-2\omega)t} - e^{i(\omega_{nk}-\omega)t}], \quad (2.27)$$

sendo possível negligenciar o segundo termo, que corresponde a uma resposta transiente não relacionada com a absorção de dois fótons.

Integrada, a equação diferencial fornece

$$c_k^{(2)}(t) = \sum_n \frac{\mu_{kn}\mu_{ng}E^2}{\hbar^2(\omega_{ng}-\omega)} \left[\frac{e^{i(\omega_{ng}-2\omega)t} - 1}{(\omega_{kg}-2\omega)} \right]. \quad (2.28)$$

A probabilidade de que um elétron esteja num estado $|k\rangle$ num tempo arbitrário é dada por

$$p_k^{(2)}(t) = |c_k^{(2)}(t)|^2 = \left| \sum_n \frac{\mu_{kn}\mu_{ng}E^2}{\hbar^2(\omega_{ng}-\omega)} \left[\frac{e^{i(\omega_{ng}-2\omega)t} - 1}{(\omega_{kg}-2\omega)} \right] \right|^2, \quad (2.29)$$

que para tempos longos se torna

$$p_k^{(2)}(t) = \left| \sum_n \frac{\mu_{kn}\mu_{ng}E^2}{\hbar^2(\omega_{ng}-\omega)} \right|^2 2\pi t \delta(\omega_{kg} - 2\omega). \quad (2.30)$$

Considerando k não como um estado em específico, mas como uma densidade de estados, a probabilidade de encontrá-lo então é mais geral e dada por

$$p_k^{(2)}(t) = \left| \sum_n \frac{\mu_{kn}\mu_{ng}E^2}{\hbar^2(\omega_{ng}-\omega)} \right|^2 2\pi t \rho_f(\omega_{kg} = 2\omega), \quad (2.31)$$

em que $\rho_f(\omega_{kg} = 2\omega)$ é a densidade de estados finais, modelada por uma Lorentziana.

Uma vez que a probabilidade cresce linearmente com o tempo, é possível definir uma taxa de transição para o nível superior associada à intensidade luminosa, dada por

$$W_{kg}^{(2)}(t) = \frac{p_k^{(2)}(t)}{t} \equiv \sigma_{kg}^{(2)}(\omega) I^2, \quad (2.32)$$

possível também de ser definida em função do produto da seção de choque de absorção de dois fótons $\sigma_{kg}^{(2)}(\omega)$ e da intensidade luminosa $I = 2n\epsilon_0 c |E|^2$.

Uma vez que a intensidade é proporcional ao inverso do quadrado do diâmetro do feixe luminoso, temos que ela será tão maior quanto menor for o diâmetro do feixe. Em outras palavras, dado que estaremos focalizando um laser de pulsos ultracurtos através de uma lente objetiva, a região de elevada intensidade ocorrerá apenas próximo do volume focal do feixe.

Finalmente, escrevemos a expressão para essa seção de choque de absorção de dois fótons como sendo

$$\sigma_{kg}^{(2)}(\omega) = \frac{1}{4n^2\epsilon_0^2 c^2} \left| \sum_n \frac{\mu_{kn}\mu_{ng}}{\hbar^2(\omega_{ng}-\omega)} \right|^2 2\pi \rho_f(\omega_{kg} = 2\omega). \quad (2.33)$$

Enquanto uma sessão de choque ordinária é dada em unidades de área, a sessão de choque de absorção de dois fótons é dada em Göppert-Mayers (GM), unidade equivalente a $10^{-58} \text{ m}^4/\text{s}/\text{fóton}$ em unidades do sistema internacional.⁸ Essa ordem de magnitude tão baixa está associada à natureza dependente de altas intensidades luminosas, bem como de sua relação com o quadrado da intensidade para dar origem à taxa de transição.

A partir da seção de choque de absorção de dois fótons é possível construir o coeficiente de absorção de dois fótons, necessário para construir uma expressão mais geral para o coeficiente de absorção que leve em conta a parte linear e não linear. Tal expressão é dada por

$$\alpha = \alpha_0 + \beta I, \quad (2.34)$$

em que α_0 é o coeficiente de absorção linear, β é o coeficiente de absorção de dois fótons e I é a intensidade luminosa. Para o fotoiniciador utilizado nesse trabalho, o coeficiente de absorção não linear é $0,0025 \text{ cm/GW}$.⁴³

2.3 Aspectos gerais de fotopolimerização

Os principais aspectos físicos e propriedades mecânicas de uma dada substância polimérica são governados por sua estrutura química, sendo que sua organização supermolecular dependerá, em última instância, da organização em nível polimérico da molécula.⁴⁴ Deste modo, é possível afirmar que polímeros são compostos químicos orgânicos que possuem alto peso molecular, resultantes da concatenação de diversos grupos recorrentes, chamados de meros, conectados entre si por meio de ligações químicas.⁴⁴⁻⁴⁵ Assim sendo, um polímero real é uma mistura de diferentes macromoléculas com distintas massas moleculares, existindo como estruturas lineares, ramificadas ou reticuladas.⁴⁴

A reação que dá origem a esses compostos de interesse é denominada polimerização, sendo que os produtos dessas reações se classificam nestes três grupos principais: termofixos, termoplásticos e elastômeros. Os termofixos são formados por longas cadeias orgânicas ramificadas e não se comportam bem ao serem aquecidos, deteriorando-se em vez de fundir. Por outro lado, eles apresentam maior rigidez e resistência se comparados aos termoplásticos, que também são compostos por cadeias orgânicas longas, ramificadas ou lineares, mas fracamente ligadas entre si, com ligações de van der Waals. Isso lhes confere a capacidade de

serem dúcteis mecanicamente plásticos, sendo também facilmente recicláveis. Por fim, os elastômeros, aos quais normalmente nos referimos como borrachas, têm como característica principal o fato de sua deformação elástica ser muito alta, facilmente superior a 200%, deformando-se de forma reversível. Os elastômeros podem tanto ser termoplásticos como termofixos pouco reticulados.^{40,45}

Quanto ao mecanismo da reação, podemos classificá-lo como de adição ou de condensação.⁴³⁻⁴⁶ A polimerização por condensação costuma formar pequenas moléculas como subprodutos da reação, a saber, água, metanol, etanol, entre outras, conforme ilustrado pela Fig. 2.2. Apesar de apresentar como resultado da reação estruturas com propriedades um tanto quanto similares, essa reação é mais lenta que a polimerização por adição.⁴⁶

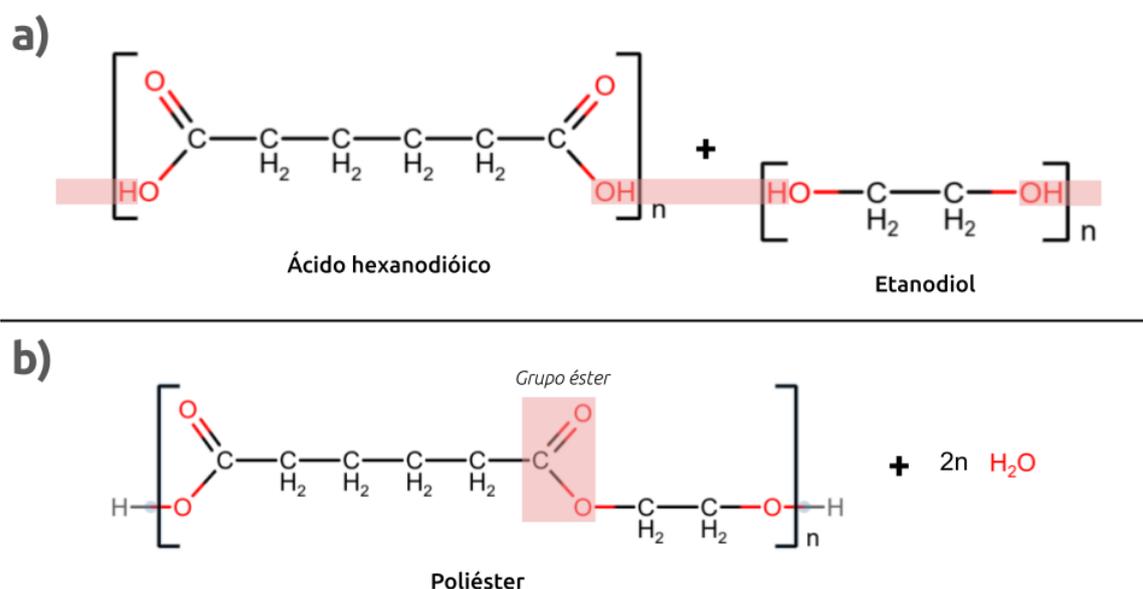


Figura 2.2 - Exemplo de polimerização por condensação: (a) reagem n mols de ácido hexanodíico com n mols de etanodiol; (b) forma-se a cadeia polimérica do poliéster, restando água como subproduto.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na polimerização por adição, os monômeros são unidos sequencialmente, como numa cadeia, sem a existência de subprodutos na reação. Assim, o polímero resultante tem como fórmula química um múltiplo exato da fórmula química dos seus meros. É possível subdividir essa reação em três etapas, a saber: iniciação, propagação e terminação, ilustradas na Fig. 2.3.

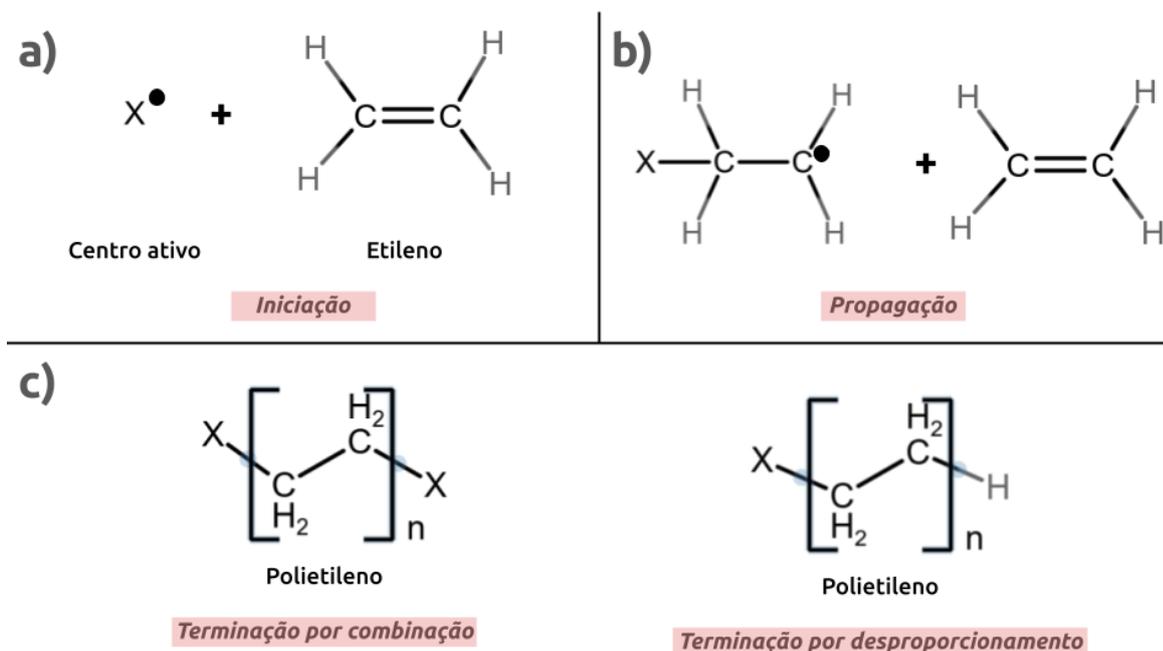


Figura 2.3 - Exemplo de polimerização por adição: (a) iniciação, pela ação do centro ativo; (b) propagação, com destaque para a extremidade ativa; (c) terminação, com a formação do polímero por combinação e por desproporcionamento.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em sua primeira etapa, um iniciador reage com uma unidade monomérica e forma um centro ativo, podendo o iniciador ser um radical livre, um cátion ou um ânion.⁴⁷ A propagação, como o próprio nome sugere, se resume à sucessiva adição de monômeros à cadeia polimérica, que propaga sua extremidade ativa ao reagir com os meros ainda não reagidos e fazendo com que a cadeia cresça. Por fim, a terminação pode ocorrer de três formas: por combinação, por desproporcionamento ou pelo centro ativo. A combinação ocorre no encontro das extremidades ativas de duas cadeias poliméricas reagentes, enquanto que o desproporcionamento se dá com a transferência de um átomo de hidrogênio da cadeia em crescimento para um centro ativo e a terminação por centro ativo, quando o centroativo se fixa ao fim da cadeia.

A técnica da fotopolimerização nasce quando o centro ativo (radical livre, ânion ou cátion) que terá como papel o desencadeamento de uma reação por adição surge da degradação de um composto químico pela ação de um ou mais fótons. Trata-se, portanto, de um processo fotoquímico guiado por um composto que denominamos fotoiniciador, comumente solubilizado em uma mistura de monômeros acrílicos insaturados líquidos.

Uma vez exposto à ação de lasers de alta intensidade, o fotoiniciador realiza a absorção dos fótons e dá início à reação de polimerização da resina pelo método da adição. Sendo assim, vários estudos acerca do uso de lasers de femtosegundos para a fabricação de estruturas poliméricas em microescala têm sido conduzidos,⁴⁸ abordando especialmente, mas não restritamente, suas aplicações biológicas.⁴⁹

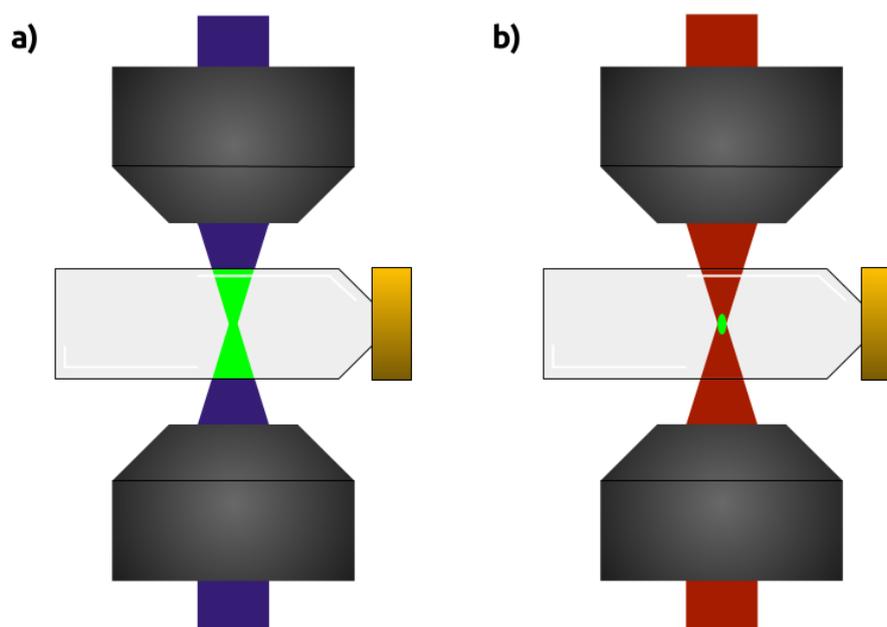


Figura 2.4 - Fluorescência por incidência de: (a) radiação UV numa cubeta, com material fluorescendo em todo caminho óptico; (b) radiação IR intensa na cubeta, confinando a fluorescência ao volume focal.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A maior vantagem de se empregar P2F está no seu alto confinamento espacial da reação fotoquímica, como ilustrado na Fig. 2.4. Enquanto a absorção linear ocorre em todo o caminho óptico dentro do material, a A2F fica contida dentro do volume focal do feixe laser, que é focalizado por uma objetiva de microscópio.

Uma vez que a taxa de absorção de dois fótons depende do produto entre a seção de choque de absorção de dois fótons e do quadrado da intensidade luminosa, conforme visto na equação (2.32), a polimerização fica confinada a um volume elipsoidal em torno do foco, ao qual damos o nome de *voxel*. O *voxel* é a menor unidade tridimensional de resolução de um processo de P2F, e seu tamanho afetará diretamente a resolução espacial das estruturas construídas no que tange à sua rugosidade. O uso de diferentes objetivas de microscópio com aberturas numéricas (NA) e distâncias de trabalho (w.d.) distintas afetará drasticamente o resultado da polimerização.⁴⁰ Em nosso sistema, que será descrito em detalhes posteriormente, o *voxel* tem um diâmetro de 2 μm e uma altura de 5 μm , aproximadamente.

