

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A REDAÇÃO FINAL DA
TESE DEFENDIDA POR Cláudio Roberto
Cutrim Carvalho E APROVADA PELA
COMISSÃO JULGADORA EM 31/07/2003
Cecília Ab. Zavaglia
ORIENTADOR

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA



1150064328



BAE

T/UNICAMP C252m

2003 11 11 20

**Microfabricação de Arcabouços
Tridimensionais para Engenharia de Tecidos
pelo Método de Litografia Macia**

Autor: Cláudio Roberto Cutrim Carvalho
Orientadora: Profª Drª Cecília de Carvalho Zavaglia

07/2003

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS**

Microfabricação de Arcabouços Tridimensionais para Engenharia de Tecidos pelo Método de Litografia Macia

Autor: Cláudio Roberto Cutrim Carvalho

Orientadora: Profª Drª Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia

Curso: Engenharia Mecânica

Área de Concentração: Materiais e Processos de Fabricação

Dissertação de mestrado acadêmico apresentado à comissão de Pós Graduação da Faculdade de Engenharia Mecânica, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Mecânica.

Campinas, 31 de julho de 2003
S.P. - Brasil

UNIDADE	FEM
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	C 252m
V	EX
TOMBO BCI	69328
PROC.	16-P. 0004605
C	☐
D	☒
PREÇO	11,00
DATA	13/06/03
Nº EXP	001035334

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

C252m

Carvalho, Cláudio Roberto Cutrim

Microfabricação de arcabouços tridimensionais para engenharia de tecidos pelo método de litografia macia / Cláudio Roberto Cutrim Carvalho. --Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientador: Cecília de Carvalho Zavaglia.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica.

1. Litografia. 2. Tecidos (Anatomia e fisiologia) – Cultura e meios de cultura. 3. Matriz extracelular. I. Zavaglia, Cecília de Carvalho. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Mecânica. III. Título.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
MECÂNICA**

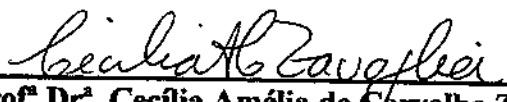
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADEMICO

**Microfabricação de Arcabouços
Tridimensionais para Engenharia de
Tecidos pelo Método de Litografia Macia**

Autor: Cláudio Roberto Cutrim Carvalho

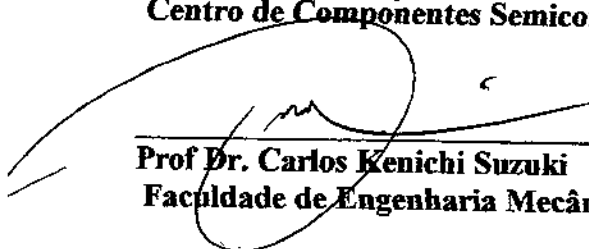
Orientadora: Profª Drª Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia



**Profª Drª. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia, Presidente
Faculdade de Engenharia Mecânica - UNICAMP**



**Profª. Drª. Mária Beny Pinto Zakia
Centro de Componentes Semicondutores - UNICAMP**



**Prof Dr. Carlos Kenichi Suzuki
Faculdade de Engenharia Mecânica - UNICAMP**

Campinas, 31 de julho de 2003

Agradecimentos

Às Profas. Cecília Zavaglia e Maria Beny, pelas oportunidades

Agradecimento especial à técnica Regina Maria A. G. Floriano, que foi imprescindível para a realização do trabalho

À Deus e a toda a minha família

Resumo

CARVALHO, Cláudio Cutrim, *Microfabricação de arcabouços tridimensionais para engenharia de tecidos pelo método de litografia macia*, Campinas: Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2003, 67 p. Dissertação (Mestrado).

Litografia macia tem sido usado recentemente para criar micro e nano estruturas bi e tridimensionais para cultura de células e engenharia de tecidos usando PDMS (poli dimetil-siloxano). PDMS é um elastômero biocompatível, opticamente transparente, não tóxica, e barato que pode ser moldado com alta fidelidade. Fabricou-se um arranjo de estruturas quadradas com espaçamento regular e secção transversal variando $100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$, $150\mu\text{m} \times 150\mu\text{m}$, $200\mu\text{m} \times 200\mu\text{m}$, $250\mu\text{m} \times 250\mu\text{m}$ com $50\mu\text{m}$ de altura e uma linha separando cada uma dessas estruturas de $30\mu\text{m}$. A proposta deste arranjo foi implementar a técnica de litografia macia para construção de dispositivos para aplicação em engenharia de tecidos, tais como: estudar o comportamento celular, adesão e espalhamento celular. Fabricaram-se também membranas porosas com diâmetro de $100\mu\text{m}$ com altura de $35\mu\text{m}$ e espaçamento entre os poros de $35\mu\text{m}$ e alguns canais microfluídicos. Estes arcabouços tridimensionais fornecerão o suporte físico para a fixação celular e reconstrução tecidual.

Palavras Chave

Litografia macia, engenharia de tecidos, arcabouços.

Abstract

CARVALHO, Cláudio Cutrim, *Microfabrication of tri-dimensionals scaffolds for tissue engineering by soft lithography* Campinas: Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2003, 67p. Dissertação (Mestrado)

Soft lithography and microtransfer techniques have been used to create two and three dimensional micro and nanostructures for cells culture and tissue engineering, using PDMS (polydimethylsiloxane). PDMS is a biocompatible elastomer, optically transparent, non-toxic and inexpensive that can be molded with high fidelity. We fabricated three dimensional PDMS structures with regular spaced square arrays with 100 μ m, 150 μ m, 200 μ m and 250 μ m a side and 30 μ m line width and 50 μ m hight. The purpose of these structures is implematation of lithography soft for biomedical research such: study the behavior, adhesion and spreading of the cells. We also fabricated PDMS porous membrane with diameter of 100 μ m, 30 μ m height, spaced by 35 μ m and some microfluidic channels. These three dimensional scaffolds will provide the physical support to cells attachment and tissue reconstruction

Key Words

Soft lithography, tissue engineering, scaffolds

Sumário

Ítem	Página
Capítulo 1- Justificativas e objetivos	1
1.1. Justificativas	1
1.2. Objetivos gerais	2
1.3. Objetivos específicos	2
Capítulo 2 - Microsistemas eletro-mecânicos	3
2.1. MEMS e BioMEMS	3
2.2. Substrato e material	5
Capítulo 3 - Métodos de fabricação de micro e nano estruturas	6
3.1. A tecnologia da fotolitografia	7
3.1.1. Esquema da técnica de fotolitografia	7
3.1.2. Limitações da fotolitografia à fabricação de nano – estruturas	9
3.2. A tecnologia da litografia macia	11
3.2.1. O processo tecnológico da litografia macia	11
3.2.2. Características gerais do PMDS	13
3.2.3. Vantagens e desvantagens do PDMS	13
3.3. Tecnologia de micromoldagem de polímeros	14
3.3.1. Fabricação dos moldes master e stamp	15
3.3.2. Self assembly e estruturas self assembled	15

3.3.3. Self assembly monolayer (SAM) em litografia macia	16
3.4. As técnicas de micro fabricação por litografia macia	17
3.4.1. Microcontact printing	17
3.4.2. Replica molding (REM)	18
3.4.3. Microtransfer molding (MTM)	19
3.4.4. Micromolding in Capillaries (MIMIC)	20
3.4.5. Solvent assisted micromolding (SAMIM)	21
Capítulo 4 - O método da engenharia de tecidos	23
4.1. Técnicas convencionais à substituição de tecidos ou órgãos	26
4.2. Técnicas alternativas à substituição de tecidos e órgãos	27
4.3. Biomateriais utilizados na engenharia de tecidos ósseos	28
Capítulo 5 - Método de confecção de arcabouços porosos	30
5.1 Características de um arcabouço para engenharia de tecidos	31
5.2 Comentários	34
5.3 Métodos de microfabricação usados para fazer arcabouços porosos tridimensionais	34
5.3.1 Polymer-demixed	35
5.3.2 Microcontact printing sobre materiais biológicos	35
Capítulo 6 - Materiais e métodos	37
6.1. Materiais	37
6.2. Metodologia	37
Capítulo 7 – Resultados e discussão	40
7.1 Arranjos de planaltos e vales	41
7.1.1 Aspecto macroscópico dos moldes de silício	41
7.1.2 Funções	43
7.1.3 Dimensões	44
7.2. Membranas porosas com furos trans-passantes.	44
7.2.1. Estrutura inicial (molde) e final obtida	44
7.2.2. Função	47
7.2.3. Dimensões	49
7.2.4. Comentários	49
7.3. Membranas porosas com furos não trans-passantes	49

7.3.1. Estrutura inicial (molde) e final obtida	49
7.3.2. Função	50
7.3.3. Dimensões	52
7.3.4. Comentários	52
7.4. Canais microfluídicos	53
7.4.1. Molde de canais microfluídicos	53
7.4.2. Réplicas em PDMS	54
7.4.3. Dimensões	55
7.4.4. Função	55
7.4.5. Comentários	56
Capítulo 8 - Conclusão	57
Referências bibliográficas	58

Lista de figuras

Figura	Página
Capítulo 3 - Métodos de fabricação de micro e nano estruturas	
3.1 - Técnica fotolitográfica	8
3.2 - Diagrama da técnica de fabricação de uma microengrenagem	9
3.3 - Obtenção de uma máscara com o desenho ou padrão desejado	9
3.4 - Diagrama de fabricação de moldes PDMS	12
3.5 - Mono camadas constituídas por self assembly	12
3.6 - Diagrama da técnica de impressão por micro - contato	17
3.7 - Diagrama da técnica de réplica de micromoldes	19
3.8 - Diagrama da técnica de MTM	20
3.9 - Diagrama da técnica de moldagem por capilaridade	21
3.10 - Diagrama do processo SAMIM	22
Capítulo 4 - O método da engenharia de tecidos	
4.1 - Engenharia de tecidos é uma área de pesquisa multidisciplinar	23
4.2 - Metodologia da engenharia de tecidos.	25
Capítulo 7 - Resultados e discussão	
7.1 Exemplo de padronização de substratos para estudo do comportamento, morfologia e cultivo de tecidos em função das características geométricas .	41
7.2 - Aspecto macroscópico das lâminas de silício que servirão para confecção das réplicas em PDMS	42
7.3 - Microscopia óptica com aumento de 150 x. Molde de silício, visto de cima, confeccionado por corrosão anisotrópica, estão representados os planaltos, e os espaços entre estes, são os vales	42

7.4 - Foto de microscopia óptica com aumento de 150 x. Réplica complementar ao molde de silício, feito de PDMS.	43
7.5 - Foto microscópio óptico aumento 100 x. Representando molde de silício com estruturas semelhante a “pilares”. Este molde foi feito pela técnica de RIE (Reactive Ion Etching), aparelho do Instituto de Física Gleb Wataghin (IFGW), UNICAMP	44
7.6 - Foto mostrando o molde anterior com aumento de 150 x.	45
7.7 - Foto de microscopia óptica com aumento de 200x. Molde de silício para confecção das membranas trans-passantes	45
7.8 - Foto de microscopia óptica com aumento de 200x, mostrando a réplica de PDMS, membrana porosa de PDMS.	46
7.9 - Foto de microscopia óptica, aumento de 200x, observar os poros trans-passantes por outra vista na réplica de PDMS.	46
7.10 - Foto de microscopia óptica com aumento de 150x. Réplica de PDMS, membrana porosa, observar a regularidade da distribuição e do tamanho dos poros.	47
7.11 - O arranjo das fibras de colágeno (10nm) com os cristais de hidroxiapatita (50nm), constituindo uma malha de aproximadamente de 10 a 100 micras para cada osteoblasto como ilustra a figura acima à direita. Acima à esquerda, a ilustração artística do empilhamento de membranas porosas com espessuras as mais variadas possíveis.	48
7.12 - Foto de microscopia óptica com aumento de 100 x. O molde de silício obtido foi o mesmo usado para obtenção da membrana porosa de PDMS.	49
7.13 - Foto de microscópio óptico com aumento de 200x. Réplica em PDMS, Poros não trans-passantes (ou recessos). Diâmetro médio de 100 μm profundidade de 50 μm . À direita um diagrama mostrando o efeito de conformação mecânica e encapsulamento que tem os recessos e poros sobre as células.	50
7.14 - Mecanismos de liberação controlada utilizando técnicas de litografia macia: I) liberação controlada passiva, II) liberação controlada por osmose, III) liberação controlada por biosensores.	51
7.15 - Foto por microscopia eletrônica de varredura de secção transversal de um compósito poroso de polímero biodegradável/hidroxiapatita (HAp), o qual foi cultivado por 8 semanas com células da medula óssea in vitro, e do lado direito, arcabouço baseado em HAp. Notar a presença de poros de tamanhos irregulares de ambos. Fonte: Tutorial em engenharia de tecidos de “Carnegie Mellon	

- University Bone Tissue Engineering Initiative” <http://www-2.cs.cmu.edu/People/tissue/materials.html>, consulta: 5/12/2002. Abaixo arcabouço fabricado pelo método de litografia macia. Observando a morfologia e distribuição dos poros fica evidente a estrutura mais homogênea. 53
- 7.16 - Moldes dos canais micro-fluídicos baseados em filmes de níquel (cedidos gentilmente pelo Laboratório de Micro-fabricação da Faculdade de Engenharia Mecânica-UNICAMP. Observar os dispositivos tubulares de PVC (tubos recortados) para delimitar o espalhamento do PDMS, foram colados no substrato. Na foto, estão dispostos moldes de microtubos em forma de “U”, “M” e algarismo romano “VI” 54
- 7.17 - Foto da macroscopia de canais microfluídicos em forma de algarismo romano VI. Observar que os tubos de vinil estão reforçados por arames de cobre para o tubo não dobrar. 54
- 7.18 - Observa-se os canais em forma de “M” e os microtubos feitos de vinil (de grau médico) por onde podem entrar ou sair fluidos. 55
- 7.19 - A figura acima da esquerda mostra uma representação artística da irrigação sanguínea executada por capilares e arteríolas. A figura da direita mostra um arranjo microfabricado mimetizando a microcirculação. Fonte: <http://www.mgh.harvard.edu/depts/tissue/index.html>, the Massachusetts General Hospital web site 2003. 55

Nomenclatura

Abreviações

µm - micrômetro

PMDS - poli dimetil siloxano

MEMS - microsistemas eletro-mecânicos

CMOS - *complementary metal oxide semiconductor*

BICMOS - *bipolar complementary metal oxide semiconductor*

BioMEMS - bio electro-mechanical system

DNA - ácido desoxiribonucleico

PCR - *polimerase chain reaction*

PDGF - fator de crescimento derivado das plaquetas

MBC - método de baixo para cima

MCB - método de cima para baixo

UV - ultra violeta

ArF - fluoreto de argônio

FIB- *focus ion beam*

RIE - *reactive ion etching*

SAM- *self assembled monolayers*

REM- *replica molding*

MTM- *microtransfer molding*

MIMIC - *micromolding in capillaries*

SAMIM - *solvent assisted micromolding*

PLLA - poli (L- ácido láctico)

PGA - poli (ácido glicólico)

PLGA - poli (L- ácido láctico) -co-(ácido glicólico)

BMP - proteína morfo genética

MEC - matriz extra-celular

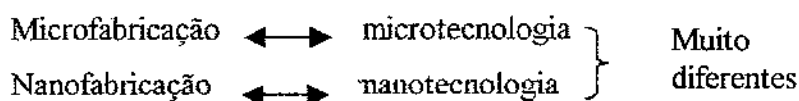
FDA - *food and drug agency*

PMMA - poli (metacrilato de metila)

CAPITULO 1 - Justificativas e Objetivos

1.1 Justificativas

Tanto a engenharia de tecidos quanto à micro e ⁿnanotecnologias são áreas de pesquisa extremamente empolgantes. Em resumo, a engenharia de tecidos desenvolve métodos para a construção de tecidos ou órgãos para reparação ou substituição de partes da anatomia do corpo humano (ossos, cartilagem, nervos e vasos, por exemplo) usando células, biomoléculas e biomateriais. Por outro lado, a microtecnologia ou nanotecnologia cria dispositivos de pequena grandeza para desempenhar funções diversas: sensores, atuadores, dispositivos microeletrônicos. Esta dissertação propõe estabelecer um elo entre estas duas áreas aplicando a técnica de microfabricação por litografia macia direcionada para a cultura de tecidos e implantologia. Sendo assim, as principais justificativas da realização deste trabalho são:



1) Como nano e micro-ciência tratam de uma ciência emergente, o governo tem a esperança de que o investimento em nanotecnologia renda bem e o Brasil consiga acompanhar o ritmo de desenvolvimento dos outros países. Afinal, começam todos mais ou menos da mesma marca, sem as décadas de descompasso que marcam outras áreas científicas. As apostas são altas. Há previsões de investimentos entre US\$ 200 milhões e US\$ 300 milhões nos próximos dez anos. É perfeitamente cabível que em dez anos, podemos superar a marca de comercialização de US\$ 1

bilhão em produtos brasileiros com nanotecnologia. Portanto, a dissertação está dentro de um contexto atual do desenvolvimento tecnológico do país nesta área^[91].

2) A falta de técnicas capazes de gerar e fabricar micro e nanoestruturas de modo rápido e econômico representa um obstáculo para países menos favorecidos, limitando deste modo, o acesso destes às áreas de nanociência e nanotecnologia. A litografia macia é uma alternativa bastante atraente a partir deste ponto de vista^[37, 40].

3) A pesquisa é motivada também por uma consciência crescente na indústria biomédica e na comunidade científica voltada ao estudo da engenharia de tecidos, que interações de superfície e geometria do substrato são importantes sobre a morfologia e fisiologia da célula, sendo portanto críticas na utilização segura de biomateriais. Pensando assim, a litografia macia é capaz de gerar nas superfícies dos biomateriais, padrões e arranjos de estruturas ou moléculas ou radicais químicos capazes de permitir maior ou menor adesão de um tipo celular, pois a topografia da superfície e funcionalização de moléculas são parâmetros chaves que determinam adesão da célula, expressão, crescimento e fenótipo^[27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 37, 38, 39].

1.2 Objetivo geral:

Este trabalho visa desenvolver membranas e arcabouços 3-D para engenharia de tecidos, com geometria e topografia extremamente controladas, utilizando para isto a técnica de litografia macia.

1.3 Objetivos específicos:

A técnica de litografia macia utilizada será a de réplica em micro-moldes de silício, isto é, será fabricado um molde baseado em silício por técnicas fotolitográficas. Uma vez obtido o molde de silício, será conformado sobre este um elastômero chamado de PDMS (polidimetilsiloxano, um tipo de silicone). O PDMS será descolado do molde e constituirá uma réplica complementar das estruturas desenvolvidas sobre o substrato de silício. Inicialmente serão confeccionadas membranas de poros de tamanho controlado e dispositivo microfluídicos. As réplicas de PDMS serão utilizadas em trabalhos futuros para estudo e aplicação em engenharia de tecidos.

CAPÍTULO 2 - Microsistemas Eletro-Mecânicos

2.1 - MEMS e BioMEMS

MEMS, Microsistemas eletro-mecânicos (Micro-Electro-Mechanical Systems), é uma sigla que significa a integração de elementos mecânicos, eletrônicos, sensores e atuadores em um determinado substrato (silício, vidro, polímeros sintéticos, etc.) através de tecnologias de microfabricação (fotolitografia, litografia macia, etc) [2, 10].

A parte eletrônica geralmente é fabricada usando processos de fabricação de circuitos integrados como CMOS (*complementary metal oxide semiconductor*) [1, 2] ou BICMOS (*bipolar complementary metal oxide semiconductor*) [1, 2, 10]. Por outro lado, os componentes mecânicos são fabricados usando técnicas compatíveis com o substrato. No silício, por exemplo, os elementos mecânicos são gravados seletivamente por processos de corrosão química ou física ou partes da estrutura são adicionadas por processos de deposição de novas camadas [1, 2].

Na prática, os microsistemas (MEMS) envolvem componentes eletrônicos e não eletrônicos e desenvolvem funções tais como aquisição de sinais, processamento de sinais, atuadores e controle, podem servir como veículos para a realização de reações de análises químicas e bioquímicas. Envolve o conhecimento de leis de escala, diferentes métodos de microfabricação e materiais [1, 2, 3].

