

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

CLARA ANDRADE SAPIO

Fabricação de microambientes bacterianos através da polimerização por absorção
de dois fótons

São Carlos
2022

CLARA ANDRADE SAPIO

**Fabricação de microambientes bacterianos através da polimerização por
absorção de dois fótons**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Instituto de Física de São Carlos da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Bacharel em
Física.

Orientador: Prof. Dr. Cleber Renato Mendonça –
Instituto de Física de São Carlos

**São Carlos
2022**

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.

RESUMO

O desenvolvimento da microfabricação pela técnica de polimerização via absorção de dois fótons vêm ganhando notoriedade no campo da biofotônica. O uso dessa técnica aliada ao estudo biológico de ambientes e dos microorganismos a serem utilizados possibilitou a criação de microambientes biocompatíveis para estudos de proliferação, adesão e migração bacteriana, constituindo uma área de estudo de grande interesse para o campo interdisciplinar da Física e da Biologia. Dessa forma, o presente estudo constitui-se da utilização de um laser de pulsos ultracurtos capaz de promover o fenômeno não linear da absorção de dois fótons quando em contato com uma resina polimérica que possui um fotoinicador adequado. A partir desse processo, ocorre uma reação de polimerização na amostra, permitindo a fabricação de estruturas versáteis e com geometrias diferenciadas, com o propósito de servirem de microambientes para o estudo de características da bactéria da espécie *Cutibacterium acnes*. Os resultados deste trabalho evidenciam a biocompatibilidade dos ambientes fabricados com o desenvolvimento das bactérias e abrem margens para possíveis análises sobre a influência da geometria das estruturas no crescimento da *C. acnes*, entre outros aspectos.

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

1 INTRODUÇÃO

A Fotônica é uma área que alia conhecimentos de óptica com os respectivos dispositivos criados com várias finalidades, tais como guiar a luz com a produção de guias de onda diversos [1], fabricação de ressonadores ópticos [2], manipulação de nanopartículas metálicas [3] e, como é o caso dessa pesquisa, fabricação de microestruturas desenvolvidas para estudos biológicos.

No intuito de mimetizar estruturas biológicas e ambientes *in vivo*, diversas técnicas de fabricação foram utilizadas, muitas delas apresentando desvantagens em relação ao método de fabricação via polimerização por absorção de dois fótons [4]. A boa resolução e versatilidade dessa técnica permitiu a confecção de estruturas tanto bidimensionais quanto tridimensionais, com variados tamanhos, geometrias e porosidades. No caso da polimerização via absorção de dois fótons (P2F), é necessária alta intensidade luminosa para promover uma excitação não linear, o que torna o laser de femtossegundos com cristal de Ti:safira um bom candidato. Os pulsos ultracurtos desse laser garantem altas intensidades de pico e a focalização do laser limita-se a um pequeno volume

focal, denominado voxel. A incidência do laser na amostra, preparada a partir de uma resina polimérica com um fotoiniciador adequado, faz com que seja possível fabricar estruturas com resolução acima do limite de difração, penetrar na amostra sem causar danos superficiais e pode-se explorar a liberdade de geometrias na fabricação [5]. É importante ressaltar que a P2F é uma técnica baseada no uso da óptica não linear e fundamentada no conceito de absorção de dois fótons, que será explorado nas seções seguintes. Com isso, a interação do laser com a amostra foge dos resultados típicos esperados pela óptica linear, a partir do surgimento de termos de ordens elevadas na polarização do meio, diretamente dependente do campo eletromagnético incidente. No caso específico das aplicações biológicas, a P2F mostrou-se de grande utilidade na fabricação de microagulhas [6], microválvulas [7] e plataformas biocompatíveis para o estudo de microorganismos [8].

Neste trabalho, foi feita a fabricação de estruturas com diferentes geometrias por meio do processo de polimerização via absorção de dois fótons, exibindo a versatilidade desta técnica. Além disso, também foi realizado o cultivo de bactérias da espécie *C. acnes* nas estruturas fabricadas, objetivando estudar a biocompatibilidade dos materiais utilizados com o microorganismo e caracterizar possíveis preferências de desenvolvimento deste em estruturas de tamanhos, espaçamentos e geometrias distintas.

2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1. Modelo clássico da interação entre luz e matéria

O eletromagnetismo clássico como conhecemos é pautado nas equações de Maxwell e nas considerações de Lorentz acerca da interação entre luz e matéria [9]. Para tanto, considera-se que os elétrons oscilam harmonicamente com uma força externa oriunda de um campo eletromagnético descrito por uma onda plana e harmônica, conforme a equação:

$$E(z, t) = E_0 \cos(\omega t - kz) \quad (2.1)$$

No regime de baixa intensidade do campo elétrico, a polarização induzida no meio apresenta uma resposta linear com o campo dada por:

$$P = \epsilon_0 \chi E \quad (2.2)$$

onde ϵ_0 é a permissividade do vácuo e χ é a susceptibilidade elétrica do meio.

2.2. Óptica não linear

Através do tratamento semi-clássico da interação entre luz e matéria, Einstein pôde prever a emissão estimulada da luz e, consequentemente, o princípio fundamental do laser, que foi descoberto por volta de 1917 [11]. Em virtude do descobrimento do laser e da utilização de diferentes cavidades e energias por pulso, veio à tona o conhecimento de uma nova área no campo da Física: a óptica não linear.

