UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

VICENTE SILVA MATTOS

Desenvolvimento de nanoestruturas em superfície metálica (prata) com laser pulsado femtossegundo para aumento de fluorescência

São Carlos
2019

VICENTE SILVA MATTOS

Desenvolvimento de nanoestruturas em superfície metálica (prata) com laser pulsado femtossegundo para aumento de fluorescência

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

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Jarbas Caiado de Castro Neto
Coorientadora: Dra. Fernanda Rossi Paolillo

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

São Carlos
2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Mattos, Vicente Silva
Desenvolvimento de nanoestruturas em superfície metálica (prata) com laser pulsado femtossegundo para aumento de fluorescência / Vicente Silva Mattos; orientador Jarbas Caiado de Castro Neto; co-orientadora Fernanda Rossi Paolillo - versão corrigida -- São Carlos, 2019.
116 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2019.

1. Fluorescência. 2. Laser femtossegundo. 3. Nanoestruturas. I. Castro Neto, Jarbas Caiado de, orient. II. Paolillo, Fernanda Rossi, co-orient. III. Título.

Ao eu do futuro, que ao ver o caminho
percorrido e a marca deixada no passado, possa se orgulhar
do ser que se tornou.

AGRADECIMENTOS

Nenhum caminho é percorrido sozinho. Mesmo quando não há ninguém ao redor, você está ali, na sua própria companhia. Todos os que fizeram parte desta jornada se fazem presentes a todo tempo, mesmo que apenas nas memórias de um passado.

Agradeço primeiramente a Deus, pelo amor demonstrado por quem eu sou e pela força e energia para seguir em frente, mesmo nas horas mais escuras e solitárias. É nEle em quem me espelho e tomo como alvo.

Aos meus pais, Maria das Graças e José Roberto, pelo apoio incondicional a todo momento e motivação à continuar com minha formação e desenvolvimento.

A meus irmãos Anita, Lucas e Amanda, que apesar das divergências, sempre estiveram ao meu lado. Mas à você, Amanda, dedico meu carinho especial, pois foi a principal companhia em momentos de dificuldade. Acrescento também ao Hulk e Aslan (in memoriam), sem os mesmos esse período teria sido muito mais triste.

À Amanda Cristina Zangirolami, pela amizade em todas as horas desde a chegada em São Carlos, onde sobrevivemos uma graduação e um mestrado, a quem vou levar por toda a vida. Foi sua energia que me alegrou nos dias onde estava mais pra baixo.

Aos amigos Ana Carolina Ferraz, Lucas Tomaz Catunda, Roberta Lopes, Leonardo Almeida, Virginia Gonzaga, Camila Cardoso e Vinicius Pereira pelas amizades, companhia, celebração nos momentos alegres e suporte nos momentos tristes. Sem estas amizades os dias em São Carlos seriam muito mais solitários.

Aos amigos Suélen Lima, Aialla Freitas, Matheus Lopes, Ana Cláudia Pereira, Taís Perez e Maikel Izaias, pela amizade a mais de uma década que carrego no coração.

Também às amizades de Crysthian Mello, Murilo Pereira, Leandro Rosa, Lucas Colucci, Daniel Tanimoto, Érika Uemura, Carolin Capps, Daniel Cavallini, Ariel Alves, Gustavo Sandrin, Marina Alves, Fábio Leandro da Silva, Yuri Volpato.

Aos eventos TEDx que criaram grande impacto na minha vida, com grandes transformações pessoasi, e à Dory (Bruna Freire), por ter me incluído num mundo TEDx ainda maior.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Jarbas Caiado de Castro Neto e Dra. Fernanda Rossi Paolillo, pelo auxílio na condução da projeto, referências para a pesquisa e inspiração para criação de carreira.

Ao Prof. Dr. Francisco Eduardo Gontijo Guimarães pelo apoio com parte vital no desenvolvimento do projeto. Ao Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato pelo apoio nas etapas iniciais da pesquisa. Ao Dr. Marcelo de Assumpção Pereira da Silva, do Laboratório de Microscopia Eletrônica, pelo auxílio nas análises realizadas.

Aos colegas do Laboratório de Inovações Optrônicas em Oftalmologia e Agricultura (LIOOA), pelo suporte no desenvolvimento de ideias, discussões construtivas e troca de experiências.

À Kamzu Cookie Shop, pelo suporte quando foi necessário, e aos colegas de trabalho, que me mostram como é ter interações reais por longos períodos e como sobreviver a eles.

Ao Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica (CEPOF) e ao Instituto de Física de São Carlos (IFSC/USP) pelo suporte técnico e de infraestrutura para a realização de todas as etapas envolvidas.

À Fundação de Apoio à Física e Química (FAFQ) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pelo financiamento da pesquisa.

“Culture - the way we express ourselves and understand each other - can bind us together as one world.”

Yo-Yo Ma

RESUMO

MATTOS, V. S. **Desenvolvimento de nanoestruturas em superfície metálica (prata) com laser pulsado femtossegundo para aumento de fluorescência**. 2019. 116p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Carlos, São Carlos, 2019.

Fluorescência é uma técnica bastante utilizada para diagnóstico, análise de materiais e tecidos biológicos, técnicas forenses entre outras. Neste contexto, métodos para detectar sinais de moléculas fluorescentes com maior sensibilidade e especificidade têm sido investigados, principalmente para detecção de moléculas em concentrações extremamente baixas. Dada a importância do tema, o presente trabalho, de caráter inovador, busca gerar nanoestruturas em prata com laser pulsado femtossegundo, capazes de aumentar níveis de fluorescência de moléculas próximas às nanoestruturas. Foi utilizado um laser Libra femtossegundo de 450 mW, 1 KHz de frequência e comprimento de onda de 850 nm da Coherent para a criação de nanoestruturas em prata pura polida. Diferentes parâmetros de marcação resultaram em variados perfis de nanoestruturas, tanto periódicas e regulares, quanto aglomerados caóticos de esferas nanométricas pela superfície marcada, onde as estruturas apresentavam periodicidade de aproximadamente 500 nm e as esferas possuem tamanhos variando de 50 a 500 nm, quando avaliadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia de força atômica (AFM). O efeito de proximidade destas nanoestruturas caóticas com a adição de um fluoróforo (Protoporfirina IX à 0,5 µg/ml em etanol) proporcionou um aumento do sinal de fluorescência, quando comparado à uma região não marcada, quando avaliado por microscopia confocal de fluorescêcia. Portanto, este aumento de sinal foi de aproximadamente 25 vezes para excitação de um fóton (405 nm) e cerca de 300 vezes para a excitação de dois fótons (800 nm).

Palavras chave: Fluorescência. Laser femtossegundo. Nanoestruturas.

ABSTRACT

MATTOS, V. S. **Formation of silver nanostructures using femtosecond pulsed laser to metal enhanced fluorescence**. 2019. 118p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Carlos, São Carlos, 2019.

Fluorescence is a widely applied technique in diagnosis, material and biological tissue analysis, forensic sciences and other areas. Tools for enhancing the fluorescence signal with high sensitivity and specificity are needed to detect trace levels of target molecules. This innovative project aims to create nanostructures on pure silver using femtosecond pulsed laser to enhance the fluorescence signal emission from molecules near that interface. It was used a femtosecond Libra laser of 450 mW, 1KHz of frequency and wavelength of 850 nm from Coherent to form the nanostructures on polished pure silver. The nanostructures were obtained on different shapes onto the surfaces, from periodic nanostructures having ~500 nm of periodicity, to chaotic agglomerates of silver spheres with size ranging from 50 to 500 nm, when analyzed with Scanning Electron Microscopy and Atomic Force Microscopy. The effect of proximity between the chaotic structures and the fluorophore (Protoporphyrin IX at 0,5 µg/ml in ethanol) resulted in an increase of 25 times the fluorescence signal when used one photon excitation (405 nm) and enhancement of 300 times using two photon excitation.

Keywords: Fluorescence. Femtosecond laser. Nanostructures.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama de Jablonski para absorção de um fóton e emissão de fluorescência 28

Figura 2 - Diagrama de Jablonski para absorção de um fóton e emissão de fluorescência 28

Figura 3 - Esquema representativo da interação de dois fótons em laser disposto em pulsos curtos 29

Figura 4 - Diagrama de Jablonski para fosforescência 30

Figura 5 - Diagrama de Jablonski para quenching 31

Figura 6 - Diagrama de Jablonski para o efeito de FRET 32

Figura 7 - Diagrama de Jablonski demonstrando o decaimento radiativo dos fluoróforos (emissão de fluorescência) e não radiativo 33

Figura 8 - Estrutura molecular da Protoporfirina IX 34

Figura 9 - Espectros de absorção e emissão de fluorescência da Protoporfirina IX 34

Figura 10 - Esquema de funcionamento de microscópio de fluorescência 36

Figura 11 - Esquema da seleção de plano de análise confocal através de um pinhole para microscopia de fluorescência 36

Figura 12 - Esquema da transferência de plasmons acoplados entre nanoestruturas e um fluoróforo próximo, com aumento do sinal de fluorescência 37

Figura 13 - Diagrama de Jablonski demonstrando o aumento do campo elétrico para excitação do fluoróforo devido à incidência de radiação externa (E) como devido à excitação gerada pelos plasmons (Em) e os decaimentos radiativos devido à emissão do fluoróforo (Γ) e do metal (Γm), além do decaimento não radiativo (knr) 38

Figura 14 - Esquema de amplificação de pulsos curtos 43

Figura 15 - Representação do efeito de LSPR em nanopartículas metálicas 45

Figura 16 - Estrutura cristalina da prata 50

Figura 17 - Placas de prata embutidas 51

Figura 18 - Observação na lupa de placa de prata embutida antes do polimento 52

Figura 19 - Placa de prata embutida após polimento por lixa granulação 2000 53

Figura 20 - Análise por AFM de placa de prata polida, indicando os riscos presentes 56

Figura 21 - Análise por MEV de placa de prata polida, indicando os riscos presentes 56

Figura 22 - Banda de emissão do laser Ti:Saphira utilizado 57

Figura 23 - Esquema do posicionamento da amostra em relação à distância ao foco do laser 59

Figura 24 - Esquema do efeito do laser sobre a superfície de acordo com a distância da amostra ao foco do laser 60

Figura 25 - Esquema representativo da sobreposição horizontal dos spots do laser de acordo com a alteração da velocidade 61

Figura 26 - Esquema representativo da sobreposição vertical e horizontal de spot do laser de acordo com a alteração da distância entre linhas de marcação 62

Figura 27 - Variação do tamanho do spot do laser em relação à distância da amostra ao foco 65

Figura 28 - Imagem de MEV de linhas marcadas variando-se a distância da superfície ao foco do laser 66

Figura 29 - Imagens da variação de cores devido à difração da luz de placa marcada com parâmetros de baixa intensidade 68

Figura 30 - Imagem de MEV de nanoestruturas periódicas geradas pela marcação à laser com parâmetros de baixa intensidade 69

Figura 31 - Imagem de MEV de nanoestruturas não-periódicas geradas pela marcação à laser com parâmetros de baixa intensidade 69

Figura 32 - Imagem de AFM de nanoestruturas periódicas geradas pela marcação à laser com parâmetros de baixa intensidade 70

Figura 33 - Imagem de AFM de nanoestruturas periódicas geradas pela marcação à laser com parâmetros de baixa intensidade 71

Figura 34 - Aparência da placa marcada com parâmetros de alta intensidade 72

Figura 35 - Imagem de MEV da placa marcada com parâmetros de alta intensidade, mostrando regiões de repetições e respectivos tamanhos 73

Figura 36 - Imagem de MEV da placa marcada com parâmetros de alta intensidade, mostrando o perfil caótico que a superfície possui 73

Figura 37 - Imagem de MEV da placa marcada com parâmetros de alta intensidade, mostrando aglomerados de nanoestruturas 74

Figura 38 - Imagem de MEV da placa marcada com parâmetros de alta intensidade, com destaque para uma das estruturas esféricas observadas 75

Figura 39 - Imagem de MEV da placa marcada com parâmetros de alta intensidade, com destaque para uma das formações sobre as estruturas esféricas observadas 76

Figura 40 - Imagem de microscopia confocal da placa marcada com parâmetros de alta intensidade, mostrando os diferentes planos de reflexão da luz sobre a amostra 77