Além disso, MEMS são sistemas, e por isso problemas e questões quanto ao seu dimensionamento vêm à tona, tais como: empacotamento do sistema, divisão do sistema em componentes, distribuição espacial, calibração, estabilidade, processamento de sinais e ruídos [8].

A engenharia de miniaturização (MEMS) aplicada à biomedicina e biotecnologia são chamadas de BioMEMS (Bio-electro-mechanical-system). Em BioMEMS há uma gama maior de materiais envolvidos, pois suas aplicações estão diretamente ligadas a manipulação de biomoléculas (proteínas, DNAs), células e também como implantes. Portanto, problemas como biocompatibilidade e toxicidade devem ser levados em conta quando está sendo dimensionado um microsistema para aplicação biomédica [7, 9, 10, 37].

A área de BioMEMS tem impulsionado diversos segmentos da biologia, química e da medicina. Algumas de suas aplicações podem ser citadas:

- *genômica, proteômica e medicina forense: chips de DNA e sistemas microfluídicos para PCR e cromatografia de proteínas [7, 8, 9].

- *Diagnóstico clínico - sensores de glicose [10, 11, 7]

- *Dispositivos para liberação controlada de drogas

- * Controle de qualidade: sensores de gases e pH na indústria química e alimentícia [8].

Os fabricantes sempre procuram reduzir custos e melhorar o desempenho de seus sistemas, portanto a tecnologia de microsistemas pode ser um meio de se alcançar estes objetivos. Os microsistemas essencialmente são *microchips*, sistemas complexos, miniaturizados e empacotados de maneira apropriada para proteção do sistema e facilitar seu relacionamento com o meio externo [1, 2, 7, 8, 10].

As maiores dos microsistemas usam a mesma tecnologia de fabricação dos dispositivos eletrônicos existentes nos computadores pessoais e telefones celulares, isto é, a tecnologia baseada em silício. Entretanto quando se trata de sistemas que manipulam células, microcanais por onde escoam fluidos biológicos (sistemas microfluídicos), moléculas termolábeis e instáveis (enzimas e proteínas), os sistemas que precisam ser implantados, surge então a necessidade de se buscar novos processos de microfabricação distintos dos processos usualmente utilizados para fabricação de MEMS [1, 2, 7, 8, 10, 11].

2.2 Substrato e Material

Enquanto os produtos baseados em silício utilizam padrões e métodos bem definidos, como por exemplo, as bolachas de silício e fotoresistes, os micros e nanosistemas desenvolvidos para aplicação biomédica muitas vezes são forçados a trabalhar com outros tipos de materiais. As razões para estas restrições são atribuídas à incompatibilidade que alguns sistemas ou fluidos biológicos desenvolvem frente ao silício, forçando o projetista a procurar novos materiais, isto é, biomateriais, que são biocompatíveis e atóxicos ao sistema biológico. Exemplos de substratos e materiais para uso em BioMEMS são: alguns vidros, polipropileno, polímeros bioreabsorvíveis, tais como o poli (ácido láctico) e poli (ácido glicólico), a polidioxanona, etc. Outro fator importante no desenvolvimento de novos métodos para a produção de microsistemas e canais microfluídicos para aplicação biomédica (BioMEMS) diz respeito ao custo de fabricação [5, 7, 11, 15].

Devido à demanda de produção de dispositivos baseados em silício (grandes lotes) ser bem superior ao volume de produção de BioMEMS, ocasiona uma situação econômica desfavorável para os produtores de BioMEMS que precisam produzir pequenas quantidades a baixo custo. Daí a necessidade por novos métodos de microfabricação, neste caso, a litografia macia tem seu lugar de destaque dentre as técnicas de baixo custo para produção de BioMEMS^[5, 7].

CAPÍTULO 3: Métodos de Fabricação de Micro e Nano Sistemas

Existem dois métodos conhecidos de construção de micro e nano objetos: o primeiro deles é conhecido como o “método de baixo para cima” (MBC) e o segundo como o “método de cima para baixo” (MCB). O “método baixo para cima” é uma técnica baseada na manipulação de moléculas e átomos à construção de objetos (mais complexos que os existentes em estado original) ou dos elementos que compõem tal objeto.

A abordagem do MBC vem sendo mais explorada pelos químicos e biólogos moleculares. Neste caso, o MBC envolve o desenvolvimento de dispositivos baseados em proteínas e moléculas com propriedades de se auto-construir ou de se rearranjar (*self-assembler*) à semelhança da natureza (exemplo, DNA)^[40, 41]. Por sua vez, a abordagem do MCB começa a partir de padrões gerados em larga escala e progride até as dimensões desejadas por intermédio da redução das dimensões laterais do padrão inicialmente gerado, em geral determinado por um fator de 10.

As técnicas aplicadas para a fabricação de dispositivos microeletrônicos (abordagem de cima para baixo) têm sido usadas para a produção em massa de micro e nano estruturas (podendo alcançar até 100 nm, equivalente a 500 átomos de silício enfileirados). Dentre as técnicas mais utilizadas, destaca-se a fotolitografia ^[40, 41].

3.1. A tecnologia da fotolitografia

Pode-se dizer que a fotolitografia é basicamente uma extensão da fotografia. Não obstante, a fotolitografia parte do processo fotolitográfico para obter um negativo fotográfico do padrão desejado. Este negativo chamado de máscara (ou master), é então usado para copiar o padrão no interior dos metais e materiais semicondutores. Uma vez obtido o negativo, pode-se estabelecer várias cópias a partir deste.

A fotolitografia é uma técnica muito usada para fabricar “chips” de computadores e demais dispositivos microeletrônicos. A tecnologia da fotolitografia pode ser refinada para fazer até nanoestruturas. Porém, caso se quisesse alcançar as nano medidas, o método da fotolitografia se tornaria mais caro e tecnicamente mais difícil ^[8, 1].

3.1.1. Esquema da técnica de fotolitografia

A técnica da fotolitografia pode ser visualizada esquematicamente na figura 3.1. Neste diagrama, podem ser feitas as seguintes observações:

- a) Há um filme fino de óxido de silício sobre uma bolacha de silício. Neste caso é desejado que algumas partes do filme de SiO_2 sejam seletivamente removidas;
- b) é construída uma máscara com o desenho ou padrão que se quer desenvolver (baseado em cromo e vidro) e é depositado um polímero foto-sensível, chamado de *fotoresiste*, sobre a bolacha de silício;
- c) ocorre exposição à luz UV ou raio-X;
- d) há dois tipos de *fotoresiste*: o positivo e o negativo; quando a luz atinge o positivo ele fica fraco e pode ser “extraído” seletivamente após tratamentos químicos específicos;
- e) simultaneamente o *fotoresiste* negativo se torna resistente, no local onde foi exposto a luz; e
- f) a extração por soluções químicas fica restrita a zonas não expostas a radiações.

A exposição à luz por Ultra Violeta (UV) ou Raio-X, poderá reproduzir zonas expostas e não expostas a radiação, conforme o padrão da máscara. Com efeito, pode-se obter zonas modificadas e outras não modificadas para conformação final por tratamento químico, que eliminará a porção mais “fraca” do *fotoreviste* (Ver figuras 3.2 e 3.3).

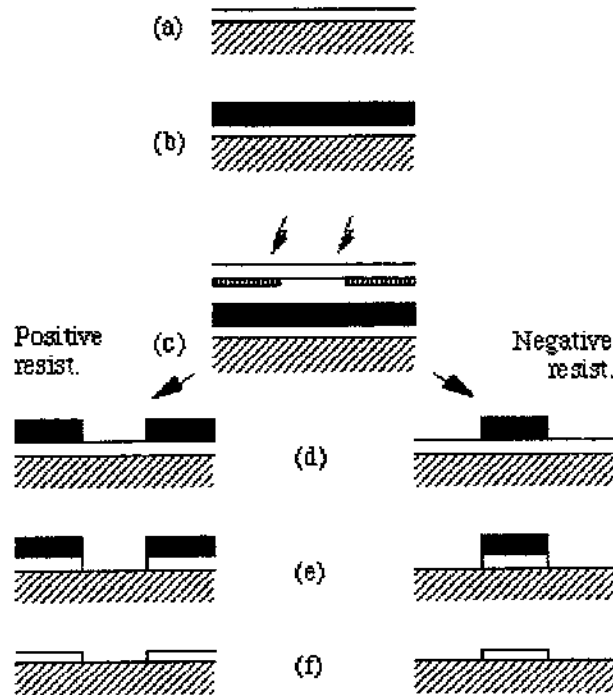


Figura 3.1: Técnica fotolitográfica

Fonte: <http://www.dbanks.demon.co.uk/ueng/plith.html>, consulta: 28/05/2003.

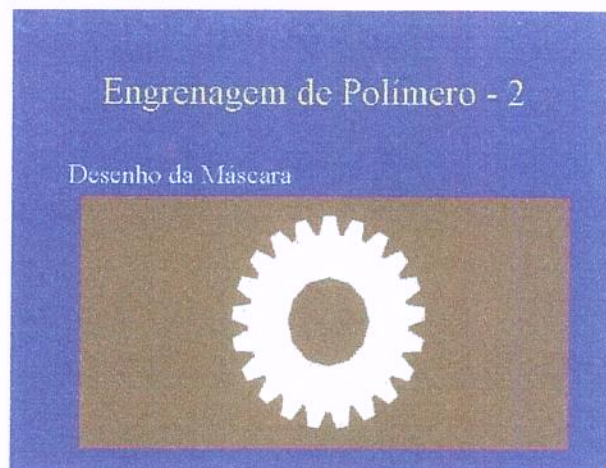


Figura 3.2: Diagrama da técnica de fabricação de uma microengrenagem.

Fonte: Luis Otávio, 2002 aula de microfabricação, Unicamp



Figura 3.3: Obtenção de uma máscara com o desenho ou padrão desejado.

Fonte: Luis Otávio, 2002 aula de microfabricação, Unicamp

3.1.2. Limitações da fotolitografia à fabricação de nano – estruturas

Como já foi dito anteriormente, há limitações de natureza técnica e econômica quanto à adequação da fotolitografia à fabricação de objetos de nano estruturas. A primeira das limitações está relacionada com o comprimento de onda da radiação que o método trabalha, pois, neste caso, o menor comprimento de onda da luz ultravioleta usada para a produção em massa atinge a faixa dos 250 nanômetros. Nesta condição, a difração provocada pelo método sobre a radiação compromete a confecção de objetos de dimensões muito pequenos^[13].

Uma outra limitação da fotolitografia está relacionada com o custo dos equipamentos utilizados para fabricar as nanos estruturas na escala de alguns nanômetros (cerca de 100 nanômetros ou poucos microns). Neste particular, o método fotolitográfico torna-se caro, pois são necessários dispositivos ópticos e *fotoresistes* mais sofisticados e, portanto, mais onerosos. Por exemplo, a combinação de luz ultravioleta, emitido por uma fonte de *excimer laser* (193nm ArF)^[13], não é um método barato e não constitui-se a única opção para todas as aplicações^[16, 61]

O método fotolitográfico apresenta uma outra limitação relacionada com a pouca eficiência para a reprodução de estruturas não planares^[16]. De fato, a etapa química do processo litográfico pode apresentar algumas situações críticas, no momento da fabricação dos dispositivos, de domínio incompleto na implementação dos padrões gerados sobre as superfícies dos substratos^[8].

Não bastasse, a adequação do método litográfico, para medição de estruturas nanométricas, pode gerar somente estruturas bidimensionais na medida em que não é um método flexível, quanto a funcionalização de superfícies, para ancoragem de moléculas específicas para o cultivo de tecidos^[50, 51, 52]. Por fim, existe ainda uma forte restrição para a aplicação do método litográfico em seres humano. De fato, há uma variedade de materiais usados pelo método fotolitográfico que não são biomateriais^[50, 51, 52].

Em face das limitações da fotolitografia, novas técnicas têm sido desenvolvidas para ultrapassar a barreira dos 100nm imposta pelo método fotolitográfico. Dentre estes métodos, incluem-se:

- a litografia com UV extreme^[62, 63]
- a litografia com Raio X macio^[62, 63]
- o feixe de elétrons^[52]
- o FIB (FOCUS ION BEAM)^[62, 63], e
- a litografia com probe^[62, 63]

Apesar dessas técnicas litográficas avançadas serem capazes de gerar até mesmo estruturas nanométricas, o custo econômico das mesmas torna-as inviáveis à produção de micro e nano-estruturas em massa. Apesar disso, deve ser ressaltado que a fotolitografia é a tecnologia dominante para a fabricação de micro e algumas nanoestruturas^[55, 56, 57].

3.2. A tecnologia da litografia macia

A litografia macia é um método não fotolitográfico de construir micro e nano estruturas baseadas em auto-organização - um termo em inglês que expressa a capacidade de certas moléculas de se auto-estruturarem ou de se organizarem espontaneamente - e em réplica de moldes ^[13, 14].

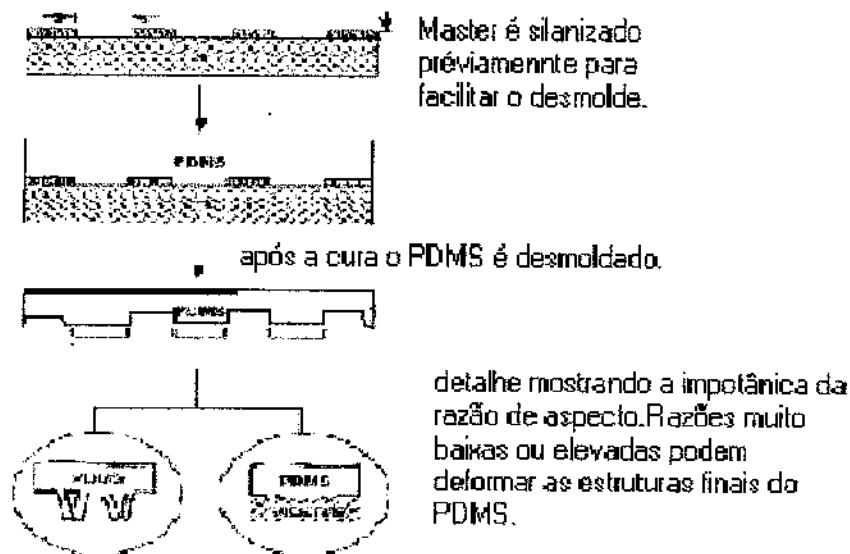
A litografia macia é um método não fotolitográfico para fabricação de micro e nano estruturas. Para tal, a litografia macia se baseia na técnica de réplica de moldes e na técnica de construção de estruturas utilizando compostos químicos com propriedades de se auto-organizar ou auto-rearranjar. Além disso, é um método de baixo custo, eficaz e de fácil execução ^[13, 14, 16].

A litografia macia usa um polímero, ou melhor, um elastômero com estruturas padronizadas na sua superfície para formar padrões sobre um substrato. O elastômero mais usado na litografia macia é o PDMS (poli-dimetilsiloxane). Esta substância é um polímero que tem capacidade de se conformar sobre superfícies não planares, microscópicas ou, até mesmo, com dimensões na escala de nanômetros. Essas características tornam o PDMS um elastômero útil o bastante para ser utilizado como material para construção de micro e nano-estruturas ^[17, 18, 13]. Cabe observar, entretanto, o método da “litografia macia” pode também utilizar outros elastômeros, tais como os poli-uretanos, poli-imidas e outros ^[13].

3.2.1. O processo tecnológico da litografia macia

Na tecnologia da litografia macia, o PDMS é aplicado sobre um outro molde. Quando isto acontece, o molde representa um negativo da estrutura replicante que se deseja construir sobre o elastômero. O PDMS, em geral, é posto sobre um molde construído por técnicas de microlitografia - por exemplo, as técnicas de fotolitografia e a microfabricação por feixe de elétrons - na forma de um pré-polímero.

Neste processo, normalmente, é adicionado um agente para fazer a cura do polímero. Após a cura do polímero, este é descolado do molde e aí então ficam configuradas as estruturas padronizadas do molde litografado, como mostra a figura 3.4.



Esquema de replicação do PDMS, a partir de um molde

Figura 3. 4 -Diagrama de fabricação de moldes PDMS

Fonte: XIA, Y. WHITESIDES, G.M. Soft lithography. Annu. Rev. Mater. Sci. 28 – 1998

O ponto chave da litografia macia, como mostra a figura 3.4, é a obtenção de um molde (ou master) por técnicas litográficas que utilizam um elastômero para se conformar sobre a superfície do molde. Este molde pode ser sinalizado para facilitar o desmolde do polímero.

O molde de PDMS é preenchido com um pré-polímero para dar a forma desejada a partir do relevo da superfície do próprio molde. Como na técnica de *microcontact printing*, em geral, usa-se o relevo da superfície do molde como um carimbo e a tinta seria uma substância com característica *self-assembly* ou seja, com a propriedade de se auto organizar para construir micro e nano-estruturas sobre um substrato^[20]. A figura 3.5 apresenta, como exemplo, uma mono-camada constituída por moléculas *self assembly* e, ao lado, a foto do STM (microscopia de tunelamento) de dodecanetiol sobre ouro.



Figura 3.5: Mono - Camadas constituídas por *self assembly*

Fonte: <http://www.zurich.ibm.com/st/microcontact/highres/mucp.html>. Acesso em 12/01/2003.

3.2.2. Características gerais do PDMS

O PDMS (poli-dimetil siloxane) é um composto constituído por uma parte inorgânica (siloxane) e outra parte orgânica (dimetil). Por isso, o PDMS apresenta propriedades físicas, químicas e biológicas úteis para manipulação pela técnica de litografia macia. Dentre estas, destacam-se:

a) As propriedades físicas

O PDMS não é higroscópico, portanto não aumenta de volume frente à umidade. A membrana de PDMS é permeável a gases. O PDMS possui boa estabilidade térmica (mesmo a temperaturas aproximadas de 186°C). O PDMS é flexível, isotrópico, homogêneo e, por isso mesmo, pode ser deformado mecanicamente. O PDMS pode ser reforçado em estado sólido por ligações cruzadas (*cross - linking*). Por fim, o PDMS apresenta baixa temperatura de transição vítrea [13, 19].

b) As propriedades químicas

O PDMS possui baixo nível de energia livre de interface, boa estabilidade química, que pode ser padronizada facilmente com aderência reversível, e ainda é opticamente transparente [13, 35].

c) As propriedades biológicas

O PDMS possui boas propriedades biológicas dentre as quais a sua biocompatibilidade com os fluidos biológicos para fazer membranas porosas e canais micro-fluidicos para sistemas de análises clínicas e engenharia de tecidos. O PDMS é transparente, por conseguinte, células, tecidos e outros materiais biológicos podem ser facilmente visualizadas. Além disso, o PDMS se presta à confecção de arcabouços tridimensionais e sistemas para a liberação controlada de drogas [50, 51, 52, 60, 61].

3.2.3. Vantagens e Desvantagens do PDMS

• *Vantagens do PDMS*

Entre as vantagens tem-se a baixa energia livre de superfície. Uma outra vantagem é que o

PDMS deforma mecanicamente. Com isso, pode-se conseguir variar as formas pela aplicação de força. O PDMS ajusta-se em superfícies curvas ou 3D de tamanhos micron e sub-micron. Os pré-polímeros e os agentes para “curar” estão disponíveis comercialmente. Além disso, sua formulação, fabricação e aplicação é extensivamente bem documentada^[12, 13, 14, 65].

O PDMS é um produto durável. Assim, uma vez desenvolvido os padrões deste polímero, o seu molde pode ser usado diversas vezes (até 50 vezes), por vários meses, sem qualquer degradação sensível^[20, 21]. As propriedades de superfície do PDMS podem ser modificadas por funcionalização de moléculas, tratamento com plasma ou modificando a taxa de ligações cruzadas. Por tudo isso, o PDMS torna-se um polímero bastante versátil para ser utilizado como biomaterial^[37, 52].

- ***Desvantagens do PDMS***

Apesar das vantagens apresentadas, o PDMS tem algumas desvantagens que serão descritas a seguir. Uma desvantagem do PDMS é que ele pode passar por um processo de encolhimento de até 1%, após a cura. O PDMS, quando em contato com solventes orgânicos, tais como tolueno e hexano, pode também produzir edemas^[13, 14].