Quando o campo elétrico externo se torna comparável ao campo interatômico, que liga os elétrons ao núcleo ($E_{interatômico} \approx 10^{11}V/m$), o material passa a responder de forma não linear ao campo aplicado [2]. Nesta situação, a polarização induzida no meio passa a ser escrita como uma série de potências do campo elétrico, dada por:

$$P = \varepsilon_0\chi^{(1)}E + \varepsilon_0\chi^{(2)}E^2 + \varepsilon_0\chi^{(3)}E^3 + \dots \quad (2.3)$$

Na Eq. 2.3, os termos $\chi^{(2)}$ e $\chi^{(3)}$ representam as susceptibilidades elétricas de segunda e terceira ordem, respectivamente. Esses termos de ordens mais altas do campo elétrico dão origem a fenômenos ópticos de caráter não linear, como por exemplo a geração de segundo harmônico [10] e a retificação óptica [11] (associadas ao termo quadrático), além da geração de terceiro harmônico [12] e a dependência do índice de refração (efeito Kerr óptico) [13] e do coeficiente de absorção (associado à absorção multifotônica) [14] com a intensidade da radiação incidente (associadas ao termo cúbico).

Podemos ver matematicamente esses efeitos não lineares substituindo a Eq. 2.1 (campo elétrico escrito como um cosseno) na Eq. 2.3 e em seguida reescrevendo a expressão da polarização em termos de potências da função cosseno. Utilizando identidades trigonométricas, temos:

$$\begin{aligned} P = & \varepsilon_0\chi^{(1)}E_0\cos(\omega t - kz) + \frac{1}{2}\varepsilon_0\chi^{(2)}E_0^2[1 + \cos(2\omega t - 2kz)] + \\ & \varepsilon_0\chi^{(3)}E_0^3\left[\frac{3}{4}\cos(\omega t - kz) + \frac{1}{4}\cos(3\omega t - 3kz)\right] + \dots \end{aligned} \quad (2.4)$$

Dessa forma, vê-se que o termo de $\chi^{(1)}$ representa a polarização linear, os termos de cosseno com frequência de 2ω e 3ω representam os efeitos não lineares de geração de segundo e terceiro harmônico, o termo que não possui cosseno está ligado ao fenômeno de

retificação óptica e o termo de $\chi^{(3)}$ que multiplica $\cos(\omega t - kz)$ é o que expressa o efeito Kerr óptico e a absorção multifotônica.

2.3. Absorção de dois fótons

Como mencionado na seção anterior, a absorção de dois fótons está ligada ao termo de terceira ordem da susceptibilidade elétrica. Quando o material é submetido a altas intensidades de radiação incidente, um dos efeitos introduzidos pelos termos de terceira ordem na polarização é fazer com que o coeficiente de absorção total da amostra dependa da intensidade da luz incidente:

$$\alpha(I) = \alpha_0 + \beta I \quad (2.5)$$

sendo α_0 o coeficiente de absorção linear, β o coeficiente de absorção de dois fótons e I a intensidade da luz incidente.

O conceito teórico da absorção de dois fótons foi previsto pela física germano-americana Maria Göppert-Mayer em 1931 [15] em sua tese de doutorado na Universidade de Gottingen. Futura ganhadora do Prêmio Nobel de Física, essa cientista calculou a probabilidade de transição de um estado atômico para outro de maior energia por meio da absorção simultânea de dois fótons. Alguns anos mais tarde, nas experiências de Kaiser e Garret esse efeito foi observado ao se estudar a fluorescência de um cristal de $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{2+}$ [16]. A absorção de dois fótons ganhou atenção quando ocorreu a invenção dos lasers de pulsos ultracurtos, tal como o de Ti:safira, e atualmente esse conceito é explorado em diferentes áreas, como limitadores ópticos [17], armazenamento óptico tridimensional [18], microscopia de fluorescência [19] e fabricação de estruturas via polimerização [20].

A absorção de dois fótons (A2F) é uma consequência da interação não linear entre a luz e a matéria, sendo um processo no qual um átomo é excitado para um estado de energia mais alta através da absorção simultânea de dois fótons (ao invés de um só como previa a óptica linear). Esse processo pode ser classificado como degenerado quando ambos os fótons possuem mesma energia, ou não degenerado quando cada fóton possui energia distinta, mantendo sempre a condição de que a soma das energias dos dois fótons deve corresponder à energia de transição eletrônica.