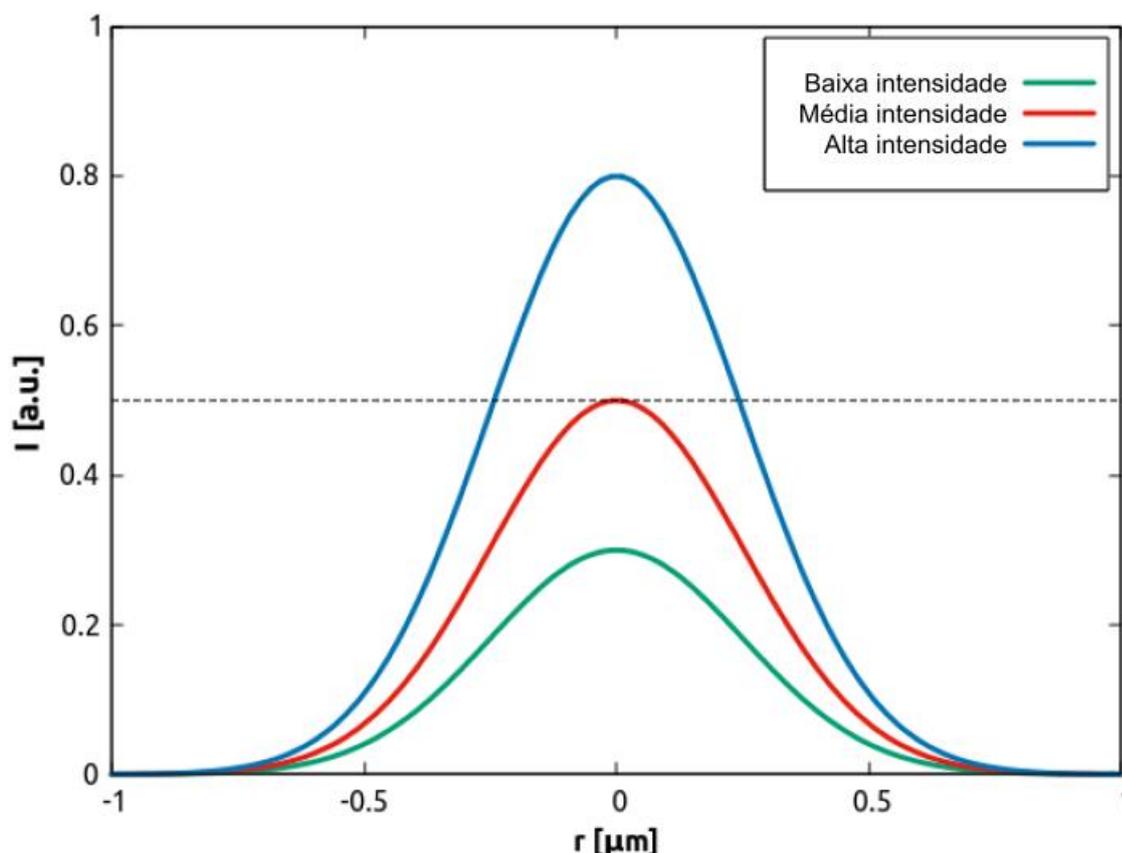


Figura 2.5 – Representação de um perfil de intensidade para lasers em configurações de energia de pulso distintas, com a linha tracejada representando o limiar de polimerização. Escala de intensidade arbitrária.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Outro fator relevante é o limiar de polimerização, ilustrado na Fig. 2.5. Ele está intimamente ligado à energia de ativação da reação de polimerização e pode ser descrito como o menor valor de intensidade luminosa para o qual a energia fornecida é capaz de desencadear a reação desejada. Assim, para valores menores ou iguais a esse limiar, energia luminosa suficiente não é fornecida e a polimerização não ocorre. Valores típicos do limiar de polimerização utilizados nesse trabalho são em torno de 0,87 nJ.

2.4 Aspectos biológicos

Após a fabricação e caracterização estrutural das plataformas, é necessário realizar testes de biocompatibilidade, o que se constitui numa etapa crucial deste trabalho. Sendo os fotoiniciadores compostos reativos, se após a fabricação ainda houver moléculas não convertidas em radicais livres, bem como radicais que porventura não desencadearam P2F, estes poderão ser danosos à função celular dos microorganismos estudados.⁴⁹

De modo a verificar a biocompatibilidade das estruturas, uma forma de se avaliar se a técnica e a resina acrílica propostas são viáveis é inocular *Escherichia coli* nas estruturas e acompanhar seu desenvolvimento. Por meio tanto de imagens de microscopia óptica como de microscopia de varredura eletrônica é possível avaliar a permanência das bactérias nos microambientes. Em caso positivo, isso será um sinal de que os probióticos terão elevado potencial de também prosperar nesse ambiente, uma vez que *E. coli* e bactérias probióticas compartilham do mesmo nicho ecológico.⁵⁰

Bactérias tanto do gênero *Lactobacillus* quanto do gênero *Bifidobacterium* são probióticos comumente encontrados na microbiota intestinal dos seres humanos.⁵¹ Ao longo do trato digestivo humano, elas estão sujeitas a ambientes com pH agressivo, à resposta imunológica do hospedeiro, e até mesmo à competição interespecífica de outros agentes bióticos. Em face a essas adversidades, é comum que bactérias de uma espécie agreguem-se num biofilme em vez de permanecerem solitárias. Um biofilme é um agregado de bactérias que produzem uma matriz extracelular amorfa feita de proteínas, lipídios, oligossacarídeos e até mesmo DNA, agindo como uma camada protetora que preserva a comunidade de maneira mais eficiente.⁵²⁻⁵³ Comumente, essa forma de colonização ocorre quando se dá a adesão entre bactéria e tipos específicos de células epiteliais, a exemplo da mucosa intestinal.⁵⁴

Em se tratando da cultura de bactérias em laboratório, matrizes sintéticas vêm sendo utilizadas para estudar o comportamento de micro-organismos em diferentes geometrias e materiais, visando elucidar a complexidade dos mecanismos de sinalização envolvidos em seu desenvolvimento. Nos últimos anos, a P2F tornou-se uma técnica interessante para essa finalidade, por permitir a fabricação de estruturas tridimensionais com controle preciso do tamanho e forma, na escala de interesse para o estudo de micro-organismos.²² Em se tratando da cultura de bactérias *in vitro*, estruturas tridimensionais, se não têm se mostrado superiores, ao menos têm dado resultados únicos e promissores ao lado de análises de crescimento bidimensionais em técnicas consagradas, como o uso de placas de Petri.⁵⁵ Nesse sentido, o estudo do desenvolvimento de biofilmes bacterianos em microestruturas mostra-se promissor.

Em geral, duas abordagens são empregadas no *design* destes microambientes, seja buscando imitar ou simular características do ambiente biológico onde os organismos serão desenvolvidos, seja buscando entender quais aspectos geométricos influenciam seu desenvolvimento. Em todo caso, os microambientes devem ter dimensões micrométricas, com rugosidade na escala de nanômetros, oferecer suporte mecânico, permitir o confinamento das células em algum nível (nichos), permitir acesso óptico para observação, e permitir distribuição celular e dispersão homogênea de nutrientes.^{27-28,56-59}

Um estudo mais aprofundado no emprego de estruturas microfabricadas na cultura de seres vivos apontará que sua rugosidade superficial se configura como um fator crucial, por afetar o desenvolvimento de células e bactérias, estando ligado a uma maior ou menor adesão celular nas estruturas. Em geral, apenas após esse processo inicial de adesão os microorganismos iniciam seu crescimento e reprodução.^{28,56-62} No processo de fabricação via P2F, podemos controlar, dentro de um certo range, a rugosidade superficial através de uma combinação entre a densidade de linhas utilizadas na fabricação, a abertura numérica da objetiva e a energia do pulso. Portanto, esse será outro parâmetro a ser alterado nas plataformas mencionadas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Como visto no Capítulo anterior, a técnica de P2F é versátil e eficaz, sendo que neste trabalho optou-se por lançar mão de resinas acrílicas para dar origem aos polímeros que hão de compor as estruturas fabricadas, com vistas ao crescimento de bactérias probióticas. Neste Capítulo, começamos com a descrição do aparato experimental utilizado, compreendendo o sistema laser pulsado e o sistema de microfabricação polimérica, juntamente com todo o aparato óptico, optomecânico, eletromecânico, eletrônico e software utilizado. Descreve-se também em maior detalhe a composição monomérica do preparado acrílico confeccionado, levando em conta as características que cada um dos meros traz para o polímero finalizado, bem como as propriedades do fotoiniciador utilizado e os métodos aplicados para a preparação da mistura. Por fim, descreve-se o processo de preparação da amostra para fabricação e processamento pós-fabricação, deixando-a pronta para análise de sua estrutura em microscopia de varredura eletrônica e subsequente crescimento de bactérias em ambiente apropriado.

3.1 Aparato experimental

A construção de um sistema de microfabricação na técnica de polimerização multifotônica pode se dar de variadas formas, sendo possível utilizar conjuntos de microlentes, para fabricar várias estruturas ao mesmo tempo numa grande área, mas com baixa potência,⁶³ bem como moduladores acusto-ópticos, para controlar a exposição da amostra ao feixe de luz.⁶⁴ O sistema utilizado nesse experimento utiliza um laser de bombeio Verdi V-10 Coherent centrado em 532 nm, que fornece em torno de 4,5 W, para excitar um oscilador laser de Ti:safira, operando em modo pulsado. O laser Ti:safira opera centrado em 790 nm, com largura de banda à meia-altura em torno de 50 nm, potência em torno de 250 mW, pulsos de 100 fs e taxa de repetição de 86 MHz. Apesar de o oscilador laser poder atuar em modo CW, sua cavidade, esquematizada na Fig. 3.1, é alinhada de maneira que qualquer perturbação provoque uma transição para o modo pulsado (*mode-lock*), uma vez que este é o regime empregado na microfabricação.

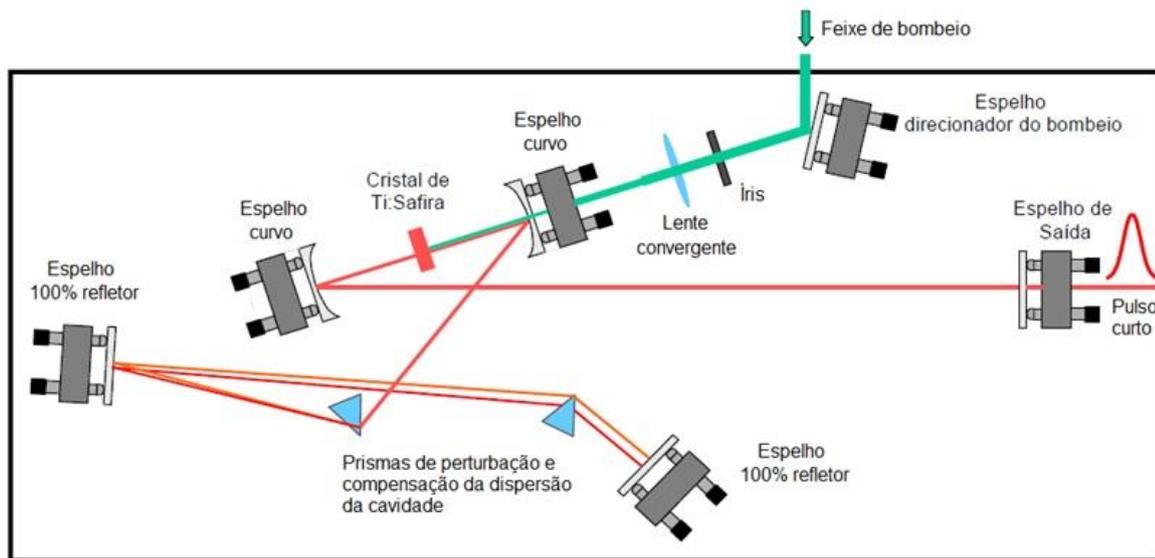


Figura 3.1 - Cavidade do oscilador laser empregado no sistema.

Fonte: OTUKA. ⁶⁵

Com o laser operando no modo pulsado, o feixe interage com a montagem experimental da P2F representada na Fig. 3.2. Ao sair da cavidade, quando o obturador mecânico se encontra aberto, o feixe laser é direcionado a um conjunto formado por uma lâmina de meia onda e um polarizador, utilizados para ajustar a potência do laser que chegará à amostra, selecionando consequentemente a energia do feixe com base no limiar de polimerização do fotoiniciador. Chamaremos de potência de trabalho a potência do feixe que sai desse conjunto, sendo que o valor utilizado nesse trabalho é de 75 mW.

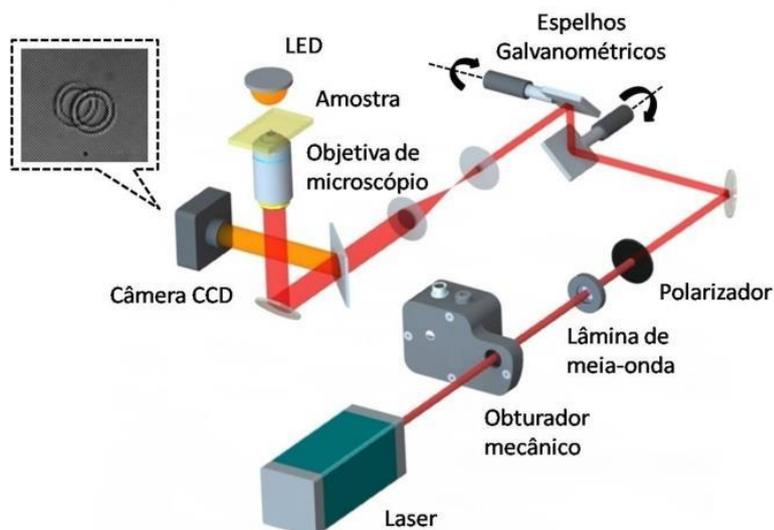


Figura 3.2 - Esquema da montagem experimental da microfabricação via fotopolimerização por A2F.

Fonte: TOMAZIO. ⁶⁶

O feixe passa também por um filtro de luz verde, que impede que a luz do laser de bombeio siga para a amostra e um conjunto de íris que facilitam o alinhamento do feixe. Um par de espelhos galvanométricos é responsável pelo deslocamento do feixe no plano xy , com cada espelho promovendo a deflexão do laser em uma das direções linearmente independentes. Esses espelhos são controlados via software, para a fabricação das microestruturas. Como a amplitude de movimento dos espelhos não pode ser alta, lança-se mão de um conjunto de lentes telescópicas para expandir o feixe e utilizar toda a abertura numérica das objetivas de microscópio utilizadas na fabricação.⁴⁰ Usando uma objetiva de microscópio de magnificação 10x e abertura numérica 0.25, o feixe é focalizado no volume da amostra, que está posicionada sobre o estágio de translação em z , este movido por um motor de passos. Assim, a combinação entre os espelhos galvanométricos e o estágio de translação permite deslocar o foco do feixe de forma tridimensional no volume da resina.

Tanto os espelhos galvanométricos, o motor de passos, bem como o obturador mecânico adicionado à montagem para exposição seletiva do feixe a fim de evitar polimerizações indesejadas, são controlados via software elaborado na plataforma LabVIEW, sendo a comunicação feita por uma placa de aquisição da companhia National Instruments. Em todo o caso, é essencial monitorar e controlar manualmente a deflexão do feixe para certificar-se de que ele coincidirá com a entrada da objetiva, pois flutuações na temperatura ou até mesmo na umidade no laboratório podem afetar o comportamento do laser de bombeio e, subsequentemente, do laser pulsado. Caso contrário, parte da potência transmitida será desperdiçada e a análise dos parâmetros de microfabricação, comprometida.

Todo o processo é acompanhado em tempo real com o auxílio do sistema de iluminação formado por um LED vermelho, em comprimento de onda e intensidade que não interfiram na polimerização da resina, e um divisor de feixes, responsável por direcionar a luz para uma câmera CCD. Destarte, quaisquer modificações no volume da resina oriundas da polimerização da resina tornam-se visíveis graças à diferença do índice de refração da resina líquida para o do polímero sólido.