Além disso, a expansão térmica e a própria elasticidade do PDMS podem comprometer o uso deste material em estruturas multi-camadas. Isto acontece porque é difícil atingir alta acurácia, em termos de medidas sub-microns, quando se trabalha com áreas extensas de polímero^[13, 14, 20].

Como o PDMS é mole, ele apresenta limites de estruturas com alta razão de aspecto (h-altura ou d-profundidade/l-comprimento). Assim, quando a razão de aspecto é alta ou muito baixa, portanto extremas, pode haver deformações e distorções nos padrões gerados no PDMS^[13].

3.3. Tecnologia de micromoldagem de polímeros

A tecnologia de micromoldagem de polímeros tem vários desdobramentos que serão descritos a seguir:

3.3.1. Fabricação dos moldes *master e stamp*

O molde master (primeiro molde) é fabricado através do uso de técnicas microlitográficas como foto-litografia, e - *beam writing, extreme* - e ultra-violetas b (UV). É o master que vai determinar as estruturas que vão ser padronizadas no PDMS. Neste trabalho usa-se a fotolitografia por corrosão úmida e RIE (*Reactive Ion Etching*).

Num primeiro momento um pré-polímero é posto sobre um master. Em seguida, é colocado um agente de cura. Uma vez curado, o polímero é solto ou descolado do master. Para facilitar a soltura do polímero é utilizado um filme composto por silanos, que é aplicado sobre o master previamente à colocação do PDMS. Uma vez curado e descolado do substrato, o PDMS apresentará um padrão de superfície complementar ao da superfície padronizada do master.

O PDMS é um elastômero com nome comercial SYLGARD 184 da DOW CORNING. Este produto é fornecido em dois componentes: a) o primeiro componente é um pré-polímero (um silicone chamado de PDMS com terminações vinil); b) e o segundo componente é um agente de cura (uma mistura de copolímeros de metilhidroxissiloxane e dimetilsiloxane e um composto a base de platina).

Quando os dois componentes são misturados, colocados sobre a superfície do master, e aquecidos a elevadas temperaturas, a mistura torna-se sólida, por meio de ligações cruzadas, via reação de hidroxilação entre os grupos vinil ($\text{SiCH}=\text{CH}_2$) e os grupamentos hidroxissilano (SiH) do elastômero^[28, 13].

3.3.2. *Self assembly* e estruturas *self assembled*

Self-assembly é a capacidade de agregação e organização de sub-unidades (moléculas ou meso-objetos) em estruturas estáveis e bem definidas, via interações não covalentes^[13, 59]. Essas interações são guiadas pelas propriedades químicas das sub-unidades. Na verdade, as sub-unidades procuram atingir seu equilíbrio termodinâmico, seu estado de menor energia, e por isso se formam espontaneamente.

As moléculas com este tipo de propriedade de se agrupar e construir arranjos altamente organizados, atingindo o estado de menor energia, têm a capacidade de rejeitar erros na sua

estrutura final.^[13,14] Os mecanismos de auto-organização ou auto-estruturação de moléculas têm sido estudados principalmente nos processos biológicos de arranjos dos nucleotídeos das moléculas de DNA ou dos aminoácidos que constituem as proteínas e as membranas fosfolipídicas celulares^[32, 33].

Os *self assembled monolayers* (SAM's) constituem um dos sistemas, não biológicos, auto-organizados ou auto-montados mais estudados. Os SAM's são facilmente preparados por imersão de um substrato em solução contendo um ligante do tipo $(Y(CH_2)_n X)$, que reage contra a superfície, ou expondo este substrato à vapores contendo essas espécies químicas reativas^[13, 31].

A espessura das camadas dos SAM's é controlada por mudanças no número de grupamentos alquil(n). As propriedades de superfície podem ser modificadas desde que se altere o grupamento, X. A seletividade de ligação ou de ancoragem é controlada pelo grupamento Y. No sistema "SAMs" os grupamentos mais usados são os alcanotiolatos sobre ouro e prata e os alquil-siloxanos sobre superfícies com terminações de hidroxilas tais como Si/SiO₂, vidro e até mica.

3.3.3. "*Self assembly monolayer*" (SAM) em litografia macia

A capacidade de se auto-organizar que algumas substâncias químicas possuem, como os alcanotiolatos citado acima, tem sido usada na litografia macia, especificamente, a sub-técnica conhecida por *microcontact printing* (impressão por microcontato). Esta técnica consiste na utilização de um "carimbo" de PDMS (com estruturas padronizadas na sua superfície), e um análogo a "tinta", que seria a solução de SAM.

Sendo assim, o carimbo de PDMS poderia marcar a superfície de um determinado substrato com o sistema SAM. A característica deste substrato marcado refletiria diretamente a superfície padronizada do carimbo de PDMS. A "tinta" se impregnaria sobre o substrato formando padrões, uma vez construídos esses padrões, você pode fazer ataques de corrosão sobre o substrato protegido por estes padrões, obtendo também novas formas e estruturas.

Nesta técnica, os sistemas SAM mais utilizados são os alcanotiolatos (solução 2mM de hexadecanetiol ($CH_3(CH_2)_{15}SH$) em etanol), o substrato mais utilizado é o ouro (aonde a tinta vai se impregnar). O carimbo de PDMS é posto em contato com o substrato de ouro por 10 a 20

segundos. O hexadecanetiol se transfere do carimbo para o substrato formando um hexadecanetiolato ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{S}-$)^[13, 59, 31].

3.4. As técnicas de micro fabricação por litografia macia

Apresenta-se a seguir, de forma sucinta, as cinco principais técnicas de micro-fabricação por litografia macia: *microcontact printing*, *réplica de moldes*, *microtransfer molding*, *micromolding in capillaries* e *solvent-assisted micromolding*. Dentre estas técnicas litográficas, será explorada especificamente a técnica conhecida por **réplica de moldes**.

3.4.1. Microcontact printing

A micro impressão por contacto é uma técnica que utiliza mono-camadas auto-organizadas (self-assembly monolayer: SAM) que são transferidas, por meio de “carimbos” de PDMS, para determinados substratos (ouro ou prata) por simples contato físico, conforme pode ser visto na figura 3.6.

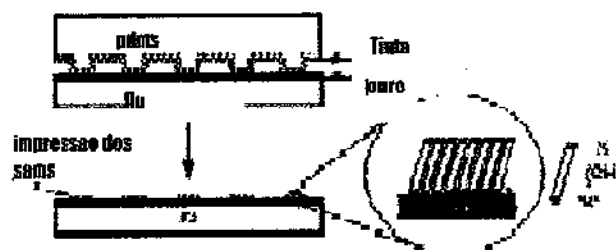


Figura 3. 6: Diagrama da técnica de impressão por micro - contato^[13].

Fonte: XIA, Y. WHITESIDES, G.M. Soft lithography. Annu. Rev. Mater. Sci. 28- 1998

No caso da tecnologia de *microcontact printing* utilizar, por exemplo, um alcanotiol sobre ouro, o *stamp* de PDMS é umedecido com uma solução de hexadecanotiol em etanol, a 2mM, e posto em contato com uma superfície de ouro por 10-20 segundos. O hexadecanotiol ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{SH}$), quando transferido do carimbo para a superfície de ouro, forma um composto chamado hexadecanotiolato ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{S}$) que gera padrões e formas sobre a superfície do ouro, conforme pode ser observado na figura 3.6.

3.4.2. *Réplica Molding(REM)*

A replicação de moldes (*REM*) é uma técnica de litografia macia que vem sendo usada, de forma eficiente, na duplicação da informação codificada na superfície dos moldes. Nesta técnica, os pré-polímeros termicamente curáveis são usados de forma que as dimensões obtidas dos replicados, depois de descolados do molde, possuem as mesmas dimensões do replicante, com uma tolerância de até 3%. A eficiência do processo é determinada pelos seguintes fatores: forças de van der Waals, umidade e preenchimento dos moldes.

A tecnologia de replicação de moldes não só permite a obtenção de cópias com uma resolução menor que 10nm, como também a duplicação de estruturas complexas e tridimensionais, fácil de fazer. Em face disso, a *REM* é um método rápido e de baixo custo^[34, 35]

Na técnica de replicação, os moldes de PDMS são preparados a partir do molde mestre (master). Na sequência, o pré-polímero (por exemplo: poli-uretano) é posto contra o molde, é curado, e, em seguida, descolado do molde, como mostra a figura 3.7. Nas imagens da figura 3.7, pode-se ver as nano-estruturas sobre o molde de PDMS, a réplica de PDMS pode ser aproveitada como um segundo molde para replicar seus padrões em outros polímeros, tais como o poliuretano.

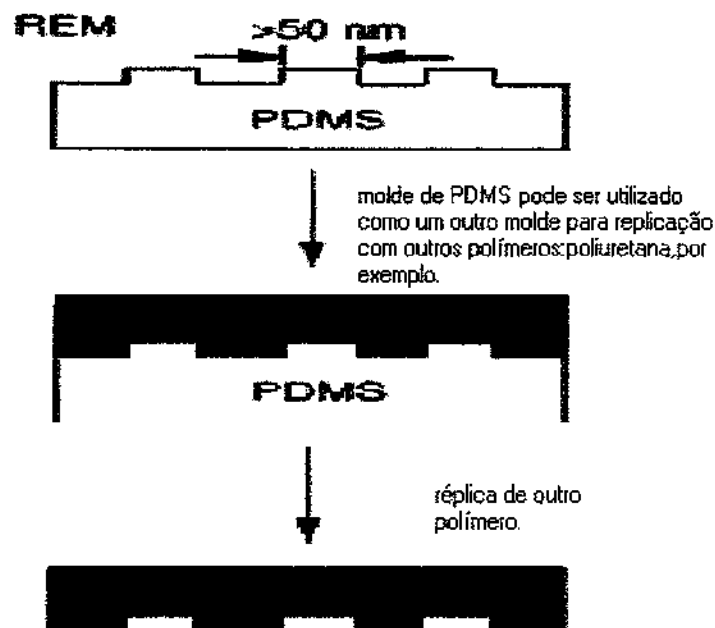


Figura 3.7: Diagrama da técnica de réplica de micromoldes

Fonte: XIA, Y. WHITESIDES, G.M. Soft lithography. Annu. Rev. Mater. Sci. 28 - 1998

Uma outra alternativa de aplicação da técnica de réplica de moldes é aquela que utiliza o molde de PDMS obtido de um MASTER e, em seguida, faz do próprio PDMS um molde para um outro tipo de material como mostra a imagem da figura 3.7. Há centros de pesquisa avançadas que vêm usando materiais biocompatíveis como um segundo material a ser aplicado no molde de PDMS. Dentre estes materiais biocompatíveis estão os polímeros bioreabsorvíveis como o PLLA, PGA OU PMMA [13, 35, 37].

3.4.3. *Microtransfer molding (MTM)*

Na técnica de “micro transferências de moldes”, uma fina camada de pré-polímero líquido é aplicado sobre a superfície do molde de PDMS e o excesso do líquido é removido por uma espátula ou por sopro de uma corrente de gás nitrogênio.

Uma vez preenchido o molde de PDMS, este é posto em contato com o substrato (por exemplo, substrato de vidro). Em seguida, o pré-polímero é curado com luz ultra-violeta (UV),

ou por aquecimento, até completar a cura. Na sequência, descola-se o molde de PDMS, e, só aí então, têm-se as estruturas padronizadas sobre o substrato, como pode ser visto na figura 3.8.

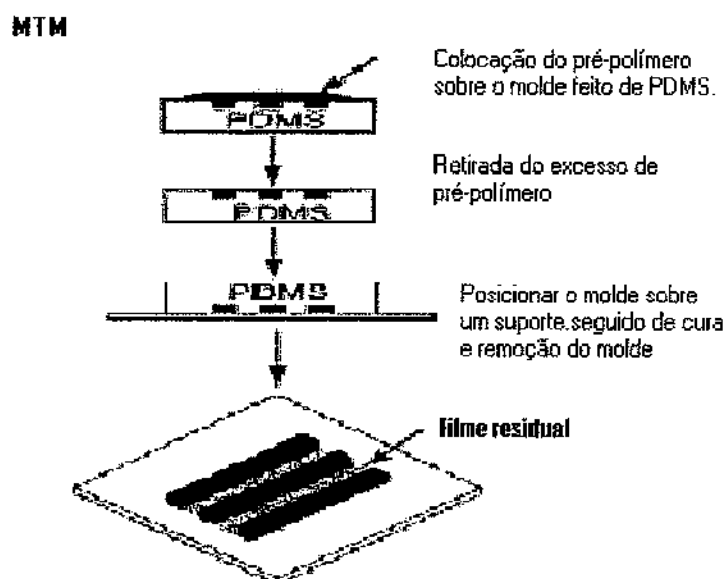


Figura 3.8: Diagrama da técnica de MTM

Fonte: XIA, Y. WHITESIDES, G.M. Soft lithography. Annu. Rev. Mater. Sci. 28 - 1998

3.4.4. Micromolding in Capillaries (MIMIC)

Tem-se ainda, a técnica de micro moldagem por capilaridade. Nesta técnica, um molde de PDMS é posto sobre uma superfície do substrato para formar uma rede de canais vazios entre eles. Deste modo, um pré-polímero com baixa viscosidade é posto ao lado do molde e, por capilaridade, este pré-polímero preenche este molde na forma de tubos capilares. Uma vez curado, como mostra a figura 3.9, remove-se o molde e têm-se as estruturas conforme o molde desejado^[17].

Os materiais usados pela técnica de “moldagem por capilaridade” são pré- polímeros, curados por luz ultra violeta ou mesmo por meio térmico, que não contenham solventes, soluções ou suspensões de polímeros estruturais ou funcionais, materiais solgel, cerâmicas, macromoléculas biológicas funcionais e sais inorgânicos.

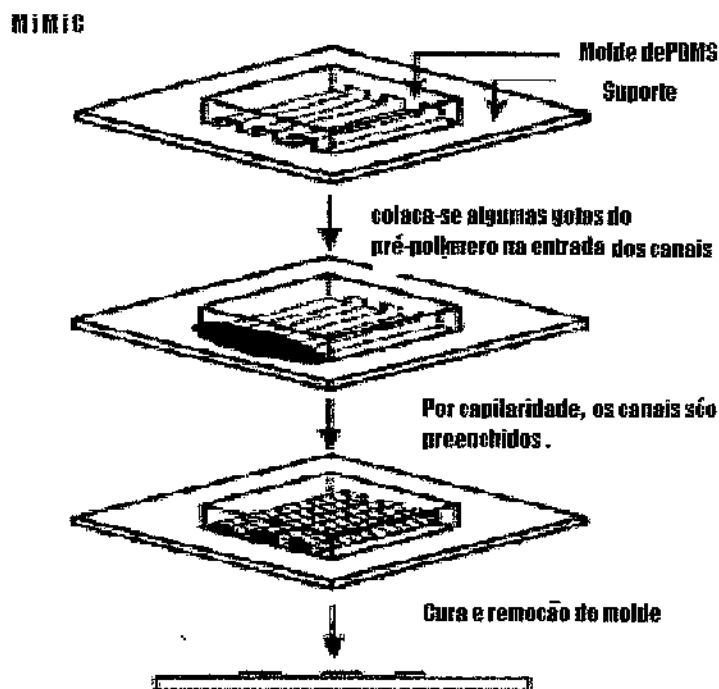


Figura 3.9: Diagrama da técnica de moldagem por capilaridade^[16]

Fonte: XIA, Y. WHITESIDES, G.M. Soft lithography. Annu. Rev. Mater. Sci. 28 - 1998

3.4.5 Solvent assisted micromolding (SAMIM)

A técnica de “moldagem baseada em solventes” pode gerar estruturas de relevo sobre a superfície de um material desde que seja usado um bom solvente capaz de “dissolver” ou, melhor dizendo, “amolecer” o material sem afetar o molde de PDMS.

Para tal, o molde de PDMS deve ser umedecido com o solvente para em seguida ser posto em contato com o substrato, que geralmente é um polímero orgânico. O solvente, quando em contato com o substrato, age amolecendo uma fina camada do substrato, resultando em um gel ou fluido. Este gel, por sua vez, é moldado contra as paredes da estrutura de relevo do molde PDMS. Quando o solvente se dissipa ou evapora, então o fluido se solidifica e forma um padrão de estrutura complementar ao molde^[13, 23].

Esta técnica permite replicar complexas estruturas de relevo, por áreas relativamente grandes, numa simples etapa. Na modalidade de técnica SAMIM, o requisito mais importante para o solvente ser usado é ele possuir uma pressão de vapor relativamente alta e uma moderada

tensão superficial capaz de assegurar rápida evaporação e não causar um mínimo edema do molde. Os solventes mais usados são etanol, metanol e acetona^[13, 23]. A figura 10 ilustra o processo de moldagem baseada no uso de solventes.

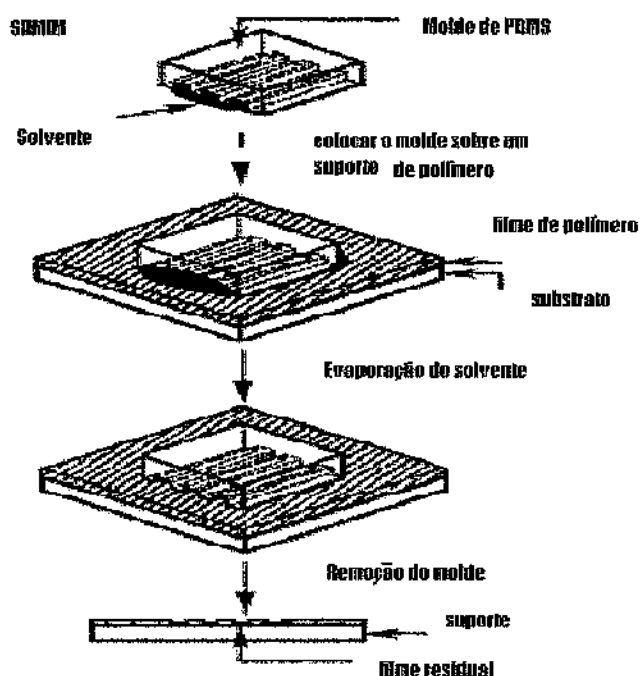


Figura 3.10: Diagrama do processo SAMIM

Fonte: XIA, Y. WHITESIDES, G.M. Soft lithography. Annu. Rev. Mater. Sci. 28 - 1998

CAPÍTULO 4 - O Método da Engenharia de Tecidos

A engenharia de tecidos é um novo ramo da ciência voltada para a pesquisa e desenvolvimento (P&D) de substitutos biológicos de reparação, reconstrução e regeneração de tecidos. Na prática, a engenharia de tecidos é entendida como um conjunto de técnicas e procedimentos, com base teórica em várias áreas do conhecimento humano, em particular a medicina, a biologia e engenharia e mais recentemente MEMS (ver figura 4.1)^[53, 81].

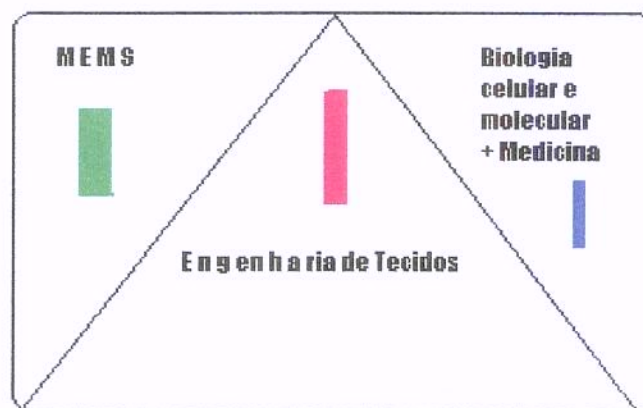


Figura 4.1 - Engenharia de tecidos é uma área de pesquisas multidisciplinar.

O princípio metodológico mais utilizado, para se fazer engenharia de tecidos, envolve as seguintes etapas (ver figura 4.2):

1ª) Etapa: A construção de arcabouços tridimensionais, biocompatíveis, porosos e biodegradáveis. Entre os arcabouços mais usados, tem-se:

- ✓ os polímeros sintéticos bioreabsorvíveis (PLLA, PGA e PLGA);
- ✓ os polímeros naturais (colágeno e derivados do ácido hialurônico); e,
- ✓ os cerâmicos (hidroxiapatita, beta fosfato tri-cálcio, biovidros, etc).