Figura 41 - Imagem de microscopia confocal da placa marcada com parâmetros de alta intensidade, mostrando de forma tridimensional a superfície formado pelos planos apresentados na Figura 40 78

Figura 42 - Imagem de microscopia confocal da placa marcada com parâmetros de alta intensidade, mostrando os planos que a formam, com a região em verde o plano xz, em vermelho o yz e no centro o plano xy 78

Figura 43 - Imagem de microscopia confocal da placa marcada com parâmetros de alta intensidade, mostrando de forma tridimensional a superfície apresentada na Figura 42 79

Figura 44- Imagem de MEV da placa marcada com combinado com jato de nitrogênio, com destaque para o rastro gerado pelas partículas sopradas assim que liberadas da região onde o laser percorreu (canto inferior esquerdo) 80

Figura 45 - Imagem de MEV de destaque das estruturas formadas com jato de nitrogênio 80

Figura 46 - Imagem de MEV de destaque das estruturas formadas com jato de nitrogênio, evidenciando o tamanho das esferas formadas 81

Figura 47 - Imagem de MEV de destaque das estruturas formadas com jato de nitrogênio, evidenciando a superfície das esferas formadas 82

Figura 48 - Imagem de MEV do rastro gerado pelo jato de nitrogênio durante a marcação, evidenciando as estruturas formadas 83

Figura 49 - Imagem de MEV de linhas marcadas variando-se a quantidade de varreduras do laser, com uma repetição em a, 40 em b, 50 em c e 200 em d 84

Figura 50 - Imagem de MEV de linhas marcadas com 50 varreduras do laser, com destaque para as três regiões logo externas ao percurso do laser 85

Figura 51 - Imagem de MEV de linhas marcadas com 500 varreduras do laser, apresentando a profundidade dos sulcos formados 85

Figura 52 - Imagem de MEV de fundo da da linha, evidenciando o buraco formado no ponto do pulso do laser 86

Figura 53 - EDX de placa marcada à laser, apresentando a composição da mesma após uma semana da marcação, sem sinais de oxidação (presença de Oxigênio sobre a mesma) 87

Figura 54 - Placa de prata polida e oxidada após um mês de exposição à atmosfera. A cor amarelada se deve à oxidação 88

Figura 55 - EDX de placa polida e oxidada (após um mês do polimento), apresentando a presença de Oxigênio sobre a mesma devido ao processo de oxidação 89

Figura 56 - EDX de placa marcada e oxidada (após um mês da marcação), apresentando a presença de Oxigênio sobre a mesma devido ao processo de oxidação 89

Figura 57 - Espectro de absorção da PpIX, indicando a banda de Soret (mais intensa) e as bandas-Q presentes..... 91

Figura 58 - Espectro de emissão da PpIX quando excitada em 405 nm. O pico máximo se apresenta em 635 nm 92

Figura 59 - Espectro de auto emissão da placa marcada quando excitada em 800 nm (excitação por dois fótons). O pico máximo se apresenta por volta dos 635 nm 94

Figura 60 - Curva dos epectros de auto emissão da placa marcada quando excitada em 800 nm (excitação por dois fótons) das regiões apresentadas na Figura 59 95

Figura 61 - Emissão da PpIX em PMMA quando excitada em 405 nm (um fóton) sobre a superfície marcada (vermelho) em relação à não marcada (verde) 96

Figura 62 - Espectros de emissão da PpIX sobre a placa marcada quando excitada em 800 nm (excitação por dois fótons) das regiões apresentadas na Figura 61..... 96

Figura 63 - Emissão da PpIX em etanol quando excitada em 405 nm (um fóton) sobre a superfície marcada (vermelho) em relação à não marcada (verde) 97

Figura 64 - Expectro de emissão da PpIX em etanol quando excitada em 405 nm (um fóton) sobre a superfície marcada (vermelho) em relação à não marcada (verde) da Figura 63 98

Figura 65 - Emissão da PpIX quando excitada em 800 nm (dois fótons) sobre a superfície marcada 99

Figura 66 - Espectros de emissão da PpIX sobre a placa marcada quando excitada em 800 nm (excitação por dois fótons) das regiões apresentadas na Figura 65..... 99

Figura 67 - Espectro Raman de amostras de glicose diluídas em água, indicando a identificação apenas até a concentração de 1 g/dl..... 113

Figura 68 - Espectros Raman para comparação dos efeitos de doenças relacionadas ao envelhecimento em pele, cristalino e ossos 115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	Microscopia de Força Atômica
AgNPs	Nanopartículas de Prata
Au-SHINs	Gold Shell-Core Isolated Nanoparticles - Nanopartículas de ouro recobertas com sílica
EDX	Espectroscopia de raios X por dispersão de energia
FRET	Förster Resonance Energy Transfer - Transferência de Energia por Ressonância de Förster
IFSC	Instituto de Física de São Carlos
Laser	Light Amplified by Stimulated Emission Radiation - Amplificação de Luz por Emissão Estimulada de Radiação
LIPSS	Laser Induced Periodic Superficial Structures - Estruturas Periódicas Induzidas por Laser
LMEA	Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise
LSPR	Localized Surface Plasmon Resonance - Ressonância Localizada dos Plasmons de Superfície
MEF	Metal Enhanced Fluorescence - Fluorescência Aumentada por Proximidade com Metal
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NPs	Nanopartículas
PpIX	Protoporfirina IX
SERS	Surface Enhancement of Raman Spectroscopy – Espectroscopia Raman de Superfície Aumentada
SPR	Surface Plasmon Resonance - Ressonância dos Plasmons de Superfície
TFD	Terapia Fotodinâmica
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

S_0	Estado fundamental
S_1	Primeiro estado excitado
v_{ext}	Frequência da radiação de excitação externa
h	Constante de Plank
dw/dt	Fator de absorção de fótons
T_1	Primeiro estado tripleto
k_0	Taxa constante de quenching para distância de maior aproximação
k_q	Taxa de quenching
Å	Angstrom
Γ	Taxa de emissão de um fluoróforo
k_{nr}	Taxa de decaimento não radiativo
τ	Tempo de vida
SiO_2	Óxido de Silicio
nm	Nanômetros
fs	Femtossegundo
$Ti^{+3}:Al_2O_3$	Titânio-safira
V/cm	Volts por centímetro
$e-ph$	Acoplamento elétron-fônon
mm	Milímetro
HV	Dureza Vickers
kHz	Kilo Hertz
mJ	Mili Joules
N_2	Gás de Nitrogênio
L/min	Litros por minuto
μm	Micrômetros

SUMÁRIO

Introdução e Objetivos 25

Capítulo 1 - Aspectos Gerais da Fluorescência 27

1.1 O Princípio de Fluorescência 27
1.2 Supressão 30
1.3 Transferência de Energia por Ressonância de Förster 31
1.4 Fluoróforos 32
1.4.1 Porfirinas e Protoporfirina IX (PpIX) 33

1.5 Espectroscopia de Fluorescência 35
Capítulo 2 - Fluorescência Aumentada por Proximidade com Metal e Aplicações 37

2.1 Bases do princípio 37
2.2 Aplicações de MEF 39
Capítulo 3 - Ferramentas para Modificação de Superfícies – O Laser 41

3.1 O que é um Laser 41
3.1.1 Laser titânio-saphira 42

Capítulo 4 - Interação da radiação com a superfície: Os Plasmons de Superfície 45

4.1 Bases físicas/matemáticas 45
4.2 Plasmons em nanoestruturas metálicas 46
4.3 Estruturas periódicas induzidas por laser 46
4.4 Criação de nanoestruturas 47
Capítulo 5 - O Uso de Metais Preciosos: Procedimentos Realizados e Resultados da Preparação 49

5.1 Características específicas 49
5.2 Prata 49
5.3 Metalografia 50
5.4 Procedimentos utilizados na preparação da superfície 50
5.4.1 Prata pura 50

5.4.2 Metalografia 51

5.4.2.1 Processo de Embutimento 51

5.4.2.2 Processo de Polimento 51

5.4.2.3 Finalização 54

5.5 Análise das Superfícies: Técnicas Empregadas 54
5.5.1 Microscopia óptica 54
5.5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) 54
5.5.3 Espectroscopia de Raios X por dispersão de energia (EDX) 55
5.5.4 Microscopia de Força Atômica (AFM) 55
5.6 Resultados da Preparação da Superfície 55
Capítulo 6 - Marcação à Laser: Procedimentos Realizados e Resultados para a Criação de Nanoestruturas 57
6.1 Características do laser utilizado 57
6.2 Processos de variação de parâmetros realizados 59
6.2.1 Variação da distância da amostra ao foco 59
6.2.2 Variação da velocidade de marcação 60
6.2.3 Variação da distância entre linhas 61
6.2.4 Alteração na quantidade de varreduras do laser 62
6.2.5 Testes de marcação em linhas 62
6.2.6 Marcação com jato de gás 63
6.2.7 Finalização e limpeza das amostras 63
6.3 Resultados da marcação à laser 63
6.3.1 Alteração da distância ao foco 63
6.3.2 Parâmetros de baixa intensidade 67
6.3.3 Análise da placa marcada por AFM 70
6.3.4 Parâmetros de alta intensidade 71
6.3.5 Análise por microscopia confocal 76
6.3.6 Marcação com jato de gás 79
6.3.7 Marcação em linhas 83
6.4 EDX das placas polidas e marcadas 86
Capítulo 7 - Interação Fluoróforo-nanoestruturas: Procedimentos e Resultados Obtidos 91
7.1 Caracterização da Protoporfirina IX (PpIX) 91
7.1.1 Espectroscopia de absorção 91

7.1.2 Espectroscopia de fluorescência 92

7.2 Deposição do fluoróforo sobre a superfície 92

7.3 Análise de fluorescência 93

7.3.1 Microscopia Confocal por Fluorescência 93

7.3.2 Fluorescência da superfície marcada 93

7.3.3 Resultado do Aumento de fluorescência 95

Capítulo 8 - Discussões, Conclusões Gerais e Perspectivas Futuras 101

8.1 Preparação da superfície de prata 101

8.2 Processo de marcação à laser 101

8.3 Análises da alteração das superfíceis com a atmosfera 103

8.4 Análises do aumento de fluorescência 104

8.5 Conclusões gerais 105

8.6 Aplicação da técnica para sensores 106

Referências 107

Apêndice 111

Apêndice A - Análise de produtos finais de glicação avançada (AGEs) em pele utilizando espectroscopia Raman e de fluorescência 111

Apêndice B - Detecção de glicose em soluções diluidas utilizando espectroscopia Raman 113

Apêndice C - Identificação de AGEs em diferentes tecidos biológicos 115

Introdução e Objetivos

Nos últimos anos, o uso de sensores tem sido cada vez mais abundante, e o desenvolvimento de novas formas mais precisas se tornam cada vez mais necessárias. O uso da técnica de espectroscopia por fluorescência se apresenta como uma ferramenta prática para uso em diagnóstico, monitoramento ambiental, na indústria alimentícia e outras aplicações, como pesquisa genética, molecular e física, entre outras áreas. As metodologias que envolvem a análise do espectro de fluorescência são muito amplas, sendo aplicáveis tanto na identificação de moléculas naturalmente fluorescentes quando para moléculas não-fluorescentes associadas a fluoróforos. Entretanto, para a identificação destas moléculas, é cada vez mais desejado o desenvolvimento de tecnologias com maior poder de resolução e mais especificidade, com formas de amplificar o sinal de fluoróforos que não são naturalmente muito intensos. Neste contexto, fluorescência aumentada pela proximidade com superfície metálica (MEF - *Metal Enhanced Fluorescence*, no inglês) apresenta grande aplicabilidade para o desenvolvimento de sensores para análise de moléculas em baixa concentração. (1)

Superfícies metálicas interagindo com substâncias próximas à elas podem proporcionar esta amplificação. Estas superfícies podem ser criadas com uso de laser de alta intensidade. Um laser pulsado femtossegundo pode criar nanoestruturas periódicas (LIPSS - *Laser Induced Periodic Superficial Structures*) ou estruturas não regulares em superfícies, e a prata, como um metal de alta condutividade elétrica, pode gerar nanoestruturas compatíveis com o efeito MEF. As superfícies necessárias para tal efeito contam com a excitação dos plasmons de superfície, que aumentam a intensidade do campo elétrico local, causando o aumento do sinal de fluorescência das moléculas. (2)

Tendo em vista os conceitos envolvidos, o presente trabalho possui caráter inovador e tem como objetivo gerar nanoestruturas em prata, capazes de aumentar o sinal de fluorescência de moléculas próximas a elas, com uso de laser pulsado femtossegundo.

