



A arte de esculpir com a luz: fundamentos e aplicações da polimerização via absorção multifotônica

Adriano J. G. Otuka¹ e Cleber R. Mendonça²

¹ Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP);

² Universidade de São Paulo (USP)

adriano.otuka@unesp.br e crmendon@ifsc.usp.br

RESUMO: A confecção de dispositivos miniaturizados, em escala micro e/ou nanométrica, é uma demanda frequente para as mais diversas áreas tecnológicas. Técnicas de processamento a laser tem sido amplamente empregada para a fabricação dessas estruturas. Em especial, a polimerização via absorção multifotônica (PAM) tem se destacado como uma ferramenta versátil, dinâmica e de fácil operação, permitindo alcançar dispositivos com resolução que superam o limite de difração. Nesse trabalho, descreveremos os principais fundamentos teóricos envolvidos na PAM, bem como as potenciais aplicações dos dispositivos fabricados. Em especial, discutiremos sobre as aplicações em bioengenharia, destacando alguns trabalhos recentes.

Palavras-chave: Aplicações em bioengenharia. Microfabricação a laser. Polimerização via absorção multifotônica.

ABSTRACT: The fabrication of miniaturized devices at the micro- and/or nanoscale is a frequent requirement across various technological fields. Laser processing techniques have been widely employed for the manufacturing of these structures. In particular, Multiphoton Absorption Polymerization (MAP) has stood out as a versatile, dynamic, and easy-to-operate tool, enabling the creation of devices with resolutions that surpass the diffraction limit. In this work, we will present the main theoretical fundamentals involved in MAP, as well as the potential applications of the fabricated devices. In particular, we will discuss bioengineering applications, highlighting some recent works.

Keywords: Bioengineering Applications. Laser Microfabrication. Multiphoton Absorption Polymerization.

<http://doi.org/10.5281/zenodo.17967243>



A IMPORTÂNCIA ESTRATÉGICA DA MINIATURIZAÇÃO DE DISPOSITIVOS E AS TÉCNICAS DE MICROFABRICAÇÃO

A busca por dispositivos miniaturizados, nas escalas micrométrica e nanométrica, transcende a mera redução de tamanho; ela representa uma prioridade estratégica para o avanço de diversas áreas tecnológicas [1]. Esta tendência, impulsionada pelo conceito de que a função, o desempenho e a eficiência muitas vezes melhoram à medida que as dimensões diminuem, é o cerne da microengenharia e da nanotecnologia modernas [2]. A miniaturização de dispositivos também viabiliza a integração e portabilidade essenciais para as tecnologias modernas. Essa escala permite a combinação de múltiplas funções – como detecção, processamento e atuação – em uma única plataforma minúscula [3]. O resultado direto dessa integração são, por exemplo, os sistemas conhecidos como “*Lab-on-Chip*”, que são plataformas compactas e altamente eficientes. Essa capacidade de concentrar um laboratório inteiro em um pequeno chip é fundamental para o desenvolvimento de diagnósticos rápidos e portáteis, revolucionando a saúde e a análise ambiental [4]. Além disso, a transição para a nanoescala pode induzir novas fenomenologias. Por exemplo, os materiais passam a exibir propriedades quânticas, ópticas e de superfície radicalmente diferentes daquelas observadas no mundo macroscópico [5]. A habilidade de manipular essas propriedades inéditas é a base da fotônica [6], que pode descrever detalhadamente a interação da luz com a matéria, e também de metamateriais [7], estruturas projetadas para apresentar características não encontradas na natureza.

Técnicas de microfabricação são fundamentais para a criação de componentes essenciais em eletrônica, medicina, óptica e biotecnologia, como microprocessadores, sensores, micro-sistemas eletromecânicos (MEMS – *Micro-Electro-Mechanical Systems*) [8]. A importância da microfabricação reside na sua capacidade de conferir aos dispositivos características únicas, como alta eficiência, baixo consumo de energia e, em muitos casos, a integração complexa com outros sistemas. Utiliza-se de ferramentas interdisciplinares que integram design, engenharia e produção para criar estruturas funcionais nas escalas micrométrica e nanométrica. Essas técnicas podem ser divididas em duas grandes categorias: métodos subtrativos e métodos aditivos. No primeiro grupo, destaca-se a indústria de semicondutores e envolve a remoção seletiva de



material para esculpir as estruturas desejadas a partir de um substrato maior. Como exemplo, a litografia óptica permite que um padrão geométrico seja transferido para uma camada de material sensível à luz (fotorresiste). Embora a litografia óptica utilize luz UV para exposição, sua resolução é limitada pelo limite de difração da luz [9]. Por sua vez, a litografia por feixe de elétrons (*E-beam*) oferece resolução sub-nanométrica [10], sendo crucial para diversas pesquisas, mas é dispendiosa para produção em massa. Tais técnicas são excelentes para a produção de estruturas planas e de alta precisão em 2D, mas enfrentam dificuldades significativas na criação de geometrias verdadeiramente tridimensionais (3D). Por outro lado, as técnicas aditivas constroem as estruturas camada por camada, muitas vezes, a nível atômico, sendo fundamentais para a nanotecnologia. Uma das técnicas aditiva mais notável é a Polimerização via Absorção Multifotônica (MAP) [11].