2ª) Etapa: O cultivo de células em ambiente laboratorial próprio. Há dois tipos de células cultivadas: as células maduras e diferenciadas (condrócitos ou osteócitos isolados de uma área doadora, exemplo: condilo femural; e as células tronco, mesenquimais indiferenciadas adultas (origem: medula óssea, tecido gorduroso e sangue).

3ª) Etapa: Adição de fatores de crescimento à matriz. Os fatores mais usados são as BMPS (proteínas morfo-genéticas) que podem ser de origem animal, como as BMPs bovinas, ou de origem recombinada (tecnologia do DNA recombinante).

4ª) Etapa: Implantação do arcabouço no local da lesão. Este arcabouço pode ser implantado de várias formas, a saber ^[81]:

- ✓ Implantado sozinho;
- ✓ Implantado juntamente com as células cultivadas fora do paciente (semeadas sobre o arcabouço);
- ✓ implantado associado com fatores de crescimento (proteína) morfogenética do osso (BMP), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e outros^[81,82 e 83].

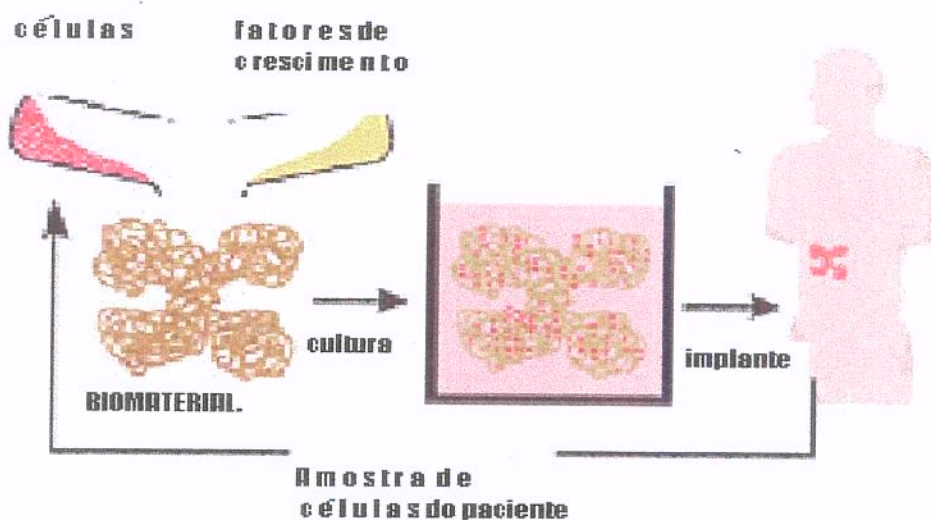


Figura 4.2 - Metodologia da engenharia de tecidos.

Há também dificuldades quanto ao uso do método da engenharia de tecidos. De fato, um obstáculo a ser superado é descobrir os mecanismos capazes de melhorar e controlar a distribuição espacial de células MEC e os fatores de crescimento dentro do biomaterial. Outro problema a ser resolvido reside na definição precisa das características das micro e nano estruturas dos biomateriais, sobretudo aquelas relacionadas com a malha 3D do biomaterial, tais como: tamanho de fibras, poros, permeabilidade aos nutrientes, difusão de moléculas com funções biológicas importantes e a capacidade de adesão da célula ao biomaterial^[34, 39, 81, 83].

Por fim, deve-se acrescentar, existem limitações impostas pelos processos de fabricação em relação à incorporação de fatores de crescimento e moléculas bioativas. Alguns processos de fabricação expõem os peptídeos a condições termodinâmicas (temperatura e pressão) ou químicas (solventes) que podem comprometer a estabilidade e atividade biológica dos mesmos.

4.1. Técnicas convencionais à substituição de tecidos ou órgãos

Todos os anos, na medicina, vários procedimentos cirúrgicos são realizados e, muitas vezes, há necessidade de se reparar, ou mesmo substituir um tecido, um órgão lesado ou com função insuficiente. Dentre as abordagens técnicas mais usadas para reparar tecidos e órgãos insuficientes, destaca-se:

a) A técnica do auto - enxerto

O protocolo envolve colher um tecido de uma determinada localização no paciente e transplantá-lo para um outro lugar do seu corpo. Neste caso, utilizando o enxerto autólogo, pode-se obter bons resultados clínicos. A questão da rejeição deixa de ser um problema importante, já que o implante é proveniente do próprio paciente. Como exemplos típicos de procedimentos de auto-enxerto ou enxerto autólogo, tem-se:

- ✓ **O “by pass” da coronária** - Neste caso, os enxertos de veias e artérias são removidos de determinadas localizações (safena e mamária) para serem então transplantadas ao coração com o objetivo de suprir a deficiência da vascularização local;
- ✓ **Artrodese espinhal e fraturas cominutivas** - Neste caso, o enxerto ósseo proveniente da crista ilíaca é largamente utilizado para estabilizar segmentos da coluna vertebral, defeitos ósseos e pseudoartroses.

Não obstante, ainda assim, existem algumas desvantagens na utilização do auto-enxerto dentre as quais se incluem as dores ou deformidades da área doadora e a limitação da quantidade de enxerto que pode ser retirado em cirurgias de grande porte (ex: tumores ósseos, revisões de artroplastias de quadril)^[81].

b) A técnica do alo-enxerto

Esta técnica consiste em retirar tecido ou órgão de um doador e, depois, transplantar para o paciente. O doador pode ter recentemente falecido e doado um órgão (por exemplo, coração, rim, fígado, osso e pâncreas). Há, ainda, os casos de doadores vivos que são usados para doar pulmões e rins. Entretanto, apesar da tecnologia do transplante ter tornado mais eficiente, sobretudo com o advento de drogas anti-rejeição, surge agora uma outra barreira, o problema da pouca disponibilidade de doadores^[81, 82].

c) A técnica de implantes artificiais:

Desde algum tempo, engenheiros e cientistas vêm criando dispositivos biomiméticos e materiais para replicar, aumentar ou estender as funções desempenhadas pelos sistemas biológicos. Como exemplo, citam-se os componentes artificiais (próteses) para o quadril, joelho e ombro, válvulas para o coração e implantes de silicone para a mama.

Muitos destes sistemas têm tido sucesso na sua utilização. Entretanto, os materiais utilizados nestes implantes são passíveis de problemas após certo tempo de uso. Isto se deve à perda, com o decorrer do tempo, das propriedades mecânicas e químicas dos materiais usados como implantes (aços inoxidável, ligas de titânio e ligas de cobalto-cromo), tais como: fadiga do implante, corrosão, fratura, toxicidade, liberação de debris (partículas de desgaste), etc.

Enquanto todas essas terapias têm oferecido melhorias na qualidade de vida dos pacientes, existem novas tecnologias no horizonte que procuram superar as limitações das abordagens convencionais. Essas novas abordagens incluem crescimento de tecidos e órgãos em animais, transgênicos, bioreatores, biomateriais e terapia gênica^[81, 83].

4.2. Técnicas alternativas à substituição de tecidos e órgãos

Como se sabe, as colônias de célula necessitam de estímulos externos ou sinalizações bioquímicas para crescerem dentro de um arranjo 3D, como as células que compõem órgãos ou tecidos o fazem. No corpo humano, as células são constantemente bombardeadas com sinais elétricos, mecânicos e estímulos químicos que orientam as células para o que elas devem "ser" e o que devem "fazer". No entanto, se esses sinais não são devidamente recebidos ou processados, a chance de crescimento e de integração entre o tecido hospedeiro e uma matriz tridimensional são maiores^[76, 77, 78, 79].

O estímulo estrutural ou mecânico envolve a interação de células com sua matriz extracelular (MEC). A MEC é a responsável pela forma e sustentação ao nosso corpo. O osso, por exemplo, é suprido de uma MEC feita basicamente de uma rede de fibra de colágeno entremeando uma matriz dura de fosfato de cálcio^[76, 77, 83].

Osteoblastos, osteoclastos e osteócitos coexistem em um ciclo equilibrado de formação e reabsorção de MEC, isto é, o osso é criando e destruindo continuamente. A este processo

contínuo de formação e destruição de osso, realizado pelos osteoblastos e osteoclastos respectivamente, dá-se o nome de remodelamento ósseo^[76, 77, 79].

O funcionamento de um tecido ou órgão depende dos estímulos locais e sistêmicos, tais como: estímulo físico (matriz), elétrico, mecânico (solicitações mecânicas), hormônios e citocinas. As citocinas são mediadores químicos e exercem uma ação regulatória na formação dos tecidos, tais como, quimiotaxia, diferenciação e controle da proliferação celular(mitose)^[50].

4.3. Biomateriais utilizados na engenharia de tecidos ósseos

Biomateriais são definidos como quaisquer substâncias (exceto drogas) ou combinação de substâncias, de origem sintética ou natural, que podem ser usadas por um determinado periodo de tempo como parte de um sistema para tratamento para fins de suporte ou reposição de tecido e de órgão ou função do organismo humano^[34, 38].

Os materiais biomiméticos não são feitos de coisas vivas, mas sua arquitetura (micro e macroscópica), composição química e propriedades mecânicas devem ser similares ou compatíveis aos tecidos que pretende substituir. Os biomateriais mais usados como matrizes para a engenharia de tecidos ósseos^[80], são:

- ✓ os polímeros bioreabsorvíveis - derivados do poli (ácido láctico) e poli (ácido glicólico);
- ✓ as membranas de colágeno (o colágeno pode ser de origem bovina ou recombinado do tipo 1 e 2);
- ✓ os hidrogéis; os cerâmicos - hidroxiapatita, beta-fosfato tricálcio.

(De um modo geral, os biomateriais usados como matriz apresentam função osteo-condutiva^[64]), isto é, capacidade de dar suporte ao crescimento e organização do tecido ósseo (ou cartilaginoso) e vascular durante a reparação óssea (ou cartilaginosa). A utilização de enxertos autólogos, a exemplo do enxerto esponjoso do ilíaco, melhora a taxa de consolidação, podendo atingir valores de 87%-100%^[66]. Não obstante, a necessidade de grandes quantidades de enxerto, morbidade da área doadora e falha da integração do enxerto tem gerado uma procura por novos tipos de enxertos capazes de suprir a demanda (defeitos ósseos e artrodeses de grandes segmentos vertebrais) e ainda estimular o crescimento ósseo.

Mais ainda sabe-se que existe uma forte correlação entre o tempo de consolidação e resultados funcionais. Assim sendo, quanto maior for o tempo de consolidação, piores serão os resultados funcionais do membro fraturado^[68, 71, 72, 73]. Um paciente que tem um tempo prolongado de consolidação, sem dúvida, está mais suscetível a desenvolver atrofia muscular, rigidez articular (imobilizações de longa duração) e comprometimento de seu bem estar físico e mental^[67, 68, 69, 70]. Percebe-se, portanto, que existe uma necessidade da medicina oferecer ao paciente novas condições e métodos de tratamento que acelerem o tempo de consolidação óssea e melhorem a qualidade do osso neoformado.

CAPÍTULO 5 - Métodos de Confeção de Arcabouços Porosos

Apesar dos avanços tecnológicos recentes, milhares de pessoas ainda morrem por insuficiência de seus órgãos (coração, rim e pâncreas, por exemplo) devido à carência de órgãos e tecidos de doadores ou substitutos artificiais ineficientes^[53]. Embora engenheiros e médicos tenham tentado repor as funções de órgãos através de dispositivos mecânicos (diálise e coração mecânico), ou através de implantação de dispositivos sintéticos (próteses de quadril e joelho, vasos, válvulas cardíacas sintéticas), esses métodos são frequentemente soluções temporárias e muitas vezes não permitem o paciente retornar completamente suas atividades normais^[53]. Infecção e rejeição de dispositivo são também problemas sérios em tais procedimentos^[75].

O campo emergente da engenharia de tecidos pode ajudar a resolver muitas destes problemas. Engenharia de tecidos envolve o uso de células para regenerar o tecido danificado, objetivando unicamente substâncias naturais para restaurar função de órgão. Isto tem sido feito inserindo células em suportes tridimensionais biodegradáveis para manter suas funções tecido-específicas quando implantadas. Um substrato deve ser associado com estas células para auxiliar a organização das células em três dimensões^[51]. É claro, o material usado para esta função deve ser biocompatível, não apresentar citotoxicidade e não ser imunogênico deve ser fácil de esterilizar e apresentar propriedades mecânicas compatíveis com o órgão ou tecido que se pretende substituir^[51].

Tanto os materiais sintéticos como os naturais têm sido pesquisados para uso como arcabouço tridimensional para engenharia de tecido^[25,48,54]. Os materiais sintéticos podem ser facilmente produzidos em massa e suas propriedades podem ser feitas sob medida para aplicações específicas. Isto inclui a criação de polímeros bioreabsorvíveis que permite o crescimento de

tecido no seu interior, enquanto o processo de degradação vai sendo deflagrado, eliminando a necessidade de uma segunda cirurgia para remover o implantado^[51].

5.1 Características de um arcabouço para engenharia de tecidos

Os arcabouços podem ser de origem sintética e natural. Podem ser de um único material ou de compósitos (mistura de mais um tipo de material para formar o arcabouço). Os arcabouços sintéticos mais utilizados são polímeros bioreabsorvíveis sintéticos que já são aprovados pelo FDA como materiais de sutura. A maioria deles é formada por poli (hidroxi-ácidos) que são degradados por hidrólise e seus produtos de degradação não são tóxicos podendo ser metabolizados e excretados pelo organismo^[xx]. Os principais destes polímeros são poli (ácido glicólico) (PGA), poli (L-ácido láctico) (PLLA) e seu copolímero, poli (L-ácido láctico)-co-poli (ácido glicólico) (PLGA)^[53]. Com esse copolímero, o tempo de degradação pode ser controlado para casar com o tempo necessário para a formação de tecido novo. O PLLA é mais hidrofóbico e menos cristalino que PGA e degrada em um tempo mais lento ^[53]. A degradação de um copolímero amorfo pode assim ser facilmente controlada por alterar-se a razão de PLA ao PGA na formulação.

Além do tempo de degradação, certas características físicas do arcabouço devem ser consideradas quando se projeta um substrato para ser utilizado em engenharia de tecidos. Para que haja crescimento de tecido, o arcabouço deve apresentar grande área superficial para permitir adesão de células. Isto é usualmente criando uma estrutura polimérica altamente porosa, uma espécie de espuma. Nessa espuma, o tamanho do poro deve ser bastante grande de modo que as células penetrem no poro, e o poro deve ser interconectado para facilitar a nutrição e evitar o desperdício e favorecer as trocas fisiológicas^[50]. Essas características (porosidade e tamanho dos poros) são freqüentemente dependentes do método de fabricação do arcabouço ^[38, 42, 43, 84].

Vários métodos têm sido desenvolvidos para criar arcabouços altamente porosos, tais como colagem de fibras^[34], solvente casting/particulate leaching^[36, 33, 38, 42] e separação de fase^[32, 58, 15, 46, 43, 44]. Esta etapa da revisão descreverá sucintamente algumas técnicas de fabricação de arcabouços porosos tridimensionais.

a) Colagem de fibras

Nesse método o arcabouço é confeccionado a partir de fibras de PGA. Essas fibras formam

arranjos em três dimensões, fornecendo área de superfície grande para interação e crescimento das células. As fibras do PGA são imersas em uma solução do PLLA. Quando o solvente evapora, a rede de fibras do PGA ficam embutidas na matriz de PLLA. O compósito é então aquecido acima da temperatura de fusão de ambos os polímeros. O PLLA funde primeiro e preenche os vazios deixados pelas fibras de PGA, por isso, quando as fibras de PGA começam a se fundir, a estrutura não colapsa e para minimizar a energia de interface, as fibras se fundem (e se “colam”) nos pontos onde se cruzam, formando uma “esponja” porosa.

O PLLA é então removido por dissolução com o cloreto de metileno. Esta técnica de fabricação resulta em espumas com porosidades de até 81% e diâmetros do poro de até 500 µm. Hepatócitos cultivados por uma semana nestas espumas permanecem vivas e começaram interagir mutuamente para formação de *clusters* ou grupamentos funcionais^[84].

Um segundo método para colagem de fibras de PGA utiliza O PLLA ou PLGA, estes são dissolvidos em clorofórmio e borrifado (atomização) sobre as fibras do PGA^[39]. Desde que o PGA é pouco solúvel em clorofórmio, as fibras permanecem inalteradas durante este processo. O solvente é então evaporado, deixando as fibras de PGA “coladas”. Quando tubos feitos desta maneira foram implantados nos ratos por 17 dias, foi observado crescimento tecidual, indicando que construções com essas propriedades físicas podiam encorajar a formação de neotecido^[39].

Embora as técnicas de colagem de fibras produzam arcabouços porosos com alta interconectividade de poros que são convenientes à regeneração de tecidos^[39], ambos os métodos envolvem o uso de solventes que podem ser tóxicos para células se não completamente removidas.

b) *Solvent casting/particulate leaching*

É um método para criar poros, que envolve o uso de um água e um soluto porogênico (soluto capaz de gerar poros), tal como sal (NaCl)^[36, 84]. O primeiro passo do processo é dissolver o polímero (PLLA ou PLGA) em cloreto de metila e então colocar esta solução sobre uma “placa de Petri” preenchida com o soluto porogênico. Depois, por evaporação do solvente, o composto polímero/sal resultante é lavado em água por aproximadamente dois dias para remover o NaCl. As porosidades do arcabouço resultantes podem ser controladas pela quantidade de sal adicionada, enquanto o tamanho do poro é dependente do tamanho dos cristais de sal. Com 70% em peso de sal ou acima, os poros exibem alta interconectividade^[84]. Os arcabouços fabricados desta maneira têm sido utilizados extensamente com várias células e tem mostrado nenhum efeito

adverso no novo tecido formado^[36, 27, 28].

c) Fabricação de espuma com gás (*Gas foaming*)

Para que se elimine a necessidade de solventes orgânicos na fabricação de arcabouços porosos, uma nova técnica envolvendo gás como um agente gerador de poros tem sido introduzido^[38]. O processo começa com a formação de discos sólidos de PGA, PLLA ou PLGA usando moldagem a quente. Os discos sólidos são colocados em uma câmara e expostas a alta pressão de CO₂ (5.5 MPa) por três dias, então a pressão é rapidamente decrescida para a pressão atmosférica. Porosidades de até 93% e dimensões de poros de até 100 µm podem ser obtidas usando esta técnica. Além disso, este processo de fabricação requer nenhuma lavagem com água para a retirada de solutos porogênicos e não usa nenhum solvente químico severo. As altas temperaturas envolvidas na formação do disco proíbem a incorporação de células ou moléculas bioativas e a estrutura de poros não são interconectadas, dificultando a sementeação e a migração de células dentro da espuma.

d) Emulsificação/processo *freeze-drying*

Técnicas adicionais propostas para fabricação polímeros porosos são baseadas nos conceitos de separação de fase em vez de incorporação de um agente gerador de poros. Eles incluem emulsificação/*freeze-drying*^[38] e separação de fase líquido-líquido^[32, 15, 46, 43, 44]. A técnica de emulsificação/*freeze-drying* consiste em colocar duas soluções imiscíveis (fase orgânica-polimérica e fase aquosa) juntas, a emulsão formada é então homogeneizada e resfriada em nitrogênio líquido, em seguida é submetido ao método *freeze-drying* para extrair a fase líquida, restando a matriz polimérica porosa. Arcabouços com grande porosidade (até 95%), mas pequenos tamanhos do poro (13-35 nm) tem sido fabricado usando esta técnica. Esses parâmetros são muito dependentes de fatores tais como a razão de solução do polímero para água e viscosidade de emulsão.

e) Separação de fases

A separação de fase líquido-líquido emprega princípios da termodinâmica para criar fase rica em polímeros e fase pobre em polímeros dentro de uma solução de polímeros. A fase pobre em polímeros é então removida, deixando uma rede altamente porosa^[32, 15, 46, 43, 44]. A solução de polímeros é esfriada abaixo do ponto de fusão do solvente e submetida à secagem a vácuo, por

vários dias, para sublimar completamente o solvente. Algumas vezes pode ser adicionado um não-solvente (água) para ajudar a separação de fase. A separação de fase ocorre via nucleação e crescimento em temperaturas abaixo da temperatura crítica, arcabouços de PLLA e PLGA tem sido formulados usando esta técnica^[32, 15, 46, 43, 44].