Desta forma, os objetivos específicos são:

- Preparação da superfície metálica (prata) para eliminação de riscos;

- Realizar a marcação com laser pulsado femtossegundo e observar estruturas criadas;
- Análise da formação de nanoestruturas;
- Deposição de fluoróforo sobre as nanoestruturas de forma homogênea;
- Análise do aumento de fluorescência;

Para melhor entendimento dos conceitos, processos, técnicas e tecnologias envolvidas, este trabalho fornecerá explicações sobre os mesmos conforme segue.

Primeiramente, será tratado no Capítulo 1 o princípio de fluorescência, abordando os principais fundamentos relacionados, formas de alteração de sinal e também de detecção do mesmo por técnicas de espectroscopia. Em seguida, o Capítulo 2 trata do princípio de aumento de fluorescência por proximidade com superfície metálica, conceitos envolvidos e aplicações desta técnica já desenvolvidas.

O Capítulo 3 apresenta o princípio de laser como ferramenta utilizada para a criação das nanoestruturas necessárias para o efeito MEF. Já no Capítulo 4, a interação entre laser e superfície metálica entra em questão através dos plasmons de superfície e efeitos relacionados.

O uso de metais, em especial a prata, é tratado no Capítulo 5, incluindo o conceito de metalografia. Nele também inicia-se a apresentação dos procedimentos utilizados no trabalho, primeiro com as etapas de preparação das amostras utilizadas, assim como os resultados obtidos das análises das superfícies antes da marcação das mesmas pelo laser. No Capítulo 6 é apresentada a metodologia utilizada para a marcação das superfícies, as variações testadas, a análise das regiões marcadas e também a apresentação dos resultados e descrição das nanoestruturas formadas nestes processos.

A forma que se deu a interação de fluoróforos com as nanoestruturas criadas, processos realizados para a interação e análises por microscopia confocal e resultados obtidos são descritos no Capítulo 7, que ademais mostra os diferentes níveis de amplificação obtidos com as diferentes estruturas formadas.

Por fim, o Capítulo 8 apresenta as discussões gerais deste trabalho e conclusões, assim como possíveis caminhos futuros para as próximas etapas do projeto, indicando perspectivas de próximos desenvolvimentos.

Capítulo 1

Aspectos Gerais da Fluorescência

1.1 O Princípio de Fluorescência

Luminescência é o fenômeno da emissão espontânea de luz de uma espécie excitada eletrônica ou vibracionalmente fora do equilíbrio térmico com o ambiente. (3) Compostos luminescentes podem ser caracterizados de acordo com sua composição: compostos orgânicos, inorgânicos ou organometálicos. Fluorescência e fosforescência são casos particulares de luminescência, com os modos de excitação sendo alcançados devido à absorção de um ou mais fótons, levando à elevação dos elétrons a um estado excitado. As formas de emissão se diferem pelo fato que fosforescência é a emissão espontânea de radiação, levando à desexcitação dos elétrons, sendo que estes passam por um estado tripleto intermediário estável ou instável. Enquanto isso, a fluorescência é a emissão espontânea de fótons pelo material e ocorre em nanossegundos após a excitação. (4)

Quando ocorre a excitação por um único fóton de comprimento de onda e energia apropriados de uma população de fluoróforos, os elétrons destes migram do estado fundamental (S_0) para o estado excitado (S_1). Como o estado excitado apresenta diversos estados vibracionais internos, os elétrons rapidamente relaxam até o estado vibracional mais baixo, e então decaem para o estado fundamental (S_0), o que resulta na emissão de fluorescência com um fóton de menor energia e maior comprimento de onda. Um esquema da excitação e emissão de fluoróforos pode ser visto no diagrama de Jablonski na Figura 1. Esta emissão é extremamente rápida, com tempo de meia-vida da ordem de 10^{-8} s. Estes diagramas de Jablonski são bastante úteis para ilustrar os processos moleculares que ocorrem nos estados excitados. Para a molécula ser excitada do estado fundamental (S_0) para o estado excitado (S_1), deve haver a absorção de fótons com a energia correspondente à diferença de energia entre estes estados, de forma que a energia do estado excitado seja a soma da energia do estado fundamental, mas a energia da radiação incidente ($h\nu_{ext}$), conforme a Equação 01. (4)

$$S_1 = S_0 + h\nu_{ext} \quad (01)$$

Na equação, ν_{ext} é a frequência da radiação de excitação externa, e h é a constante de Plank.

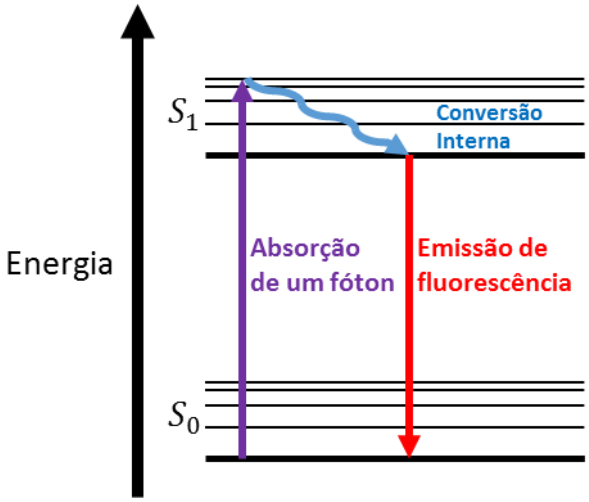

Figura 1 - Diagrama de Jablonski para absorção de um fóton e emissão de fluorescência
Fonte: Elaborada pelo autor

Por outro lado, pode ocorrer a excitação do fluoróforo por de mais de um fóton (*multi-photon excitation*), onde a energia emitida na fluorescência é maior do que a radiação de excitação de um dos fótons. Neste caso, ao menos dois fótons são necessários para excitar os elétrons do estado fundamental (S_0) para o estado excitado (S_1). O diagrama de Jablonski para este caso pode ser observado na Figura 2. (5)

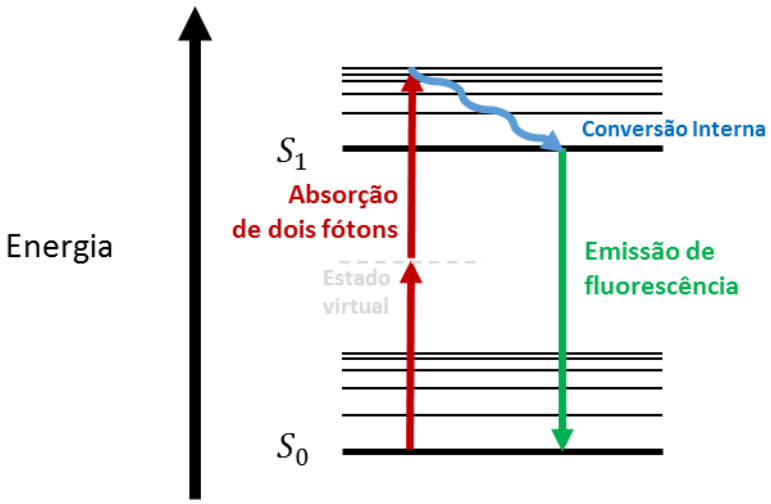

Figura 2 - Diagrama de Jablonski para absorção de um fóton e emissão de fluorescência
Fonte: Elaborada pelo autor

No processo de absorção de apenas um fóton a absorção da luz é proporcional à intensidade $\left(\frac{dw}{dt} \propto I\right)$, então quanto maior a intensidade da radiação incidente, maior a absorção. Na absorção simultânea de dois fótons, a absorção é proporcional ao quadrado da intensidade da radiação incidente $\left(\frac{dw}{dt} \propto I^2\right)$. Como consequência da dependência quadrática, o efeito pode implicar em fotodegradação da molécula em questão. Por ser um efeito que demanda muita energia de pico, o mesmo é observado basicamente na região das proximidades do ponto focal do pulso do laser, o que possibilita resolução espacial ao longo do feixe, assim como radialmente para a geração de imagens de absorção de dois fótons. (6)

Pulsos de laser ultra curtos aumentam a absorção por múltiplos fótons, uma vez que a absorção média não é apenas proporcional à potência média, mas se beneficia bastante do empacotamento dos fótons de excitação disponíveis em intervalos de tempo muito curtos, e este efeito é verificado principalmente quando utilizados pulsos menores que a ordem de picosegundos (10^{-12} s), como pode ser observado na Figura 3. (7)

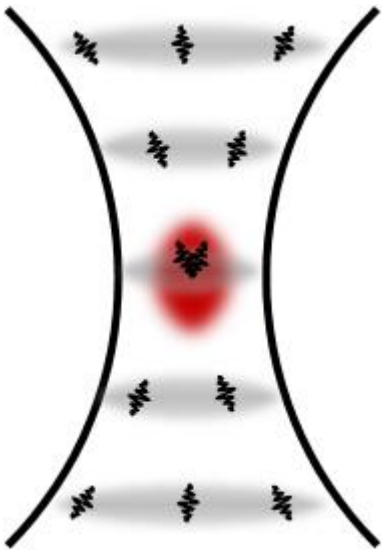

Figura 3 - Esquema representativo da interação de dois fótons em laser disposto em pulsos curtos
Fonte: Elaborada pelo autor

Quando uma molécula no estado excitado (S_1) sofre conversão de spin para o primeiro estado tripleto (T_1), ou seja, ocorre cruzamento intersistema com inversão do spin do elétron, a energia do fóton emitido é muito menor do que o que ocorre na fluorescência, e este efeito é denominado fosforescência (Figura 4). (8)

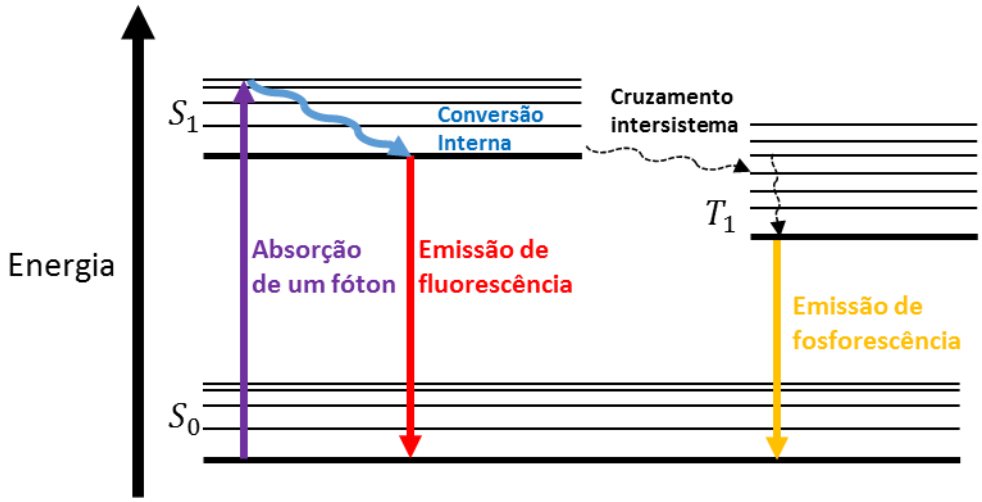

Figura 4 - Diagrama de Jablonski para fosforescência
Fonte: Elaborada pelo autor

1.2 Supressão

Diversos processos na solução em que o fluoróforo está envolvido podem levar à supressão (efeito de *quenching*), que é uma redução do sinal de fluorescência do mesmo. Isso se deve à efeitos de reações em estados excitados, formação de complexos, transferência de energia ou colisões. Este efeito é exponencialmente dependente da distância entre o fluoróforo e o elemento causador de quenching, segundo a Equação 02. (9)

$$k_q(r) = k_0 \exp^{-\frac{2(r-d)}{L}} \qquad (02)$$

Na equação, k_0 é a constante de velocidade de supressão para o raio colisional, que é a distância de maior aproximação (d), e L é o comprimento de tunelamento efetivo no contexto de transferência de energia e raio de Bohr efetivo no contexto de transferência de energia eletrônica. O parâmetro L assume, de acordo com o par doador-aceptor, valores entre 0,7 e 6 Å. A Figura 5 apresenta o diagrama de Jablonski mostrando o decaimento não radiativo devido ao efeito de supressão, além do decaimento radiativo devido à fluorescência. (10)