Fatores como a energia do pulso, velocidade de varredura do feixe, e focalização podem e devem ser monitorados ao longo do processo de fabricação e entre fabricações distintas. Isso porque estruturas variadas geram vetorizações tridimensionais diferentes, que por sua vez requerem velocidades de fabricação apropriadas para que não haja rugosidades na superfície das estruturas confeccionadas. Além disso, misturas diferentes de monômeros acrílicos requerem intensidades de feixe distintas.

3.2 Monômeros acrílicos

Com o desenvolvimento de novos materiais e novas técnicas de microfabricação, muitas têm sido as possibilidades no emprego da técnica de P2F. É certo que o fator preponderante na escolha do material usado é a finalidade a que se deseja destinar a estrutura confeccionada. É possível dispor nanopartículas de sílica amorfa em uma matriz monomérica para realizar estruturas tridimensionais que depois serão sinterizadas para gerar microlentes.⁶⁷ Outra possibilidade é o emprego de polilactida com vistas a confeccionar uma matriz biodegradável para o crescimento de células neuronais e para a diferenciação de células derivadas do tecido adiposo humano em linhagem osteogênica.⁶⁸⁻⁶⁹ Em nosso trabalho, utilizamos resinas acrílicas monoméricas para criar microestruturas visando analisar o desenvolvimento de bactérias, por serem essas resinas muito utilizadas na P2F e terem um conjunto amplo de vantagens, sendo também já conhecidas em nosso grupo de pesquisa.⁷⁰

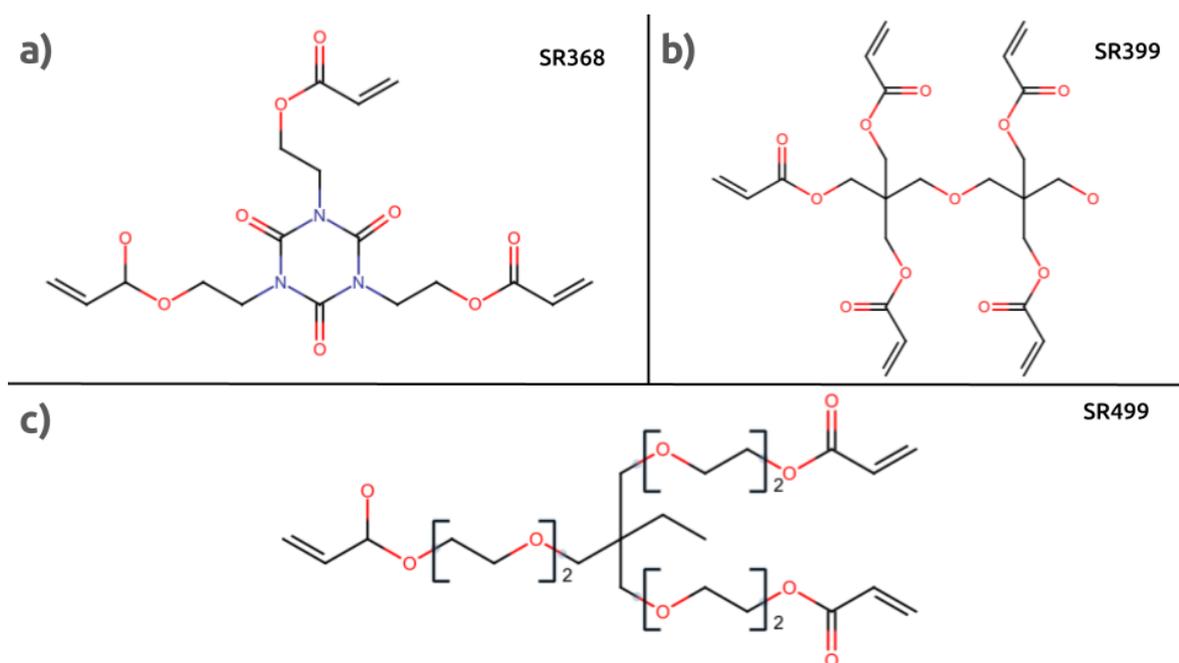


Figura 3.3 - Fórmula estrutural dos monômeros (a) SR368; (b) SR399; e (c) SR499, comercializados pela Sartomer.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Uma das estratégias para melhorar as propriedades mecânicas da estrutura fabricada pode ser a mistura de monômeros distintos com características particulares.¹¹ Contemplando essa possibilidade, combinaram-se ester três monômeros acrílicos distintos: tris(2-hidroxietil)isocianurato triacrilato, ou *tris(2-hydroxyethyl)isocyanurate triacrylate*, vendido comercialmente como SR368; dipentaeritritol pentaacrilato, ou *dipentaerythritol*

pentaacrylate, vendido comercialmente como SR399; e trimetilolpropano triacrilato 6 EO, ou *ethoxylated (6) trimethylolpropane triacrylate*, vendido comercialmente como SR499. Todos esses compostos são comercializados pela empresa Sartomer Arkema Group. A Fig. 3.3 ilustra as estruturas moleculares destes meros.

Para o preparo da resina, foi realizada uma mistura em partes iguais em massa desses três monômeros, a qual é misturada em um agitador termomagnético a 50 °C por uma hora junto ao fotoiniciador, em proporção de 3% da massa total dos meros acrílicos. É interessante pontuar que, conforme supramencionado, cada mero contribui com uma característica específica para a boa qualidade estrutural do ambiente microfabricado conforme as peculiaridades de seu arranjo químico e molecular. Nota-se que a presença do anel orgânico no monômero SR368 tem como resultado na estrutura final a promoção da rigidez estrutural, ao passo que os grupos etoxilados do mero SR499, em função de sua longa cadeia, colaboram com a redução do encolhimento mecânico da estrutura que sucede o processo de fotopolimerização.¹¹ Além disso, o monômero SR399 proporciona à estrutura boa resistência mecânica, já que sua estrutura pentaacrílica, ao ser polimerizada, dá origem a diversas ramificações do polímero gerado, reforçando sua estrutura.⁷⁰

3.3 Fotoiniciador Irgacure TPO-L

A reação fotoquímica responsável por levar à polimerização da mistura de resinas é desencadeada pelo fotoiniciador. Nesse trabalho utilizou-se o óxido de 2,4,6-trimetilbenzoiletoxi-fenil fosfina, ou *2,4,6-trimethylbenzoyl-diphenyl phosphinate*, vendido comercialmente como Irgacure TPO-L pela BASF, sendo anteriormente comercializado pelo nome de Lucirin TPO-L. Sua fórmula estrutural está ilustrada na Fig. 3.4. Quando ocorre o rompimento da ligação entre carbono e fósforo na molécula do Irgacure TPO-L em função da A2F formam-se os radicais livres pelo mecanismo de reação unimolecular, conforme representado em Fig. 3.4. Isso caracteriza esse fotoiniciador como sendo do Norrish Tipo I, pois diferente dos fotoiniciadores Tipo II, que necessitam de um co-iniciador para dar início à reação, os do Tipo I ainda têm a característica de dar origem a dois radicais igualmente reativos após a cisão fotoquímica.^{40,47} Em seguida, o radical fosfinoil, que contém o átomo de fósforo, promove reações de polimerização por adição envolvendo os monômeros da mistura, acarretando assim na polimerização da resina.

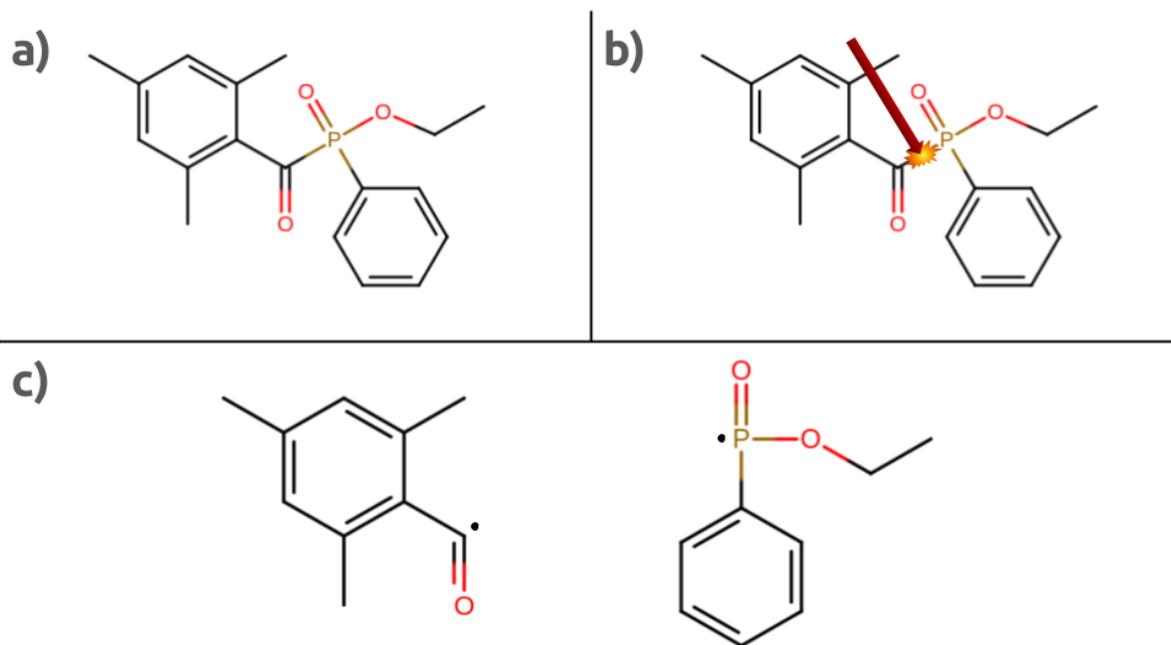


Figura 3.4 - (a) Fórmula estrutural do Irgacure TPO-L; (b) indicação do rompimento fotoquímico da ligação entre carbono e fósforo; (c) estrutura química dos radicais formados.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Mendonça *et al.*,⁷¹ caracterizaram as absorções linear e não linear em relação ao comprimento de onda da luz empregada como agente de excitação do Irgacure TPO-L. Para a absorção linear há apenas um pico de absorção em 365 nm, enquanto que para a A2F existem três: um mais intenso em 610 nm, e dois secundários, centrados em 730 nm e 780 nm. Utilizamos a última banda, pois o laser utilizado opera centrado nessa mesma região e a absorção linear do fotoiniciador para comprimentos de onda superiores a 500 nm é baixa.

3.4 Preparo da amostra

Uma vez feito o preparado acrílico da amostra, o mesmo é guardado em uma estufa mantida a 50 °C e com proteção da luz, para evitar uma eventual exposição à radiação ultravioleta com potencial absorção linear, provocando assim uma polimerização indesejada. Para proceder o processo de polimerização por absorção de dois fótons em nosso aparato experimental as amostras devem ser preparadas no laboratório de química do grupo de pesquisa e então levadas em recipientes escuros, novamente, para prevenir polimerizações indesejadas decorrentes de absorção linear.

O preparo da amostra, como ilustrado na Fig. 3.5, tem como base uma lâmina de microscópio, que é higienizada com álcool. Sobre esta lâmina coloca-se um substrato de vidro, um prisma de base quadrada com faces de 1 cm de lado e com a mesma espessura da lâmina de microscópio, que também é higienizado com álcool para remover manchas de gordura e impurezas de qualquer natureza que porventura possam atrapalhar o processo de polimerização. Há também a possibilidade de soprar a vidraria com um jato de nitrogênio para remover quaisquer fiapos e impurezas sólidas que tenham se fixado ao substrato por forças de van der Waals no processo de higienização com álcool.

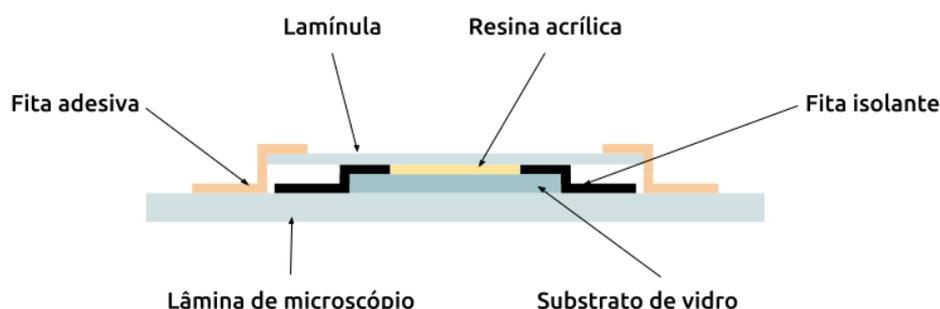


Figura 3.5 - Ilustração do preparo das amostras de resina acrílica preparadas para o processo de P2F.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O substrato é fixado na lâmina com o auxílio de finas tiras de fita isolante, para que o substrato fique firme, uma vez que a montagem experimental necessita que o laser chegue por baixo da estação de suporte da amostra e, portanto, esta deve ser colocada de forma invertida. Sobre o substrato aplica-se a resina acrílica destinada à fotopolimerização e esta é coberta por uma lamínula, também previamente higienizada e soprada com o jato de nitrogênio. A lamínula por sua vez é fixada com fita adesiva e assim está pronta a amostra para ser montada no aparato experimental e proceder-se a P2F.

3.5 Limpeza da amostra

Após a microfabricação as amostras são colocadas em banho de álcool etílico em uma placa de Petri aquecida a 75 °C no termoagitador. As fitas adesivas são retiradas com o auxílio de uma pinça, seguindo-se a remoção da lamínula com o uso de luvas, empregando cuidado para não desprender as estruturas recém-fabricadas do substrato. Segue-se para a remoção das fitas isolantes, também com o auxílio da pinça, colocando o substrato inclinado sobre a lâmina em seguida e ligando o agitador magnético para fazer circular o álcool aquecido e remover por completo toda a resina acrílica que não tiver sido polimerizada.

Uma vez limpa, as amostras são secas em estufa a 45 °C por pelo menos 24 horas antes de serem analisadas em sua morfologia no microscópio eletrônico de varredura, de modo a conhecer sua integridade e aspectos dimensionais da estrutura. A partir desse ponto, as amostras podem ser encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia Clínica da UNESP – Araraquara que, sob a colaboração da Prof.^a Dr.^a Carla Raquel Fontana, foi responsável por conduzir o crescimento das culturas de bactérias utilizando os protocolos laboratoriais de biossegurança adequados.

Nos Capítulos subsequentes, apresentaremos os resultados obtidos e as hipóteses e conclusões aventadas durante a execução deste trabalho.

4 ESTRUTURAS FABRICADAS E TESTES DE BIOCAMPATIBILIDADE

Tendo sido já estabelecido que a técnica de polimerização via absorção de dois fótons é uma técnica precisa e versátil, e tendo já sido lançado todo o embasamento teórico para tanto, lançamos nossa atenção às possíveis aplicações e implementações que tal técnica pode exibir no escopo do nosso trabalho.

Em 2014, nosso grupo de pesquisa em Fotônica, em parceria com o Laboratório de Microbiologia Clínica da UNESP – Araraquara e o Laboratório Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio (LNNA) da Embrapa - São Carlos, avaliou o desenvolvimento de bactérias *Escherichia coli* em microestruturas fabricadas via fotopolimerização a partir de uma resina composta de uma mistura de dois monômeros triacíclicos.²⁸ Esse estudo demonstrou não só que estruturas poliméricas dopadas com o antibiótico ciprofloxacina inibiram o desenvolvimento das bactérias *E. coli* no entorno das estruturas fabricadas, mas também que determinadas geometrias poderiam ser empregadas a fim de se estudar o aprisionamento e a migração bacterianas.

Em 2021, também em nosso grupo de pesquisa, demonstrou-se o emprego de microestruturas poliméricas fabricadas via P2F a partir da mesma resina empregada neste trabalho para o crescimento e desenvolvimento de bactérias *Komagataeibacter xylinus*.⁷⁰ Essas bactérias produzem biocelulose e por meio do cultivo em microambientes foi possível perceber que a sua interação enquanto comunidade de seres vivos com a geometria do espaço dava origem a comportamentos inesperados, como o fato de se percorrer sempre o caminho mais curto entre duas paredes da microestrutura em vez de se espalhar isotropicamente.