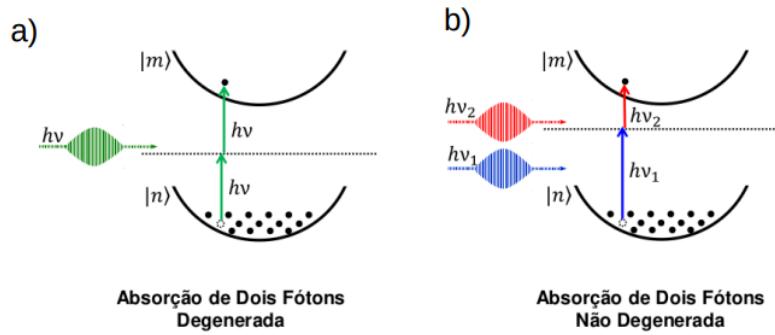


Figura 2.1: Representação do processo de absorção de dois fótons degenerada (a) e não degenerada (b). Fonte: [5]

A probabilidade de ocorrência do fenômeno da A2F é quantificada pelo coeficiente β presente na Eq. 2.5 e pode ser expresso em função da seção de choque de absorção de dois fótons δ_{A2F} , do número N de absorvedores por unidade de volume da energia $h\nu$ envolvida:

$$\beta = \frac{\delta_{A2F} N}{h\nu} \quad (2.6)$$

2.4. Fundamentos da polimerização por absorção de dois fótons

Em muitas técnicas de microfabricação, faz-se necessária a utilização de máscaras como agentes intermediários para proteger a amostra e solidificar a estrutura apenas na região exposta à luz ou apenas na região protegida pela máscara, dependendo do tipo do fotoresiste utilizado (negativo ou positivo, respectivamente). Entretanto, no caso da P2F, o uso de máscaras é dispensável, pois a reação de polimerização da amostra restringe-se às vizinhas de um pequeno volume focal (voxel), garantindo confinamento espacial tal como mostra a Fig. 2.2.

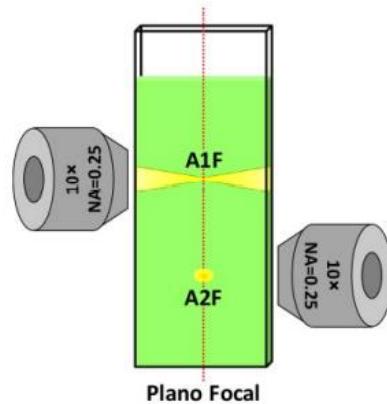


Figura 2.2: Confinamento espacial da absorção de dois fótons (A2F) em comparação com o da absorção de um fóton (A1F). Fonte: [5]

Existem vários tipos de reação de fotopolimerização no processo de microfabricação via A2F, porém destaca-se a polimerização por geração de radicais livres, por conta da alta taxa de reação e grande disponibilidade de monômeros e fotoiniciadores para que ela ocorra [2]. Esse processo divide-se em três etapas, sendo uma delas representada esquematicamente na Fig. 2.3.

Na primeira etapa (iniciação), ocorre a formação de radicais livres por meio da interação da luz com o fotoiniciador. Esses radicais livres reagem com monômeros, quebrando as ligações duplas entre os carbonos e promovendo a formação de centros ativos. Na segunda etapa (propagação), esses centros ativos se combinam com novos monômeros e esse processo se repete várias vezes, pois essa nova combinação será um novo centro ativo e, portanto, se combinará com outro monômero. Assim, a cadeia molecular é sucessivamente aumentada até formar uma macromolécula (polímero) e, por fim, ocorre a terceira etapa (terminação), na qual os centros ativos das cadeias são suprimidos ao reagirem com outros centros ativos (reação biomolecular entre dois macrorradicais) [21].

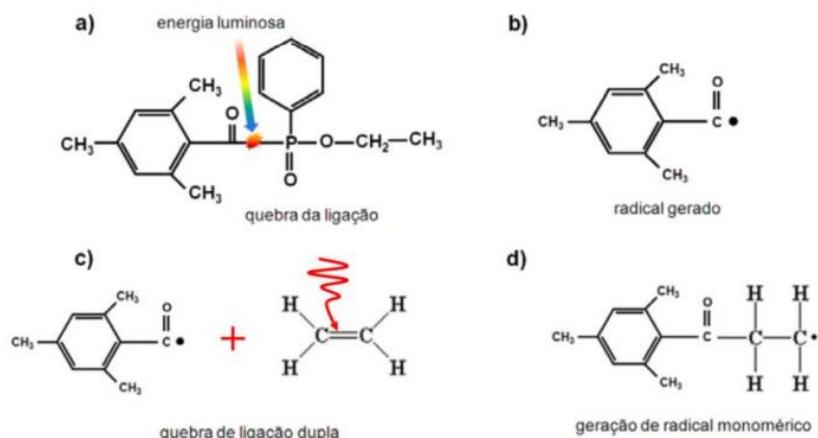


Figura 2.3: Etapa de iniciação da reação de fotopolimerização desde a reação do fotoiniciador com a luz até a geração de um centro ativo. Fonte: [2]

A fotopolimerização ocorre se a intensidade da radiação incidente encontra-se acima do limiar de polimerização da amostra, tal como mostram as intensidades I_2 e I_3 no gráfico da Fig. 2.4. A intensidade I_1 não é suficiente para que ocorra a fotopolimerização.