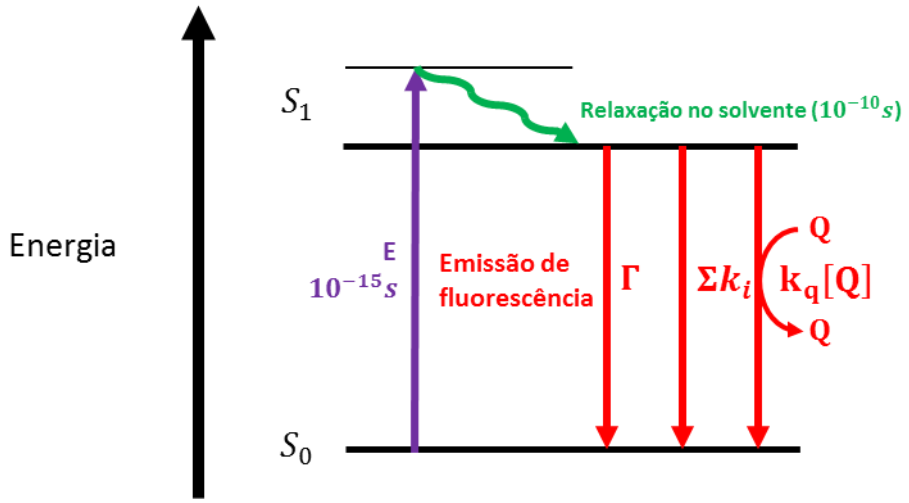

Figura 5 - Diagrama de Jablonski para quenching
Fonte: Elaborada pelo autor

1.3 Transferência de Energia por Ressonância de Förster

A Transferência de energia por Ressonância de Förster, do inglês *Förster Resonance Energy Transfer* - FRET, é o fenômeno da transferência de energia de forma não-radiativa entre fluoróforos próximos como efeito de perda de energia. Neste efeito um fluoróforo, o doador, é excitado pela radiação em seu comprimento de onda específico. Após o processo de decaimento para um estado excitado de menor energia, a energia que seria emitida como fluorescência é transferida de forma não radiativa por Ressonância de Förster para outro fluoróforo que esteja próximo, o aceptor, enquanto o doador retorna ao estado fundamental e o aceptor excitado emite fluorescência e também retorna ao seu estado fundamental. Este efeito é local, e sua eficiência decai com a sexta potência da distância entre os fluoróforos, ou seja, uma medida da intensidade de emissão pode indicar a distância a que os fluoróforos se encontram. (11) A Figura 6 apresenta como o diagrama de Jablonksi representa o efeito de FRET.

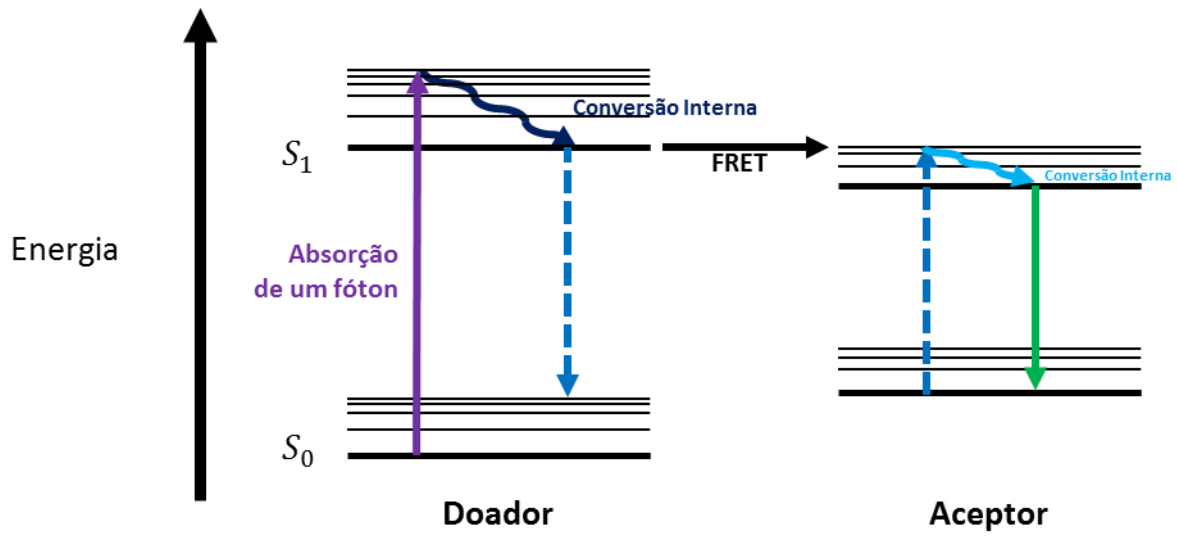

Figura 6 - Diagrama de Jablonski para o efeito de FRET
Fonte: Elaborada pelo autor

1.4 Fluoróforos

Os fluoróforos são moléculas que absorvem luz ou alguma outra radiação eletromagnética e reemitem esta radiação com energia menor e comprimento de onda maior. Eles são divididos em duas classes gerais, os intrínsecos, que ocorrem naturalmente, e os extrínsecos, que são adicionados a moléculas que não apresentam as propriedades espectrais desejadas. A estrutura molecular e o ambiente químico afeta a forma como a luminescência do fluoróforo irá ocorrer, além da intensidade com que ocorre. As características mais importantes de um fluoróforo são seu rendimento quântico e seu tempo de vida. O Rendimento quântico é a relação entre fótons absorvidos e fótons emitidos pela molécula. Esta relação pode ser medida com base nas constantes Γ e k_{nr}que são, respectivamente, a velocidade de emissão do fluoróforo e a velocidade de decaimento não radiativo ao estado fundamental (S_0). Então o rendimento quântico (Q) é calculado pela relação apresentada na Equação 03. (8)

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}} \qquad (03)$$

O rendimento quântico é próximo de um quando a taxa de decaimento não radiativo é muito menor que a do radiativo ($k_{nr} < \Gamma$). A Figura 7 apresenta o decaimento radiativo do fluoróforo (Γ) e o não radiativo (k_{nr}).

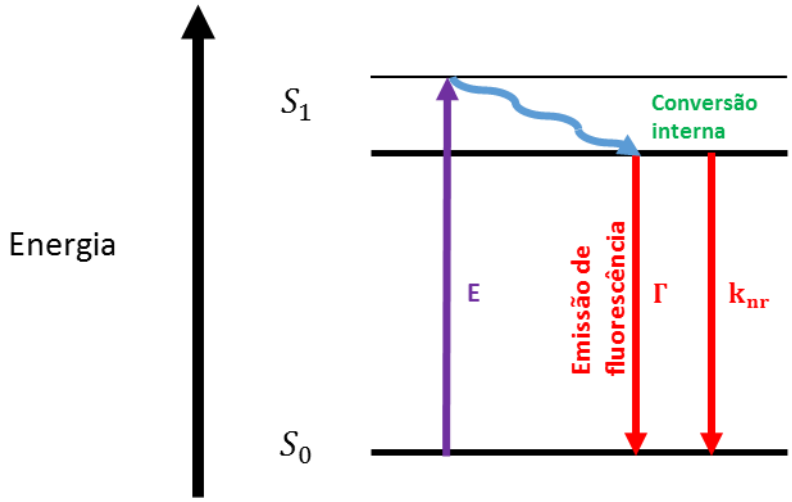

Figura 7 - Diagrama de Jablonski demonstrando o decaimento radiativo dos fluoróforos (emissão de fluorescência) e não radiativo

Fonte: Elaborada pelo autor

Já o tempo de vida indica o intervalo necessário para a relaxação dos elétrons do estado excitado para o estado fundamental, e da ordem de 10 ns. O tempo de vida (τ) pode ser dado pela Equação 04. (8)

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}} \qquad (04)$$

1.4.1 Porfirinas e Protoporfirina IX (PpIX)

Porfirinas são macromoléculas cíclicas com importantes papéis em organismos vivos. Contém quatro anéis pirrólicos e possuem um anel tetraédrico em seu núcleo, onde pode ocorrer a coordenação de um átomo metálico. Quando coordenadas com um íon de ferro, possuem importante função biológica em hemoproteínas. A banda Soret das porfirinas coordenadas com metal se apresenta com alta intensidade entre 400 e 500 nm no espectro de absorção. (9)

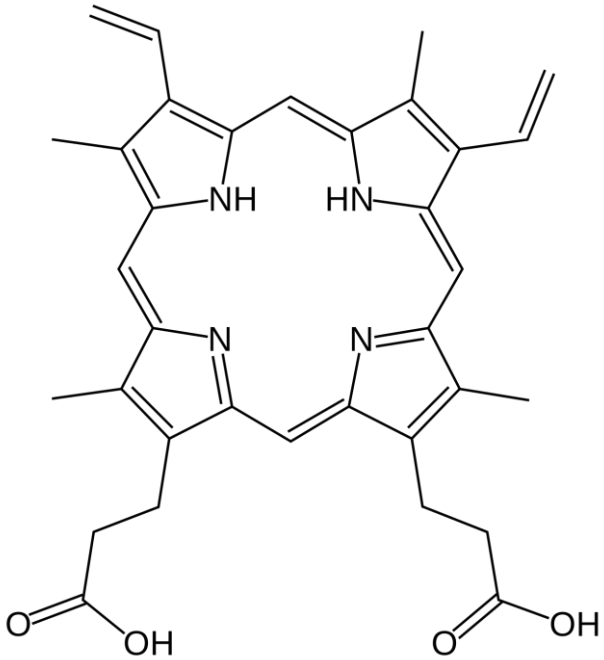

Figura 8 - Estrutura molecular da Protoporfirina IX
Fonte: Elaborada pelo autor através do software ACD/ChemSketch

A Figura 8 apresenta a estrutura molecular da Protoporfirina IX, enquanto a Figura 9 mostra a banda de Soret e as quatro bandas Q da molécula.

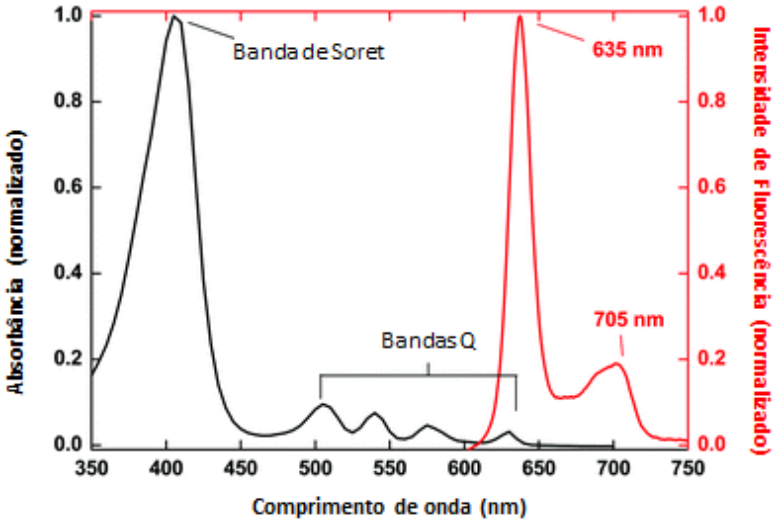

Figura 9 - Espectros de absorção e emissão de fluorescência da Protoporfirina IX
Fonte: Adaptada de VALENTINE et al. (12)

A Protoporfirina IX (PpIX) é uma das porfirinas mais comuns e faz parte da composição da hemoglobina, responsável pelo transporte de oxigênio pela corrente sanguínea nas células vermelhas. (13) Quando associada a um íon ferro, se dá nome de grupo heme. É uma porfirina que pode ser endógena (derivada da

degradação de glóbulos vermelhos, hemoglobina e bilirrubina) ou exógena (denominada de fotossensibilizador). (14)

A PpIX é um fotossensibilizador muito utilizado em terapia fotodinâmica (TFD) para tratamento de câncer e descontaminação. Além da intensa banda de Soret por volta de 400 nm, também apresenta quatro bandas Q entre 500 e 620 nm. Como a janela terapêutica óptica varia de 600 a 800 nm, a última banda Q com pico em 633 nm é utilizada para a TFD no tratamento de câncer por promover maior penetração da radiação vermelha através do tecido biológico. Entretanto, TFD com comprimentos de onda menores, como a radiação azul, penetram menos e podem ser utilizados para descontaminação de úlceras, tratamento de acne vulgaris, periodontite entre outros procedimentos dermatológicos e odontológicos. (15)

1.5 Espectroscopia de Fluorescência

Quando a luz interage com as moléculas, a interação pode ser de absorção, quando o material absorve essa radiação; reflexão especular (espalhamento Rayleigh), quando a luz é refletida com o mesmo ângulo de incidência; ou espalhamento difuso (espalhamento Raman), quando a radiação espalhada pelo material tem energia diferente daquela incidente. A fluorescência é uma forma de espalhamento da luz, sendo que difere do espalhamento Raman pelo tempo de vida, uma vez que este apresenta tempo de vida de 10^{-15} s enquanto a fluorescência apresenta tempo de vida da ordem de $10^{-8} - 10^{-9}$ s. A medida da interação que ocorre da matéria com a luz pode ser feita com técnicas de espectroscopia. Para análise de fluoróforos e materiais fluorescentes, pode ser utilizada a microscopia de fluorescência. A Figura 10 apresenta um esquema do funcionamento de microscópio de fluorescência, composto laser para excitação, conjunto de espelhos para varredura XY, conjunto de lentes para observação e amplificação da análise, detector para coleta dos dados, além de esquema de pinhole para captura de diferentes planos de análise.