5.2 Comentários

Muitas técnicas têm sido investigadas recentemente para formar arcabouços altamente porosos convenientes para uso em engenharia de tecido. Muitos destes métodos são capazes de formar matrizes com alta porosidade para encorajar o crescimento celular. Entretanto, quase todas as técnicas descritas nesta revisão requerem o uso de solventes orgânicos, que podem reduzir a capacidade das células de formar novos tecidos *in vivo*, além de não oferecer um controle rígido sobre os parâmetros de rede (porosidade e interconectividade entre os poros). A técnica de litografia desenvolvida nesta tese pretende oferecer controle dos aspectos geométricos, sobre tudo das características dos poros formados. Nesta oportunidade, será utilizado o PDMS como constituinte dos arcabouços, nos próximos trabalhos utilizaremos uma diversidade maior de materiais, tais como PLLA e PMMA.

5.3 Métodos de microfabricação usados para fazer arcabouços porosos tridimensionais

Deposição bi e tridimensional de arcabouços porosos a partir de um sistema baseado em uma micro-seringa guiado por um servomecanismo.

Um método bastante preciso para a fabricação de arcabouços com precisão tridimensional é a técnica da deposição de biomateriais através de microseringas^[85]. Neste caso, a poli (caprolactona) e o poli (L-ácido lático), sobre a superfície de um substrato. A micro seringa é guiada por um servo mecanismo de alta precisão. O sistema deposita polímeros biocompatíveis com uma resolução lateral de 5 μm . O sistema foi caracterizado em termos de parâmetros de altura, comprimento e forma das estruturas depositadas pela seringa, bem como velocidade do motor e viscosidade dos polímeros. A principal vantagem deste sistema em relação à fabricação de arcabouços tridimensionais por outros métodos é a simplicidade do método e possibilidade de

controlar a altura, comprimento e largura da linha de polímero depositado, variando a concentração, viscosidade do polímero, a pressão aplicada e a velocidade de deposição.

5.3.1 *Polymer - demixed*

A técnica de *Polymer-demixed*^[86], na mesma linha de controle sobre as estruturas dos arcabouços (topografia de superfície) para engenharia de tecidos, observa o desempenho de fibroblastos quando colocados em substratos padronizados com estruturas de ilhas (nanoilhas: 13, 35 e 95nm em altura).

A técnica utiliza blendas de poliestireno (PS) e poli (4-bromoestireno) (PbrS) que espontaneamente separam as fases quando submetidas ao *spin casting* sobre bolachas de silício. Através do controle da concentração dos polímeros e a proporção entre cada um deles, topografias podem ser produzidas, desde ilhas a *pits*, de altura e profundidades variadas. As dimensões e a densidade das estruturas produzidas dependem da composição da blenda e da composição da solução que vai ser submetida ao *spin casting*.

A técnica de *polymer demixed* pode ser considerada um método barato para fazer topografias na escala de nanômetros. Este estudo ainda mostrou que a topografia de uma superfície influencia o espalhamento, adesão celular, proliferação celular e morfologia dos fibroblastos. Com a utilização de materiais com biocompatibilidade comprovada, este método pode ter sua aplicação nas cirurgias de ortopedia, quando se deseja um aumento na adesão celular ou em aplicações que se deseja baixo grau de adesão celular, como válvulas e cateteres cardíacos. Neste caso a técnica também tem seu espaço.

5.3.2 *Microcontact printing* sobre materiais biológicos

Na técnica de microfabricação, descrita anteriormente, fica claro que algumas vezes é necessário aumentar a adesão celular, deste modo, o arcabouço, apresentará maior integração com o tecido circunjacente, conseqüentemente, pode facilitar a regeneração de um determinado órgão ou tecido. Por outro lado, algumas vezes a adesão celular não é desejada. Por exemplo, o método de *microcontact printing* foi explorado para padronizar moléculas inibidoras de

crescimento celular sobre a superfície de cápsulas de cristalinos humanos retirados de cirurgias de catarata^[87]. Foram cultivadas células epiteliais pigmentadas da retina de humanos e células epiteliais da íris de coelhos sobre cápsulas de cristalinos na presença ou na ausência de arranjos de fatores inibitórios de adesão celular.

A técnica de *microcontact printing*, descrita anteriormente, é uma técnica baseada na fabricação de carimbos de PDMS e na utilização de moléculas com propriedades de se auto-organizar, mas que usualmente utilizam substratos sintéticos como vidro, Au ou Pt.

Nesse trabalho^[87], a técnica foi reproduzida, usando um substrato humano, isto é, a superfície da cápsula do cristalino. Deste modo, os padrões estabelecidos podem determinar a organização das células cultivadas sobre a superfície da cápsula. Além disso, a aplicação da técnica direta sobre os tecidos humanos autólogos pode facilitar a disposição (arranjo espacial) e transplante de células para reposição de tecidos e órgãos em mau funcionamento.

A idéia central da tese é um maior controle sobre a topografia e geometria do implante no nível microscópico para promover maior estímulo à adesão e crescimento celular. Alguns trabalhos, por exemplo, indicam que alguns biomateriais são mais permissivos a formação de tecido ósseo que outros. Um material que apresenta a superfície com rugosidades, exerce um efeito maior sobre o grau de crescimento de osteoblastos. Isto é devido em parte a um efeito mecânico auto-travante (superfícies com macro-rugosidades maiores que 25 μm).

Porém a célula também sofre estímulo da micro-rugosidade de um implante, isto acontece quando a célula percebe uma geometria compatível com seu tamanho. Por exemplo, rugosidades com picos de até 2 μm e distâncias entre um pico e outro de 10 μm , que é o tamanho aproximado das células.

CAPÍTULO 6 - Materiais e Métodos

Descreve-se neste capítulo todas as etapas para a fabricação de estruturas por litografia macia, especificamente, a tecnologia de réplica de micromoldes (REM), cuja base teórica foi bem detalhada no capítulo de teoria e revisão bibliográfica.

Processo para Fabricação de Padrões por Litografia Macia

6.1 Materiais

Os seguintes materiais e equipamentos foram utilizados para os experimentos:

Revelador MIF 312 (Microchem Corp);

Solução de KOH, 8M;

Fonte de “Reactive Ion Etching” (RIE), equipamento do IFGW, UNICAMP;

Fotorresiste 5214 Clariant;

Tri-metoxi-silano, 95% da Aldrich;

PDMS 184 KIT da Dow Corning;

Fonte de UV (CCS, UNICAMP);

Microscópio óptico da Carl Zeiss-Jenotech;

6.2 Metodologia

A confecção de estruturas por litografia macia obedeceu as seguintes etapas:

1. Limpeza da lâmina de silício e a seguir oxidação térmica para formação de óxido de silício (SiO_2) com $1,5\mu\text{m}$ de espessura.
2. Espalhamento do *fotorresiste* 5214 no *spinner* com 4000rpm e tempo de 40 segundos. A espessura resultante é de $1,4\mu\text{m}$.
3. Tratamento térmico na placa quente (“hot plate”) a temperatura de 118°C durante 2min.
4. Colocação da máscara com o padrão a ser gravado sobre a lâmina coberta com *fotorresiste*.
5. Exposição à radiação ultra-violeta (UV-400) durante 40 segundos.
6. Colocação da lâmina no revelador MIF 312 (diluído 1:1 em água). O *fotorresiste* exposto à luz UV se dissolve.
7. A lâmina é removida do revelador e lavada em água e a seguir seca.
8. com nitrogênio líquido e sofre um novo tratamento térmico na placa quente a 118°C durante 1 min.
9. Ataque químico do SiO_2 em solução de Buffer HF para abrir o padrão da máscara na superfície do silício.
10. A lâmina com o padrão gravado sofre um processo de corrosão por ataque químico (solução de KOH, 8M) ou por *Plasma Reactive Ion Etching* (RIE), utilizando SF_6 e O_2 , para aprofundar as estruturas gravadas. A profundidade do ataque é da ordem de $50\mu\text{m}$. O ataque químico gera estruturas distorcidas do padrão gravado. O ataque com plasma (RIE) reproduz com maior fidelidade o padrão gravado na lâmina.
11. Passivação da superfície do Silício para evitar que o PDMS fique preso à lâmina
12. a)- algumas gotas de tri-metoxi-silano são colocadas em uma lâmina de vidro
13. b)- a lâmina de vidro e a de silício são colocadas em um dissecador e em seguida é feito vácuo durante 8 horas.
14. A seguir a lamina é retirada do dissecador e a superfície do silício está “passivada” (coberta por um filme fino semelhante ao teflon).
15. Os dois componentes do PDMS são misturados na proporção 10:1.
16. O PDMS é colocado sobre a superfície tratada do silício (pode-se usar o *spinner* para controlar a espessura do PDMS, variando a rotação e o tempo de spin).
17. A lâmina coberta com o PDMS é colocada em estufa a 65°C por 2hs. para curar o PDMS.
18. A lâmina é retirada da estufa, volta à temperatura ambiente e o PDMS é retirado da

superfície do silício; o lado do PDMS que ficou em contato com o silício é uma réplica da estrutura que foi gravada e atacada no silício.

19. Canais microfluídicos: em particular, para a confecção dos canais micro-fluídicos utilizamos um molde feito por deposição de filmes fino níquel, porém este molde foi cedido gentilmente pelo Laboratório de Microfabricação da Faculdade de Engenharia Mecânica (UNICAMP). Sendo assim, o PDMS foi depositado, curado e desmoldado seguindo os mesmos passos descritos anteriormente, com exceção, na aplicação de tubos de PVC recortado (cilindros), para delimitar a aplicação de PDMS a uma região circular. Utilizou-se também microtubos de Vinil de grau médico para guiar a entrada e saída de fluidos dos canais de PDMS. Estes são inseridos previamente a cura e fixados por fita adesiva sobre os tubos recortados de PVC.

CAPÍTULO 7 Resultados e Discussão

Nesse capítulo serão apresentados os resultados conforme a estrutura inicial (moldes) e final obtida (réplicas), seguido das dimensões do objeto, finalidades e algumas observações. As estruturas obtidas são as seguintes:

- 7.1) Arranjos de planaltos e vales,
- 7.2) Membranas porosas com furos trans-passantes,
- 7.3) Membranas porosas com furos não trans-passantes,
- 7.4) Canais microfluídicos;

A habilidade que a célula possui de migrar é um evento muito importante em muitos processos fisiológicos e patológicos, e tem sido estudado muito intensamente.

O funcionamento da célula é mediada por interações químicas entre receptores sobre a membrana celular e domínios específicos de ligações dentro da matrix extra-celular (ECM), esta que forma o arcabouço 3D dos tecidos em geral.

As características geométricas e físicas da ECM são muito importantes na regulação da migração celular. Baseando-se em estudos de migração celular em superfícies, pode-se descrever quatro etapas físicas que produzem o evento da migração celular: 1) modificação da forma da membrana celular através da formação pseudópodes, 2) adesão celular ao substrato, 3) contração do citoesqueleto e 4) desconexão do psudópodes. A velocidade de migração celular depende da integração de todas estas etapas, porém uma dessas etapas pode ser determinante conforme as condições físicas e bioquímicas impostas a esta célula, entretanto, apesar de muita informação obtida da biologia molecular sobre os mecanismos de adesão e migração celular, pouca coisa se sabe sobre a real influência das propriedades físicas e mecânicas do substrato (biomaterial) sobre

a adesão e velocidade de migração celular. O projeto e construção de substratos por métodos de microfabricação ou nanofabricação visam criar ou reproduzir de maneira mais fidedigna as condições físicas e geométricas que são impostas às células no ambiente biológico, condições essas difíceis de reproduzir por outros métodos. Deste modo, tem importância fundamental o desenvolvimento de substratos com as mais diversas formas e geometrias com intuito de simular o complexo mundo (micro) biológico, As informações obtidas com este método implementado na tese juntamente com os próximos estudos biológicos de cultura e comportamento celular servirão de base para criação e aperfeiçoamento de novos biomateriais.

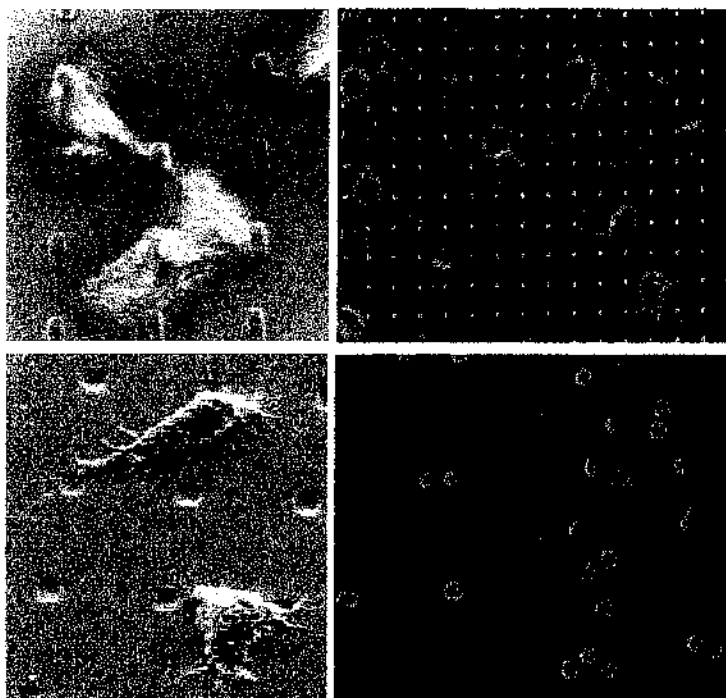


Figura 7.1 Exemplo de padronização de substratos para estudo do comportamento, morfologia e cultivo de tecidos em função das características geométricas.

Fonte: National Science Foundation/2003

http://www.cheme.cornell.edu/~saltzman/Projects/Tissue_Engineering/Cell_migration_in_microgeometr/cell_migration_in_microgeometr.html.

7.1. Arranjos de vales e planaltos: “Master” ou molde em silício e respectiva réplica em PDMS:

7.1.1 Aspecto macroscópico dos moldes de silício (ver figura 6.1) obtidos por corrosão úmida por KOH (hidróxido de potássio), observar os quatro setores, cada um com o mesmo tipo de padrão, vales e planaltos, variando apenas as dimensões.

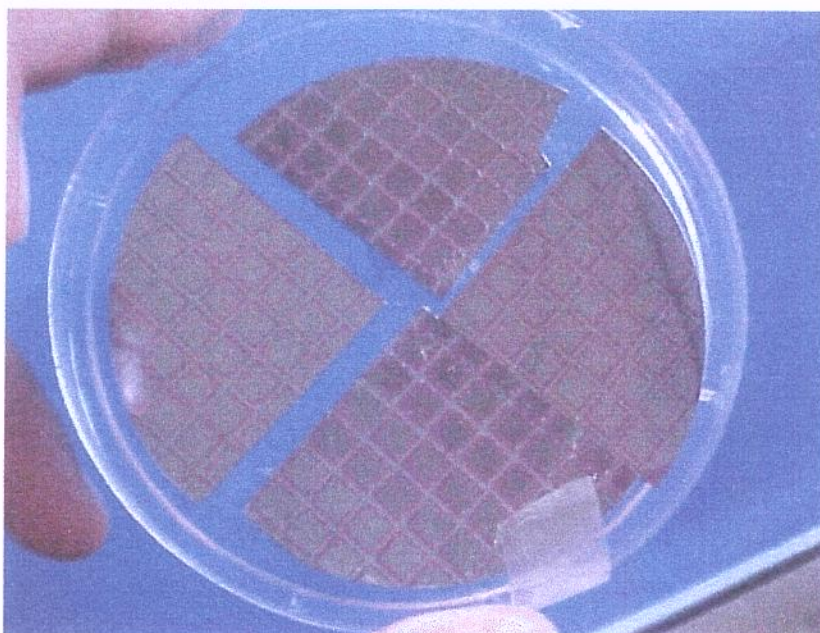


Figura 7.2 - Aspecto macroscópico das lâminas de silício que servirão para confecção das réplicas em PDMS.

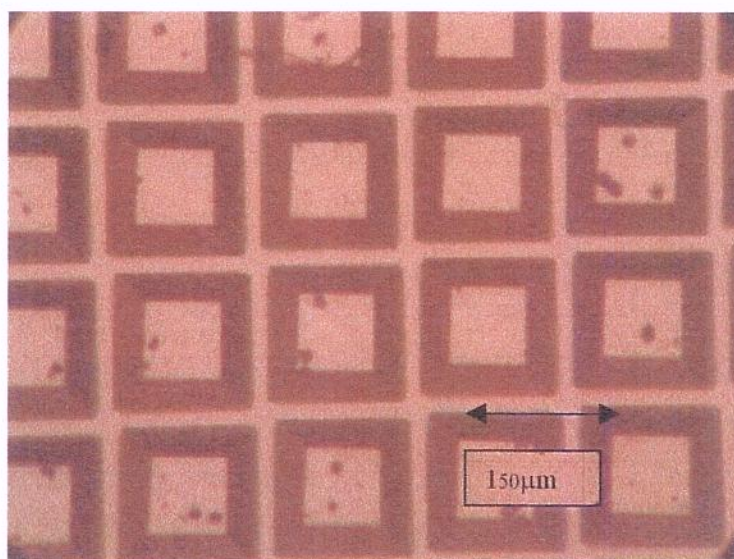


Figura 7.3 - Microscopia óptica com aumento de 150 x. Molde de silício visto de cima, confeccionado por corrosão anisotrópica, estão representados os planaltos, e os espaços entre estes, são os vales.

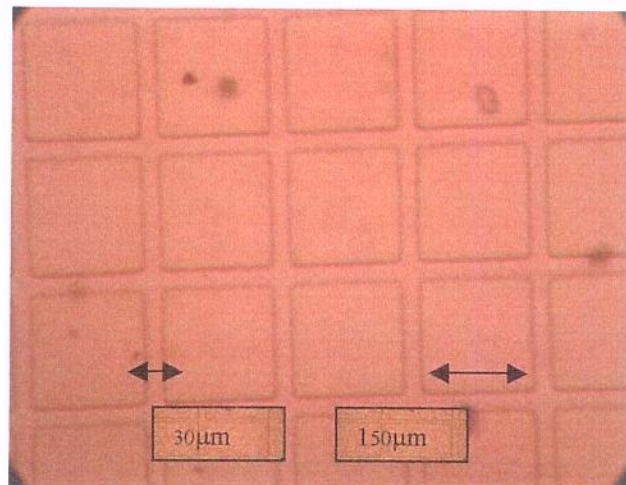


Figura 7.4 - Foto de microscopia óptica com aumento de 150 x. Réplica complementar ao molde de silício, feito de PDMS.

Fonte: XIA, Y. WHITESIDES, G.M. Soft lithography. Annu. Rev. Mater. Sci. 28 - 1998

7.1.2 Funções: Estudo do comportamento celular: adesão e espalhamento celular.

O estudo quantitativo sistemático de cada fator individual mecânico sobre a motilidade pode ser facilitado profundamente através do desenvolvimento de arranjos de padrões geométricos. Várias linhas de pesquisa evidenciam que os espaçamentos entre os obstáculos mecânicos são parâmetros críticos na adesão e migração celular, portanto este tipo de padrões aplicado a este substrato tem a pretensão de oferecer os mais diversos tipos de geometria, que outra técnica não seria capaz de oferecer para estudo da fisiologia e morfologia celular. Por outro lado, materiais e substratos tridimensionais suportam a migração celular através de mecanismos que não existem em superfícies de materiais planos. Por exemplo, neutrófilos não se movem em superfícies 2-D revestidas de colágeno devido sua fraca adesão, porém move-se rapidamente em estruturas tridimensionais do mesmo material, do mesmo modo, os linfócitos não se movimentam eficazmente em substratos 2-D revestidas de fibronectina, mas são hábeis em estruturas 3-D de colágeno.

A morfologia de leucócitos em uma estrutura 2-D é diferente de um leucócito em uma estrutura 3-D, muitos pseudopodes estão presentes em células colocadas em substratos tridimensionais, o que sugere que estes pseudopodes podem se fixar sobre os vales e picos do substrato, servindo como pontos de ancoragem.