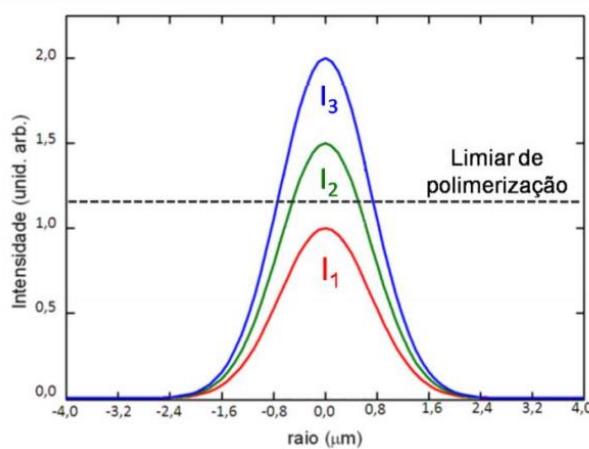


Figura 2.4: Representação gráfica do limiar de polimerização e de diferentes intensidades da radiação em função da coordenada radial no foco de um feixe gaussiano. Fonte: [2]

Este limiar é uma propriedade vantajosa para a A2F, pois o ajuste da intensidade do laser confere maior resolução na fabricação das estruturas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Preparação da amostra

Em cima de um substrato de vidro, é preparada uma amostra contendo dois monômeros e um fotoiniciador. Os monômeros utilizados neste trabalho são SR-399 e SR-368, representados estruturalmente na Fig. 3.1 e o fotoiniciador responsável por promover a fotopolimerização por radicais livres é o Lucirin TPO-L, cuja fórmula estrutural está representada na Fig. 3.2.

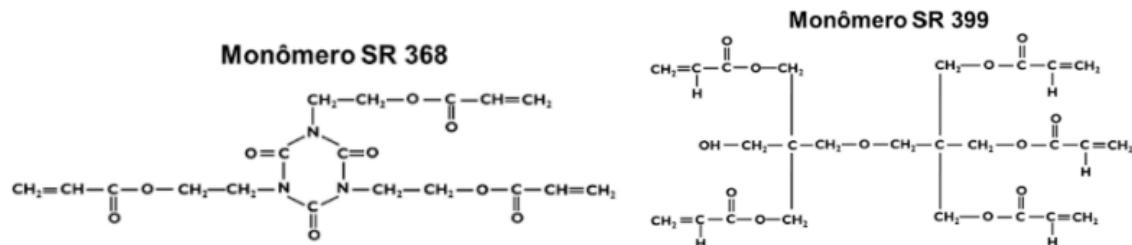


Figura 3.1: Fórmulas estruturais dos monômeros SR-368 e SR-399 utilizados. Fonte: [5]

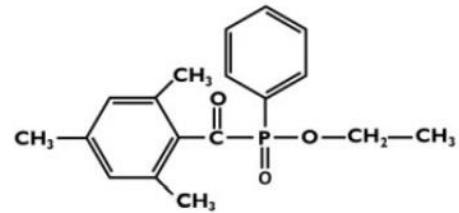


Figura 3.2: Fórmula estrutural do fotoiniciador Lucirin TPO-L. Fonte: [22]

3.2. Sistema de microfabricação

Depois de preparada, a amostra é levada para o sistema de microfabricação mostrado esquematicamente na Fig. 3.3.

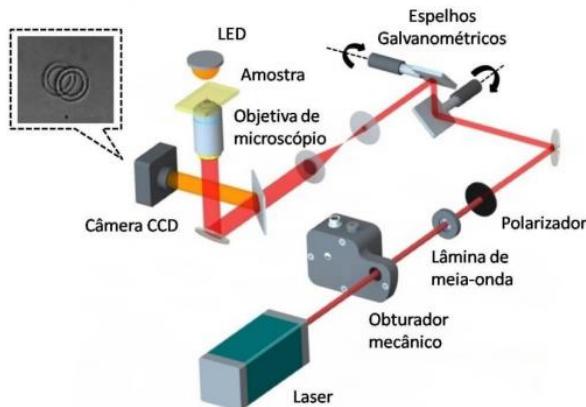


Figura 3.3: Esquema experimental da microfabricação via P2F. Fonte: [2]

Como laser de bombeio para o oscilador de Ti:safira é utilizado um laser cw (Verdi V-10, Coherent) operando em 532 nm com potência média de 4,5 W. O laser de Ti:safira utilizado no processo de P2F opera no regime de travamento de modos (*mode-locking*) [23], e gera pulsos ultracurtos da ordem de 100 fs, com taxa de repetição de ~ 80 MHz, comprimento de onda centrado em 760 nm e potência média de aproximadamente 440 mW. Para controlar a potência do laser que chegará na amostra, utilizamos uma lâmina de meia onda e um polarizador. Através da utilização de um par de espelhos acoplados a motores galvanométricos, programados por meio da plataforma LabVIEW, é possível controlar o posicionamento xy do feixe no processo de polimerização. O obturador mecânico é usado para evitar que a polimerização ocorra em áreas indesejadas. O imageamento da fabricação é realizado através de uma câmera CCD, sendo que a iluminação da amostra é feita através de um LED vermelho para evitar polimerização linear da resina. A imagem obtida é transferida para o computador, onde então pode-se acompanhar o processo de fabricação camada a camada. Para a fabricação das estruturas, o programa utilizado

é o *LabVIEW*, no qual diferentes geometrias podem ser formuladas e transmitidas para a microfabricação de forma tridimensional. Esse *software* permite que seja ajustada a quantidade de camadas a serem feitas, a densidade de pontos, a velocidade de varredura do laser, entre outros aspectos. Com isso, pode-se otimizar a fabricação e analisar a diferença que faz cada um destes parâmetros para a confecção da estrutura.

O poder de focalização do feixe laser na amostra é feito pela utilização de uma lente objetiva de magnificação 10x (abertura numérica de 0,25).