A microscopia de fluorescência confocal se baseia na análise de amostras em diferentes planos de visualização, através da obstrução da luz que vem de planos diferentes daquele de observação. Através de um pinhole, são selecionados apenas os raios de luz que são emitidos pelo plano em questão, mantendo os demais fora

do ponto de observação. Esta seleção é feita baseada no escaneamento ponto-a-ponto da amostra, onde cada ponto na amostra representa um pixel na imagem ao final, com isto, regiões fora do ponto focal são eliminadas na imagem final.

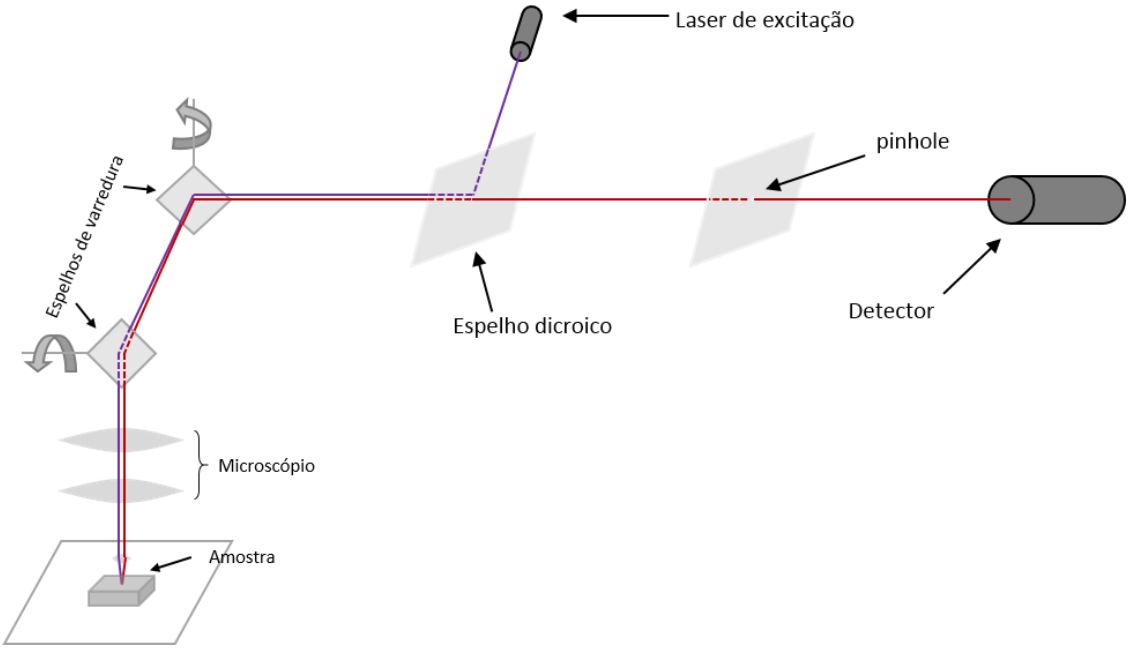

Figura 10 - Esquema de funcionamento de microscópio de fluorescência
Fonte: Elaborada pelo autor

Com as varreduras de planos finos da amostra, é possível fazer a construção tridimensional da mesma. A Figura 11 mostra o esquema de funcionamento de microscopia confocal e a seleção de um plano focal de análise específico através de uso de um *pinhole* (furo) para fazer tal seleção. (5)

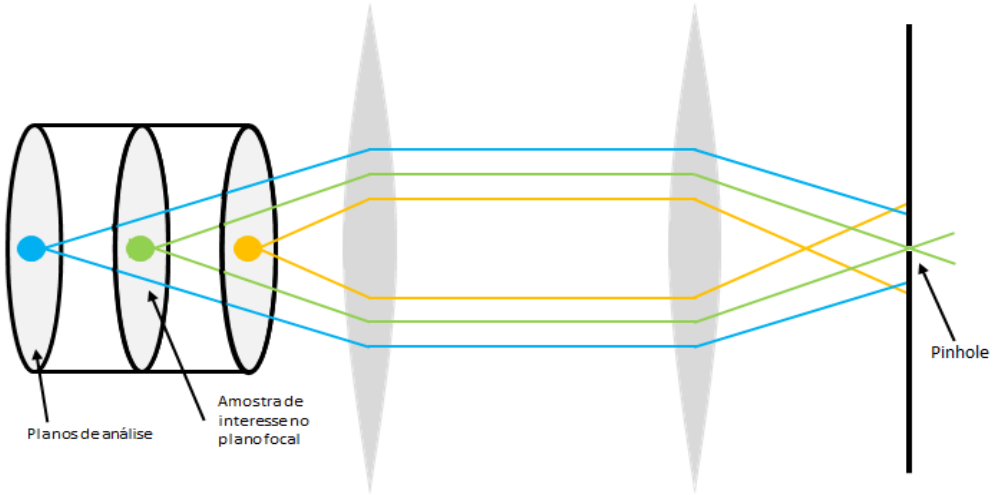

Figura 11 - Esquema da seleção de plano de análise confocal através de um pinhole para microscopia de fluorescência
Fonte: Elaborada pelo autor

Capítulo 2
Fluorescência Aumentada por Proximidade com Metal e Aplicações

2.1 Bases do princípio

Quando no estado excitado, os fluoróforos tem propriedades de um dipolo oscilante, e isto pode induzir a oscilação dos elétrons em uma superfície metálica próxima. O campo elétrico criado por este metal pode interagir com o fluoróforo, alterando seu espectro de emissão. Esta interação pode ocasionar em aumento do rendimento quântico, da fotoestabilidade, e aumento das distância de transferência de energia por ressonância, além da redução do tempo de vida do fluoróforo. Este efeito é denominado *Metal Enhanced Fluorescence* (MEF), ou Fluorescência Aumentada por Proximidade com Metal. (16) A Figura 12 apresenta um esquema da transferência dos plasmons acoplados entre o fluoróforo e nanoestruturas próximas.

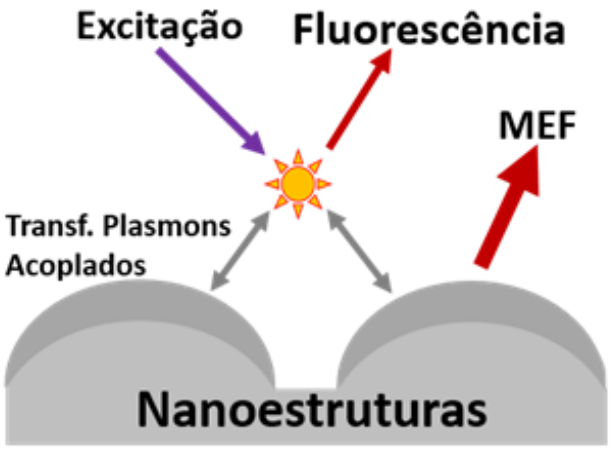

Figura 12 - Esquema da transferência de plasmons acoplados entre nanoestruturas e um fluoróforo próximo, com aumento do sinal de fluorescência

Fonte: Elaborada pelo autor

Com o campo elétrico criado pela excitação do metal, o diagrama de Jablonski apresentado na Figura 7 se altera para a forma na Figura 13, onde a

excitação do fluoróforo é devida à absorção dos fótons da radiação incidente, mas também devida ao metal da superfície, $(E + E_m)$, o que resulta em aumento da intensidade de fluorescência, alterando o rendimento quântico e o tempo de vida, e estes podem ser calculados da forma apresentada nas Equações 05 e 06. Ou seja, com o aumento de Γ_m, o tempo de vida irá diminuir. (8)

$$Q_m = \frac{\Gamma + \Gamma_m}{\Gamma + \Gamma_m + k_{nr}} \tag{05}$$

$$\tau_m = \frac{1}{\Gamma + \Gamma_m + k_{nr}} \tag{06}$$

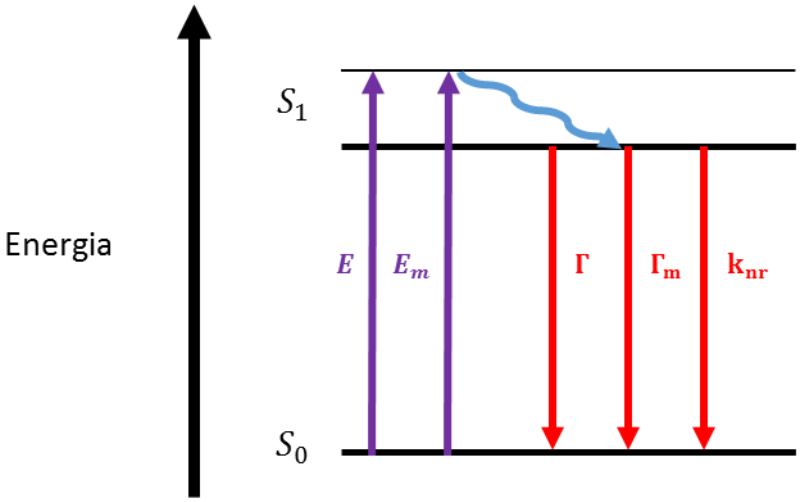

Figura 13 - Diagrama de Jablonski demonstrando o aumento do campo elétrico para excitação do fluoróforo devido à incidência de radiação externa (E) como devido à excitação gerada pelos plasmons (E_m) e os decaimentos radiativos devido à emissão do fluoróforo (Γ) e do metal (Γ_m), além do decaimento não radiativo (k_{nr})

Fonte: Elaborada pelo autor

A interação entre o fluoróforo e o metal pode ser descrita de acordo com três possíveis processos. O primeiro processo é por transferência de energia do fluoróforo para o metal, uma vez que a distância entre ambos é da ordem de nanômetros, a proximidade com o metal “amortece” o dipolo oscilante, desse modo amortecendo a fluorescência, este é um processo não radiativo e domina em pequenas distâncias, pois é inversamente proporcional ao cubo da distância entre o metal e o fluoróforo. O segundo mecanismo é quando ocorre a concentração do campo eletromagnético local. As estruturas metálicas agem como antenas que concentram estes campos locais onde estão os fluoróforos, o que ocasiona o

aumento da fluorescência, e é descrito ao se resolver as equações de Maxwell nos arredores da estrutura de metal, onde este efeito de antena de estruturas metálicas e em algumas frequências há a ressonância da estrutura de metal. No modelo de Drude para metais, estes são tratados como uma matriz carregada positivamente com um gás de elétrons movendo-se através destes íons que quando submetido a um campo eletromagnético externo, estes elétrons se movem de forma coerente pelo material. Neste modelo, os efeitos restauradores da lei de Coulomb fazem com que a densidade de cargas oscilem pelo metal. Como é um efeito localizado, esta oscilação é denominada ressonância dos plasmons de superfície localizados. Esta ressonância em duas ou mais nanoestruturas podem ser combinadas com o campo elétrico altamente amplificado entre as partículas. Já o terceiro mecanismo, que é a modificação do decaimento radiativo do fluoróforo devido à modificação na densidade de estados dos fótons, com aumento da taxa de radiação e consequente diminuição do tempo de vida do fluoróforo, é devido a maior densidade dos modos fotônicos nas proximidades das nanoestruturas. (16)

Um fluoróforo excitado induz distribuição de cargas sobre a superfície metálica. Se o plasmon da superfície consegue irradiar-se, então a emissão do fluoróforo é observada como emissão acoplada. Por outro lado, se o plasmon não for capaz de irradiar, então é observada a supressão do fluoróforo. O tempo de vida dos fluoróforos diminui quando este se aproxima a 10 nm da superfície. (17)

2.2 Aplicações de MEF

As aplicações de estruturas metálicas utilizadas para aumento de sinal de fluorescência variam em diferentes formas e composições, como demonstrado pela revisão da literatura.