POLIMERIZAÇÃO VIA ABSORÇÃO MULTIFOTÔNICA: UMA VISÃO GERAL E DIVERSAS APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS

A Polimerização via Absorção Multifotônica (PAM), também referida como polimerização via absorção de dois fótons, consolidou-se como uma das técnicas mais sofisticadas e versáteis no cenário da micro e nanofabricação moderna [12]. Diferente das metodologias convencionais de litografia óptica, que operam fundamentalmente em processos planares, a MAP permite a verdadeira fabricação aditiva tridimensional com uma liberdade de *design* sem precedentes. A essência desta técnica reside na utilização de fenômenos ópticos não-lineares para confinar a reação química de polimerização a um volume espacial extremamente reduzido, superando as barreiras tradicionais impostas pelo limite de difração da luz e permitindo a construção de arquiteturas complexas, impossíveis de serem obtidas por métodos de moldagem ou corrosão.

O fundamento físico que viabiliza essa precisão extrema é o fenômeno da absorção de dois fótons, que atua na convergência entre a óptica não-linear e a fotoquímica de polímeros. Diferentemente da litografia convencional, que depende da absorção linear de um único fóton de alta energia (geralmente ultravioleta) para iniciar uma reação, a PAM utiliza a interação simultânea de múltiplos fótons de menor energia (geralmente no infravermelho próximo) para alcançar o mesmo estado de excitação



molecular. A premissa fundamental, prevista teoricamente por Maria Goeppert-Mayer na década de 1930, é que um átomo ou molécula pode absorver dois fótons em um único evento quântico, desde que a soma das energias desses fótons seja igual ao *gap* de energia necessária para promover o elétron do estado fundamental para o estado excitado [13]. Para que esse fenômeno ocorra com probabilidade estatística relevante, é necessário um fluxo de fótons extremamente alto (alta intensidade luminosa). Isso ocorre porque a transição não é direta; ela passa por um estado intermediário "virtual" de curtíssima duração (na ordem de femtossegundos), determinado pelo princípio da incerteza de Heisenberg. Se um segundo fóton não chegar dentro dessa janela temporal infinitesimal, a molécula relaxa e a absorção não se concretiza. Para satisfazer essa condição de alto fluxo de fótons, a técnica emprega lasers de femtossegundos pulsados, focados através de objetivas de alta abertura numérica. O uso de pulsos ultracurtos é crucial, pois permite atingir as intensidades de pico necessárias para a absorção de dois fótons, sem transferir calor excessivo que poderia danificar termicamente a amostra. O aspecto mais revolucionário da técnica de PAM reside na dependência não-linear da taxa de absorção em relação à intensidade da luz. Enquanto na absorção linear a probabilidade de excitação é proporcional à intensidade incidente (I), na absorção de dois fótons essa probabilidade é proporcional ao quadrado da intensidade (I^2). Essa relação quadrática tem uma implicação espacial profunda: a absorção cai drasticamente assim que nos afastamos do centro do foco do laser. Consequentemente, a excitação do fotoiniciador e a subsequente polimerização ficam estritamente confinadas a um volume minúsculo no ponto focal, denominado *voxel* (pixel volumétrico). Fora desse micro-volume, a densidade de fótons é insuficiente para sustentar a absorção de dois fótons, deixando a resina inalterada, permitindo que o feixe penetre profundamente no material sem causar solidificação indesejada na superfície ou no trajeto óptico. Além do confinamento óptico, a microfabricação via PAM incorpora um limiar químico de polimerização que permite resoluções espaciais que superam o limite de difração da luz [11]. Embora o foco do laser tenha um tamanho físico definido pela difração (o disco de Airy), a reação de polimerização só se sustenta nas regiões onde a taxa de geração de radicais livres supera a taxa de inibição (geralmente causada pelo oxigênio dissolvido na resina) [14]. Ajustando a energia do pulso para ficar ligeiramente acima desse limiar, é possível polimerizar apenas a parte central da distribuição gaussiana de intensidade. Isso

permite a criação de estruturas com detalhes na ordem de dezenas de nanômetros [15], muito menores do que o comprimento de onda do laser utilizado, conferindo à técnica sua capacidade inigualável de precisão e a habilidade de "escrever" geometrias 3D complexas livremente no espaço.

Para focalizar o feixe laser dentro da amostra fotossensível, utiliza-se objetivas de microscópios. Quando maior for sua abertura numérica, menor será o *voxel* polimerizado. A varredura do feixe pode ser realizada a partir da movimentação da amostra, utilizando estágios de translação, ou espelhos galvanométricos, que direcionam o feixe para as regiões de interesse. Um sistema independente de iluminação e imageamento permite acompanhar em tempo real o processo de microfabricação. A Fig. 1 apresenta um esquema típico de aparato experimental utilizado na PAM.