3.3. Lavagem da amostra e microscopia eletrônica

Finalizada a microfabricação, a amostra é submetida a um processo de lavagem com álcool etílico aquecido a cerca de 70° C durante um período de aproximadamente 10 minutos. Esse processo é necessário para retirar o excesso de resina da amostra e sobrar apenas as estruturas fabricadas. Em seguida, a amostra é colocada em uma estufa até que ocorra o processo de sua secagem total.

Depois de secas, as amostras são observadas no microscópio eletrônico de varredura (MEV) de bancada *Hitachi TM300*, operando a uma tensão de 15 kV. Esse processo é realizado antes do cultivo das bactérias apenas para verificar se a microfabricação ocorreu conforme o esperado e para efetuar medições do tamanho e altura das estruturas.

3.4. Esterilização e cultivo das bactérias

A esterilização da amostra é feita submetendo-a a uma luz ultravioleta por cerca de 30 minutos. Em seguida a amostra é devidamente armazenada e preparada para o transporte, no qual será direcionada para a Universidade Estadual Paulista (UNESP) “Júlio de Mesquita Filho” – Campus Araraquara, de acordo com a parceria estabelecida com o Laboratório de Microbiologia Clínica a fim de efetuar o cultivo das bactérias da espécie *C. acnes*.

O cultivo das bactérias foi realizado através da imersão da amostra em uma placa de Petri esterilizada e contendo 20 mL de inóculo composto pelas colônias das cepas da *C. acnes* e caldo TSB (caldo nutritivo que suporta o crescimento dos microorganismos em questão). Após 12 horas de crescimento do inóculo sobre as amostras, foi realizada uma lavagem com solução salina das lâminas seguida do teste de coloração de Gram. Esta lavagem foi importante para a remoção das células microbianas não aderidas à superfície da amostra.

De volta ao Instituto de Física de São Carlos, as amostras foram, por fim, submetidas a um novo processo de imageamento por meio do MEV descrito na subseção 3.3.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Fabricação das estruturas

A fim de demonstrar a versatilidade da técnica de P2F na fabricação de estruturas de vários tamanhos e geometrias, foram confeccionadas estruturas cilíndricas, hexagonais, em forma de pirâmide e do que denominamos de “falso cone” (pirâmide com base constituída por um polígono de 20 lados).

Na Fig. 4.1 pode-se observar a imagem de uma estrutura de hexágonos em formato de “favo de mel”, uma das primeiras confeccionadas desde o início deste trabalho. Os lados de cada hexágono medem em torno de 50 μm e a altura de cada um está por volta de 20 μm . Pode-se perceber boa integridade estrutural, baixa rugosidade da superfície das estruturas e alta resolução da imagem MEV.

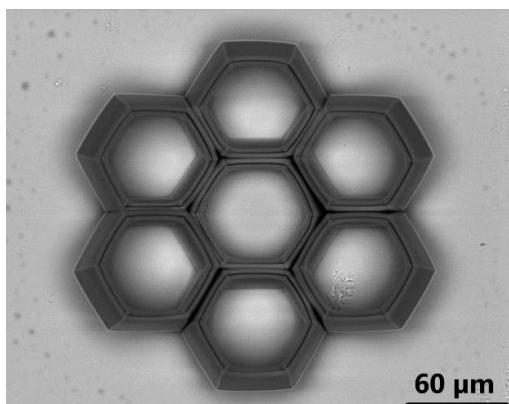


Figura 4.1: Imagem MEV das estruturas hexagonais fabricadas via P2F. Fonte: autora

Além dos hexágonos, várias estruturas foram fabricadas ao longo da pesquisa, podendo evidenciar ainda mais a alta capacidade de fabricação da técnica de P2F. Na Fig. 4.2, pode-se observar uma matriz de pirâmides de base icosagonal, semelhantes a estruturas cônicas. Nestas, o tamanho da base ficou em torno de 16 μm , a altura de cada estrutura ficou por volta de 28 μm e o espaçamento médio entre os “falsos cones” foi de aproximadamente 9 μm . Pode-se observar boa adesão ao substrato, porém foram percebidas algumas irregularidades entre uma estrutura e outra, o que provavelmente se deve ao próprio processo de fabricação das mesmas. Como o processo ocorre camada a camada, algumas diferenças quanto à potência do laser ou problemas relacionados aos pequenos desalinhamentos na hora da fabricação podem influenciar na precisão da geometria das estruturas. Além disso, há um efeito de encolhimento das estruturas e que não ocorre de forma idêntica para cada uma delas, o que interfere nas diferenças de altura entre uma e outra.