7.1.3 Dimensões: foram feitos moldes de silício com planaltos de secção transversal média $100 \times 100/150 \times 150/200 \times 200/250 \times 250 \mu\text{m}$ e altura: $50 \mu\text{m}$. Os espaços entre os planaltos, os chamados vales, tem $30 \mu\text{m}$. As réplicas apresentaram dimensões similares.

7.2 - Membranas porosas com furos trans-passantes

7.2.1- Estrutura inicial (molde) e final obtida, respectivamente.

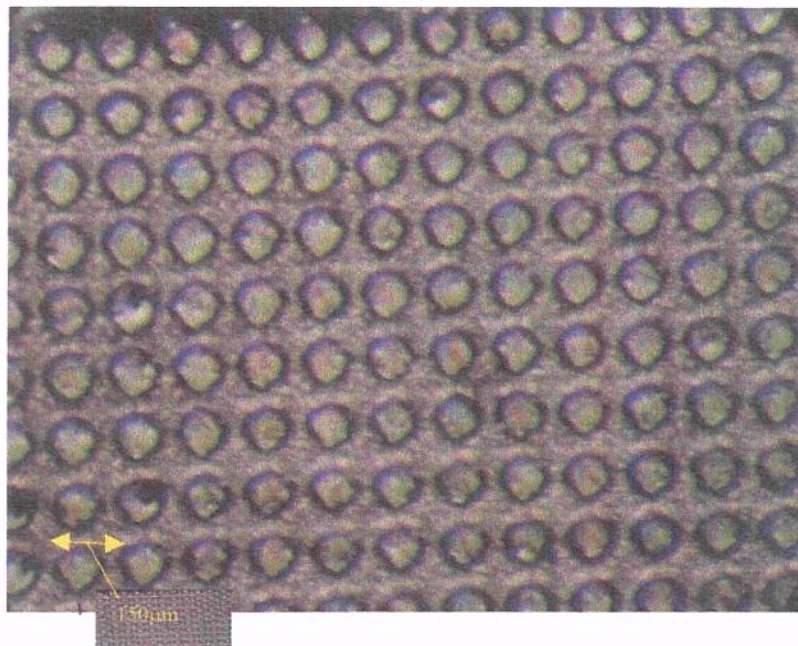


Figura 7.5 - Foto microscópio óptico aumento 100 x. Representando molde de silício com estruturas semelhante a “pilares”. Este molde foi feito pela técnica de RIE (Reactive Ion Etching), aparelho do Instituto de Física Gleb Wataghin (IFGW), Unicamp.

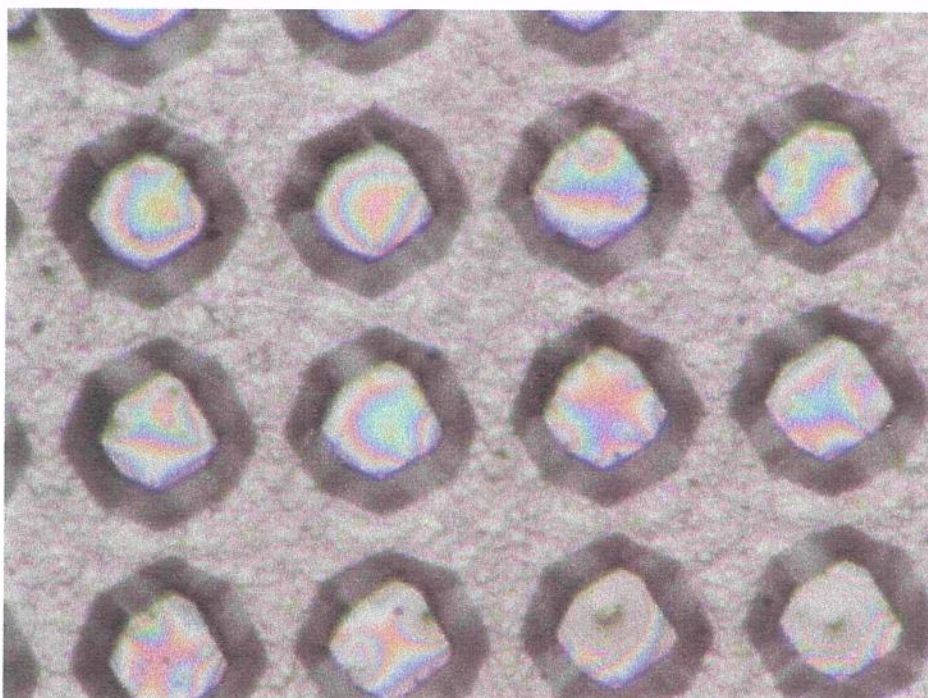


Figura 7.6 - Foto mostrando o molde anterior com aumento de 150 x.

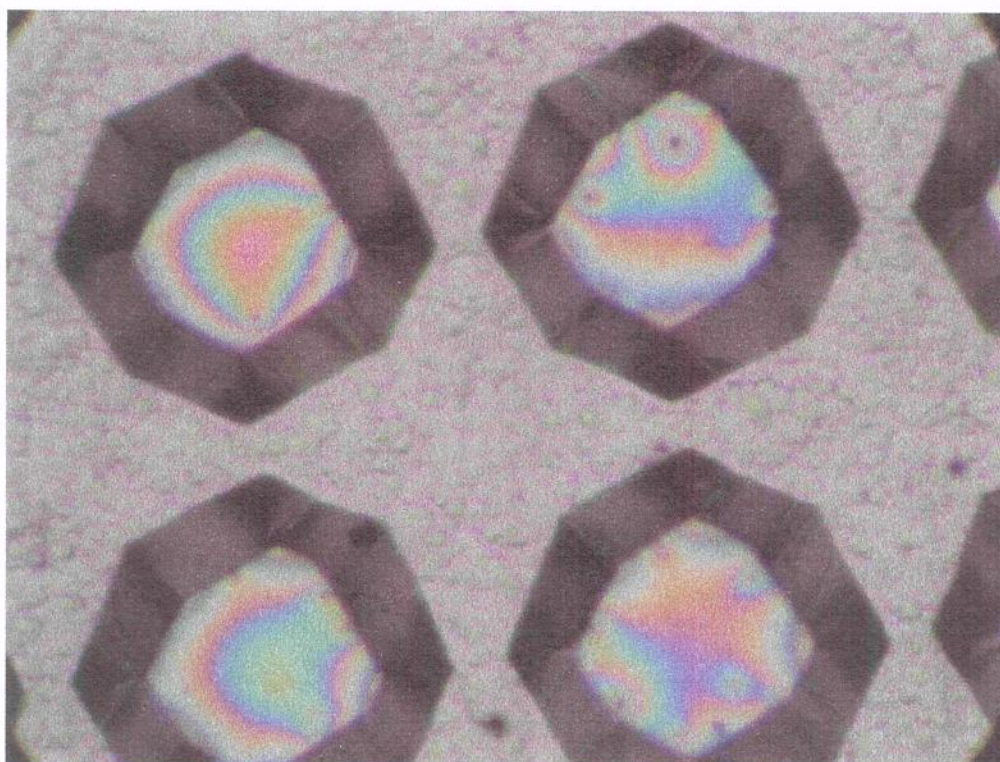


Figura 7.7 - Foto de microscopia óptica com aumento de 200x. Molde de silício para confecção de moldes trans-passantes.

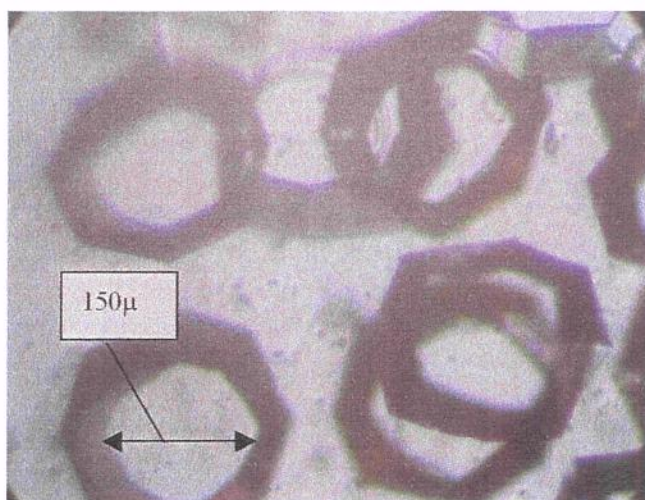


Figura 7.8 - Foto de microscopia óptica com aumento de 200x, mostrando a réplica de PDMS, membrana porosa de PDMS. O diâmetro médio dos poros é de 150 micra.

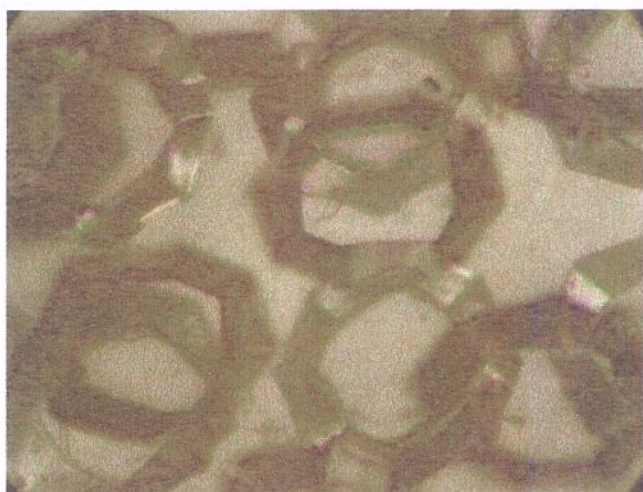


Figura 7.9 - Foto de microscopia óptica, aumento de 200x, observar os poros transpassantes por outra vista na réplica de PDMS.

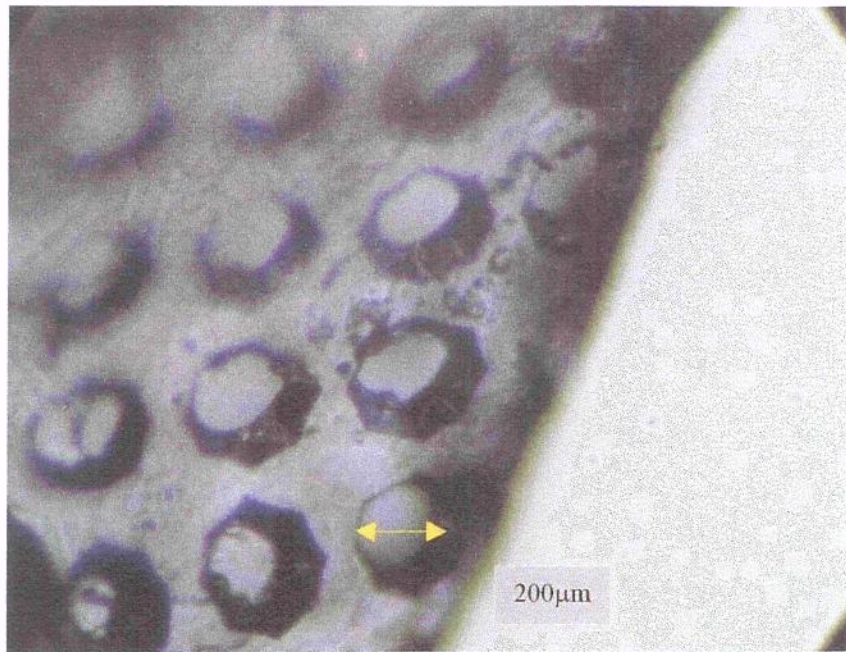


Figura 7.10 - Foto de microscopia óptica com aumento de 150x. Réplica de PDMS, membrana porosa, observar a regularidade da distribuição e do tamanho dos poros.

7.2.2 - Função: Arcabouço tridimensional para crescimento celular. O arcabouço tridimensional faz o papel dos elementos fundamentais do tecido ósseo, por exemplo. O arranjo das fibras de colágeno (10nm) com os cristais de Hidroxi-apatita (500nm), constituem uma malha de aproximadamente de 10 a 100 microm para cada osteoblasto (ver figura).

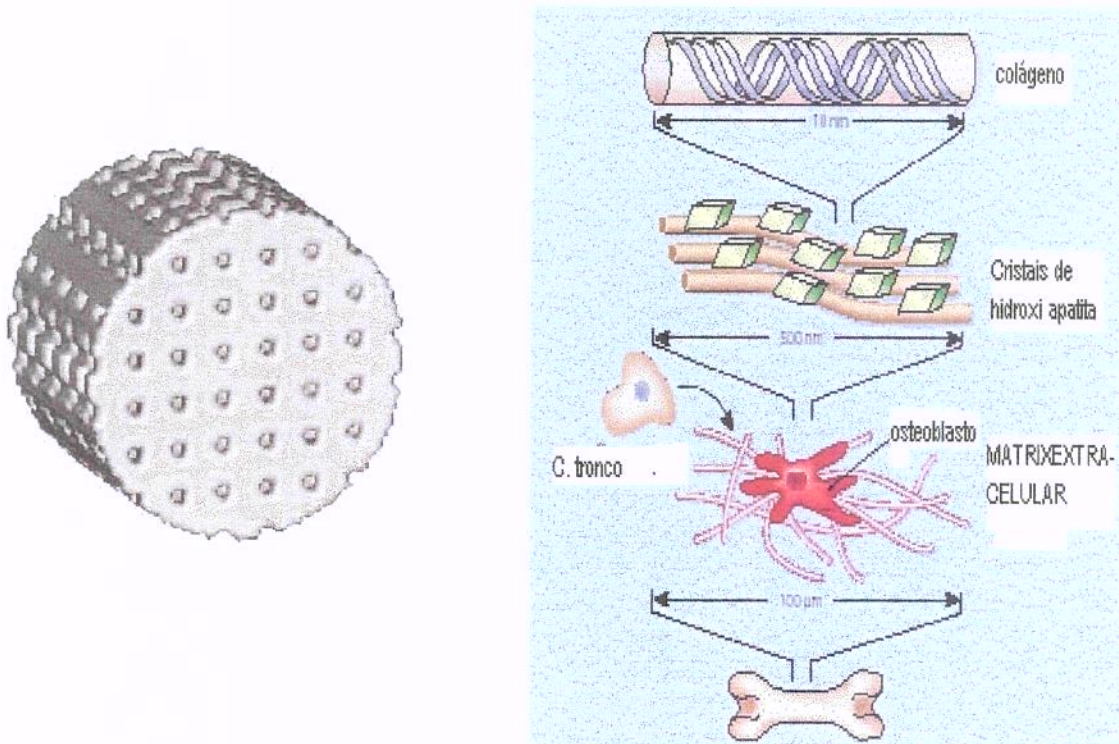


Figura 7.11- O arranjo das fibras de colágeno (10nm) com os cristais de Hidroxi-apatita (500nm), constituindo uma malha de aproximadamente de 10 a 100 micra para cada osteoblasto como ilustra a figura acima à direita. Acima à esquerda, a ilustração artística do empilhamento de membranas porosas com espessuras as mais variadas possíveis.

Para construção de estruturas porosas maiores podemos fazer o empilhamento de membranas porosas com espessuras as mais variadas possíveis, inclusive podendo variar a densidade de poros em função da altura do empilhamento (fig 7.11), tendo em vista o exemplo da cartilagem articular que é constituída de quatro camadas, cada camada com uma densidade celular. A figura acima à esquerda, mostra o aspecto artístico que estas membranas empilhadas teriam.

O arranjo, distribuição e tamanho dos poros são fatores importantíssimos para que as células possam interagir positivamente com o biomaterial e formar o tecido. O arcabouço tridimensional poroso é capaz de modificar a expressão fenotípica da célula, transformando em maior ou menor grau a capacidade de fixação da célula, produção de matriz extracelular, facilitar a comunicação celular e difusão de nutrientes.

Por outro lado, a utilização de biomateriais com características padronizadas e homogêneas facilita o dimensionamento e modelamento por métodos computacionais, por exemplo, o estudo

de biomateriais para liberação controlada de drogas por difusão usando biomateriais porosos é um importante foco de pesquisas, porém o estudo da liberação desses materiais fica ainda muito dependente dos métodos in-vitro de análise, pois a microestrutura desses biomateriais são bastante variáveis ao longo do dispositivo. Assim sendo, um controle rigoroso das características microestruturais por métodos de microfabricação constitui um valioso método para facilitar e otimizar dispositivos de liberação controlada de drogas.

7.2.3 - Dimensões: O molde de silício apresenta as seguintes dimensões aproximadas: altura de 35 μm e diâmetro médio de 100 μm . A réplica de PDMS o diâmetro médio do poro é de 100 μm , espessura 35 μm .

7.2.4 - Comentários: Estas estruturas foram obtidas por “spinner” do PDMS em uma rotação aproximada de 1000 rpm, após esta etapa, foi retirado o molde de silício com o PDMS espalhado. Com uma espátula retirou-se o excesso, e posteriormente, descolou-se o PDMS.

7.3 - Membranas porosas com furos não trans-passantes

7.3.1- Estrutura inicial (molde) e final obtida

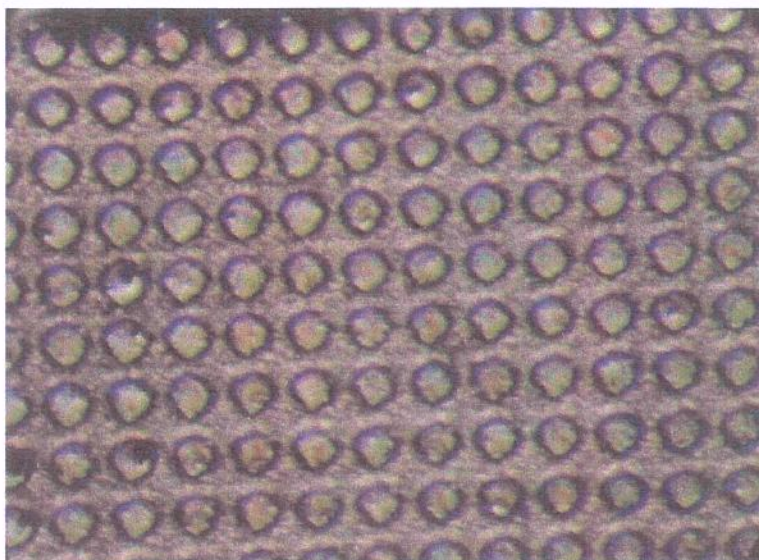


Figura 7.12 - Foto de microscopia óptica com aumento de 100 x. O molde de silício obtido foi o mesmo usado para obtenção da membrana porosa de PDMS.

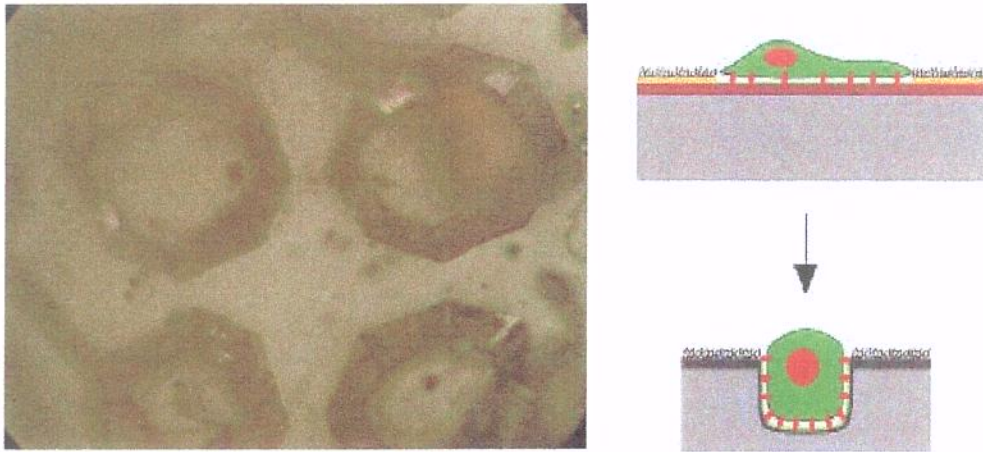


Figura 7.13 - Foto de microscópio óptico com aumento de 200x. Réplica em PDMS, Poros não trans-passantes (ou recessos). Diâmetro médio de 100 μm , profundidade de 50 μm . À direita um diagrama mostrando o efeito de conformação mecânica e encapsulamento que tem os recessos e poros sobre as células.