A seleção e o desenvolvimento de materiais para a PAM constituem um pilar tão fundamental quanto a própria configuração óptica do sistema a laser [16]. A amostra utilizada nesta técnica de microfabricação não é um simples consumível, mas sim um sistema químico complexo projetado para responder a requisitos físicos específicos: deve ser transparente ao comprimento de onda do laser (geralmente no infravermelho próximo) para permitir a penetração profunda do feixe, e, simultaneamente, possuir uma elevada secção transversal de absorção de dois fótons para garantir uma polimerização eficiente e confinada no volume focal. A formulação básica de qualquer resina para PAM consiste, essencialmente, numa mistura de monômeros ou oligômeros,

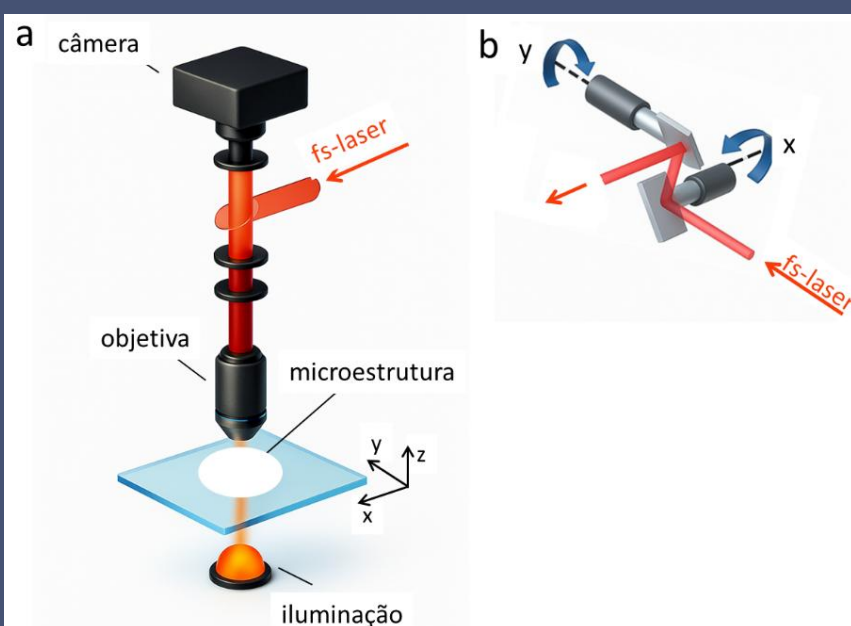


FIGURA 1 - ESQUEMATIZAÇÃO EXPERIMENTAL DE SISTEMA DE MICROFABRICAÇÃO VIA POLIMERIZAÇÃO MULTIFOTÔNICA

a) Um laser de alta intensidade (por exemplo, femtossegundos) é focalizado através de lentes objetivas na amostra fotossensível. A varredura do feixe pode ser realizada a partir da movimentação da amostra, utilizando estágios de translação, ou b) espelhos galvanométricos, que direcionam o feixe para regiões de interesse. Um sistema independente de iluminação e imageamento permite acompanhar em tempo real o processo de microfabricação.



que constituem a base estrutural, e um fotoiniciador, a molécula responsável por absorver a energia luminosa e desencadear a reação de polimerização que leva à solidificação.

No universo dos materiais sintéticos, as resinas à base de acrilatos e epóxi têm sido as pioneiras da tecnologia. As resinas de acrilato caracterizam-se pela sua reatividade extremamente rápida, o que permite velocidades de escrita elevadas, essenciais para a viabilidade industrial da técnica. No entanto, sofrem frequentemente com uma contração volumétrica significativa durante a cura, o que pode distorcer as microestruturas finais. Em contrapartida, as resinas epóxi, como o famoso fotorresiste negativo SU-8, oferecem uma estabilidade mecânica e química superior, sendo ideais para componentes de MEMS e microfluídica, embora o seu processo de polimerização catiônica seja tipicamente mais lento. Para mitigar as limitações de ambos, foram desenvolvidos materiais híbridos orgânico-inorgânicos, conhecidos como ORMOCERs (*Organically Modified Ceramics*). Estes materiais combinam a facilidade de processamento dos polímeros orgânicos com a rigidez e estabilidade térmica de uma rede inorgânica de silício-oxigênio, apresentando uma contração mínima e uma excelente qualidade óptica, tornando-os ideais para a fabricação de microlentes e guias de onda.