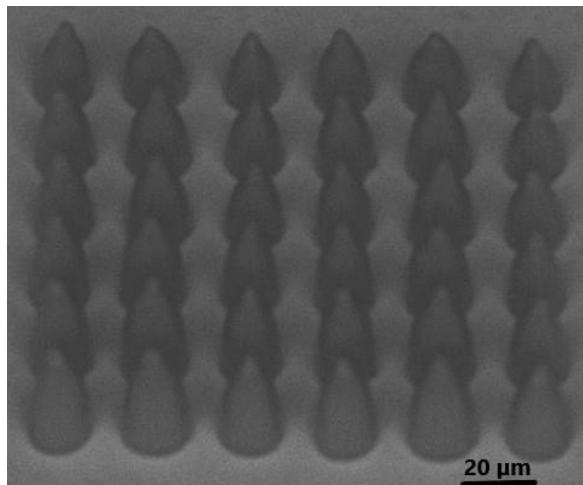


Figura 4.2: Imagem MEV da matriz de pirâmides de base icosagonal. Fonte: autora

Como mais um exemplo da possibilidade que a técnica nos oferece no que diz respeito à exploração de diferentes geometrias, a Fig 4.3 evidencia uma imagem MEV de uma matriz de cilindros ocos, com cerca de 38 µm de diâmetro e 20 µm de altura. O espaçamento entre os cilindros da matriz é cerca de 12 µm. Também neste caso pode-se perceber boa adesão das estruturas ao substrato e boa resolução, embora nota-se algumas diferenças entre um cilindro e outro em termos da altura ou do diâmetro da base, também por conta da sensibilidade do processo de fabricação e pelos efeitos de encolhimento intrínsecos a ele.

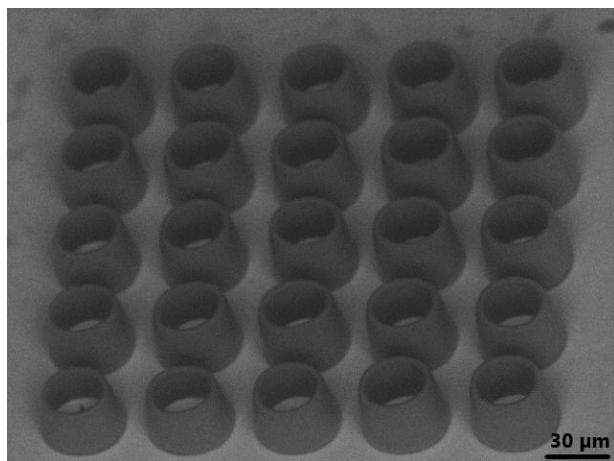


Figura 4.3: Imagens da matriz de cilindros ocos obtida via MEV. Fonte: autora

Em suma, percebe-se que a técnica de P2F é capaz de promover a fabricação de estruturas muito distintas, com controle sobre o formato, espaçamento, altura, entre outros parâmetros. As pequenas irregularidades observadas não foram julgadas como problemas para o desenvolvimento da pesquisa, pois o objetivo das estruturas é servir de microambientes para as bactérias da espécie *C. acnes* e, na prática, a maioria dos ambientes bacterianos não apresenta simetria perfeita.

4.2. Biocompatibilidade

Após a inoculação das bactérias na amostra, as estruturas foram submetidas a um novo processo de imageamento via MEV, a fim de se observar se houve o desenvolvimento das bactérias na região próxima às matrizes das estruturas.

Conforme se pode observar na Fig. 4.4, houve um desenvolvimento considerável das bactérias no entorno tanto dos cilindros ocos (a) quanto no hexágono (b). As estruturas evidenciadas mantiveram-se fixas ao substrato mesmo após o processo de inoculação e a percepção visual das imagens sugere que em ambos os casos as bactérias apresentaram preferir se concentrar mais próximas às estruturas e até mesmo em sua superfície. Para corroborar com essa percepção, uma contagem superficial de bactérias e de densidade das mesmas foi realizada no programa *ImageJ*, evidenciando que, de fato, a densidade de bactérias foi maior nas regiões mais próximas às estruturas e dentro da cavidade das mesmas. Assim, pode-se mostrar que houve biocompatibilidade entre as estruturas da amostra e as bactérias da espécie *C. acnes*.

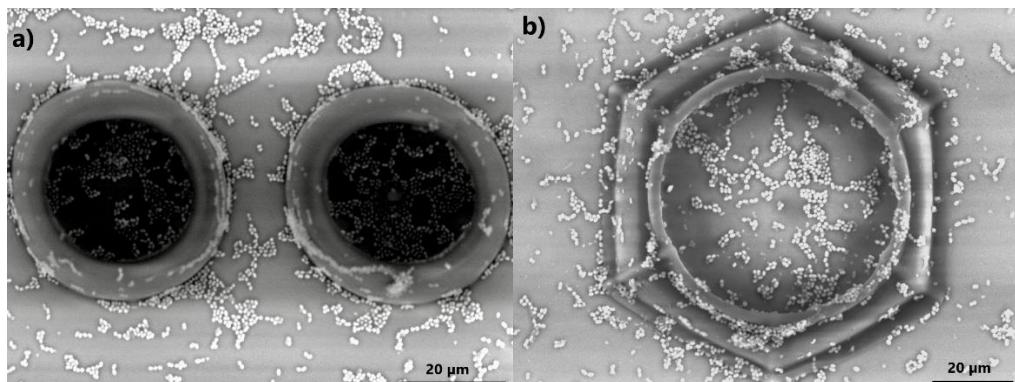


Figura 4.4: Imagens MEV de estruturas cilíndricas (a) e hexagonal (b) evidenciando a aglomeração das bactérias nos entornos. Fonte: autora

Novas análises de imagem foram feitas em amostras com outras estruturas, como mostra a Fig. 4.5. A diferença principal entre os cilindros da Fig. 4.5 (a) e Fig. 4.5 (b) é que os primeiros são preenchidos, enquanto que os últimos possuem uma cavidade em seu interior. As dimensões de ambos são aproximadamente iguais, tanto do diâmetro quanto de suas alturas e espaçamento entre uma estrutura e outra. Esses cilindros evidenciam também um alto fator de biocompatibilidade das bactérias com as estruturas, porém aparentemente não há uma grande discrepância entre a concentração de bactérias comparando os cilindros preenchidos com os ocos. Análises mais aprofundadas quanto a influência de ter ou não uma cavidade em seu interior podem ser realizadas com o auxílio do *ImageJ*, entretanto devido às configurações geométricas do suporte da amostra inserida no MEV, não foi possível uma perspectiva inclinada tridimensional para se analisar, por exemplo, a adesão das bactérias na própria superfície das estruturas.