Neste Capítulo, primeiramente, são apresentadas as estruturas fabricadas pela técnica de P2F no aparato descrito quanto à sua natureza estrutural e geométrica. Em seguida, são exibidos os resultados do desenvolvimento de bactérias *E. coli* em algumas das estruturas e subsequente avaliação e interpretação das microscopias óptica, de fluorescência e de varredura eletrônica das amostras inoculadas com os microorganismos.

4.1 Plataformas confeccionadas

Por meio de análise com microscópio eletrônico de varredura (MEV) foi possível verificar boa integridade estrutural das estruturas microfabricadas via P2F, ademais de algumas estruturas terem ficado com alturas variáveis. Esse fator, contudo, não foi capaz de interferir nos resultados dos testes de crescimento bacteriano, como será mostrado.

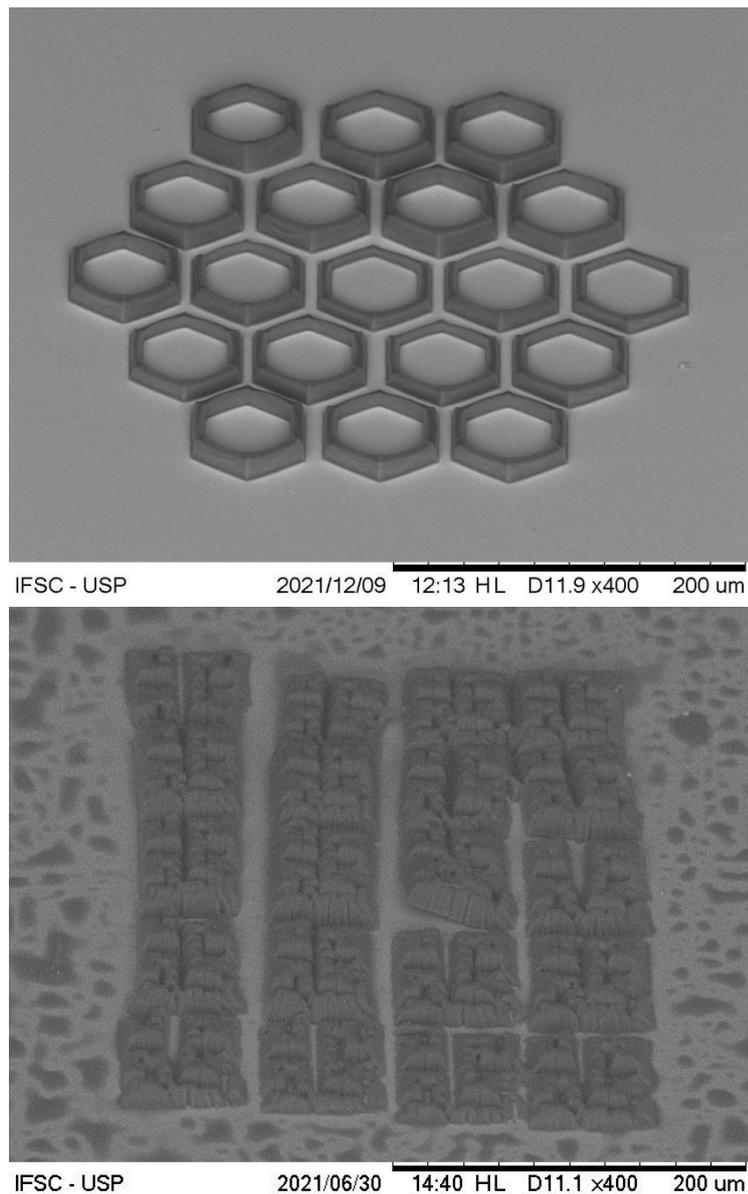


Figura 4.1 – Microscopia de varredura eletrônica das estruturas do tipo favo de mel (acima) e carpete (abaixo), fabricadas com objetiva 10x, NA 0.25, e potência de fabricação 75 mW.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A Fig. 4.1 mostra as primeiras microestruturas fabricadas: um arranjo de prismas hexagonais ocos, que aqui denominamos *favo de mel*, e um arranjo de prismas quadrados rugosos, que denominamos *carpete*. A alturas individuais dos prismas hexagonais varia entre 10 e 35 μm , com lados em torno de 60 μm . Já o tamanho total da estrutura favo de mel tem cerca de 300 μm de diâmetro e aproximadamente 180 micrômetros de lado. Com relação ao carpete, cada uma de suas partes foi feita seguindo uma vetorização tridimensional do prisma de base quadrada baseada numa curva de Hilbert, com vistas a maximizar a superfície de contato da estrutura. Cada retalho tem lados em torno de 70 μm , e o diâmetro médio das rugosidades do carpete é por volta de 2 μm . Desta forma, a estrutura total do carpete tem lados aproximados em 300 μm .

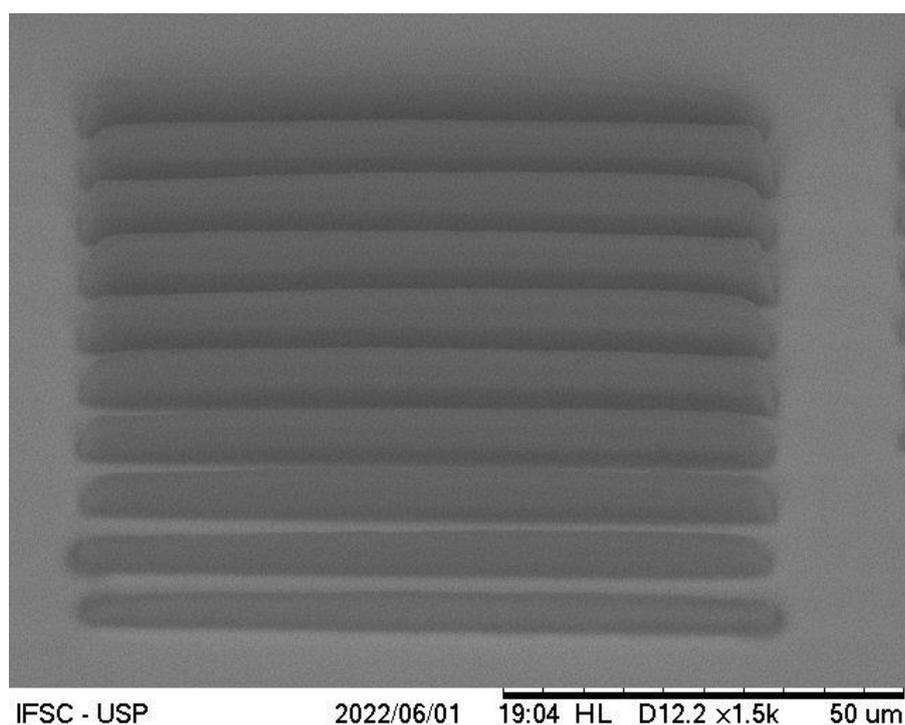
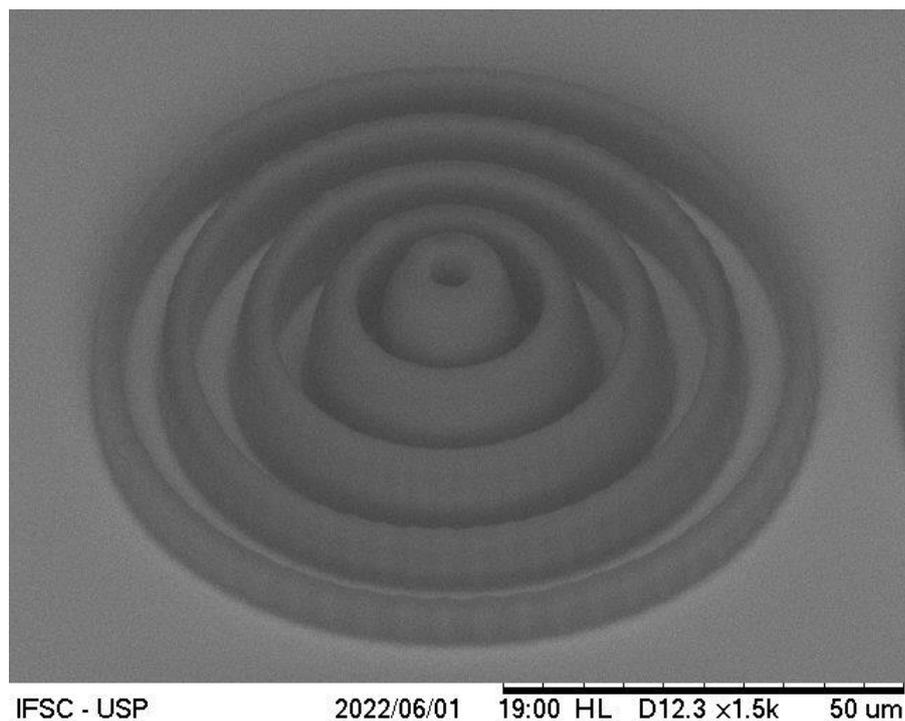


Figura 4.2 – Microscopia de varredura eletrônica das estruturas com sulcos concêntricos (acima) e paralelos (abaixo), fabricadas com objetiva 10x, NA 0.25, e potência de fabricação 75 mW.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Após serem realizados os testes de biocompatibilidade, a serem tratados com maior detalhamento na seção seguinte, foi proposto o desenvolvimento de um novo tipo de estrutura com base num conjunto de sulcos concêntricos (curvos) e paralelos (retilíneos), exibidos na Fig. 4.2.

Os anéis concêntricos apresentam alturas variando de 4 a 10 μm , contando com uma espessura média de 3,8 μm e espaçamento médio em torno de 4,4 μm , com um diâmetro total na ordem de 94 μm . Já os sulcos paralelos têm alturas variando entre 3 e 5 μm , com espessura média e espaçamento médio em torno de 4,5 μm e largura total da ordem de 90 μm .

4.2 Testes de biocompatibilidade

Conforme supramencionado, os testes de biocompatibilidade são uma etapa essencial no processo da viabilização do uso de microambientes poliméricos acrílicos como plataforma de desenvolvimento bacteriano. Os primeiros testes se deram com bactérias *Escherichia coli*, que comumente habitam a microbiota intestinal de vertebrados,⁵⁰ tal qual os probióticos, disponibilizadas pelo Laboratório de Microbiologia Clínica da UNESP – Araraquara, com a colaboração da Prof.^a Dr.^a Carla Raquel Fontana.

Isso servirá como prova de conceito, já que, se bactérias *E. coli* que habitam o mesmo ecossistema sobreviverem nos microambientes, os probióticos, que possuem o mesmo habitat, possivelmente prosperarão. As bactérias foram inoculadas nas estruturas fabricadas com a resina e o método propostos e mantidas em ambiente adequado (temperatura, atmosfera etc.) para seu crescimento. A viabilidade do crescimento dos probióticos será estudada tanto por meio de microscopia óptica, ao analisar a presença das bactérias sobre as estruturas com base no método de coloração de Gram, como por meio de microscopia de varredura eletrônica.

A Fig. 4.3 ilustra o comportamento das bactérias no entorno das estruturas depois de 24 horas (imagens ao topo) e 32 horas (imagem abaixo). Nota-se que além de ocupar a região externa à estrutura e seus interstícios, as bactérias aderiram às bordas e topo dos prismas hexagonais ociosos. Isso levanta a hipótese de que algumas regiões podem ser ótimas se comparadas a outros locos na microestrutura para o desenvolvimento da cepa utilizada, por conta de fatores como competição intraespecífica e disposição espacial do meio de cultura em função da geometria da estrutura fabricada. Aventada a hipótese, uma forma de analisá-la é verificar qual o estado de crescimento das bactérias em tempos diferentes para estruturas similares.

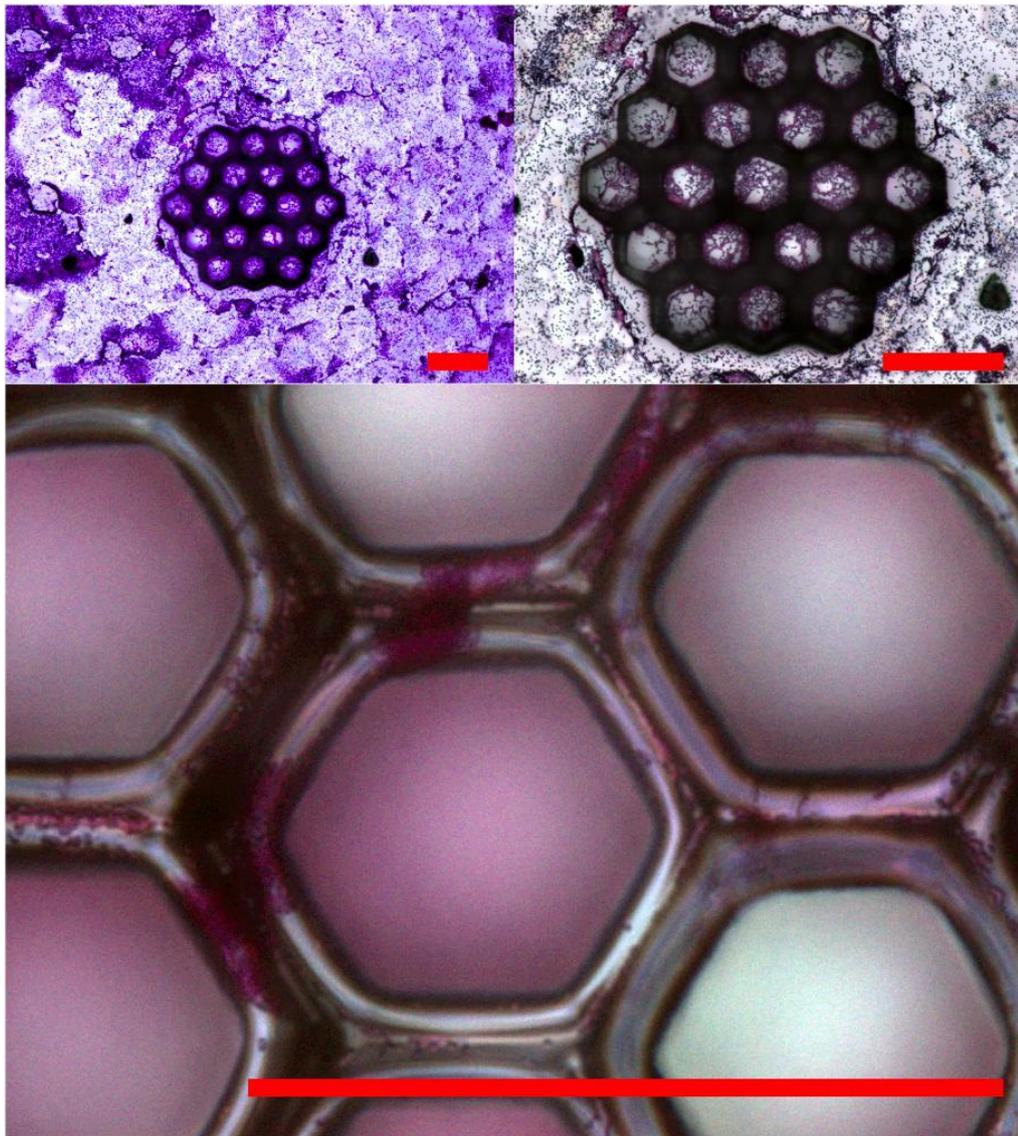


Figura 4.3 – Em sentido horário, partindo do topo à esquerda: estrutura favo de mel distante, próxima e com detalhe para a borda dos prismas ocas. As barras têm 100 μm . Imagens feitas com microscopia óptica.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Com o uso do *software* ImageJ foi possível analisar a densidade de bactérias nas imagens de microscopia óptica para o crescimento das bactérias *E. coli* nos tempos de 24 horas e 32 horas. As imagens foram colocadas em escala de cinza, como mostrado na Fig. 4.4 para outro conjunto de estruturas. A seguir, foram usadas as ferramentas de processamento de imagem do programa para calcular a densidade de bactérias dentro de cada sítio nos prismas ocas, bem como no seu entorno. Assim sendo, os valores relativos de densidade de bactérias na média dos sítios e no entorno servem como base de interpretação para compreender o desenvolvimento das bactérias em função do tempo. Tais valores são calculados como uma média num *range* contínuo de 0 a 255, com base nos valores de intensidade de luz por pixel, que por sua vez varia discretamente de 0 (preto) a 255 (branco).