Paralelamente, a expansão da PAM para a bioengenharia exigiu uma revolução na química dos materiais, deslocando o foco de resinas rígidas e insolúveis para hidrogéis macios e biocompatíveis. Neste contexto, o desafio reside em formular materiais que possam ser processados em ambiente aquoso e na presença de células vivas sem causar toxicidade. Materiais naturais modificados, como a gelatina metacrilada (GelMA), tornaram-se populares por preservarem sequências de reconhecimento celular essenciais para a adesão e proliferação biológica. Simultaneamente, polímeros sintéticos como o polietilenoglicol diacrilato (PEGDA) oferecem um controle preciso sobre a rigidez mecânica e a porosidade da estrutura, permitindo adaptar o ambiente para tipos celulares específicos. Um obstáculo crítico nesta vertente tem sido o desenvolvimento de fotoiniciadores solúveis em água que sejam eficientes na absorção de dois fótons, uma vez que os iniciadores tradicionais são frequentemente hidrofóbicos ou citotóxicos.

A fronteira mais recente na ciência dos materiais para PAM envolve a funcionalização ativa e a criação de materiais compósitos. Pesquisadores têm incorporado, por exemplo, nanopartículas metálicas, nanotubos de carbono ou pontos quânticos (*quantum dots*) nas matrizes poliméricas para conferir propriedades elétricas, magnéticas ou luminescentes às microestruturas. Além disso, o conceito de "impressão 4D" [17] tem sido explorado através do uso de polímeros responsivos a estímulos, que alteram a sua forma ou propriedades químicas em resposta a variações de pH, temperatura ou humidade após a fabricação. Esta versatilidade material transforma a PAM em uma ferramenta de microfabricação extremamente atraente e competitiva.

As aplicações tecnológicas decorrentes dessa capacidade única são vastas e impactam setores estratégicos. A Fig. 2 exemplifica diversas possibilidades de aplicações de microestruturas fabricadas via Polimerização via Absorção Multifotônica. A fabricação de microestruturas ópticas via PAM representa um avanço significativo na engenharia de precisão, permitindo a criação de componentes tridimensionais complexos. No campo dos sistemas de imagem, a técnica viabiliza a produção de microlentes esféricas e de forma livre (*free-form*), fundamentais para corrigir aberrações em dispositivos miniaturizados onde o espaço é restrito e a qualidade da imagem não pode ser comprometida. Inspirados na natureza, pesquisadores têm utilizado a PAM para mimetizar os olhos compostos de insetos, fabricando arranjos densos de microlentes em superfícies curvas, o que proporciona um campo de visão ampliado e alta sensibilidade

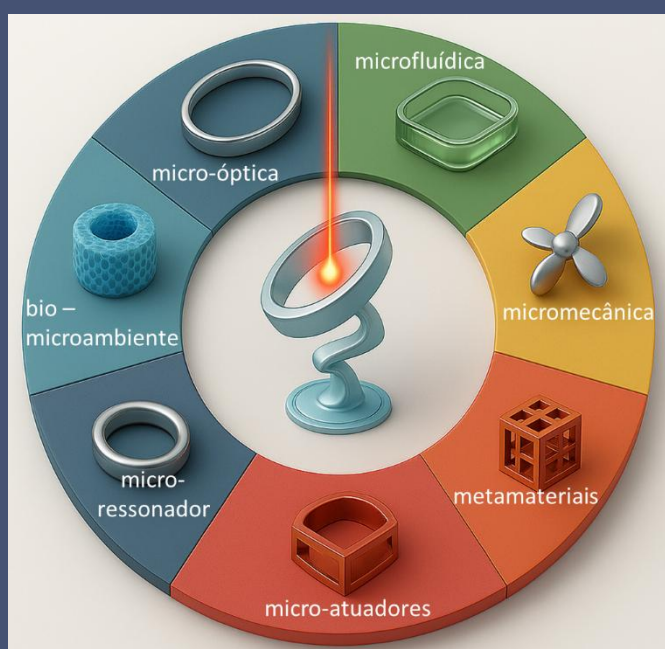


FIGURA 2 - EXEMPLOS DE MICROESTRUTURAS FABRICADAS VIA POLIMERIZAÇÃO MULTIFOTÔNICA

A versatilidade da técnica permite que dispositivos específicos sejam confeccionados para as mais diversas áreas tecnológicas, como por exemplo, óptica, fotônica, microfluídica e bioengenharia.



ao movimento, características ideais para endoscopia médica e visão de máquina avançada. Além disso, a versatilidade da técnica permite a escrita direta de elementos ópticos, como lentes e prismas, na ponta de fibras ópticas, transformando-as em sondas ativas para aplicações de "*Lab-on-Fiber*".

Outra aplicação crítica reside nas interconexões fotônicas, onde a PAM soluciona o desafio do acoplamento eficiente de luz entre chips fotônicos distintos ou entre fibras e guias de onda. Através da técnica conhecida como *Photonic Wire Bonding* [18], é possível "desenhar" conexões de polímero tridimensionais que se adaptam adiabaticamente ao modo óptico e corrigem desalinhamentos físicos, eliminando a necessidade de montagens mecânicas complexas e dispendiosas. Paralelamente, a capacidade de estruturar a matéria em escalas sub-micrométricas habilita a criação de cristais fotônicos 3D, como as estruturas *woodpile*, que manipulam o fluxo de luz criando bandas proibidas fotônicas, essenciais para filtros e espelhos de alta seletividade.