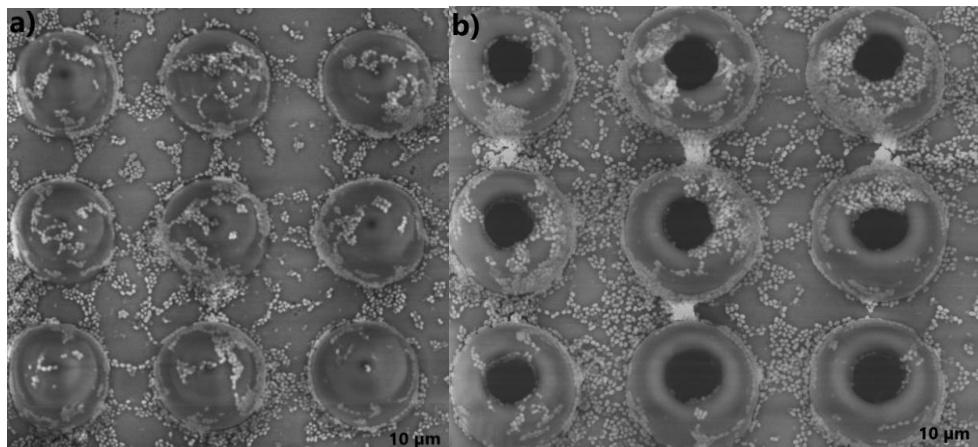


Figura 4.5: Imagens MEV de estruturas cilíndricas preenchidas (a) e com uma cavidade interior (b) de aproximadamente mesmo tamanho. Fonte: autora

Por último, os mesmos “falsos cones” descritos na subseção anterior foram submetidos à imageamento e análise de biocompatibilidade. Como pode-se observar na Fig. 4.6, é notável que as bactérias, novamente, foram compatíveis com as estruturas e em muitas delas é possível perceber que houve grande aglomeração na própria estrutura, ao invés de as bactérias se distribuírem ao longo do vidro (substrato).

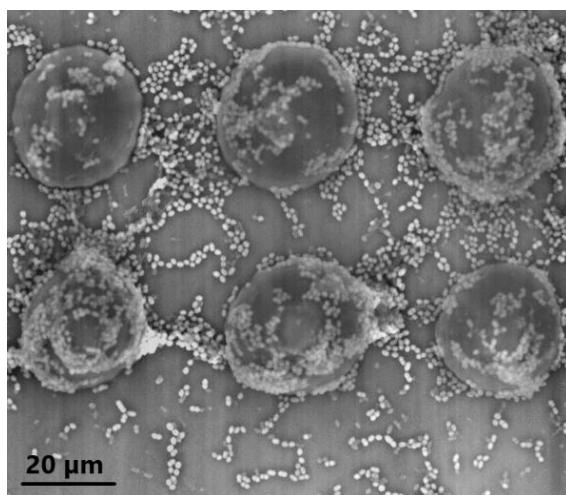


Figura 4.6: Imagens MEV de pirâmides cuja base é um icoságono (“falso cone”) para análise da concentração das bactérias. Fonte: autora

Novamente, por conta das limitações quanto à imagem das estruturas no suporte em perspectiva lateral, não foi possível utilizar o *ImageJ* para comparar a densidade de bactérias em relação à geometria da matriz de estruturas. Entretanto, pode-se observar que, independentemente da geometria, as bactérias se desenvolveram bastante nas regiões no entorno das matrizes ou mesmo na superfície das mesmas, evidenciando alta biocompatibilidade.

5 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos até o presente momento, pode-se constatar a versatilidade da técnica de polimerização por absorção de dois fôtons na microfabricação de estruturas que podem ser utilizadas em uma ampla gama de aplicações já citadas anteriormente. As vantagens da absorção de dois fôtons e do conhecimento a respeito da óptica não linear abrem um leque de possibilidades para aplicações nas diversas áreas da Física, Biologia, Química, entre outras.

A utilização da resina com os monômeros e o fotoiniciador adequados, somadas ao domínio do aparato experimental da microfabricação com o laser de Ti:safira tornam possível a fabricação das mais diversas formas geométricas, com tamanhos e disposições distintas, permitindo avaliar a diferença que faz cada um dos parâmetros de controle do laser através da plataforma *LabView* durante o processo de fabricação camada a camada.