7.3.2- Função: Arcabouço tridimensional para crescimento celular

As características geométricas dos recessos têm a capacidade de influenciar a morfologia e fisiologia da célula. As interações mecânicas acabam modificando e desencadeando respostas biológicas por parte das células.

A técnica implementada na dissertação servirá também de base para construção de liberadores controlados de medicamentos ou drogas, através de processos passivos de difusão, ou processos ativos: osmose e guiado por propelentes.

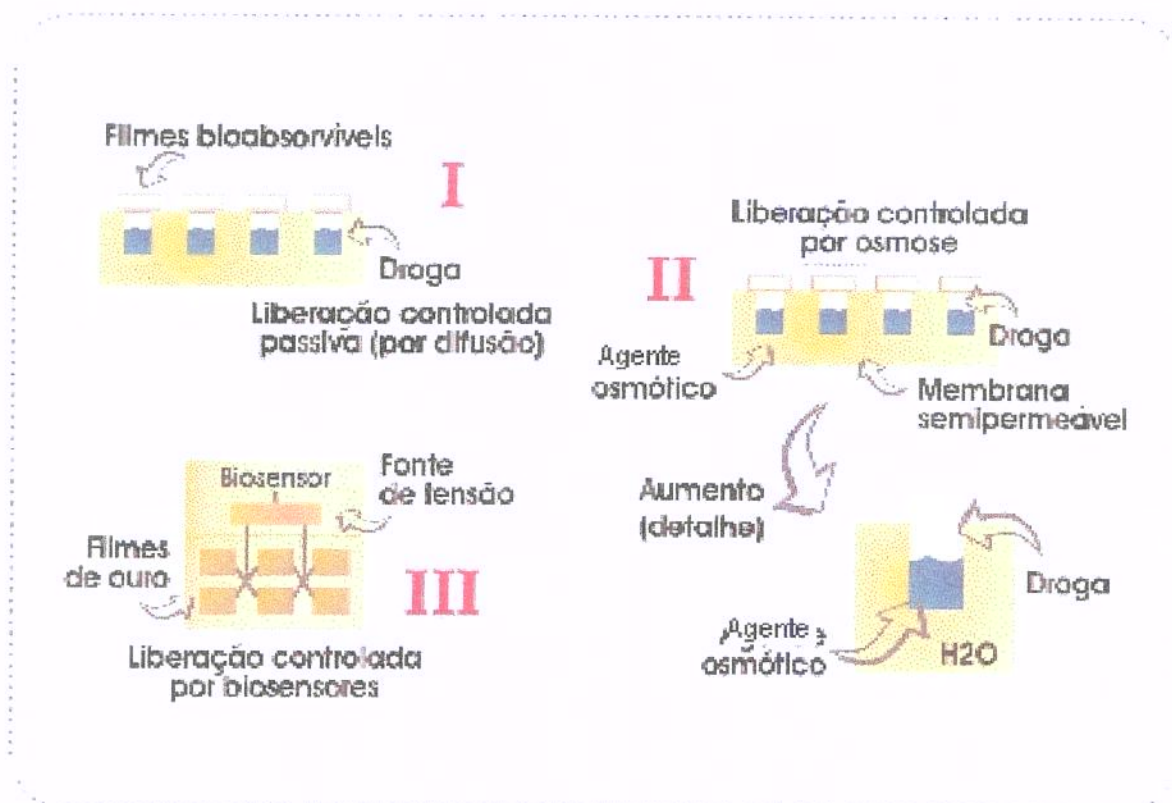


Figura 7.14 Mecanismos de liberação controlada utilizando técnicas de litografia macia: I) liberação controlada passiva, II) liberação controlada por osmose, III) liberação controlada por biosensores. Autor: Claudio R. Cutrim Carvalho, 2003.

Sucintamente, seriam construídos recessos com materiais semi-permeáveis, como o acetato de celulose, a figura acima mostra os três principais mecanismos de liberação controlada utilizando técnicas de litografia macia: I) liberação controlada passiva, II) liberação controlada por osmose, III) liberação controlada por biosensores.

A liberação passiva é constituída por bioabsorção de filmes de materiais bioabsorvíveis que cobrem recessos contendo a droga. Conhecendo-se o tempo que estes filmes se degradam podemos estimar e controlar o tempo de liberação da droga.

No caso do processo osmótico o agente osmótico gera um gradiente por diferença de osmolaridade entre o meio externo, e o interno. Um exemplo de agente osmótico é o NaCl. Por outro lado, o sistema liberador de drogas controlado por biosensores funciona através de uma tensão aplicada sobre filmes de ouro depositados sobre os recessos contendo a droga, esta tensão

seria aplicada após a percepção por sensores de variações de parâmetros fisiológicos (Ph, Pressão parcial de oxigênio, ou glicemia) que desencadearia uma tensão sobre os filmes de ouro, que por eletrólise, se dissolveriam e liberariam a droga.

7.3.3 - Dimensões: réplica de PDMS com diâmetro médio de 100 μm , profundidade de 50 μm .

7.3.4 - Comentários: Estas estruturas foram obtidas por “spinner” do PDMS em uma rotação aproximada de 1000 rpm, deixando-se um filme mais espesso que a altura dos pilares ou planaltos. Neste caso não foi utilizada a espátula para retirar o excesso de PDMS. Para efeito de comparação, observar a figura abaixo (figura 7.15) mostrando algumas características microscópicas de arcabouços feitos por outras técnicas, por exemplo, evaporação do solvente.

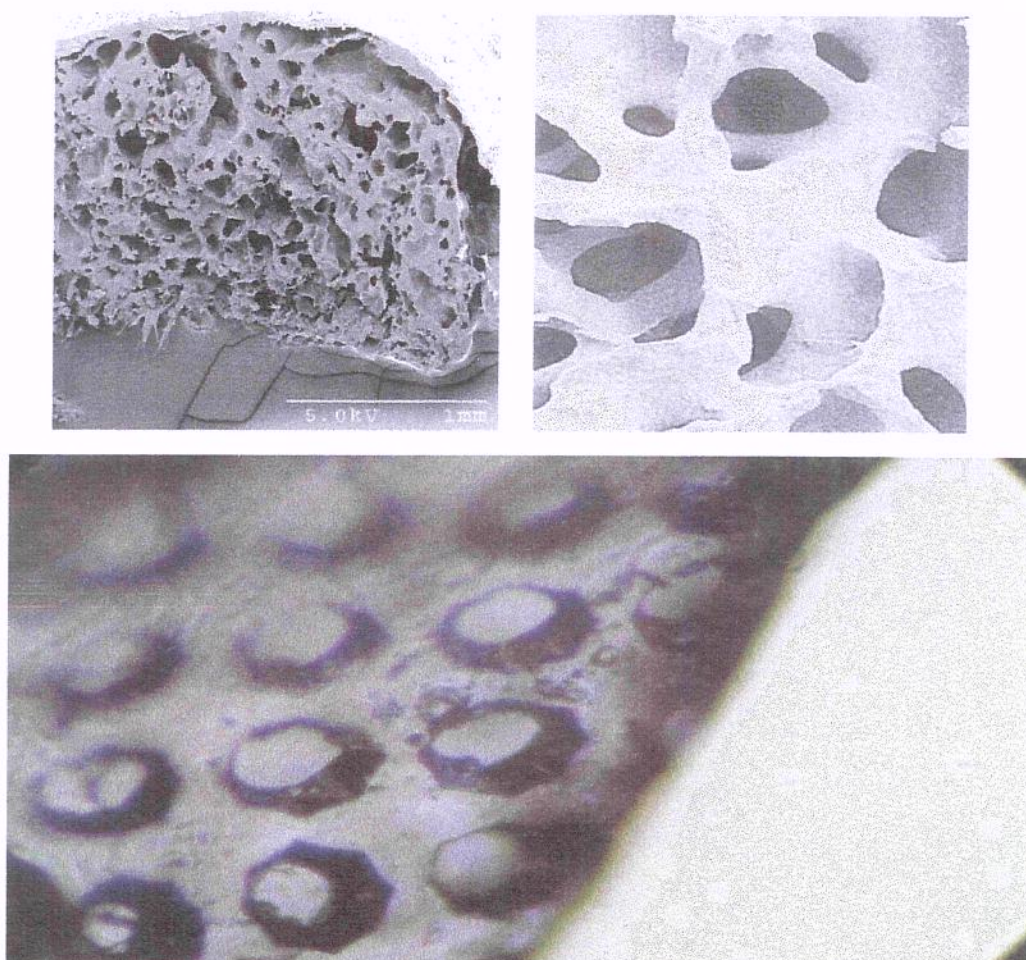


Figura 7.15 - Foto por microscopia eletrônica de varredura de secção transversal de um compósito poroso de polímero biodegradável/hidroxiapatita (HAp), o qual foi cultivado por 8 semanas com células da medula óssea *in vitro*, acima e do lado esquerda. Acima e à direita arcabouço baseado em HAp. Notar a presença de poros de tamanhos irregulares de ambos. Fonte: Tutorial em engenharia de tecidos de “Carnegie Mellon University Bone Tissue Engineering Initiative”.

<http://www-2.cs.cmu.edu/People/tissue/materials.html>, consulta: 5/12/2002. Abaixo arcabouço fabricado pelo método de litografia macia. Observando a morfologia e distribuição dos poros fica evidente a estrutura mais homogênea.

7.4 - Canais microfluídicos

7.4.1 Molde de canais microfluídicos feitos por filmes finos de níquel e cedidos gentilmente pelo laboratório de microfabricação da Faculdade de Engenharia Mecânica, FEM, UNICAMP.

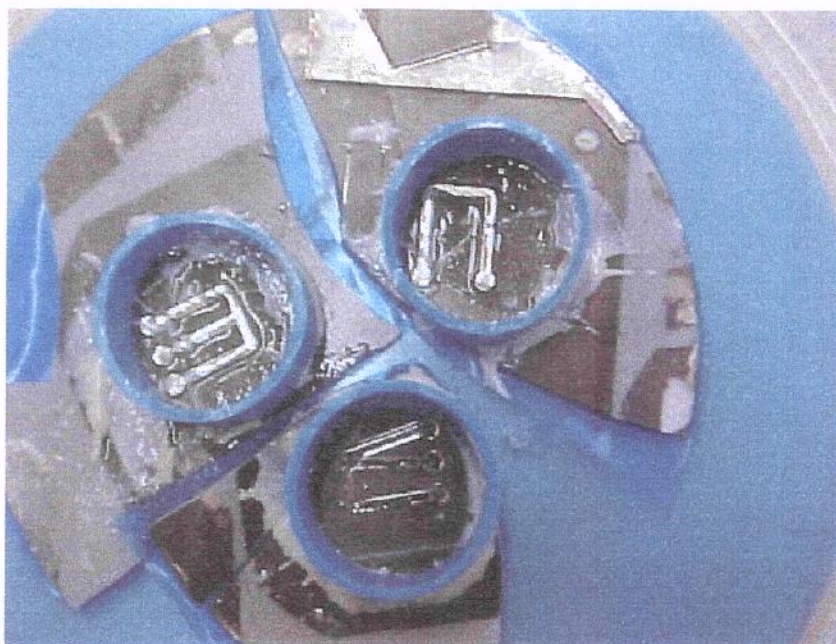


Figura 7.16 – Moldes dos canais micro-fluídicos baseados em filmes de níquel (cedidos gentilmente pelo laboratório de micro-fabricação da Faculdade de Engenharia Mecânica-UNICAMP), observar os dispositivos tubulares de PVC (tubos recortados) para delimitar o espalhamento do PDMS, estes foram colados no substrato. Na foto, Estão dispostos moldes de microtubos em forma de “U”, “M” e algarismo romano “VI”.

7.4.2 Réplicas em PDMS

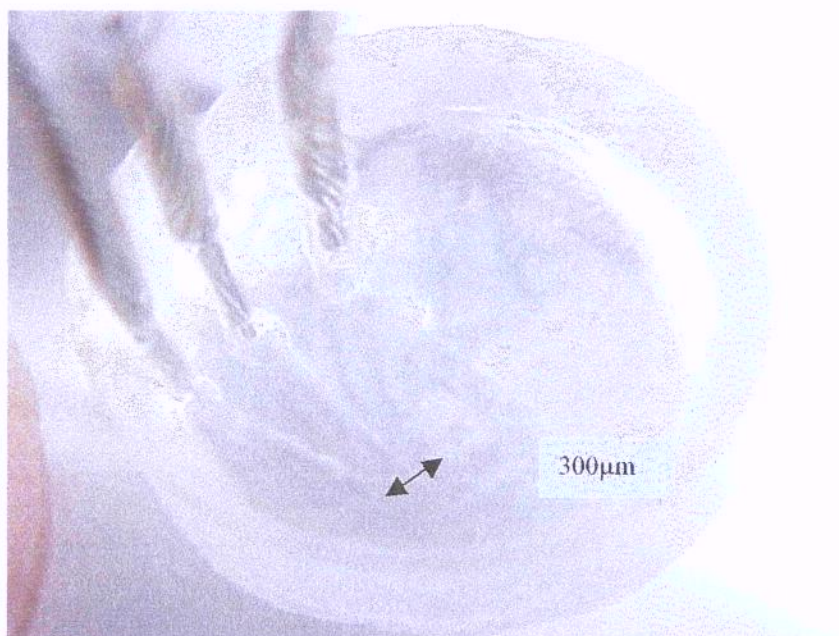


Figura 7.17 - Foto da macroscopia de canais microfluídicos em forma de algarismo romano VI, observar que os tubos de vinil estão reforçados por arames de cobre para o tubo não dobrar.

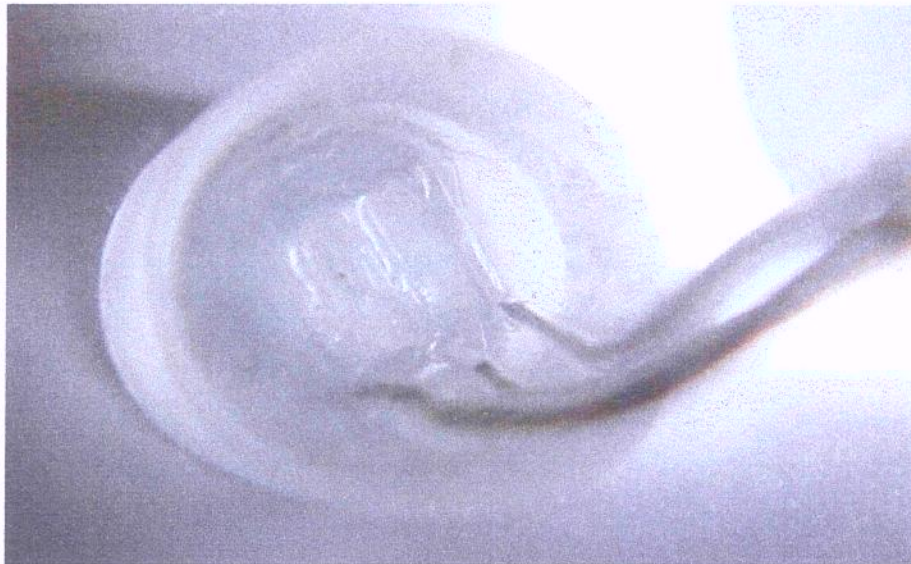


Figura 7.18 - Macroscopia de canais em forma de “M” e os microtubos feitos de vynil (de grau médico) por onde podem entrar ou sair fluidos.

7.4.3 Dimensões: Os canais apresentam 600µm de largura por 500 µm de altura

7.4.4 Função: São microcanais para efetivar o transporte de fluídos, neste caso específico servirá para conduzir futuramente fluídos biológicos (liberação de drogas, genômica e fatores de crescimento) ou químicos (micro-reatores para reações químicas).

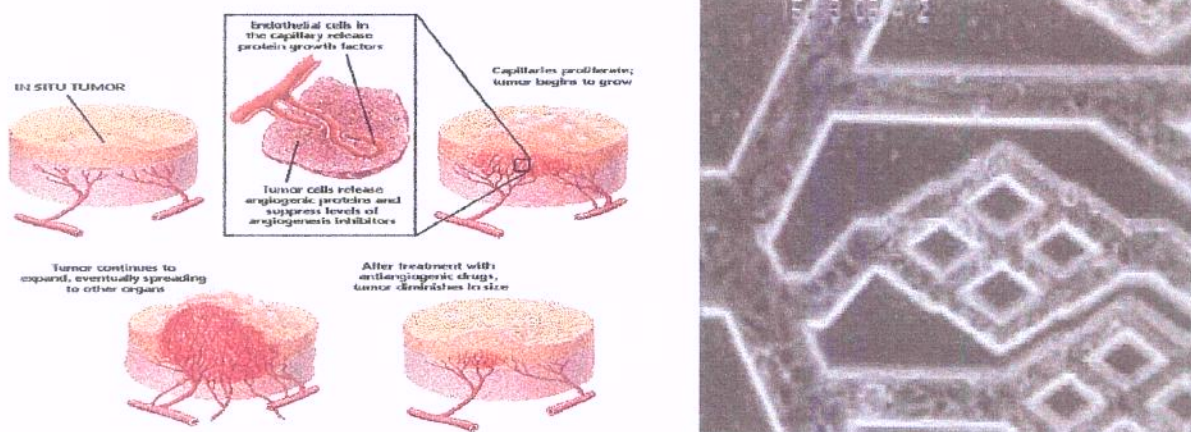


Figura 7.19 - A figura acima da esquerda mostra uma representação artística da irrigação sanguínea executada por capilares e arteríolas. A figura da direita mostra um arranjo microfabricado mimetizando a microcirculação.

Fonte: <http://www.mgh.harvard.edu/depts/tissue/index.html>, the Massachusetts General Hospital web site 2003.

Os microcanais têm por objetivo mimetizar a microcirculação (fig. 7.19), tendo em vista que os tecidos em geral são nutridos por microcanais: arteríolas e capilares que possuem dimensões microscópicas (100 a 10 micra).

7.4.5 Comentários: Os microcanais foram feitos baseando-se na mesma técnica descrita no capítulo de materiais e métodos, porém o molde utilizado foi um substrato de níquel com canais padronizados, e neste caso não precisou ser usado o desmoldante para descolar o PDMS. Além disso, foi utilizado tubo recortado de PVC para delimitar o espalhamento do PDMS. Os tubos de vinil eram simplesmente apoiados por fitas adesivas sobre os tubos recortados, para fixá-los na posição correta por onde entram e saem os fluidos.

CAPÍTULO 8 - Conclusão

Os dois objetivos principais do trabalho foram alcançados: o primeiro objetivo seria o domínio dos princípios básicos da técnica de litografia macia. E o segundo objetivo, a construção de arcabouços tridimensionais e com tamanho de poros controlados. Inicialmente com PDMS, porém, para os próximos trabalhos serão utilizados outros materiais, tais como materiais biodegradáveis de uso cirúrgico.

Utilizou-se um desmoldante chamado de tri-metoxi-silano (a 95%), um silano que não é usado como desmoldante nos trabalhos de litografia macia, porém funcionou muito bem nos nossos experimentos.

Foram dados os primeiros passos para o domínio da técnica de fabricação de canais micro-fluídicos, pelo método de litografia macia com PDMS.

Conclui-se também que os moldes de canais micro-fluídicos baseados em alumínio foram desmoldados sem a necessidade de desmoldantes.

A tecnologia de micro e nanofabricação por litografia macia terá um espaço promissor na área biomédica.

A litografia macia pode ser utilizada para fabricação de arcabouços porosos para engenharia de tecidos.