A técnica também se destaca na fabricação de microressonadores ópticos de alto fator de qualidade, como microdiscos e toróides suspensos que operam em modos de galeria sussurrante. A baixa rugosidade superficial obtida pela polimerização permite o confinamento da luz nesses volumes por longos períodos, tornando-os ideais para aplicações em sensores biológicos excepcionalmente sensíveis. Finalmente, a PAM é uma das poucas ferramentas capazes de concretizar os designs teóricos de metamateriais e metasuperfícies ópticas tridimensionais, como hélices quirais que controlam a polarização da luz ou lentes planas difrativas, abrindo novas fronteiras para a manipulação da luz em escalas menores que o seu próprio comprimento de onda. A viabilidade de todas essas aplicações depende intrinsecamente do uso de materiais especializados, como os ORMOCERs, que garantem transparência nas janelas de telecomunicações e estabilidade mecânica a longo prazo.

No campo da bioengenharia e medicina regenerativa, a técnica desempenha um papel revolucionário devido à sua compatibilidade com materiais biomédicos e à natureza menos agressiva da luz infravermelha [19]. Essa janela de transparência biológica, aliada à capacidade de processar hidrogéis e resinas biocompatíveis com resolução sub-micrométrica, permite transcender a fabricação de suportes inertes para a criação de interfaces ativas que dialogam diretamente com o tecido vivo [20]. Contudo, para maximizar o potencial terapêutico desses dispositivos, é fundamental ir além dos

polímeros sintéticos isolados e investigar estratégias de bio-hibridização. É nesse contexto que surge a motivação para explorarmos a sinergia entre a precisão da microfabricação a laser e as propriedades intrínsecas de biopolímeros naturais, uma fronteira que promete redefinir os padrões de biocompatibilidade e funcionalidade em, por exemplo, implantes médicos.

RECENTES APLICAÇÕES EM BIOENGENHARIA E MEDICINA REGENERATIVA DE MICROESTRUTURAS FABRICADAS A PARTIR DA POLIMERIZAÇÃO VIA ABSORÇÃO MULTIFOTÔNICA

Devido à sua precisão inigualável e liberdade de escrita 3D, a Polimerização via Absorção Multifotônica apresenta-se como a ferramenta ideal para a mimetização de sistemas biológicos, tornando esta, uma área de pesquisa particularmente atraente. A avaliação da difusão medicamentosa pode ser compreendida através de plataformas biocompatíveis confeccionadas via PAM. A geometria de microambientes tem se demonstrado uma característica fundamental para o desenvolvimento de microrganismos celulares e bacterianos [21–23]. A fronteira entre o sintético e o natural é dissolvida em sistemas híbridos inovadores. O uso de microestruturas fabricadas via PAM para modular o crescimento de materiais biológicos, como a celulose bacteriana,

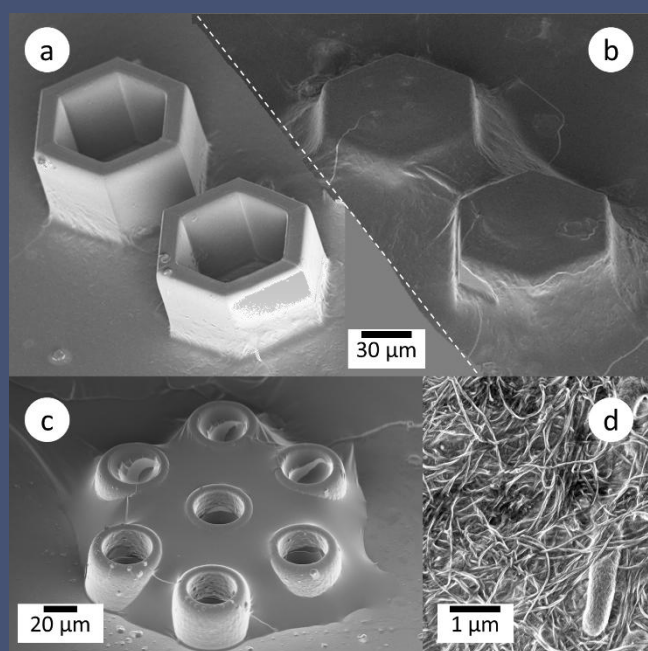


FIGURA 3 - MICROESTRUTURAS FOTOPOLIMERIZADAS PARA INVESTIGAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE MICROORGANISMOS BACTERIANOS

O desenvolvimento da bactéria *Komagataeibacter xylinus* em plataformas confeccionadas via PAM resulta na produção natural de celulose bacteriana cuja as propriedades são similares aos biofilmes crescidos em ambientes macroscópicos. a) Filme de celulose bacteriana crescida em estruturas poliméricas por um período de 6h e b) 24h. c) Filme de celulose bacteriana crescida em estruturas confeccionadas a partir de materiais híbridos por um período de 24h e d) Detalhe da biocelulose crescida em microambientes. Adaptado com permissão da Ref. [22]. Licenciado sob *Creative Commons Attribution 4.0 International*.

exemplifica essa simbiose (Fig. 3). Ao invés de apenas tentar replicar a natureza, utiliza-se a precisão da PAM para criar moldes ou reforços estruturais sobre os quais as bactérias depositam suas fibras de celulose, resultando em materiais compósitos que unem a biocompatibilidade e a porosidade da celulose com a resistência mecânica e o design complexo dos polímeros sintéticos.