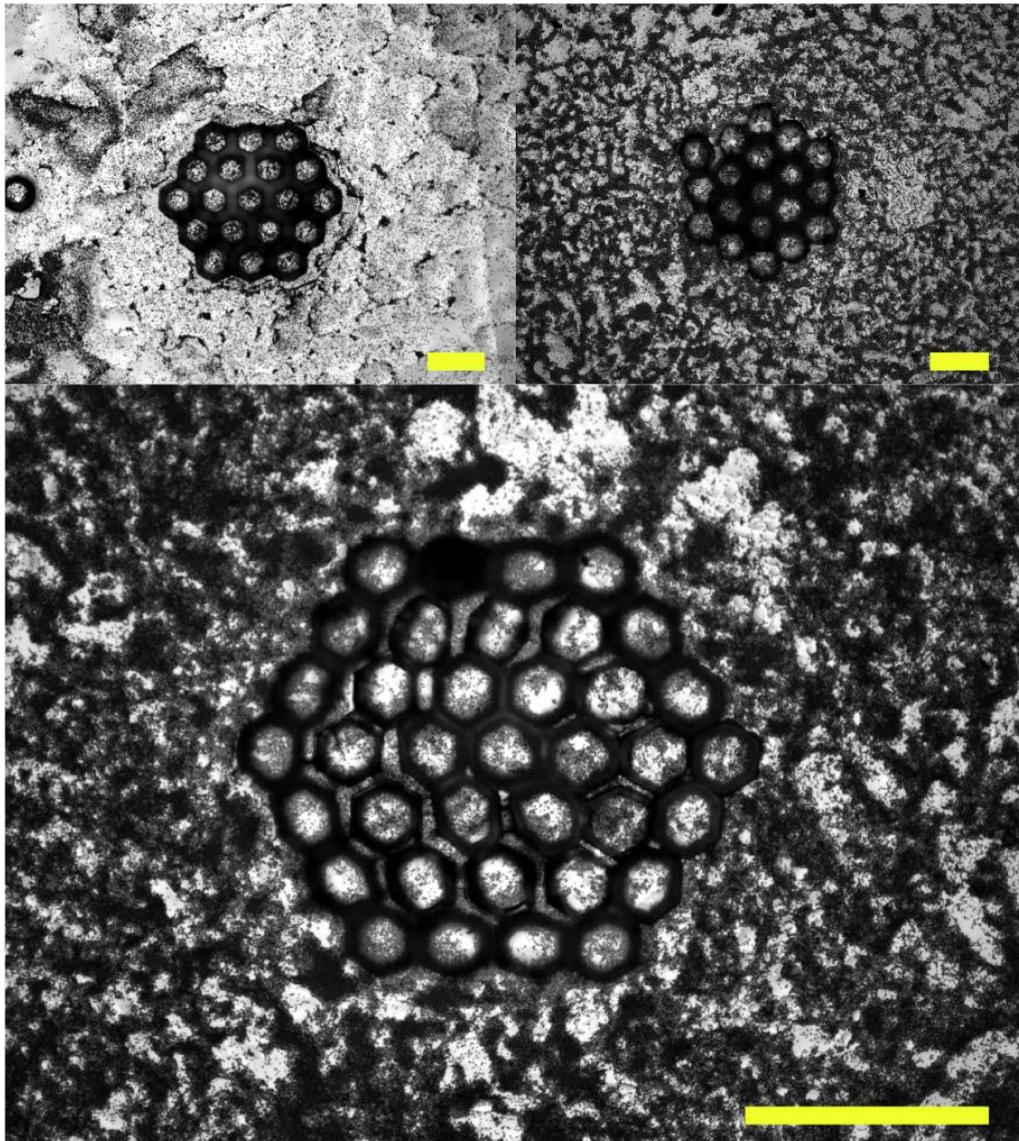


Figura 4.4 – Crescimento de bactérias em estruturas favo de mel para 24h (topo à esquerda) e 32h (topo à direita e abaixo) em escala de cinza. As barras têm 100 μm . Imagens feitas com microscopia óptica.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para entender a prevalência das bactérias nas estruturas, será calculada a razão entre a densidade de bactérias média no entorno da estrutura ρ_{EXT} e a média da densidade de bactérias $\bar{\rho}$ tomada sobre cada um dos interstícios. Tal razão é denominada índice de prevalência global de bactérias, G . Há ainda a densidade de bactérias medida apenas no entorno imediato, ρ_{ARO} , em uma espécie de aro em redor da estrutura. Nesse caso, também se calcula a razão com $\bar{\rho}$ para obtermos o índice de prevalência periférico de bactérias, g . Isso é necessário para amenizar fatores como ruído de imagem e *offset* do substrato, por exemplo. Assim, uma razão que dê valor *inferior a 1,00* indica que a densidade de bactérias dentro da estrutura é maior que o entorno e, portanto, há *menos bactérias nos vãos da estrutura do que no entorno*. Se a razão for

superior a 1,00, há mais bactérias dentro das estruturas em relação ao entorno. Ademais, quanto mais os valores distarem de 1,00, mais os comportamentos descritos estarão acentuados.

Verifica-se que o índice de prevalência global de bactérias após um tempo de crescimento de 24 horas na Fig. 4.4-a é $G = 1,42$, enquanto que para o intervalo de 32 horas em estrutura de tamanho similar na Fig 4.4-b, $G = 1,26$. Para a maior estrutura fabricada, vista na Fig. 4.4-c o valor chega a saltar para $G = 0,73$. Isso sugere que, com o passar do tempo, o ambiente fechado passa a ser menos atrativo, uma vez que se exacerba a competição intraespecífica num meio espacialmente reduzido e que mais rapidamente atinge-se a saturação de sua capacidade de sustentar vida. Por outro lado, o ambiente externo, por ser aberto e estar imerso no caldo nutritivo do meio de cultura, torna-se cada vez mais atrativo com o tempo, fator demonstrado na diminuição do valor do índice de prevalência global de bactérias.

Nas imediações das estruturas fabricadas, compreendendo a borda e o topo das estruturas, para o tempo de 24 horas, na Fig. 4.4-a o índice de prevalência periférico de bactérias é $G = 0,98$, enquanto que para 32 horas na Fig. 4.4-b o valor passa a ser de $G = 1,03$. Isso é um indicativo de que, com o passar do tempo, o entorno imediato da estrutura adensa a quantidade de bactérias que ali crescem se comparado a regiões mais distantes, comportamento inverso ao que se viu nos interstícios.

Já com relação à borda superior das estruturas é possível ver por meio de microscopia de fluorescência que as bactérias se adensam também nesses locais, conforme ilustrado na Fig. 4.5, com tempos de crescimento de 16h e 32h. Visualmente, as bactérias multiplicam-se prolificamente no topo dos prismas hexagonais com o tempo, fato notado pelo aumento do número de pontos em vermelho (bactérias) vistas opacamente sobre a estrutura, que é transparente no espectro visível e fluoresce em verde.

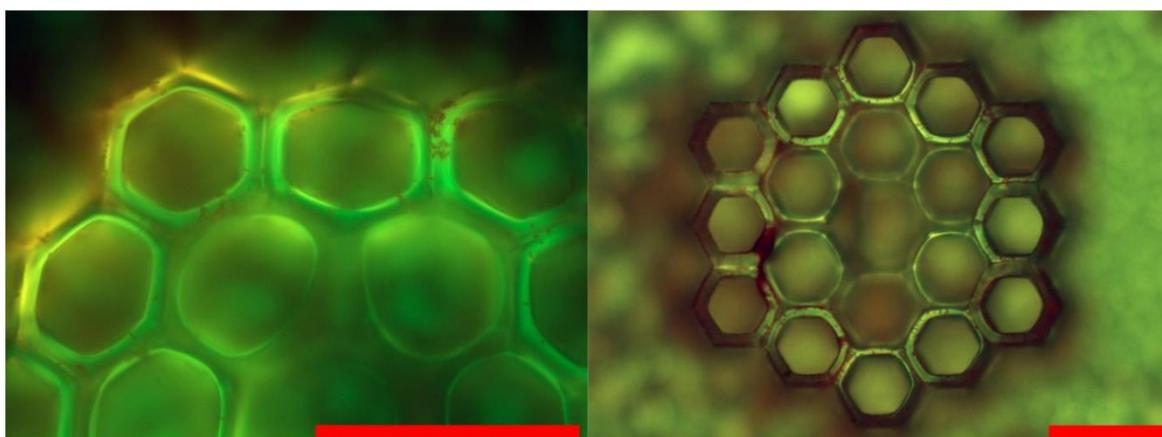


Figura 4.5 – Microscopia de fluorescência das estruturas favo de mel para 16h (esquerda) e 32h (direita), destacando bactérias aderidas em coloração avermelhada. As barras têm 100 μm .

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em concordância a essa observação, pode se avaliar por meio de microscopia de varredura eletrônica esse desenvolvimento das bactérias próximo à borda. A Fig. 4.6 exibe o crescimento do número de bactérias alojadas nessa região das estruturas num comparativo para os tempos de cultura de 24 horas e 32 horas. Tal crescimento pode ser notado pela prevalência de alguns aglomerados de bactérias, em oposição a bactérias solitárias espalhadas na borda das estruturas.

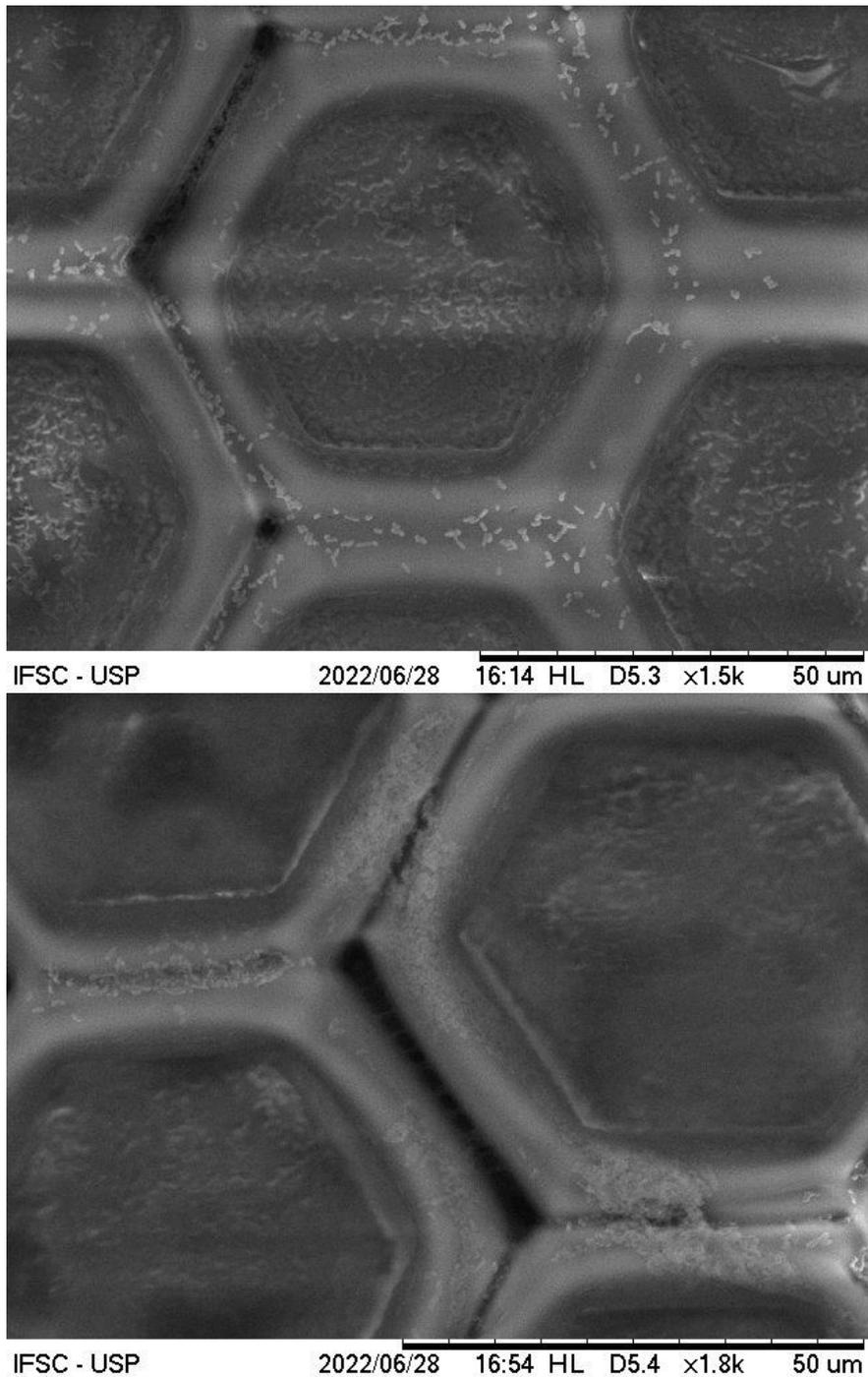


Figura 4.6 – MEV para estruturas do tipo favo de mel no tempo de crescimento de 24h (acima) e 32h (abaixo), com destaque para a região das bordas das estruturas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As estruturas do tipo carpete tiveram desempenho semelhante ao que se pôde verificar nos favos de mel. Diferente do que se esperava, os sulcos das estruturas visualmente não foram tão atraentes quanto os arredores ou o topo da estrutura. Seja no tempo de crescimento de 16 horas ou 24 horas, como ilustrado na Fig. 4.7, não se pôde distinguir preferência pela estrutura em detrimento dos arredores. Ocorre que no tempo mais longo mais aglomerados de bactérias são formados, especialmente nos sulcos maiores entre os pedaços do carpete.

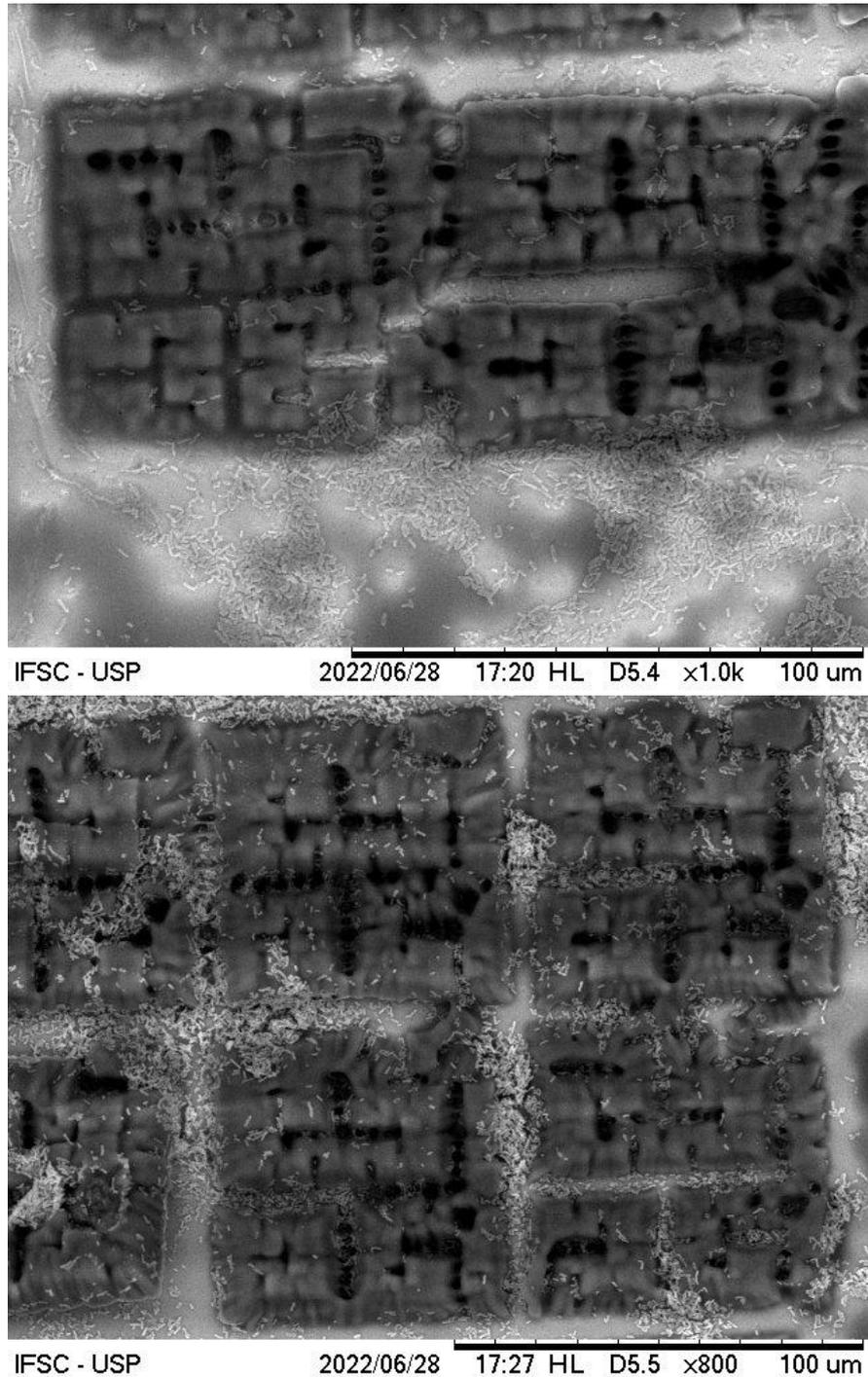


Figura 4.7 – MEV para estruturas do tipo carpete no tempo de crescimento de 16h (acima) e 24h (abaixo).
Fonte: Elaborada pelo autor.