Camacho et al. utilizaram aumento de fluorescência com plasmons utilizando nanopartículas encapsuladas (shell-isolated nanoparticles) de ouro e prata recobertas de SiO_2, obtendo aumento de fluorescência em 5 vezes quando em solução. Utilizando Au-SHINs (Gold Shell-Core *Isolated Nanoparticles* - Nanopartículas de ouro recobertas com sílica) em filmes de Langmuir-Blodgett conseguiram aumento de aproximadamente 20 vezes na eficiência de fluorescência,

e para o mesmo tipo de filme, mas com as nanopartículas de prata (Ag-SHINs), foi obtido o aumento de cerca de 90 vezes. (18)

Lismont et al. utilizaram nanopartículas de prata imobilizadas em placas de vidro. No estudo, buscaram encontrar uma combinação ótima entre a banda de Soret da PpIX com os plasmons localizados das nanopartículas de prata (AgNPs). Também investigaram a dependência da distância entre o fluoróforo e as NPs, encontrando a relação entre a distância e aumento de fluorescência, obtendo aumento de 2,5 vezes para a distância de 40 nm e de 4 vezes para 100 nm. Neste estudo, foi utilizada a combinação dos polímeros de poli(cloridrato de alilamina) e poli(sulfonato de sódio-4-estireno) tanto para a imobilização das AgNPs à superfície de vidro quanto da PpIX. (15)

Deng conseguiu o aumento em 11 vezes do sinal de fluorescência e redução pela metade do tempo de vida de fluorescência utilizando esferas de sílica cobertas com nanoestruturas de prata. (17)

Geddes, Parfenov e Lakowicz mostraram que prata metálica depositada por iluminação à laser aumenta cerca de 7 vezes a emissão de Indocianina ligada localmente, com diminuição do tempo de vida e aumento da fotoestabilidade. (19)

Ahmmed, Grambow e Kietzigg mostraram que filmes de ilhas de sílica são as mais comuns para realização de MEF, com sal de prata reduzido sobre a superfície de vidro, e posterior adição de reagentes para fixação, onde as partículas formadas são da ordem de 30 a 80 nm e plasmons por volta de 430 nm, produzindo aumentos no sinal de fluorescência de 5 a 7 vezes. (20)

Chen et al. mostrou o aumento do sinal de fluorescência de 2,4 à 10,5 vezes usando nanopartículas de prata em substrato de cobre com oxidação. (21)

Parfenov et al. mostrou o aumento de fluorescência utilizando estruturas fractais de prata formados sobre ou próximos de eletrodos de prata. Para este tipo de formação, foi obtido um aumento de cerca de 100 vezes no sinal de albumina de soro humana marcada com fluoresceína quando comparado com a amostra sobre vidro. (22)

Apesar das mais diversas técnicas existentes para a amplificação do sinal de fluorescência, a técnica proposta no presente estudo apresenta um diferencial que é a combinação da utilização de laser femtossegundo para gerar nanoestruturas em superfície metálica e seus relevantes efeitos sobre o sinal de fluorescência.

Capítulo 3
Ferramentas para Modificação de Superfícies – O Laser

3.1 O que é um Laser

Laser é uma ferramenta de alta precisão com emissão de luz monocromática (apenas um comprimento de onda ou uma banda muito estreita emitida), de alta energia, colimado (baixa divergência) e coerente (a emissão de vários átomos é sincronizada, na qual os campos elétricos oscilam em fase). É um acrônimo para o inglês de *Light Amplified by Stimulated Emission Radiation*, que significa, em tradução livre, Amplificação de Luz por Emissão Estimulada de Radiação. Tem alta aplicabilidade nas mais diversas áreas, por exemplo na física e engenharia, no desenvolvimento de diversas tecnologias para as mais diversas aplicações. A emissão destes fótons é devida à elevação de elétrons em um meio ao estado excitado e posterior decaimento destes por uma intervenção externa, o que ocasiona a emissão dos fótons pelos demais elétrons, levando à emissão estimulada com as características citadas. São vários os tipos de lasers que são utilizados, sendo os mais comuns os lasers de semicondutores, laser de fibra, laser de gás e lasers de estado sólido. Estes últimos geram saídas de grande energia, com boa qualidade de feixe, com emissão contínua ou pulsada. (23)

Um laser femtossegundo é um laser que emite pulsos ópticos com duração inferiores a 1 femtossegundo (10^{-15} s ou fs), ou seja, são pulsos ultra-curtos. Os parâmetros essenciais no uso de laser femtossegundo é a duração do pulso, a taxa de repetição dos pulsos e a potência de saída e energia de cada pulso. (24)

A interação de laser com a superfície varia de acordo com o tamanho do pulso utilizado. Esta interação é uma cadeia de eventos que decorre da resposta dos materiais no intervalo do tempo da interação laser-material. O primeiro evento é a excitação de cargas, pois quando a energia de excitação é maior que a banda de condução, a absorção de um fóton é o mecanismo de excitação dominante do

elétron da banda de valência para a banda de condução. Tal excitação ocorre no intervalo de 10 a 100 fs. Quando a excitação se encerra, os elétrons e buracos no material se redistribuem pelos efeitos de espalhamento carreador-carreador e carreador-fônon, e quando o número de elétrons excitados e carreadores se estabiliza, a energia diminui devido à perda de energia por emissão de fônons, e então o material começa a aquecer independentemente do processo à frio que ocorreu em poucos femtossegundos, no efeito de termalização. Este efeito demora alguns picosegundos, dado que os fônons carregam pouca energia, e diversos processos de espalhamento são necessários até que a rede cristalina estabeleça o equilíbrio térmico. Mesmo com a rede cristalina e os elétrons de condução em equilíbrio térmico, há um excesso de carreadores, e este excesso é eliminado ou pela recombinação de elétrons e buracos ou pela difusão para fora da região de excitação. Esta recombinação pode ser de forma radiativa (luminescência) ou não radiativa (recombinação Auger ou recombinação de defeito e superfície). (25)

3.1.1 Laser titânio-saphira

Um laser Titânio-safira (Ti^{+3}:Al_2O_3) é um laser de comprimento de onda ajustável (tunable laser) de estado sólido com um cristal de safira (Al_2O_3cristalino) dopado com íons titânio. Uma importante propriedade é a alta condutividade térmica, o que auxilia na dissipação de calor em lasers de alta energia ou intensidade. A presença dos íons titânio no cristal possibilitam uma ampla banda de ganho, permitindo a criação de pulsos ultra curtos com ampla tunabilidade do comprimento de onda. A amplitude de tunabilidade varia de 650 à 1100 nm, com máximo de ganho próximo de 805 nm. (26)

A criação de pulsos femtossegundo se dá com o auxílio de uma grade de difração, que abre um pulso de luz inicial. Este pulso passa por um amplificador, que chega à uma potência alta. Posteriormente, este pulso amplo é novamente comprimido, e então mantêm a característica de alta potência, mas com uma banda estreita. O efeito de altas potências de laser femtossegundo é devido ao fato que um pulso após ser comprimido mantém a mesma área do pulso inicial, após a amplificação, entretanto, agindo num intervalo extremamente menor. A Figura 14 mostra um esquema representativo da formação de pulsos ultracurtos de alta energia. (27)

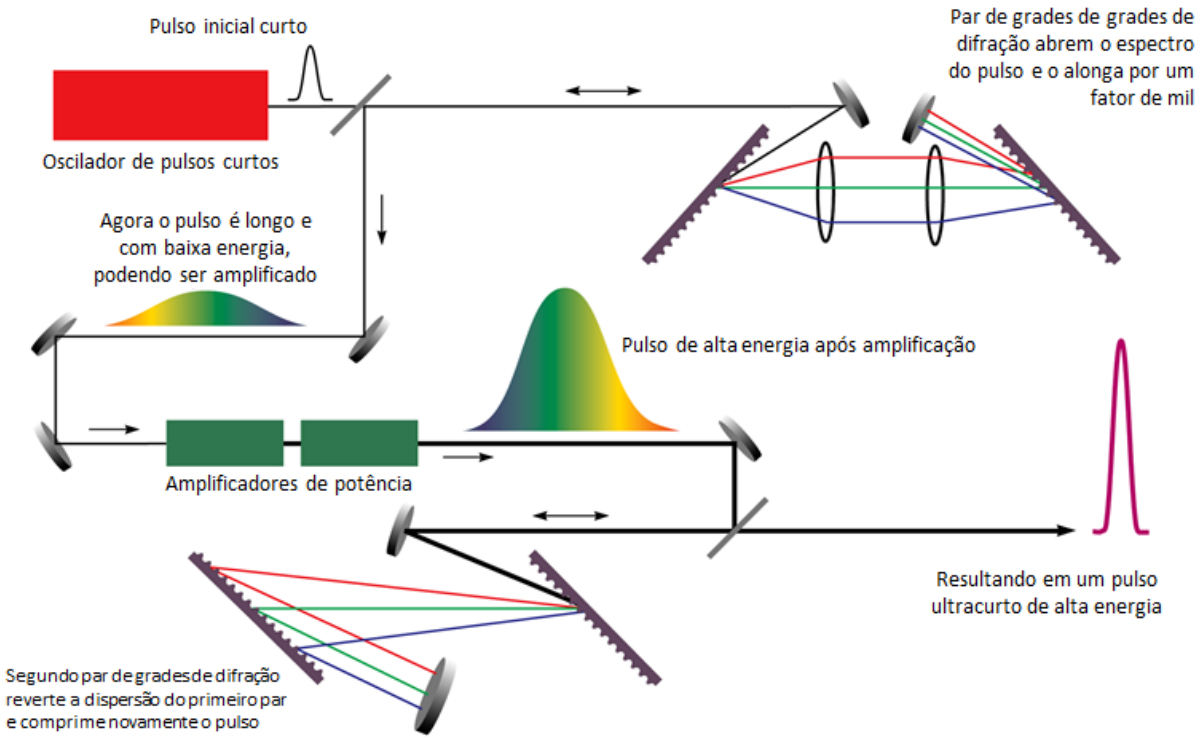

Figura 14 - Esquema de amplificação de pulsos curtos
Fonte: Adaptada de PERRY. (28)

Capítulo 4

Interação da radiação com a superfície:

os plasmons de superfície

4.1 Bases físicas/matemáticas

Os plasmons decorrem da oscilação coletiva dos elétrons de condução, este efeito recebe o nome de Ressonância dos Plasmons de Superfície, ou, do inglês, Surface Plasmon Resonance (SPR). O efeito ocorre na superfície devido à oscilação coletiva dos elétrons do metal devida à polarização destas cargas superficiais. O termo plasmon vem como uma analogia aos plasmas gasosos, onde também ocorre a oscilação coletiva dos íons, mas neste caso, dos elétrons do metal. Quando o efeito ocorre confinado em uma nanoestrutura, o efeito é denominado Ressonância Localizada dos Plasmons de Superfície (LSPR). A Figura 15 apresenta o efeito de oscilação das cargas no efeito de LSPR. (29)