A convergência da Polimerização via Absorção Multifotônica com a bioengenharia contemporânea inaugurou uma nova era na fabricação de microdispositivos médicos, transcendendo a simples produção de estruturas passivas para a criação de sistemas funcionais complexos que emulam os biológicos. No cerne dessa revolução está a capacidade da técnica de estruturar materiais tridimensionalmente com resolução sub-micrométrica, o que permitiu um salto qualitativo do cultivo celular estático para plataformas dinâmicas como os sistemas *Lab-on-Chip* (LoC) e *Organ-on-Chip* (OoC) [24,25]. Diferentemente das técnicas de litografia tradicionais, que se limitam a canais planares ou empilhados, a PAM possibilita a escrita direta de componentes microfluídicos intrínsecos – como válvulas, misturadores passivos em 3D e filtros porosos – diretamente no interior de microcanais fechados. Essa liberdade arquitetônica é fundamental para a miniaturização de laboratórios inteiros em um único chip, permitindo o processamento preciso de fluidos biológicos para diagnósticos rápidos e a triagem de fármacos com um consumo mínimo de reagentes.

A sofisticação trazida pela PAM é ainda mais evidente quando aplicamos esses conceitos à tecnologia de *Organ-on-Chip* (OoC). Nestes dispositivos, o objetivo é recapitular a fisiologia humana em microescala, e a PAM atua como a ferramenta chave para construir o alicerce desses micro-tecidos. Por exemplo [26,27], pesquisadores têm utilizado a técnica para fabricar redes vasculares artificiais complexas que garantem a perfusão de nutrientes e oxigênio para camadas espessas de tecido, superando um dos maiores gargalos da engenharia de tecidos: a necrose central em organoides volumosos. Além disso, a técnica permite a criação de barreiras biológicas artificiais, como modelos da barreira hematoencefálica ou da interface alvéolo-capilar, onde a porosidade da membrana fabricada é controlada com precisão nanométrica para estudar a permeabilidade de novos medicamentos. A integração de *scaffolds* impressos via PAM dentro desses chips fornece o suporte mecânico e topográfico necessário para que



células-tronco se auto-organizem em organoides funcionais – como mini-fígados ou glomérulos renais – mantendo a arquitetura tridimensional fiel ao órgão nativo [28,29].

Aprofundando-se na engenharia de tecidos, a personalização dos *scaffolds* via PAM atinge um nível de detalhe onde a própria geometria dita o destino celular. Em aplicações de regeneração óssea, por exemplo, a técnica não apenas cria estruturas que suportam carga, mas desenha poros com geometrias específicas que maximizam a difusão de nutrientes e facilitam a vascularização pelo corpo do hospedeiro. No sistema nervoso, a capacidade de alinhar microtúbulos e guias com precisão micrométrica é explorada para orientar o crescimento axonal, promovendo a reconexão de nervos lesionados através de "pontes" bioengenhadas que mimetizam a anisotropia do tecido neural [30–32]. Essa biomimética estrutural é reforçada pelo uso de materiais avançados, como hidrogéis de gelatina metacrilada (GelMA), que permitem a bioimpressão direta de células vivas, inserindo os componentes biológicos na estrutura durante o próprio processo de fabricação [33].

Paralelamente às estruturas fixas, a microrrobótica médica impulsionada pela PAM representa o ápice da funcionalidade dinâmica. Aproveitando conceitos de "impressão 4D", onde o quarto eixo é a resposta temporal a estímulos, cientistas desenvolvem microrrobôs capazes de navegar pela corrente sanguínea ou fluidos viscosos. Estas microestruturas, frequentemente inspiradas em flagelos bacterianos, podem ser carregadas com agentes terapêuticos e guiadas magneticamente até locais de difícil acesso, como tumores profundos ou coágulos em capilares estreitos, realizando a liberação controlada do fármaco *in situ*. A precisão da PAM é vital para garantir que as propriedades hidrodinâmicas e magnéticas desses robôs sejam perfeitamente calibradas para a propulsão eficiente em microescala [34,35].

Essas abordagens integradas consolidam a Polimerização via Absorção Multifotônica não apenas como uma ferramenta de fabricação, mas como um pilar central na construção da próxima geração de terapias regenerativas e diagnósticos de precisão.



AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a todos os colaboradores que contribuíram de alguma forma para a realização dos trabalhos aqui apresentados, e também as agências de fomento à pesquisa FAPESP (2016/20094-8 e 2018-1283-7), CNPq (INFo – Instituto Nacional de Fotônica) e CAPES.