Desse modo é possível deduzir que sítios com dimensões muito reduzidas não são muito interessantes para a formação de aglomerados de bactérias e subsequente formação de biofilmes. Isso porque eles suportam apenas um número limitado de micro-organismos. Por outro lado, um ambiente muito amplo para o cultivo das bactérias também não é o melhor promotor da formação de aglomerados de bactérias, como se vê nas primeiras horas do crescimento das bactérias sobre o substrato. Isso porque a tendência será a de se espalhar por toda a superfície antes de dar origem a esses aglomerados. Disso, subentende-se que há um tamanho de sulco, não tão pequeno nem tão amplo, que favoreça a formação de aglomerados de bactérias e potenciais biofilmes.

5 CRESCIMENTO DE PROBIÓTICOS

Apesar de comumente ser aplicada a mesma técnica para a inoculação, a cultura e desenvolvimento de bactérias *in vitro* não é estanque. Sendo assim, por mais que sejam bactérias que ocupam o mesmo nicho, não se pode assumir que *E. coli* e probióticos tenham o mesmo desenlace. Neste capítulo, investigamos como se comporta um conjunto de bactérias probióticas nas estruturas microfabricadas.

5.1 Primeria fase de crescimento

Em face das últimas conclusões, diante da hipótese de que existe um espaçamento entre as paredes da microestrutura fabricada que potencialmente pode ser ideal para o desenvolvimento das bactérias, propôs-se a adoção de um conjunto de sulcos paralelos, aberto ao ambiente externo, para explorar a influência de um ambiente não limitado espacialmente em contraste com os últimos resultados obtidos. Para fins de comparação, fez-se também um conjunto de sulcos concêntricos para ver como outra geometria de conceito similar, mas de caráter fechado, influenciaria o crescimento das bactérias.

O resultado do crescimento de um conjunto de bactérias probióticas, também desempenhado sob a supervisão da Prof.^a Dr.^a Carla Raquel Fontana no Laboratório de Microbiologia Clínica da UNESP – Araraquara, pode ser visto na Fig. 5.1 para um tempo de 18h. Tal conjunto é composto de bactérias *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* e *Bifidobacterium lactis*, comumente utilizadas como probióticas.⁷²⁻⁷⁵

Em primeiro lugar, nota-se que, por um infortúnio das circunstâncias de fabricação, as estruturas não ficaram bem aderidas ao substrato. Uma vez que as amostras são transportadas de São Carlos a Araraquara, mesmo que adequadamente posicionadas em um porta lâminas, a trepidação do transporte, bem como a adição do meio de cultura em micropipetagem pode configurar o surgimento de um impulso mecânico que resulta na desestabilização das estruturas e, portanto, seu conseqüente tombamento e perda completa de adesão, fato verificado nas estruturas com sulcos paralelos e concêntricos, respectivamente.

Isso posto, nota-se que as bactérias aderiram consideravelmente às paredes das estruturas. Além disso, no caso da estrutura circular vê-se que vários aglomerados se formaram no interior dos anéis. No caso dos sulcos lineares, pelo tombamento, houve dificuldade em analisar o desenvolvimento das bactérias aprofundadamente, mas ainda assim, nota-se a presença de alguns aglomerados nas paredes da estrutura.

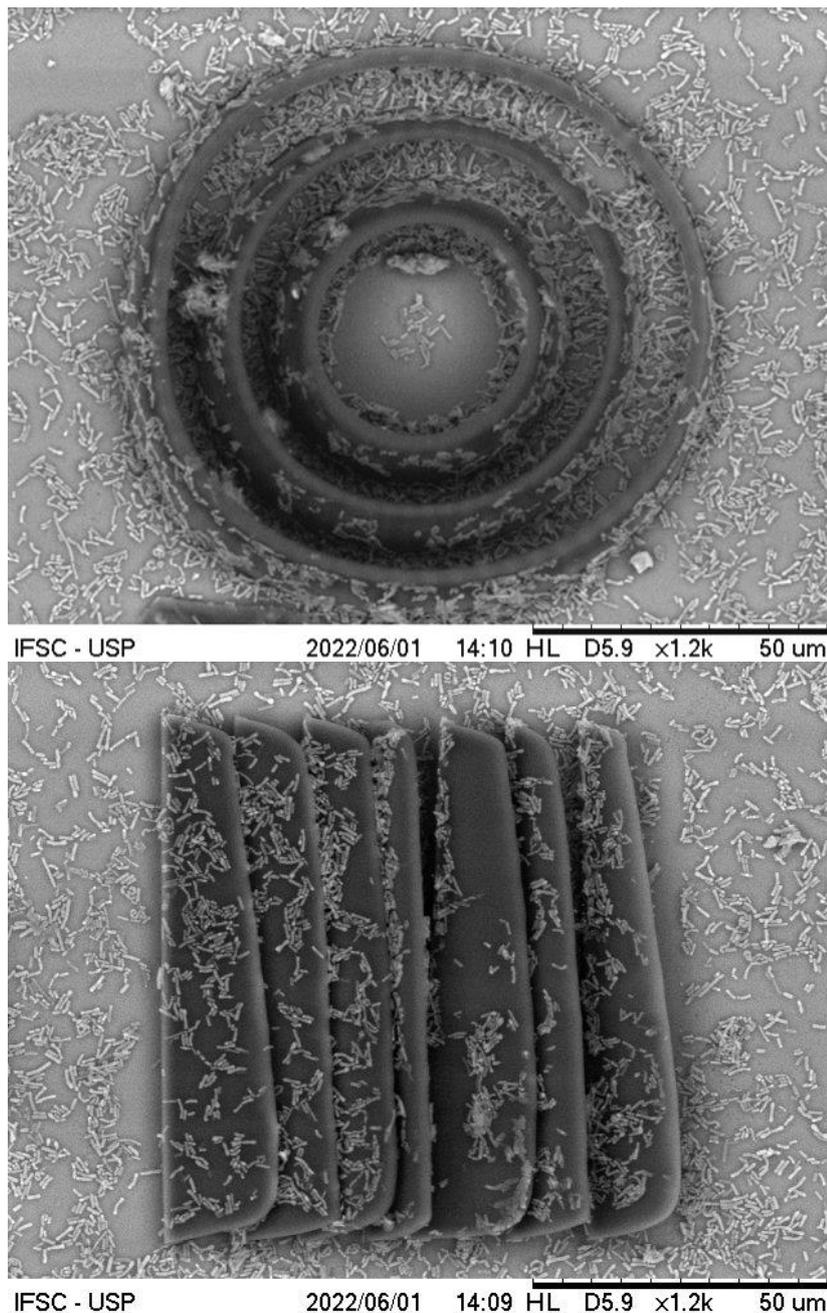


Figura 5.1 – MEV do *pool* de probióticos nas estruturas com sulcos concêntricos (acima) e paralelos (abaixo) para um tempo de 18h de crescimento.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2 Segunda fase de crescimento

Em resposta à essa primeira fase de crescimento dos probióticos nas estruturas microfabricadas, tendo notado que a execução das microestruturas foi insatisfatória, optou-se por fazer nova rodada fabricação e posterior crescimento bacteriano. Dessa maneira, estruturas do tipo sulcos concêntricos foram confeccionadas e submetidas para cultivo dos probióticos, como consta nas imagens de MEV na Fig. 5.2, com um tempo de 36h de crescimento.

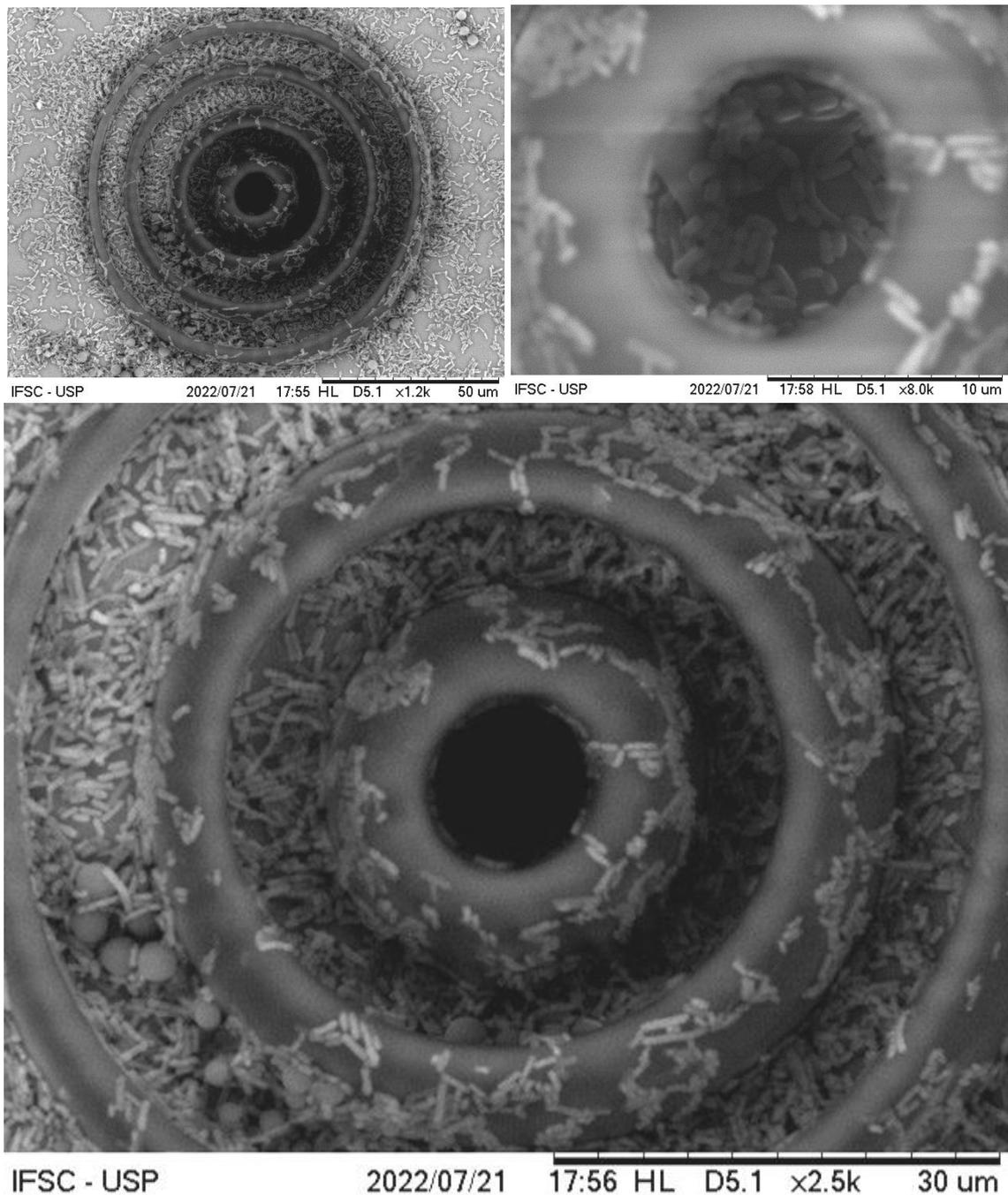


Figura 5.2 – MEV do *pool* de probióticos. Aproximações distintas para a mesma amostra, com 36h de crescimento.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Com um tempo de crescimento de 36 horas é possível notar que o comportamento observado para *E. coli* aparenta ser o mesmo para as bactérias probióticas, isto é, que ocorre elevada prevalência das bactérias no entorno da camada mais externa da estrutura, bem como nas paredes e sulcos das estruturas. Assim, reitera-se a percepção de que zonas muito amplas são desfavoráveis ao desenvolvimento pleno dos probióticos e que as estruturas funcionam como aceleradoras de crescimento bacteriano.

Semelhantemente, para com as estruturas de sulcos paralelos, nota-se mais uma vez o mesmo padrão de desenvolvimento microbial. Como exibido na Fig. 5.3, também para um cultivo de 36 horas, ocorre elevada prevalência das bactérias nos sulcos entre as paredes das estruturas, apontando que, o caráter aberto desse tipo de estrutura se conforma numa desvantagem ao desenvolvimento das bactérias, que preferem se proliferar no ambiente protegido entre as estruturas paralelamente fabricadas.

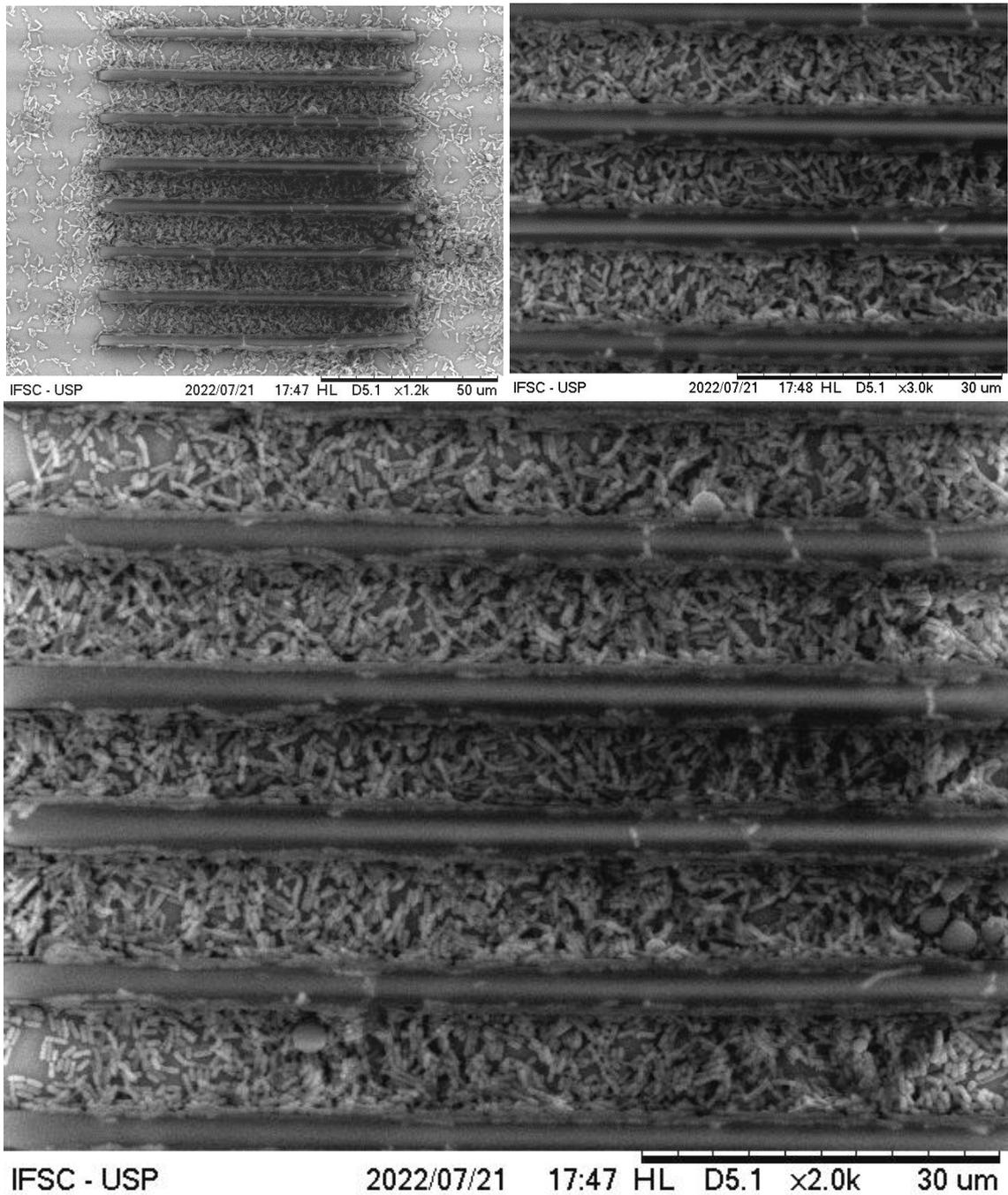


Figura 5.3 – MEV do *pool* de probióticos. Aproximações distintas para a mesma amostra, com 36h de crescimento.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Com um tempo de crescimento de 36 horas é possível notar que o comportamento notado para *E. coli* aparenta ser o mesmo para as bactérias probióticas, isto é, que ocorre elevada prevalência das bactérias no entorno da camada mais externa da estrutura, bem como nas paredes e sulcos das estruturas. Assim, reitera-se a percepção de que zonas muito amplas são desfavoráveis ao desenvolvimento pleno dos probióticos e que as estruturas funcionam como aceleradoras de crescimento bacteriano.