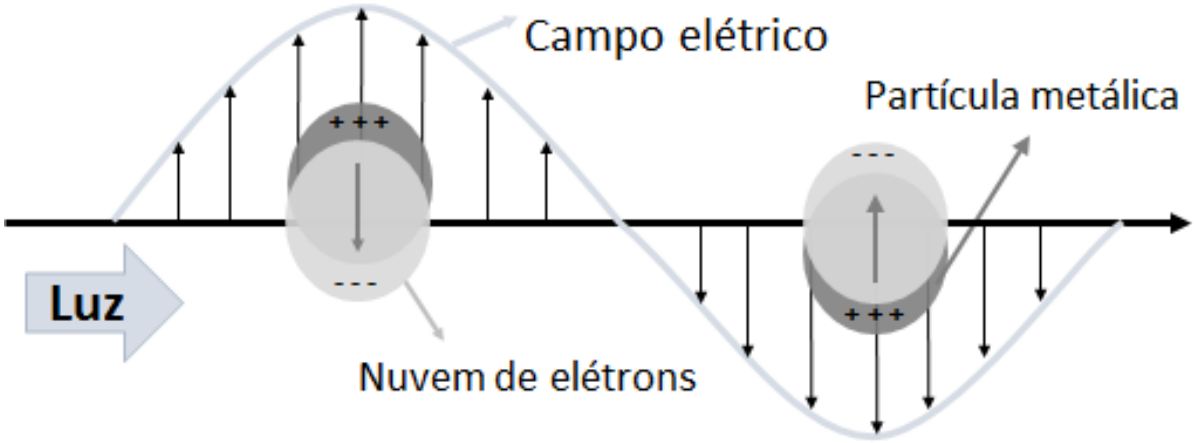

Figura 15 - Representação do efeito de LSPR em nanopartículas metálicas
Fonte: Elaborada pelo autor

Plasmon de superfície são o resultado do aumento do campo elétrico local sobre estruturas em escalas nanométricas devido à excitação por alguma fonte de

radiação. Devido à interação com a radiação, o material pode brilhar, ressoar ou se tornar uma forte fonte de luz. (30)

4.2 Plasmons em nanoestruturas metálicas

Na interação entre um fluoróforo e um sistema plasmônico, como são os LIPSS no metal, o aumento da fluorescência vem da maior taxa de excitação devido ao maior campo local percebido pelo fluoróforo, devido ao aumento de eficiência de acoplamento entre a emissão de fluorescência e o campo através do espalhamento da nanoestrutura, e com a modificação das taxas de decaimento radiativo da molécula. Por outro lado, há certa perda de energia para o metal, o que contrabalanceia o efeito observado. Este aumento de excitação pode ser otimizado pela sobreposição entre a extinção molecular e a absorção do plasmon, maximizando aumento da emissão pela sintonização do plasmon com a emissão do fluoróforo. (18)

4.3 Estruturas periódicas induzidas por laser

Estruturas superficiais periódicas induzidas por laser, do inglês Laser-Induced Periodic Surface Structures (LIPSS), surgem da interação entre um laser de alta intensidade com uma superfície atingida por ele. Estes LIPSS podem ser formados em diversos materiais expostos ao laser, sendo normalmente menores que a ordem de micrômetros. Eles podem ser formados tanto com lasers contínuos, como em lasers pulsados, a exemplo, lasers no domínio de femtossegundo. A periodicidade de estruturas deste tipo é relacionada com o comprimento de onda do laser utilizado, bem como a direção das mesmas ser ortogonal à polarização deste laser, que é resultado da interação destes com a superfície rugosa do material. (32)

A formação de LIPPS no material pode ser descrita, com certas limitações, pela teoria de Sipe. Quando há uma rugosidade na superfície do material de altura inferior ao comprimento de onda de uma radiação de alta energia que incide sobre ele, a interação entre o campo elétrico incidente e a superfície gera a absorção inomogênea de energia logo abaixo da região rugosa, o que surge uma polarização

com frequência similar à do campo incidente e gera um padrão de interferência, quando esta radiação está próxima ao limite de dano. (33)

Quando se irradia um material com um laser, as ondas eletromagnéticas interagem com o material. A radiação que é absorvida pela superfície energiza os elétrons livres (elétrons de condução) e causa colisões entre eles, gerando ionização. Quando a energia irradiada é grande, o material é fragmentado, até a densidade de plasma. Com estes feixes de alta intensidade, o *breakdown* óptico na superfície se torna um efeito relevante, em conjunto com os efeitos térmicos do pulso do laser. Este plasma gerado por pulsos curtos de alta energia facilita a deposição deslocalizada de energia, ocorrendo abaixo da densidade crítica de elétrons. (34)

A interação entre elétrons e fônons é bastante importante para a micro estruturação de superfícies. Quando um metal possui uma grande constante de acoplamento elétron-fônon (e-ph), a energia é transferida de forma muito mais rápida dos elétrons para a rede cristalina em relação à materiais com esta constante menor, e também há significantemente menos calor transferido para o interior do material com constantes de e-ph maiores. Com isto, a energia absorvida é acumulada próxima da superfície do material e aumento da hidrodinâmica do metal derretido, o que leva às estruturas superficiais induzidas pelo laser. (20)

4.4 Criação de nanoestruturas

As Estruturas Superficiais Periódicas Induzidas por Laser (LIPSS), do inglês *Laser Induced Periodic Surface Structures*, são estruturas criadas em superfícies com frequência bem definida, elas podem ser observadas quando uma superfície é exposta a pulsos ultracurtos de laser. No processo, quando o pulso atinge o metal, os elétrons da superfície absorvem esta energia, enquanto a estrutura metálica se mantém na temperatura inicial, ou seja, o sistema agora apresenta duas temperaturas distintas, com os elétrons na temperatura de um elétron volt (aproximadamente $10^4\ K$) e a estrutura à temperatura ambiente, o que faz com que o sistema tende ao equilíbrio térmico, e este equilíbrio ocorre na ordem de picossegundos. Se a energia transferida do pulso para o material é grande o bastante, o metal irá fundir e manter-se neste estado na ordem de nanossegundos,

e a profundidade da superfície afetada é da ordem de nanômetros. No processo de resolidificação, o metal passa por uma auto-organização e estruturas com os padrões em nanoescala são formadas. (35)

Um laser femtossegundo possui de intensidade, por pulso, da ordem de $I_{lp} \sim TW/cm^2$, logo, os efeitos sobre os materiais são descritos pela óptica não-linear, dada a alta intensidade. Quando consideramos o campo elétrico interatômico, com energia dos elétrons como $e = 1{,}6 \times 10^{-19} C$, num raio atômico de $r \sim 4\,\text{Å}$, obtemos a intensidade do campo da ordem de $E_{ia} \sim 1 \times 10^8 V/cm$. Para um laser pulsado com intensidade I_{lp}, e usando a função pra intensidade do campo $I = \frac{1}{2} cn\varepsilon_0 E_0^2$, com c a velocidade da luz no vácuo, n o índice de refração e ε_0 a permissividade elétrica no vácuo, obtemos uma intensidade de campo elétrico do laser da ordem de $E_0 \sim 1 \times 10^9 V/cm$. Dada mesma ordem de grandeza do camo do pulso e do material, a interação radiação-matéria gera a polarização da superfície, e a frequência desta polarização é relacionada com a do laser utilizado. (27)

Capítulo 5

O Uso de Metais Preciosos:

procedimentos realizados e resultados da preparação

5.1 Características específicas

Metais preciosos são muito bem conhecidos por sua ductibilidade, maleabilidade e condutibilidade, entretanto, são extremamente macios e difíceis de trabalhar. Em relação às propriedades físicas, esses metais são importantes para o desenvolvimento de sistemas com plasmons, uma vez que possuem condutividade elétrica e térmica bastante altas, tornando possível o uso para MEF.

5.2 Prata

A prata é o metal com maior condutividade térmica e elétrica, e também apresenta diversas vantagens em comparação a outros metais para o uso em plasmônica, sendo um dos mais importantes metais para a área, uma vez que para o uso do metal para os plasmons de superfície é importante escolher um material que possa manter os plasmons de superfície de alta intensidade no comprimento de onda desejado, e a prata o faz na faixa de 300 a 1200 nm, sendo a permissividade dielétrica de um material que determina como será a interação entre seus elétrons e a luz. (36)

A estrutura cristalina da prata é a cúbica de face centrada (CFF), com tamanho de 4,086 Å, por ter esta estrutura, cada célula unitária contém 4 átomos e um número de coordenação 12, e isto pode ser verificado na Figura 16. (37)

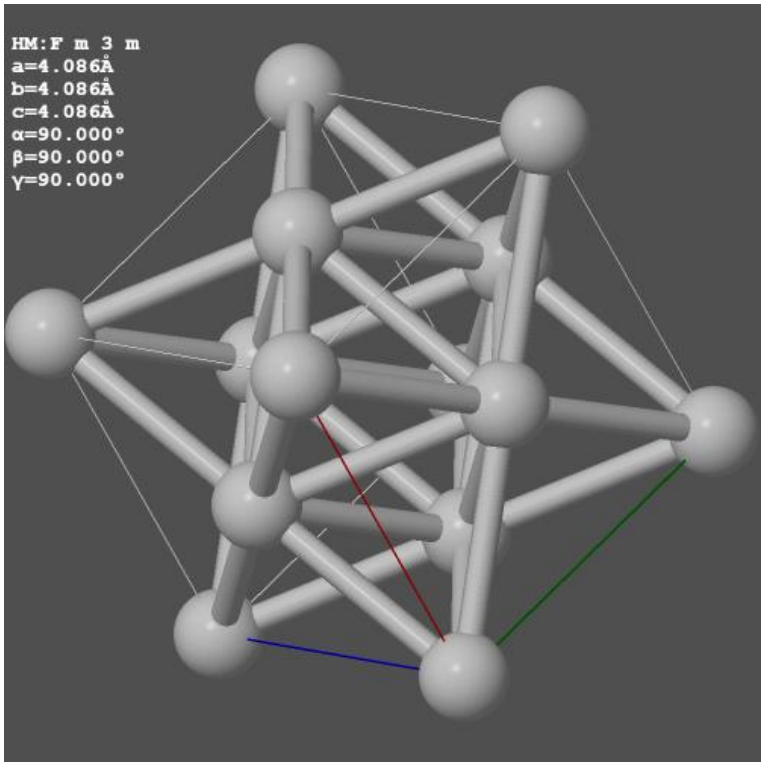

Figura 16 - Estrutura cristalina da prata
Fonte: DOWNS; HALL-WALLACE (37)

5.3 Metalografia

A prata, pelo fato de ser um metal nobre, é um material bastante mole e difícil de polir, sendo suscetível a danos quando cortada para preparação, além da grande tendência a incorporar os abrasivos utilizados. Por estas dificuldades, a metodologia empregada foi a recomendada por Voort para metais preciosos. (38)

5.4 Procedimentos utilizados na preparação da superfície

5.4.1 Prata pura

O material utilizado para os procedimentos foram placas de prata pura. As amostras foram adquiridas sem polimento em placas de 1 mm de espessura. Foram cortadas em placas menores de aproximadamente 1,25 por 1,25 mm, para melhor aproveitamento da superfície e maior facilidade de processamento.

5.4.2 Metalografia

5.4.2.1 Processo de Embutimento

As placas cortadas foram embutidas em baquelite com a embutidora BUEHLER SIMPLIMET XPS1 do Departamento de Engenharia de Materiais da Escola de Engenharia de São Carlos - USP. As baquelites foram feitas com aproximadamente 6 mm de espessura, de modo a facilitar o polimento.

Ao total, foram preparadas 10 amostras de aproximadamente 12x12 mm cada, de prata de um milímetro de espessura embutidas, para ser possível a variação de diversos parâmetros diferentes de marcação nas diversas amostras. A Figura 17 apresenta três das placas já embutidas.