REFERÊNCIAS

- [1] Drexler, K.E., “Nanosystems: Molecular Machinery, Manufacturing, and Computation”, Wiley, 1992;
- [2] Madou, M.J., “Fundamentals of Microfabrication: The Science of Miniaturization”, 2nd ed.; CRC Press, 2002;
- [3] Manz, A.; Graber, N.; Widmer, H.M., “Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing”, *Sensors Actuators B Chem.* 1990, 1, 244–248, doi:[https://doi.org/10.1016/0925-4005\(90\)80209-I](https://doi.org/10.1016/0925-4005(90)80209-I).
- [4] Yager, P.; Edwards, T.; Fu, E.; Helton, K.; Nelson, K.; Tam, M.R.; Weigl, B.H., “Microfluidic diagnostic technologies for global public health”, *Nature* 2006, 442, 412–418, doi:[10.1038/nature05064](https://doi.org/10.1038/nature05064).
- [5] Poole, C.P.; Owens, F.J., “Introduction to nanotechnology”, Wiley, 2003;
- [6] Saleh, B. E. A., Teich, M.C., “Fundamentals of Photonics”, Wiley, 1991;
- [7] Smith, D.R.; Padilla, W.J.; Vier, D.C.; Nemat-Nasser, S.C.; Schultz, S., “Composite Medium with Simultaneously Negative Permeability and Permittivity”, *Phys. Rev. Lett.* 2000, 84, 4184–4187, doi:[10.1103/PhysRevLett.84.4184](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.84.4184).
- [8] Xia, Y.; Whitesides, G.M., “Soft Lithography”, *Angew. Chemie Int. Ed.* 1998, 37, 550–575, doi:[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19980316\)37:5<550::AID-ANIE550>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19980316)37:5<550::AID-ANIE550>3.0.CO;2-G).
- [9] Mack, C.A., “Fundamental Principles of Optical Lithography: The Science of Microfabrication”, Wiley, 2007;
- [10] Vieu, C.; Carcenac, F.; Pépin, A.; Chen, Y.; Mejias, M.; Lebib, A.; Manin-Ferlazzo, L.; Couraud, L.; Launois, H., “Electron beam lithography: resolution limits and applications”, *Appl. Surf. Sci.* 2000, 164, 111–117, doi:[https://doi.org/10.1016/S0169-4332\(00\)00352-4](https://doi.org/10.1016/S0169-4332(00)00352-4).
- [11] Kawata, S.; Sun, H.B.; Tanaka, T.; Takada, K., “Finer features for functional microdevices”, *Nature* 2001, 412, 697–698, doi:[10.1038/35089130](https://doi.org/10.1038/35089130).
- [12] Otuka, A.J.G.; Tomazio, N.B.; Paula, K.T.; Mendonça, C.R., “Two-Photon Polymerization: Functionalized Microstructures, Micro-Resonators, and Bio-Scaffolds. *Polymers (Basel)*”, 2021, 13, 1–30.
- [13] Goeppert-Mayer, M., “Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen”, *Ann. Phys.* 1931, 401, 273–294.
- [14] Sun, H.B.; Kawata, S., “Two-photon photopolymerization and 3D lithographic microfabrication”, *Adv. Polym. Sci.* 2004, 170, 169–273, doi:[10.1007/b94405](https://doi.org/10.1007/b94405).