5.3 Terceira fase de crescimento

Se numa primeira instância a segunda fase de testes corrobora o que foi visualizado com relação à influência que certos aspectos da geometria estrutural podem ter sobre o desenvolvimento bacteriano, há de se considerar que um elemento importante do cultivo de bactérias necessitava ser melhor compreendido, a saber, o tempo de cultura. Desta maneira, para certificarmos de que as hipóteses aventadas até o momento estavam adequadas, tomou-se a iniciativa de efetuar nova sequência de fabricação e cultivo. Para tanto, foi feito o cultivo para os tempos de 12 horas e 24 horas do mesmo conjunto de probióticos supradito. O crescimento das bactérias em estruturas do tipo sulco concêntrico está ilustrado na Fig. 5.4.

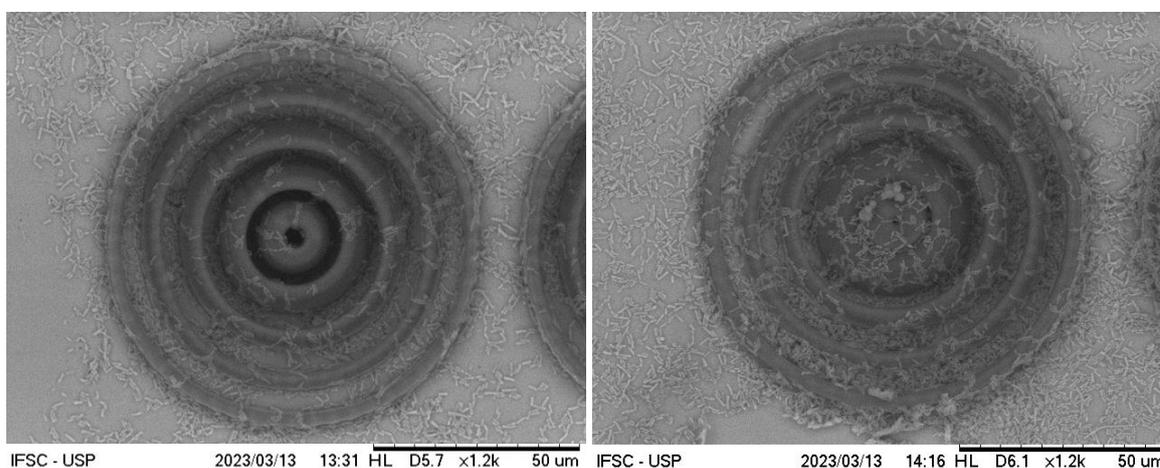


Figura 5.4 – MEV do *pool* de probióticos nas estruturas com sulcos concêntricos para 12 horas (esquerda) e 24 horas (direita).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como esperado, o fator tempo se revela na dinâmica populacional bacteriana com um aumento perceptível da presença dos probióticos na vizinhança das estruturas. Assim, para intervalos de 12h e 24h, tanto nas estruturas concêntricas como nas paralelas, conforme a Fig. 5.5, os ambientes são de fato aceleradores de colonização. Além disso, há um destaque em especial para as estruturas paralelas, uma vez que a proximidade das paredes faz as bactérias se acumularem e ligarem paredes próximas, algo similar ao relatado por Otuka *et al.*⁷⁰

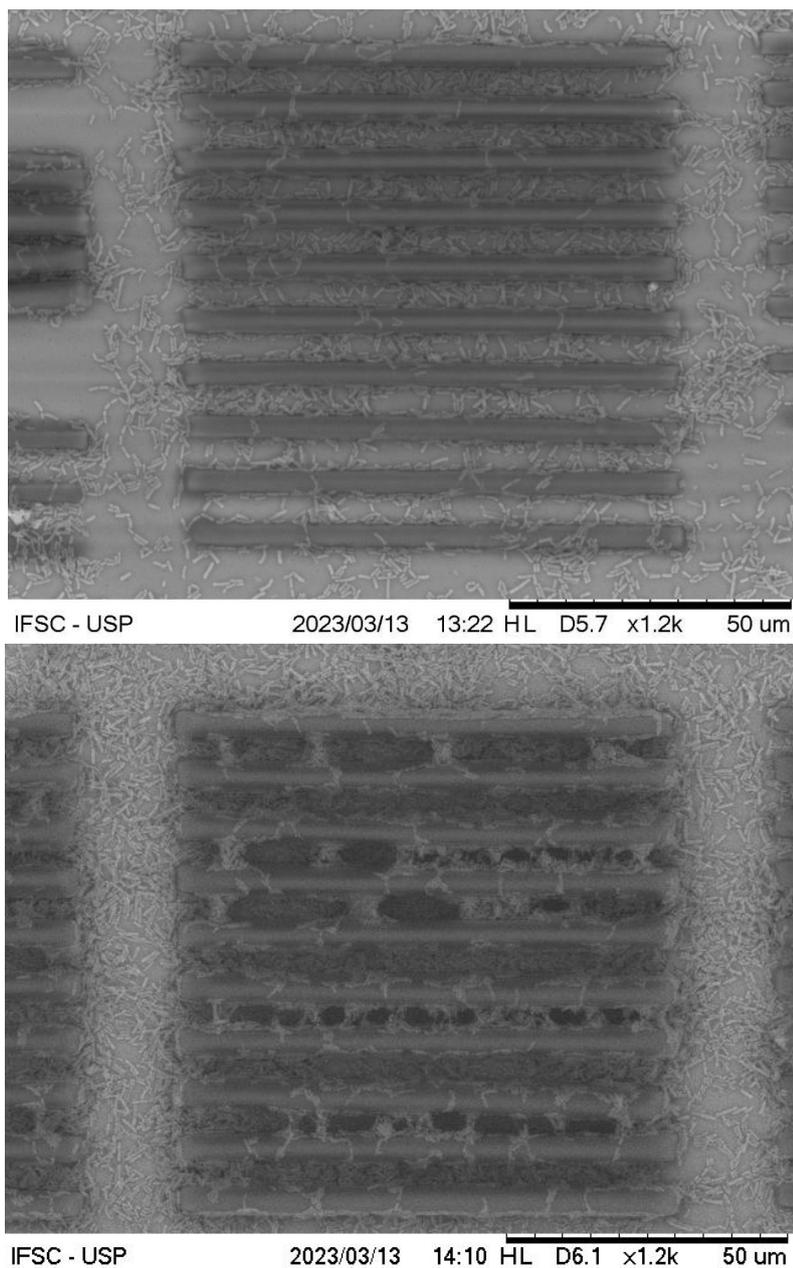


Figura 5.5 – MEV do *pool* de probióticos nas estruturas com sulcos paralelos para 12 horas (acima) e 24 horas (abaixo).

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.4 Contraprova das hipóteses aventadas

Como uma última tentativa de atestar aquilo que se supôs acerca das características do desenvolvimento de bactérias probióticas em microambientes fabricados via P2F, buscou-se explorar a influência da distância entre as paredes na geometria das estruturas fabricadas. Assim, foram mais uma vez fabricados ambientes com sulcos paralelos, mas desta feita com distância variável entre as linhas, como se vê em Fig. 5.6, também para tempos de 12h e 24h.

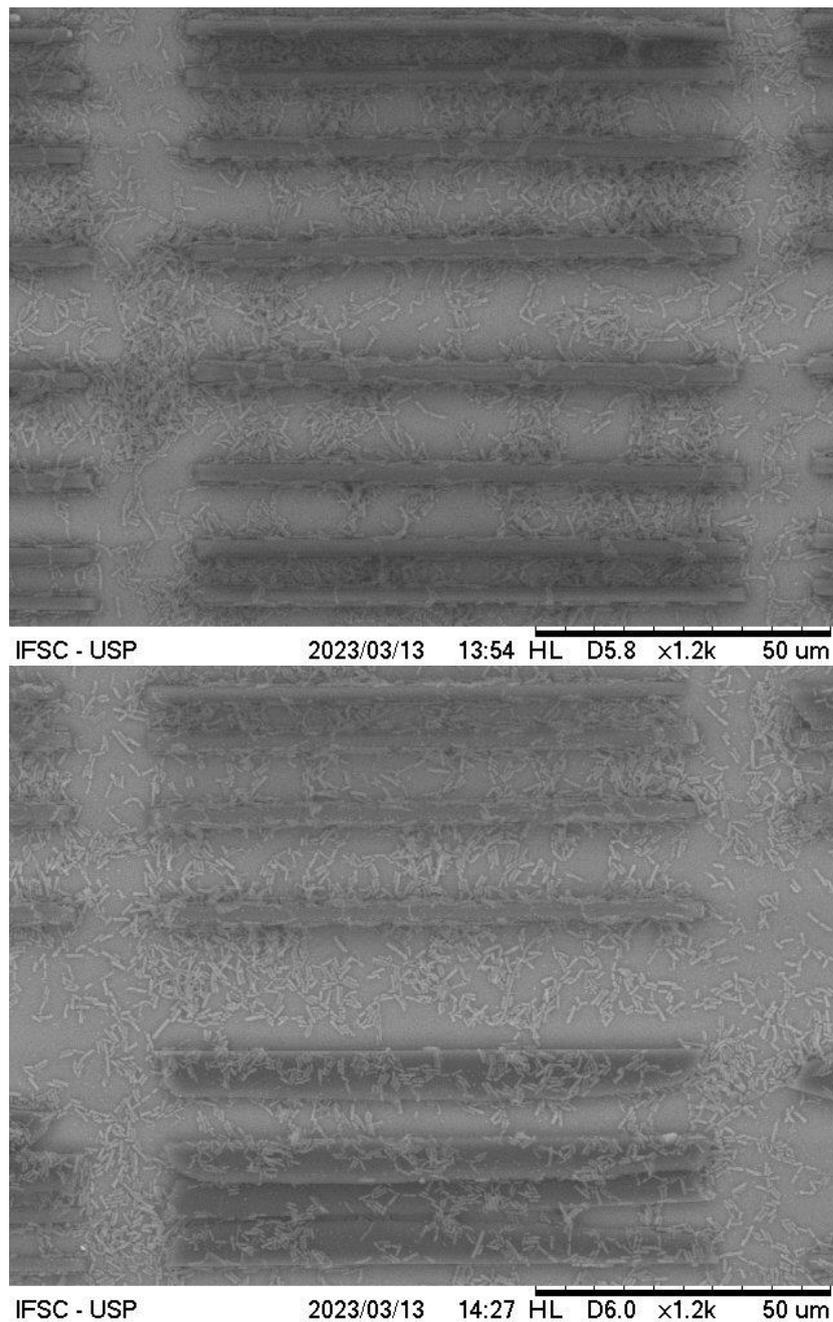


Figura 5.6 – MEV do *pool* de probióticos para 12 horas (esquerda) e 24 horas (direita) de crescimento.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Ademais do mesmo problema de tombamento sobredito no caso da estrutura utilizada para o crescimento de 24 horas, não se nota particular evolução na dinâmica populacional com o passar do tempo. Isto pode, na verdade, ser interpretado como um indicativo de que a presença de um espaço demasiado amplo na porção central da estrutura colaborou para inibir um melhor desenvolvimento das bactérias nas partes da estrutura em que as linhas fabricadas estão mais próximas. De modo distinto do que se vê na Fig. 5.5, não existe apreciável adensamento de bactérias nas estruturas.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O principal objetivo deste trabalho foi o de fabricar microestruturas tridimensionais à base de monômeros acrílicos por meio da técnica de polimerização via absorção de dois fótons e empregá-las no cultivo de bactérias probióticas. Uma vez que são bactérias de interesse comercial, entender seu comportamento em ambientes microfabricados pode levar a melhorias de cultivo e novas técnicas de entrega dessas bactérias em fármacos ou outras formas de consumo probiótico.

Por meio do uso de monômeros tri e penta-acrílicos com propriedades particulares, foi possível criar uma mistura que gerou estruturas com boas propriedades mecânicas e baixa rugosidade superficial. Excetuando-se algumas estruturas, em que a fabricação foi insatisfatória, não havendo boa adesão ao substrato, mesmo com procedimentos de lavagem, cultivo e pós-processamento, a maior parte das estruturas pôde ser analisada em microscopia óptica, de fluorescência e de varredura eletrônica para avaliar o desenvolvimento bacteriano.

Inicialmente, foram fabricadas estruturas distintas, replicáveis e tesseláveis para avaliar sua compatibilidade com o desenvolvimento de bactérias que habitam a microbiota humana, uma vez que por usar um fotoiniciador, a formação de radicais livres pela cisão química promovida pela A2F poderia acarretar em danos à função celular. Desta maneira, tesselações em padrão favo de mel, com prismas hexagonais ociosos, e em padrão de carpete, com prismas quadrados fabricados com base numa curva de Hilbert, foram fabricadas.

Foram feitos testes de biocompatibilidade com bactérias *Escherichia coli* e como resultado ponderou-se que ambientes amplos não são favoráveis ao desenvolvimento das bactérias em caráter de biofilme. Apesar disso, as estruturas fabricadas demonstraram ser bons aceleradores de crescimento bacteriano, com a adição de que estruturas muito rugosas ou estreitas demais (da ordem de grandeza de uma bactéria) não são muito atrativas para a formação de grandes grupamentos de bactérias.

Tendo depreendido que nem ambientes amplos demais nem restritos demais são desejáveis, foram confeccionadas novas estruturas com base em padrões de sulcos, concêntricos ou paralelos, formados a partir da fabricação de paredes circulares ou lineares. Desta maneira, buscava-se replicar uma alternativa a um ambiente recluso e outro ligeiramente mais aberto, tendo ainda assim espaços que promoviam certa aglutinação das bactérias, com a distância média entre as paredes sendo de duas a três vezes o comprimento das bactérias.

Uma vez fabricadas as estruturas, foi inoculado um conjunto de bactérias probióticas, sendo elas *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* e *Bifidobacterium lactis*. Tais bactérias se desenvolveram bem nos microambientes e demonstraram aptidão para crescerem rentes às paredes das estruturas fabricadas na primeira rodada de cultivo microbial *in vitro*. Nesse caso, pelo tombamento de algumas das estruturas lineares, não foi possível inferir qual estrutura era mais propícia para a formação de aglomerados de bactérias.

Num segundo momento, em que nova rodada de cultivo *in vitro* foi procedida, as percepções levantadas foram reforçadas e notou-se que as estruturas lineares se mostraram excelentes ambientes para a proliferação dos probióticos em seu interior, com a prevalência de bactérias ocorrendo quase que somente em seu interior.

Uma terceira fase de testes foi realizada a fim de conhecer a influência do aspecto temporal no desenvolvimento bacteriano nesses ambientes. Tal estudo veio a revelar um novo comportamento que havia sido notado em estudos anteriores em nosso grupo de pesquisa, isto é, o desenvolvimento bacteriano em estruturas verticais tende a ocorrer de modo a ligar as estruturas pelo caminho mais curto, como se os biofilmes bacterianos formassem cortinas entre as paredes.