Com as estruturas já construídas e após o cultivo das bactérias *C. acnes* nas amostras, foi possível utilizar o imageamento via microscopia eletrônica de varredura e analisar a biocompatibilidade do microorganismo com todos os componentes químicos que formam a resina e as estruturas em si. Com isso, observou-se grande biocompatibilidade e a pesquisa sugere que as bactérias tiveram certa preferência por se desenvolver em regiões mais próximas das estruturas ou mesmo na própria superfície da mesma.

Como propostas futuras, a continuidade dessa pesquisa deve levar em conta a fabricação de mais estruturas a fim de tentar fazer uma análise mais detalhada em relação à influência da geometria das matrizes para o desenvolvimento da *C. acnes*, bem como encontrar uma forma de imageamento que permita a perspectiva lateral das amostras, fazendo com que seja possível contabilizar as bactérias que aderiram à superfície das estruturas. Além disso, o estudo pode ser levado adiante em termos da terapia fotodinâmica, isto é, analisar a possibilidade de se eliminar as bactérias dos microambientes utilizando fontes de luz.

REFERÊNCIAS

- 1 MENG, Y., CHEN, Y., LU, L. *et al.* **Optical meta-waveguides for integrated photonics and beyond.** Light Sci Appl 10, 235 (2021).
- 2 TOMAZIO, N. B. **Fabricação de micro-rezonadores ópticos via fotopolimerização por absorção de dois fótons.** 2016. Dissertação (Mestrado em Física aplicada) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.
- 3 SILVA, D. M. da. **Produção e caracterização de materiais vítreos de germanato com nanopartículas metálicas e íons de érbio para aplicações em fotônica.** 2007. Dissertação (Mestrado em Microeletrônica) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- 4 NGUYEN, A. K., NARAYAN, R. J. **Two-photon polymerization for biological applications.** Materials Today, v. 2, ed. 6, 2017, p. 314-322.
- 5 OTUKA, A. J. G. **Estruturas poliméricas com nanotubos de carbono: processamento a laser, caracterização e aplicações.** 2016. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia e São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.
- 6 OLIVER, C. R., *et al.* **On-demand isolation and manipulation of C. elegans by in vitro maskless photopatterning.** Plos One, 2016, 11(1).
- 7 AVILA, O. I., *et al.* **Fabricating of microenvironments with different geometrical features for cell growth studies.** Journal of Laser Micro Nanoengineering, 2014. 9(3): p. 248-251.
- 8 OTUKA, A. J. G., *et al.* **Direct laser writing by two-photon polymerization as a tool for developing microenvironments for evaluation of bacterial growth.** Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications, 2014. v. 35. p. 185-189.
- 9 ZÍLIO, S. C. **Óptica Moderna,** Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2009.
- 10 FRANKEN, P. A., *et al.* **Generation of optical harmonics.** Physical Review Letters, v.7, n.4, p. 118-119, 1961.
- 11 BASS, M., *et al.* **Optical Rectification.** Physical Review Letters, v.9, n.11, p. 446-448, 1962.
- 12 FRANKEN, P.A., WARD, J. F., **Optical harmonics and nonlinear phenomena.** Reviews of Modern Physics, v.35, n.1, p. 23-39, 1963.
- 13 MA, G. H., *et al.* **Investigations of third-order nonlinear optical response of poly (p-phenylenevinylene) derivatives by femtosecond optical Kerr effect.** Physica B, v.305, n.2, p. 147-154, 2001.
- 14 HERNANDEZ, F. E., *et al.* **Three- and four-photon absorption of multiphoton absorbing fluorescent probe.** Applied Optics, v.43, n.28, p. 5394-5398, 2004.

- 15 GÖPPERT-MAYER, M., Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. Göttinger, Dissertação, p. 273-294, 1931.
- 16 KAISER, W., GARRETT, C. G. B., 2-Photon Excitation in Ca^{2+} – Eu^{2+} . Physical Review Letters, v. 7, n. 6, p. 229, 1961
- 17 OLIVEIRA, S. L., *et al.*, Perylene derivatives with large two-photon-absorption cross-sections for application in optical limiting and upconversion lasing. Advanced Materials, v. 17, n. 15, p. 1890, 2005.
- 18 PUDAVAR, H. E., *et al.*, High-density three-dimensional optical data storage in a stacked compact disk format with two-photon writing and single photon readout. Applied Physics Letters, v. 74, n. 9, p. 1338-1340, 1999.
- 19 DENK, W., STRICKLER, J. H., and WEBB, W.W., 2-photon laser scanning fluorescence microscopy. Science, v. 248, n. 4951, p. 73-76, 1990.
- 20 MARUO, S., NAKAMURA, O., KAWATA, S., Three-dimensional microfabrication with two-photon-absorbed photopolymerization. Optics Letters, v. 22, n. 2, p. 132-134, 1997.
- 21 RODRIGUES, M. R., NEUMANN, M. G., Fotopolimerização: princípios e métodos. Polímeros: Ciência e Tecnologia, v. 13, nº 4, p. 276-286, 2003.
- 22 BALDACCHINI, T., *et al.* Acrylic-based resin with favorable properties for three dimensional two-photon polymerization. Journal of Applied Physics, v. 95, p. 6072- 6076, 2004.
- 23 CRUZ, C. H. B., FRAGNITO, H. L. Fenômenos ultrarápidos: geração de pulsos laser ultracurtos e suas aplicações. Campinas: Instituto de Física de Campinas, 2000.