- [15] Takada, K.; Sun, H.B.; Kawata, S., "Improved spatial resolution and surface roughness in photopolymerization- based laser nanowriting", *Appl. Phys. Lett.* 2005, 86, 1–3, doi:10.1063/1.1864249.
- [16] Carlotti, M.; Mattoli, V., "Functional Materials for Two-Photon Polymerization in Microfabrication", *Small* 2019, 15, 1–22, doi:10.1002/smll.201902687.
- [17] Spiegel, C.A.; Hippler, M.; Münchinger, A.; Bastmeyer, M.; Barner-kowollik, C.; Wegener, M.; Blasco, E., "4D Printing at the Microscale", 2019, 1907615, 1–16, doi:10.1002/adfm.201907615.
- [18] Lindenmann, N.; Balthasar, G.; Hillerkuss, D.; Schmogrow, R.; Jordan, M.; Freude, W.; Koos, C., "Photonic wire bonding : a novel concept for chip- scale interconnects", 2012, 20, 17667–17677.
- [19] El-Tamer, A.; Hinze, U.; Chichkov, B.N., "Two-Photon Polymerization in Optics, Microfluidics, and Biomedicine", 2020, ISBN 9783319695372.
- [20] Torgersen, J.; Qin, X.-H.; Li, Z.; Ovsianikov, A.; Liska, R.; Stampfl, J., "Hydrogels for Two-Photon Polymerization: A Toolbox for Mimicking the Extracellular Matrix", *Adv. Funct. Mater.* 2013, 23, 4542–4554, doi:https://doi.org/10.1002/adfm.201203880.
- [21] Otuka, A.J.G.; Corrêa, D.S.; Fontana, C.R.; Mendonça, C.R., "Direct laser writing by two-photon polymerization as a tool for developing microenvironments for evaluation of bacterial growth", *Mater. Sci. Eng. C* 2014, 35, 185–189, doi: 10.1016/j.msec.2013.11.005.
- [22] Otuka, A.J.G.; Domenegueti, R.R.; Moraes, J.Q.R.; Balogh, D.T.; Ribeiro, S.J.L.; Mendonça, C.R., "Bacterial cellulose growth on 3D acrylate-based microstructures fabricated by two-photon polymerization", *JPhys Photonics* 2021, 3, doi:10.1088/2515-7647/abe02c.
- [23] Otuka, A.J.G.; Moraes, J.Q.R.; de Oliveira, A.B.; Fonseca, E.J.S.; Fontana, C.R.; Mendonca, C.R., "Evaluation of Probiotic Growth in Microenvironments Sculpted with Different Geometries", *ACS Omega* 2025, 10, 22679–22684, doi:10.1021/acsomega.4c11168.
- [24] Huh, D.; Hamilton, G.A.; Ingber, D.E., "From 3D cell culture to organs-on-chips", *Trends Cell Biol.* 2011, 21, 745–754, doi: 10.1016/j.tcb.2011.09.005.
- [25] Bhatia, S.N.; Ingber, D.E., "Microfluidic organs-on-chips", *Nat. Biotechnol.* 2014, 32, 760–772, doi:10.1038/nbt.2989.
- [26] Marino, A.; Tricinci, O.; Battaglini, M.; Filippeschi, C.; Mattoli, V.; Sinibaldi, E.; Ciofani, G., "A 3D Real-Scale, Biomimetic, and Biohybrid Model of the Blood-Brain Barrier Fabricated through Two-Photon Lithography", *Small* 2018, 14, doi:10.1002/smll.201702959.
- [27] Rekštytė, S.; Malinauskas, M., & Juodkazis, S., "Three-dimensional laser micro-sculpturing of silicone: towards bio-compatible scaffolds", *Opt. Express* 2013, 21, 17028–17041, doi:10.1364/OE.21.017028.
- [28] Liu, J.; Du, Y.; Xiao, X.; Tan, D.; He, Y.; Qin, L., "Construction of in vitro liver-on-a-chip models and application progress", *Biomed. Eng. Online* 2024, 23, 33, doi:10.1186/s12938-024-01226-y.
- [29] Homan, K.A.; Kolesky, D.B.; Skylar-Scott, M.A.; Herrmann, J.; Obuobi, H.; Moisan, A.; Lewis, J.A., "Bioprinting of 3D Convolved Renal Proximal Tubules on Perfusable Chips", *Sci. Rep.* 2016, 6, 34845, doi:10.1038/srep34845.
- [30] Melissinaki, V.; Gill, A.A.; Ortega, I.; Vamvakaki, M.; Ranella, A.; Haycock, J.W.; Fotakis, C.; Farsari, M.; Claeysens, F., "Direct laser writing of 3D scaffolds for neural tissue engineering applications", *Biofabrication* 2011, 3, 45005, doi:10.1088/1758-5082/3/4/045005.
- [31] Marino, A.; Ciofani, G.; Filippeschi, C.; Pellegrino, M.; Pellegrini, M.; Orsini, P.; Pasqualetti, M.; Mattoli, V.; Mazzolai, B., "Two-Photon Polymerization of Sub-micrometric Patterned Surfaces: Investigation of Cell-Substrate Interactions and Improved Differentiation of Neuron-like Cells", *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2013, 5, 13012–13021, doi:10.1021/am403895k.



- [32] Accardo, A.; Blatché, M.-C.; Courson, R.; Loubinoux, I.; Vieu, C.; Malaquin, L., “Two-photon lithography and microscopy of 3D hydrogel scaffolds for neuronal cell growth”, *Biomed. Phys. Eng. Express* 2018, 4, 27009, doi:10.1088/2057-1976/aaab93.
- [33] Engelhardt, S.; Hoch, E.; Borchers, K.; Meyer, W.; Krüger, H.; Tovar, G.E.M.; Gillner, A., “Fabrication of 2D protein microstructures and 3D polymer-protein hybrid microstructures by two-photon polymerization”, *Biofabrication* 2011, 3, 25003, doi:10.1088/1758-5082/3/2/025003.
- [34] Ceylan, H.; Yasa, I.C.; Yasa, O.; Tabak, A.F.; Giltinan, J.; Sitti, M., “3D-Printed Biodegradable Microswimmer for Theranostic Cargo Delivery and Release”, *ACS Nano* 2019, 13, 3353–3362, doi:10.1021/acsnano.8b09233.
- [35] Peyer, K.E.; Zhang, L.; Nelson, B.J., “Bio-inspired magnetic swimming microrobots for biomedical applications”, *Nanoscale* 2013, 5, 1259–1272, doi:10.1039/C2NR32554C.