Por fim, a título de contraprova, notou-se que um modelo de estrutura feita de sulcos paralelos não equidistantes, mais afastados ao centro, não deu origem a aglomerados de bactérias, mesmo tendo sido executado na mesma janela de tempo que a terceira fase de crescimento probiótico.

Em continuação a este trabalho, é possível superar novos desafios, propor novas estruturas e executar novos experimentos. Uma primeira dificuldade a ser superada é a otimização da adesão das estruturas fabricadas ao substrato, sendo possível trocar a proporção dos monômeros na resina acrílica, melhorar o alinhamento do sistema laser para que a primeira camada fabricada fique mais rente ao substrato ou ainda otimizar o método de fixação e transporte das estruturas para performar os testes biológicos. É possível também estabelecer um método de acompanhamento em tempo real do crescimento das bactérias nas microestruturas com microscopia óptica para melhor interpretar os aspectos do desenvolvimento bacteriano nas microestruturas e em seus arredores.

REFERÊNCIAS

- 1 NATURE PHOTONICS. The hidden face of nanophotonics. **Nature Photonics**, v. 5, n. 7, p. 379–379, July 2011. DOI: 10.1038/nphoton.2011.141.
- 2 VUKUSIC, P.; SAMBLES, J. R. Photonic structures in biology. **Nature**, v. 424, n. 6950, p. 852–855, Aug. 2003. DOI: 10.1038/nature01941.
- 3 AGRAWAL, G. P.; BOYD, R. W. **Contemporary nonlinear optics**. New York: Academic Press, 1992. 494 p. ISBN 9780323148207.
- 4 GATTASS, R.; MAZUR, E. Femtosecond laser micromachining in transparent materials. **Nature Photonics**, v. 2, p. 219–225, Apr. 2008.
- 5 LIU, X.; DU, D.; MOUROU, G. Laser ablation and micromachining with ultrashort laser pulses. **IEEE Journal of Quantum Electronics**, v. 33, n. 10, p. 1706–1716, 1997.
- 6 SHIRK, M. D.; MOLIAN, P. A. A review of ultrashort pulsed laser ablation of materials. **Journal of Laser Applications**, v. 10, n. 1, p. 18–28, 1998. DOI: 10.2351/1.521827.
- 7 LAFRATTA, C. *et al.* Multiphoton fabrication. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 33, p. 6238–6258, 2007. DOI: 10.1002/anie.200603995.
- 8 LI, L.; FOURKAS, J. T. Multiphoton polymerization. **Materials Today**, v. 10, n. 6, p. 30–37, 2007.
- 9 MARUO, S.; FOURKAS, J. Recent progress in multiphoton microfabrication. **Laser & Photonics Reviews**, v. 2, n. 1-2, p. 100–111, 2008. DOI: 10.1002/lpor.200710039.
- 10 KABOURAKI, E. *et al.* Redox multiphoton polymerization for 3d nanofabrication. **Nano Letters**, v. 13, n. 8, p. 3831–3835, July 2013.
- 11 BALDACCHINI, T. *et al.* Acrylic-based resin with favorable properties for threedimensional two-photon polymerization. **Journal of Applied Physics**, v. 95, n. 11, p. 6072–6076, June 2004.
- 12 DORAISWAMY, A. *et al.* Fabrication of microneedles using two photon polymerization for transdermal delivery of nanomaterials. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 10, p. 6305–6312, Oct. 2010.
- 13 SCHIZAS, C. *et al.* 3D biomedical implants fabricated using direct laser writing. **Proceedings SPIE**, v. 7591, p. 17-24, 2010. DOI: 10.1117/12.840695.
- 14 OVSIANIKOV, A.; OSTENDORF, A.; CHICHKOV, B. Three-dimensional photofabrication with femtosecond lasers for applications in photonics and biomedicine. **Applied Surface Science**, v. 253, p. 6599–6602, May 2007.
- 15 STRATAKIS, E. *et al.* Laser-based micro/nanoengineering for biological applications. **Progress in Quantum Electronics**, v. 33, p. 127–163, Sept. 2009.

- 16 GITTARD, S. *et al.* Two photon polymerization-micromolding of polyethylene glycol-gentamicin sulfate microneedles. **Advanced Engineering Materials**, v. 12, p. B77–B82, Mar. 2010.
- 17 GITTARD, S. D. *et al.* Two-photon polymerization of microneedles for transdermal drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 7, n. 4, p. 513–533, 2010. DOI: 10.1517/17425241003628171.
- 18 GITTARD, S. *et al.* Fabrication of microscale medical devices by two-photon polymerization with multiple foci via a spatial light modulator. **Biomedical Optics Express**, v. 2, p. 3167–3178, Nov 2011.
- 19 PALMA, M. *et al.* Advances in functional assemblies for regenerative medicine. **Advanced Healthcare Materials**, v. 4, n. 16, p. 2500–2519, 2015. DOI: 10.1002/adhm.201500412.
- 20 HARDY, J. G. *et al.* Multiphoton microfabrication of conducting polymer-based biomaterials. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, p. 5001–5004, 2015. DOI: 10.1039/C5TB00104H.
- 21 DANILEVICIUS, P. *et al.* The effect of porosity on cell ingrowth into accurately defined, laser-made, polylactide-based 3d scaffolds. **Applied Surface Science**, v. 336, p. 2–10, May 2015.
- 22 HOHMANN, J. K. *et al.* Three-dimensional μ -printing: an enabling technology. **Advanced Optical Materials**, v. 3, n. 11, p. 1488–1507, 2015. DOI: 10.1002/adom.201500328.
- 23 HERNANDEZ, D. S. *et al.* Functionalizing micro-3d-printed protein hydrogels for cell adhesion and patterning. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 4 10, p. 1818–1826, 2016.
- 24 CONNELL, J. L. *et al.* 3D printing of microscopic bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 46, p. 18380–18385, 2013. DOI: 10.1073/pnas.1309729110.
- 25 TAYALIA, P. *et al.* 3D cell-migration studies using two-photon engineered polymer scaffolds. **Advanced Materials**, v. 20, n. 23, p. 4494–4498, 2008. DOI: 10.1002/adma.200801319.
- 26 OLIVER, C. R. *et al.* On-demand isolation and manipulation of *c. elegans* by in vitro maskless photopatterning. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1–16, Jan. 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0145935.
- 27 AVILA, O. *et al.* Fabrication of microenvironments with different geometrical features for cell growth studies. **Journal of Laser Micro Nanoengineering**, v. 9, p. 248–251, Nov. 2014.
- 28 OTUKA, A. *et al.* Direct laser writing by two-photon polymerization as a tool for developing microenvironments for evaluation of bacterial growth. **Materials Science and Engineering C**, v. 35, p. 185–189, 2014. DOI: 10.1016/j.msec.2013.11.005.

- 29 SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 1–16, mar. 2006. DOI: 10.1590/s1516-93322006000100002.
- 30 JAMILIAN, M. *et al.* Effects of probiotic supplementation on metabolic status in pregnant women: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Archives of Iranian Medicine**, v. 19, n. 10, p. 687–682, Oct. 2016.
- 31 ODA, Y. *et al.* Role of lactobacillus rhamnosus in oral health of disabled individuals. **Current Oral Health Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–6, Mar. 2022. DOI: 10.1007/s40496-022-00305-0.
- 32 AKBARI, E. *et al.* Effect of probiotic supplementation on cognitive function and metabolic status in Alzheimer's disease: a randomized, double-blind and controlled trial. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 8, Nov. 2016. DOI: 10.3389/fnagi.2016.00256.
- 33 MORAES, F. P. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, out. 2007. DOI: 10.5216/ref.v3i2.2082.
- 34 LIN, Y.; XU, J. Microstructures fabricated by two-photon polymerization and their remote manipulation techniques: toward 3D printing of micromachines. **Advanced Optical Materials**, v. 6, n. 8, p. 1701359, Apr. 2018.
- 35 EINSTEIN, A. Strahlungs-emission und absorption nach der quantentheorie. **Deutsche Physikalische Gesellschaft**, v. 18, p. 318–323, Jan. 1916.
- 36 GÖPPERT-MAYER, M. Über elementarakte mit zwei quantensprüngen. **Annalen der Physik**, v. 401, n. 3, p. 273–294, 1931. DOI: 10.1002/andp.19314010303.
- 37 MAIMAN, T. H. Stimulated optical radiation in ruby. **Nature**, v. 187, n. 4736, p. 493–494, Aug. 1960.
- 38 KAISER, W.; GARRETT, C. G. B. Two-photon excitation in CaF₂:Eu²⁺. **Physical Review Letters**, v. 7, p. 229–231, Sept. 1961. DOI: 10.1103/PhysRevLett.7.229.
- 39 CORREA, D. S. *et al.* Two-photon polymerization fabrication of doped microstructures. In: GOMES, A. D. S. (ed.). **Polymerization**. Rijeka: IntechOpen, 2012. cap. 15. DOI: 10.5772/36061.
- 40 OTUKA, A. J. G. **Estruturas poliméricas com nanotubos de carbono**: processamento a laser, caracterização e aplicações. 2016. Tese (Doutorado em Ciências) — Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016. DOI: 10.11606/t.18.2017.tde-10112017-173923.
- 41 GRIFFITHS, D. J. **Introduction to electrodynamics**. Cambridge: Cambridge University Press, 2017. DOI: 10.1017/9781108333511.
- 42 BOYD, R. W. **Nonlinear optics**. 3rd ed. New York: Academic Press, 2008.

- 43 MENDONÇA, C. R. *et al.* A novel photoinitiator for microfabrication via two-photon polymerization. 2006, Anais. Washington, D. C.: Optical Society of America - OSA, 2006.
- 44 PEREPECHKO, I. An introduction to polymer physics. Moscow: Mir, 1981.
- 45 ASKELAND, D. R.; WENDELIN, W. J. **Ciência e engenharia dos materiais**. 2. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2015.
- 46 CALLISTER, W. D.; RETHWISCH, D. G. **Materials science and engineering: an introduction**. 9th ed. Hoboken, NJ: Wiley, 2014.
- 47 FOUASSIER, J.-P. **Photoinitiation, photopolymerization, and photocuring: fundamentals and applications**. New York: Hanser, 1995.
- 48 LEE, K.-S. *et al.* Recent developments in the use of two-photon polymerization in precise 2D and 3D microfabrications. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 17, n. 2, p. 72–82, 2006. DOI: 10.1002/pat.664.
- 49 NGUYEN, A. K.; NARAYAN, R. J. Two-photon polymerization for biological applications. **Materials Today**, v. 20, n. 6, p. 314–322, 2017.
- 50 TENAILLON, O. *et al.* The population genetics of commensal *escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, v. 8, n. 3, p. 207–217, Mar. 2010. DOI: 10.1038/nrmicro2298.
- 51 REUTER, G. The Lactobacillus and Bifidobacterium microflora of the human intestine: composition and succession. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 43–53, Sept. 2001.
- 52 AL-HADIDI, A. *et al.* Lactobacillus reuteri in its biofilm state improves protection from experimental necrotizing enterocolitis. **Nutrients**, v. 13, n. 3, p. 918, Mar. 2021. DOI: 10.3390/nu13030918.
- 53 STEPANOVIC, S. *et al.* Biofilm formation by salmonella spp. and listeria monocytogenes on plastic surface. *Letters in Applied Microbiology*, v. 38, n. 5, p. 428–432, May 2004. DOI: 10.1111/j.1472-765x.2004.01513.x.
- 54 SALAS-JARA, M. *et al.* Biofilm forming lactobacillus: new challenges for the development of probiotics. **Microorganisms**, v. 4, n. 3, p. 35, Sept. 2016. DOI: 10.3390/microorganisms4030035.
- 55 DUVAL, K. *et al.* Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. **Physiology**, v. 32, n. 4, p. 266–277, July 2017.
- 56 BAKHTINA, N. A. *et al.* 3D synthetic microstructures fabricated by two-photon polymerization promote homogeneous expression of NANOG and ESRRB in mouse embryonic stem cells. **Advanced Materials Interfaces**, v. 8, n. 6, p. 2001964, Jan. 2021. DOI: 10.1002/admi.202001964.

- 57 KOROLEVA, A. *et al.* In Vitro development of human iPSC-derived functional neuronal networks on laser-fabricated 3D scaffolds. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 13, n. 7, p. 7839–7853, Feb. 2021. DOI: 10.1021/acsami.0c16616.
- 58 DOBOS, A. *et al.* On-chip high-definition bioprinting of microvascular structures. **Biofabrication**, v. 13, n. 1, p. 015016, Dec. 2020. DOI: 10.1088/1758-5090/abb063.
- 59 ROVIRA, D. S. *et al.* Additive manufacturing of polymeric scaffolds for biomimetic cell membrane engineering. **Materials & Design**, v. 201, p. 109486, Mar. 2021. DOI: 10.1016/j.matdes.2021.109486.
- 60 HOORICK, J. V. *et al.* (Photo-)crosslinkable gelatin derivatives for biofabrication applications. **Acta Biomaterialia**, v. 97, p. 46–73, Oct. 2019. DOI: 10.1016/j.actbio.2019.07.035.
- 61 LI, B. *et al.* A bio-inspired 3d micro-structure for graphene-based bacteria sensing. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 123, p. 77–84, Jan. 2019. DOI: 10.1016/j.bios.2018.09.087.
- 62 HOORICK, J. V. *et al.* Thiol-norbornene gelatin hydrogels: influence of thiolated crosslinker on network properties and high definition 3D printing. **Biofabrication**, v. 13, n. 1, p. 015017, Jan. 2021. DOI: 10.1088/1758-5090/abc95f.
- 63 FORMANEK, F. *et al.* Three-dimensional fabrication of metallic nanostructures over large areas by two-photon polymerization. **Optics Express**, v. 14, n. 2, p. 800–809, Jan. 2006.
- 64 TIMASHEV, P. S. *et al.* 3D in vitro platform produced by two-photon polymerization for the analysis of neural network formation and function. **Biomedical Physics & Engineering Express**, v. 2, n. 3, p. 035001, Apr. 2016.
- 65 OTUKA, A. J. G. **Fabricação de microestruturas com múltiplas dopagens via fotopolimerização por absorção de dois fótons.** 2012. Dissertação (Mestrado 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, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.
- 66 TOMAZIO, N. B. **Fabricação de micro-ressonadores ópticos via fotopolimerização por absorção de dois fótons.** 2016. Dissertação (Mestrado em Ciência) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.
- 67 KOTZ, F. *et al.* Two-photon polymerization of nanocomposites for the fabrication of transparent fused silica glass microstructures. **Advanced Materials**, v. 33, n. 9, p. 2006341, Mar. 2021.
- 68 KOROLEVA, A. V. *et al.* Polylactide-based biodegradable scaffolds fabricated by two-photon polymerization for neurotransplantation. **Sovremennye Tehnologii V Medicine**, v. 8, n. 4, p. 23–29, Dec. 2016. DOI:10.17691/stm2016.8.4.03.

69 TIMASHEV, P. *et al.* Novel biodegradable star-shaped polylactide scaffolds for bone regeneration fabricated by two-photon polymerization. **Nanomedicine**, v. 11, n. 9, p. 1041–1053, May 2016.

70 OTUKA, A. J. G. *et al.* Bacterial cellulose growth on 3D acrylate-based microstructures fabricated by two-photon polymerization. **Journal of Physics: photonics**, v. 3, n. 2, p. 024003, 2021.

71 MENDONÇA, C. *et al.* Two-photon absorption spectrum of the photoinitiator lucirin tpo-l. **Applied Physics A**, v. 90, p. 633–636, Mar. 2008.

72 KALANTZOPOULOS, G. Fermented products with probiotic qualities. **Anaerobe**, v. 3, n. 2–3, p. 185–190, Apr. 1997.

73 AZAD, MD. A. K. *et al.* Probiotic species in the modulation of gut microbiota: an overview. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1–8, 2018.

74 KIM, J. Y. *et al.* Effect of probiotic mix (*Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*) in the primary prevention of eczema: a doubleblind, randomized, placebo-controlled trial. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 21, n. 2p2, p. e386–e393, Mar. 2010.

75 CHUANG, L.-C. *et al.* Probiotic *Lactobacillus paracasei* effect on cariogenic bacterial flora. **Clinical Oral Investigations**, v. 15, n. 4, p. 471–476, Aug. 2011