A técnica permite construções de arranjos tridimensionais (*ARRAYS*) de células com topografia dirigida para estudos de comportamento celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 MEHREGANY, M. Chemical and biomedical sensors. In: WALSH, S. (ed.) **MEMS Technology Tutorial**. Mountain View, CA: Semiconductor Equipment and Materials International, 1997. p. 70-86.
- 2 MALUF, N. **An introduction to microelectromechanical systems engineering**. Norwood, MA: Artech House, 2000. p. 163-176.
- 3 VIVA LA REVOLUCIÓN. **Advances in semiconductor processing technology**. San Francisco: Thomas Weisel Partners, 1999. p. 67-153.
- 4 HEUBERGER, A.; HINTSCHE, R. **Electrical biochips: a new class of MST-Devices**. In: INTERNATIONAL MEMS/MST INDUSTRY FORUM, 2001, Munich. Semi News, v. 17, n. 3.
- 5 GRACE, R. **Microelectromechanical systems (MEMS): U. S. Market Overview**. In: SENSORS EXPO, 1997, Detroit.
- 6 FRIES, D. **Direct writing of tissue support scaffolding using microoptoelectromechanical systems**. In: BIOTECHNOLOGIES FOR SPINAL SURGERY, 2002, Halle, Germany.
- 7 SASSERATH, J. N.; FRIES, D. **Processing technologies: developing microfluidics and BioMEMS**. Disponível em: <<http://www.devicelink.com/ivdt/archive/02/06/004.html>> Acesso em: 05 dez. 2002.
- 8 SENTURIA, S. D. **Microsystem design**. New York: Kluwer Academic Publishers, 2001.
- 9 FALK, Lynne; HOPPER, Amber; JOHNSON, Josh. **MEMS Inside (A BioMEMS Drug Delivery System)**. Disponível em: <<http://mba.vanderbilt.edu/david.dilts/mt310/Initial%20Report%20-20Disrupters.doc>> Acesso em 15 jan. 2003.

- 10 MADOU, Marc. **BioMEMS Class I. Introduction: from MEMS to BioMEMS / Definitions.** Disponível em: <<http://mmadou.eng.uci.edu/Classes/BIOMEMS/Biomems1.pdf>> Acesso em: 12 jan. 2003.
- 11 BIOMATERIALS AND BIOENGINEERING GLOSSARY EVOLVING TERMINOLOGY FOR EMERGING TECHNOLOGIES. Disponível em: <http://www.genomicglossaries.com/content/biomaterials.asp> Acesso em: 02 maio 2002.
- 12 BANKS, D. **Introduction to microengineering: MEMS: Banks.** Disponível em: <<http://www.dbanks.demon.co.uk/ueng/plith.html>> Acesso em: 10 set 2002.
- 13 XIA, Y.; WHITESIDES, G. M. Soft lithography. **Annu. Rev. Mater. Sci.**, 28: 153-184, 1998.
- 14 JOON, N. L.; CLEM, P. G.; NUZZO, N. D.; PAYNE, D. A. Patterning of dielectric oxide thin layers by microcontact printing of self-assembled monolayers. **J. Mat. Res.** 10: 2996-2999, 1995.
- 15 PARK, H.; PARK, K. Biocompatibility issues of implantable drug delivery systems. **Pharm. Res.**, 13(12): 1770-1776, dez. 1996.
- 16 JACKMAN, R. J.; WILBUR, J.; WHITESIDES, G. M. Fabrication of submicron features on curved substrates by microcontact printing. **Science**, 269: 664-666, 1995.
- 17 KIM, E.; XIA, Y.; WHITESIDES, G. M. Polymer microstructures formed by moulding in capillaries. **Nature**, 376: 581-584, 1995.
- 18 KUMAR, A.; WHITESIDES, G. M. Features of gold having micrometer to centimeter dimensions can be formed through a combination of stamping with an elastomeric stamp and an alkanethiol ink followed by chemical etching. **Appl. Phys. Lett.**, 63: 2002-2004, 1993.
- 19 ZHAO X. M.; XIA, Y.; WHITESIDES, G. M. Fabrication of three-dimensional microstructures: microtransfer molding. **Adv. Mater.**, 8 (10): 837-840, 1996.
- 20 WANG, D.; THOMAS, S. G.; WANG, K. L.; XIA, Y.; WHITESIDES, G. M. Nanometer scale patterning and pattern transfer on amorphous Si, crystalline Si, and SiO₂ surfaces using self-assembled monolayers. **Appl. Phys. Lett.**, 70: 1593-1595, 1997.
- 21 XIA, Y.; QIN, D.; WHITESIDES, G. M. Microcontact printing with a cylindrical rolling stamp: A practical step toward automatic manufacturing of patterns with submicrometer-sized features. **Adv. Mater.**, 8: 1015-1017, 1996.
- 22 JANSHOFF, A.; KUNNEKE, Stephanie. Micropatterned solid-supported membranes formed by micromolding in capillaries. **Eur. Biophys. J.**, 29: 549-554, 2000.

- 23 KIM, E.; XIA, Y.; ZHAO, X. M.; WHITESIDES, G. M. Solvent-assisted microcontact molding: A convenient method for fabricating three-dimensional structures of polymeric materials. **Adv. Mater**, 9: 651-654, 1997.
- 24 TEMENOFF, J. S.; MIKOS, A. G. Effect of osteoblastic culture conditions on the structure of poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foam scaffolds. **Tissue Engineering**, 5: 421-433, 1999.
- 25 GRANDE, D. A.; HALBERSTADT, C.; NAUGHTON, G.; SCHWARTZ, R.; MANJI, R. Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts. **Journal of Biomedical Materials Research**, 34: 211-220, 1997.
- 26 ISHAUG-RILEY, S. L.; CRANE-KRUGER, G. M.; YASZEMSKI, M. J.; MIKOS, A. G. Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers. **Biomaterials**, 19: 1405-1412, 1998.
- 27 ISHAUG, S. L.; CRANE, G. M.; MILLER, M. J.; YASKO, A. W.; YASZEMSKI, M. J.; MIKOS, A. G. Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. **Journal of Biomedical Materials Research**, 36: 17-28, 1997.
- 28 BRITTAİN, S.; Paul, K.; ZHAO, X. M.; WHITESIDES, G. M. Soft lithography and microfabrication., **Physics World**, 11: 31-36, 1998.
- 29 ISHAUG-RILEY, S. L.; CRANE, G. M.; GURLEK, A.; MILLER, M. J.; YASKO, A. W.; YASZEMSKI, M. J.; MIKOS, A. G. Ectopic bone formation by marrow stromal osteoblast transplantation using poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams implanted into the rat mesentery. **Journal of Biomedical Materials Research**, 36: 1-8, 1997.
- 30 UNGER, M. A.; CHOU, H. P.; THORSEN, T.; SCHERER, A.; QUAKE, S. R. Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography. **Science**, 288: 113-116, 2000.
- 31 KUMAR A.; BIEBUYCK, H. A.; WHITESIDES, G. M. Patterning self-assembled monolayers: applications in materials science. **Lang-Muir**, 10 (5): 1498-1511, 1994.
- 32 KOTZAR, G.; FREAS, M.; ABEL, P.; FLEISCHMAN, A.; ROY, S.; ZORMAN, C.; MORAN, J. M.; MELZAK, J. Evaluation of MEMS materials of construction for implantable medical devices. **Biomaterials**. 23 (13): 2737-2750, jul. 2002.
- 33 BEEBE, D. J.; MOORE, J. S.; YU, Q.; LIU, R. H.; KRAFT, M. L.; JO, B. H.; DEVADOSS, C. Microfluidic tectonics: a comprehensive construction platform for microfluidic systems. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 97 (25): 13488-13493, 05 dez. 2000.

- 34 VONDRACEK, P.; DOLEZEL, B. Biostability of medical elastomers: a review. **Biomaterials**, 5 (4): 209-214, jul. 1984.
- 35 TIEN, J.; NELSON, C.M.; CHEN, C. S. Fabrication of aligned microstructures with a single elastomeric stamp. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 99 (4): 1758-1762, 12 fev. 2002.
- 36 MIKOS, A. G.; SARAOKINOS, G.; LEITE, S. M.; VACANTI, J. P.; LANGER, R. Laminated three-dimensional biodegradable foams for use in tissue engineering. **Biomaterials**, 14: 323-330, 1993.
- 37 TEJAL, A. Desai. Micro and nanoscale structures for tissue engineering constructs. **Medical Engineering & Physics**, 22: 595-606, 2000.
- 38 MOONEY, D. J.; BALDWIN, D. F.; SUH, N. P.; VACANTI, J. P.; LANGER, R. Novel approach to fabricate porous sponges of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents. **Biomaterials**, 17: 1417-1422, 1996.
- 39 MOONEY, D. J.; MAZZONI, C. L.; BREUER, C.; MCNAMARA, K.; HERN, D.; VACANTI, J. P. Stabilized polyglycolic acid fibre-based tubes for tissue engineering. **Biomaterials**, 17: 115-124, 1996.
- 40 FREITAS JR. Robert A. **Nanomedicine**. Georgetown, TX: Landes Bioscience, 1999. Disponível em: <<http://www.nanomedicine.com/NMI.htm>> Acesso em: 02 abr. 2002.
- 41 CREIGHTON, T. E. **Proteins: structures and molecular properties**. New York: Freeman, 1983.
- 42 NAM, Y. S.; YOON, J. J.; PARK, T. G. A novel fabrication method of macroporous biodegradable polymer scaffolds using gas foaming salt as a porogen additive. **Journal of Biomedical Materials Research**, 53: 1-7, 2000.
- 43 NAM, Y. S.; PARK, T. G. Biodegradable polymeric microcellular foams by modified thermally induced phase separation method. **Biomaterials**, 20: 1783-1790, 1999.
- 44 NAM, Y. S.; PARK, T. G. Porous biodegradable polymeric scaffolds prepared by thermally induced phase separation. **Journal of Biomedical Materials Research**, 47: 8-17, 1999.
- 45 PARK, T. G. New approaches to fabricate highly porous tissue scaffolds. **Fourth Asia-Pacific Conference on Medical and Biological Engineering**, Seoul, Korea, 1999.
- 46 SCHUGENS, C.; MAQUET, V.; GRANDFILS, C.; JEROME, R.; TEYSSIE, P. Polylactide macroporous biodegradable implants for cell transplantation II. Preparation of polylactide foams for liquid-liquid phase separation. **Journal of Biomedical Materials Research**, 30: 449-461,

1996.

- 47 SHASTRI, V. P.; MARTIN, I.; LANGER, R. Macroporous polymer foams by hydrocarbon templating. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 97: 1970-1975, 2000.
- 48 SOLCHAGA, L. A.; DENNIS, J. E.; GOLDBERG, V. M.; CAPLAN, A. I. Hyaluronic acid-based polymers as cell carriers for tissue-engineered repair of bone and cartilage. **Journal of Orthopaedic Research**, 17: 205-213, 1999.
- 49 TEMENOFF, J. S.; LU, L.; MIKOS, A. G. Bone tissue engineering using synthetic polymer scaffolds. In: DAVIES, J. E. **Bone engineering**. Toronto: University of Toronto, 2001.
- 50 TEMENOFF, J. S.; MIKOS, A. G. Injectable biodegradable materials for orthopaedic tissue engineering. **Biomaterials**, 21: 2405-2412, 2000.
- 51 TEMENOFF, J. S.; MIKOS, A. G. Review: Tissue engineering for regeneration of articular cartilage. **Biomaterials**, 21: 431-440, 2000.
- 52 THOMSON, R. C.; YASZEMSKI, M. J.; POWERS, J. M.; MIKOS, A. G. Hydroxyapatite fiber reinforced poly(α -hydroxy ester) foams for bone regeneration. **Biomaterials**, 19: 1935-1943, 1998.
- 53 THOMSON, R. C.; WAKE, M. C.; YASZEMSKI, M. J.; MIKOS, A. G. Biodegradable polymer scaffolds to regenerate organs. **Advances in Polymer Science**, 122: 245-274, 1995.
- 54 WAKITANI, S.; GOTO, T.; PINEDA, S. J.; YOUNG, R. G.; MANSOUR, J. M.; CAPLAN, A. I.; GOLDBERG, V. M. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. **Journal of Bone and Joint Surgery**, 76-A: 579-592, 1994.
- 55 KANE, R. S.; TAKAYAMA, S.; OSTUNI, E.; INGBER, D. E.; WHITESIDES, G. M. Patterning proteins and cells using soft lithography. **Biomaterials**, 20: 2363-2376, 1999.
- 56 KAPUR, R.; CALVERT, J. M.; RUDOLPH, A. S. Electrical, chemical and topological addressing of mammalian cells with microfabricated systems. **J. Biomech. Eng.**, 121 (1): 65-72, 1999.
- 57 RAI-CHOUDHURY, P. (ed.) **Handbook of microlithography, micromachining, and microfabrication**. Bellingham, WA: SPIE Opt. Engineer. Press. 1994. v. 1.
- 58 WHANG, K.; THOMAS, C. H.; HEALY, K. E.; NUBER, G. A novel method to fabricate bioabsorbable scaffolds. **Polymer**, 36: 837-842, 1995.
- 59 KUMAR, A.; WHITESIDES, G. M. Features of gold having micrometer to centimeter dimensions can be formed through a combination of stamping with an elastomeric stamp and an

- alkanethiol ink followed by chemical etching. **Appl. Phys. Lett.**, 63 (14): 2002, 1993.
- 60 AHLUWALIA, A.; DE ROSSI, D.; VOZZI, G.; CHIELLINI, F.; CHIELLINI, E.; SOLARO, R.; DOMENICI, C.; BASTA, G.; RICCI, D. **Patterning bioerodable biomaterials for tissue engineering**. In: 3rd WORKSHOP ON MULTIFUNCTIONAL & SMART POLYMER SYSTEMS, 1998, Tirrenia, Italy.
- 61 VOZZI, G.; AHLUWALIA, A.; DE ROSSI, D.; PREVITI, A. Deposition of 2 and 3-D polymer scaffolds with a well defined geometry for application to tissue engineering. **Tissue Engineering**, v. 8, n. 6, p. 1089-1098, 2002.
- 62 PEASE, R. F. W. Analytical modeling and experimental verification of resist heating in mask fabrication. **J. Vac. Sci. Technol.**, B 10: 278-285, 1992.
- 63 CERRINA, F.; MARRIAN, C. Materials-fabrication and patterning at the nanoscale. **Mater. Res. Soc. Bull.** v. XXI, 12: 56-62, 1996.
- 64 ISHAUG, S. L.; PAYNE, R. G.; YASZEMSKI, M. J.; AUFDEMORTE, T. B.; BIZIOS, R.; MIKOS, A. G. Osteoblast migration on poly(α -hydroxy esters). **Bio-technol. Bioengng.**, 50: 443-451, 1994; 134: 277-286, 1996.
- 65 XIA, Y. et al. Replica molding using polymeric materials: a practical step toward nanomanufacturing. **Adv. Mater.**, 9: 147-149, 1997.
- 66 MARTI, R. K.; NOLTE, P. A.; KERKHOFFS, G. M.; BESSELAAR, P. P.; SCHAAP, G. R. Operative treatment of mid-shaft clavicular non-union. **Int. Orthop.**, 27 (3): 131-5, 2003.
- 67 PECINA, M.; GILTAJ, L. R.; VUKICEVIC, S. Orthopaedic applications of osteogenic protein-1 (BMP-7). **Int. Orthop.**, 25: 203-208, 2001.
- 68 SCHUTZ, M.; MULLER, M.; KAAB, M.; HAAS, N. Less invasive stabilization system (LISS) in the treatment of distal femoral fractures. **Acta Chir. Orthop. Traumatol. Cech.**, 70 (2): 74-82, 2003.
- 69 COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Quality criteria for health related websites. **J. Med. Internet Res.**, 4 (3): E15, dez. 2002.
- 70 MCDAID, D.; COOKSON, R.; ASTEC GROUP. Evaluating health care interventions in the European Union. **Health Policy**, 63 (2): 133-139, fev. 2003.
- 71 HANDOLL, H. H.; PARKER, M. J.; SHERRINGTON, C. Mobilization strategies after hip fracture surgery in adults. **Cochrane Database Syst Rev.**, (1): CD001704, 2003.

- 72 REBUZZI, E. et al. IMHS clinical experience in the treatment of peritrochanteric fractures. The results of a multicentric italian study of 981 cases. **Injury**, 33 (5): 407-412, jun. 2002.
- 73 PILLA, A. A. Low-intensity electromagnetic and mechanical modulation of bone growth and repair: are they equivalent? **J. Orthop. Sci.**, 7 (3): 420-428, 2002.
- 74 ISHAUG, S. L.; YASZEMSKI, M. J.; BIZIOS, R.; MIKOS, A. G. Osteoblast function on synthetic biodegradable polymers. **J. Biomed. Mater. Res.**, 28: 1445-1453, 1994.
- 75 ISHAUG, S. L.; PAYNE, R. G.; YASZEMSKI, M. J.; AUFDEMORTE, T. B.; BIZIOS, R.; MIKOS, A. G. Osteoblast migration on poly(α -hydroxy esters). **Bio-technol. Bioengng**, 50: 443-451, 1996.
- 76 MACKIE, E. J. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, 35 (9): 1301-1305, set. 2003.
- 77 SEEMAN, E. Reduced bone formation and increased bone resorption: rational targets for the treatment of osteoporosis. **Osteop. Int. Suppl.**, 3: 2-8, 19 mar. 2003.
- 78 WILKINSON, J. M.; STOCKLEY, I.; HAMER, A. J.; BARRINGTON, N. A.; EASTELL, R. Biochemical markers of bone turnover and development of heterotopic ossification after total hip arthroplasty. **J. Orthop. Res.**, 21 (3): 529-534, maio 2003.
- 79 LI, J. K.; CHANG, W. H.; LIN, J. C.; RUAAN, R. C.; LIU, H. C.; SUN, J. S. Cytokine release from osteoblasts in response to ultrasound stimulation. **Biomaterials**, 24 (13): 2379-2385, jun. 2003.
- 80 Consensus Conference of the European Society for Biomaterials, 1996. Disponível em: <<http://www.wikipedia.org/wiki/Biomaterials>> Acesso em 12 dez. 2002.
- 81 TISSUE ENGINEERING TUTORIAL. Disponível em: <<http://www.pittsburgh-tissue.net>> Acesso em: 11 mar. 2003.
- 82 HUARD, J.; FU, F. H. (Eds.). **Gene therapy and tissue engineering in orthopaedic and sports medicine**. Pittsburgh, PA: Birkhäuser, 2000.
- 83 MARTINEK, Vladimir; FU, Freddie H.; HUARD, Johnny. Gene therapy and tissue engineering in sports medicine. **The Physician and Sports Medicine**, v. 28, n. 2, p. 20-50, fev. 2000.
- 84 MIKOS, A. G.; THORSEN, A. J.; CZERWONKA, L. A.; BAO, Y.; LANGER, R.; WINSLOW, D. N.; VACANTI, J. P. Preparation and characterization of poly(L-lactic acid) foams. **Polymer**, 35: 1068-1077, 1994.

- 85 VOZZI, G.; PREVITI, A.; DE ROSSI, D. Microsyringe based deposition of two-dimensional and three-dimensional polymer scaffolds with a well-defined geometry for application to tissue engineering. **Tissue Engineering**, v. 8, n. 6, 2002.
- 86 DALBY, M. J.; RIEHLE, M. O.; JOHNSTONE, H. J.; AFFROSSMAN, S.; CURTIS, A. S. G. Polymer demixed nano-topography: control of fibroblast spreading and proliferation. **Tissue Engineering**, 8; 1099-1108, 2002.
- 87 LEE, Christina J.; HUIE, Philip; LENG, Theodore; PETERMAN, Mark C. Microcontact printing on human tissue for retinal cell transplantation. **Arch. Ophthalmol.**, 120: 1714-1718, 2002.
- 88 WHITESIDES, G. M. Self-assembly and soft lithography: an overview. **Nature Biotechnology**, v. 17, suppl., p. 10, nov. 1999.
- 89 MARC, A. U.; SCHERER, A. **Integrated elastomer fluidic lab-on-a-chip surface patterning and DNA diagnostics**. Disponível em: <<http://thebigone.caltech.edu/quake/publications/hiltonh00.pdf>> Acesso em: 12 abr. 2003.
- 90 MCCREEDY, T. Rapid prototyping of glass and PDMS microstructures for micro total analytical systems and micro chemical reactors by microfabrication in the general laboratory. **Analytica Chimica Acta**, 427: 39-43, 2001.
- 91 KNAPP, Laura. **Brasil ganha centro de pesquisa de nanotecnologia**. Jornal O Estado de São Paulo. Caderno "Ciência e Meio Ambiente". Disponível em: <http://www.estadao.com.br/ciencia/noticias/2002/jan/20/138.htm> Acesso em: 20 abr.2003.