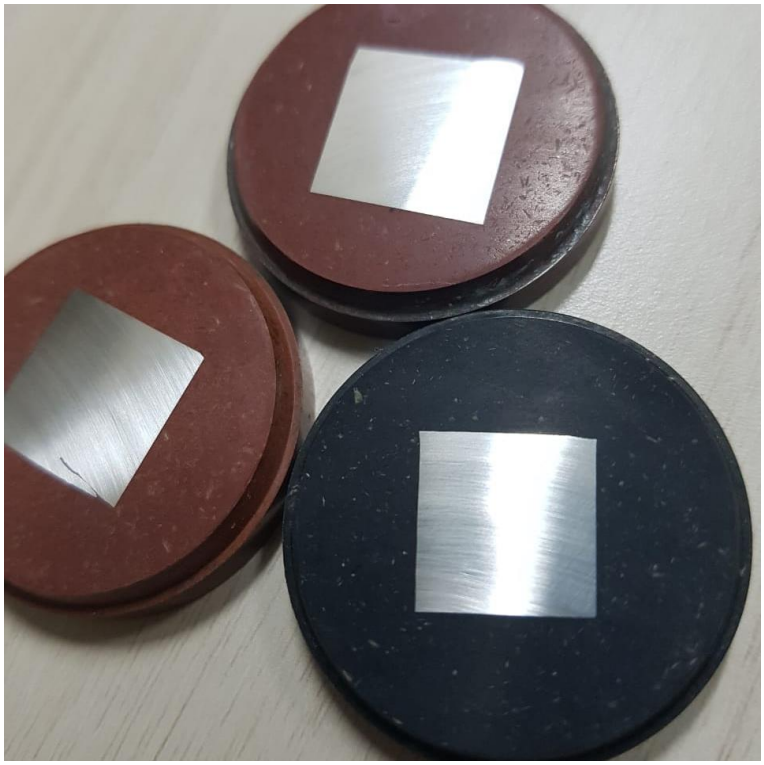

Figura 17 - Placas de prata embutidas
Fonte: Elaborada pelo autor

5.4.2.2 Processo de Polimento

Todas as amostras passaram pelas mesmas etapas de polimento, de forma a garantir melhor padronização das medidas. Para preparação da superfície, foi

iniciado o polimento com lixas de granulações 800, 1200, 1500, 2000 e 2500. Após a finalização, foi feita a análise de riscos com microscópio óptico. Anteriormente ao polimento, as placas apresentaram grande quantidade de riscos, como apresentado na Figura 18, sob observaçã ocom aumento de 10 vezes.

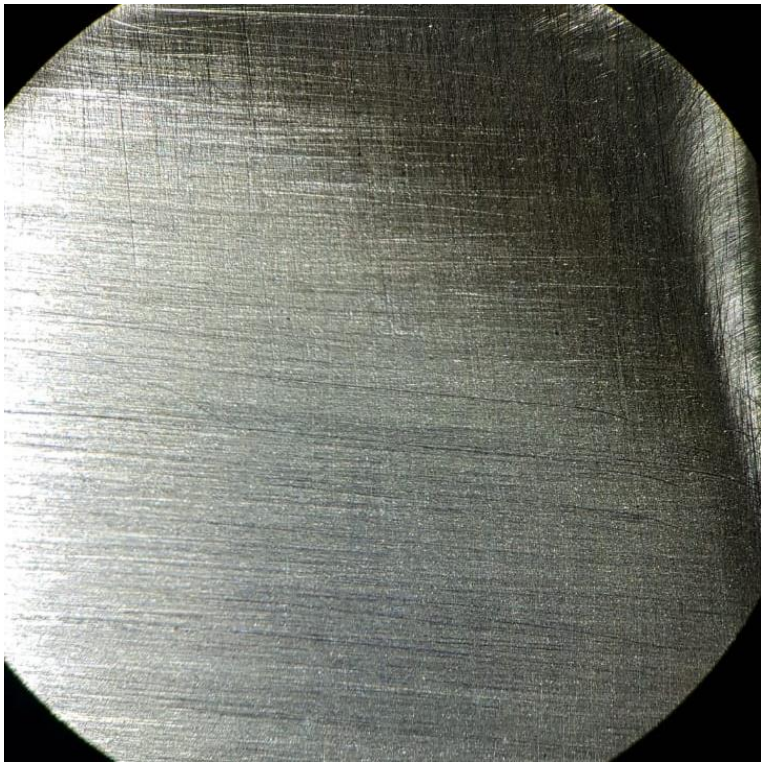

Figura 18 - Observação na lupa de placa de prata embutida antes do polimento
Fonte: Elaborada pelo autor

Verificado um padrão nos riscos formados, foi então iniciada a etapa de finalização, onde foram utilizadas pastas de diamante para polimento de amostras metalográficas. O polimento do material é realizado utilizando-se materiais com dureza de ao menos 2,5 a 3 vezes a do material em questão. Como a prata é um material mole com dureza de 251 HV na escala Vickers de dureza, são utilizados materiais como pasta de diamante (8000 HV) ou óxido de alumínio (alumina, 2000 HV) para realizar o polimento. A Figura 19 mostra a placa após a primeira etapa de polimento com lixas, com os riscos alinhados por toda a superfície, apresentada com aumento de 5 vezes.

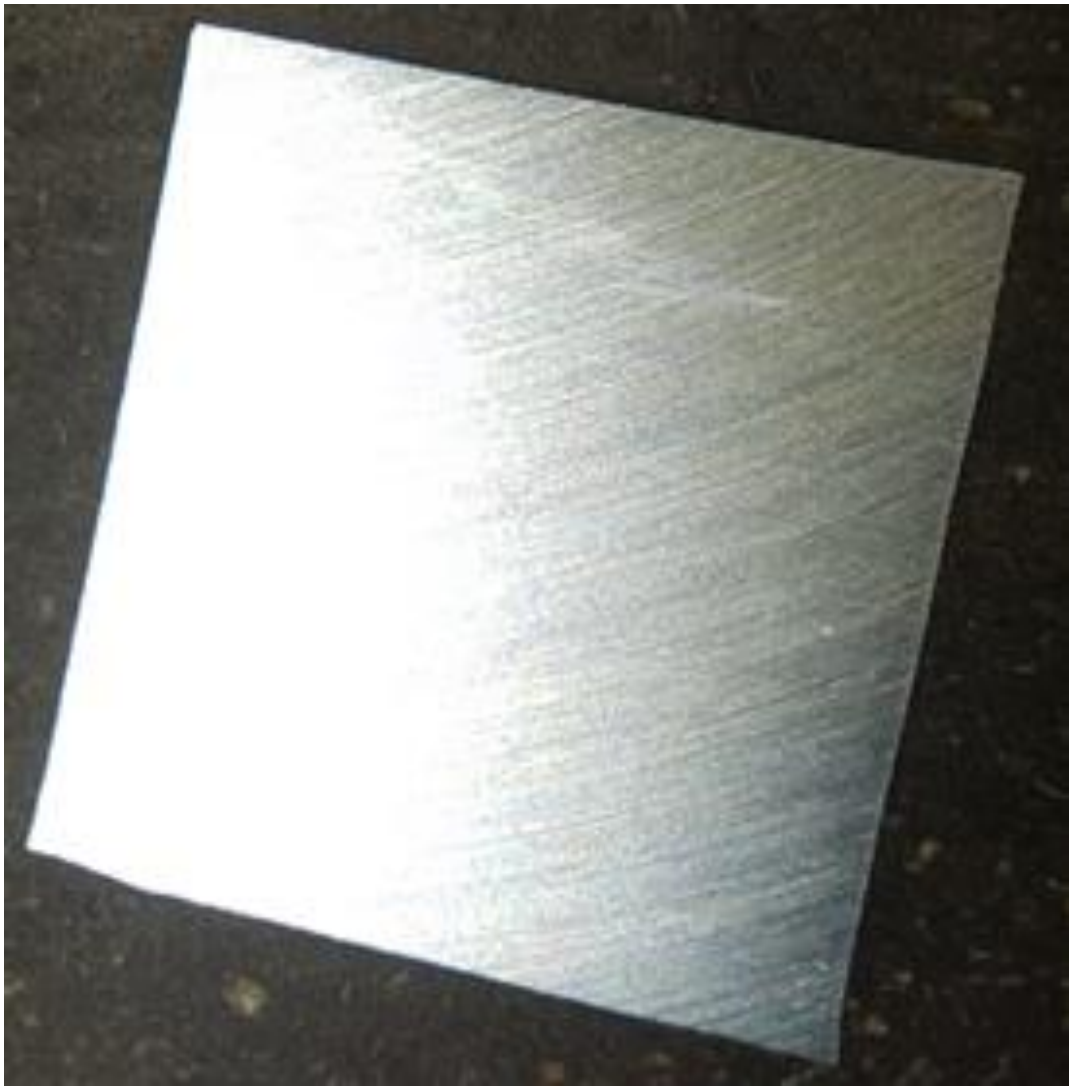

Figura 19 - Placa de prata embutida após polimento por lixa granulação 2000
Fonte: Elaborada pelo autor

A primeira etapa é feita com pó de diamante monocristalino com granulações de 9 e 3 mícrons e então aluminas de 1 µm e 0,05 µm. Este processo foi realizado sobre panos de dureza média para polimento metalográfico confeccionado em lã twill com fibra sintética macia correspondentes com os materiais utilizados. As pastas de polimento e panos foram fornecidos pela Arotec Indústria e Comércio LTDA.

O processo de polimento foi realizado na Oficina de Óptica (FCM) do Instituto de Física de São Carlos, com o uso de matrizes de polimento e politrizes, além de suportes criados por impressão 3D para os panos de polimento, de forma a se obter as melhores superfícies possíveis.

5.4.2.3 Finalização

Após o polimento, as amostras foram limpas utilizando banho ultra sônico com etanol absoluto para a remoção de resíduos que poderiam influir na marcação da mesma. Para a limpeza foi usado 5 minutos de sonicação à 40 ºC.

5.5 Análise das Superfícies: Técnicas Empregadas

5.5.1 Microscopia óptica

A primeira análise a ser feita com as amostras é a visual, verificando a presença ou não de riscos após o polimento, assim como os resultados das marcações. Para esta análise foi utilizada uma lupa ZEISS para aumento de até 40 vezes das regiões marcadas.

5.5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura permite a visualização e caracterização de materiais em escalas nanométricas ou micrométricas com alta resolução, possibilitando obter imagens de superfície com aparência tridimensional. As imagens por MEV são obtidas pelo bombardeamento da amostra em análise por um feixe de elétrons, e esta interação pode gerar elétrons secundários, retroespalhamento de elétrons, raios-x característicos e emissão de fótons em diversas energias. Tanto os elétrons secundários quanto o retroespalhamento deles são os principais responsáveis pelas informações de topografia da superfície. (39)

As análises por microscopia eletrônica feitas para o presente trabalho foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise - LMEA - do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (IFSC-USP) no Microscópio eletrônico de varredura ZEISS modelo SIGMA. A utilização da microscopia é utilizada para a determinação da regularidade das marcações assim como a periodicidade e o tamanho das nanoestruturas geradas. Também é possível com a técnica a verificação de artefatos sobre a amostra e irregularidades na superfície.

5.5.3 Espectroscopia de Raios X por dispersão de energia (EDX)

Assim como na Microscopia eletrônica de varredura, a técnica de EDX utiliza um feixe de elétrons para bombardeio da amostra, e a geração de raios-X da interação do feixe com a amostra gera informações de sua composição. (39) O equipamento utilizado para as medidas foi o Microscópio eletrônico de varredura ZEISS modelo SIGMA do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise - LMEA - do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (IFSC-USP). A técnica foi importante para a verificação da alteração da composição da superfície devido à oxidação ou interação do material da amostra (prata) com o ar (oxigênio) ou o jato de gás (nitrogênio).

5.5.4 Microscopia de Força Atômica (AFM)

A Microscopia de Força Atômica foi utilizada para mensurar a amplitude gerada nas nanoestruturas formadas na superfície. Para tanto, o equipamento utilizado foi o Microscópio de força atômica (Bruker Dimension ICON; silicon tips, cantilever spring constant 40 N m^{-1}) do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (IFSC-USP).

5.6 Resultados da Preparação da Superfície

Após o polimento da superfície de prata, as amostras foram analisadas pelas técnicas de microscopia de força atômica e microscopia eletrônica de varredura. As Figura 20 e 21 apresentam as medidas por AFM e MEV, respectivamente, de placas de prata já polidas, apresentando riscos inferiores a 300 nm, com a indicação de que estes não afetarão a criação de nanoestruturas de interesse. Nas medidas dos riscos utilizando o AFM foram verificados riscos da ordem de 0,3 µm. Estas medidas foram feitas utilizando o software Gwyddion 2.48.

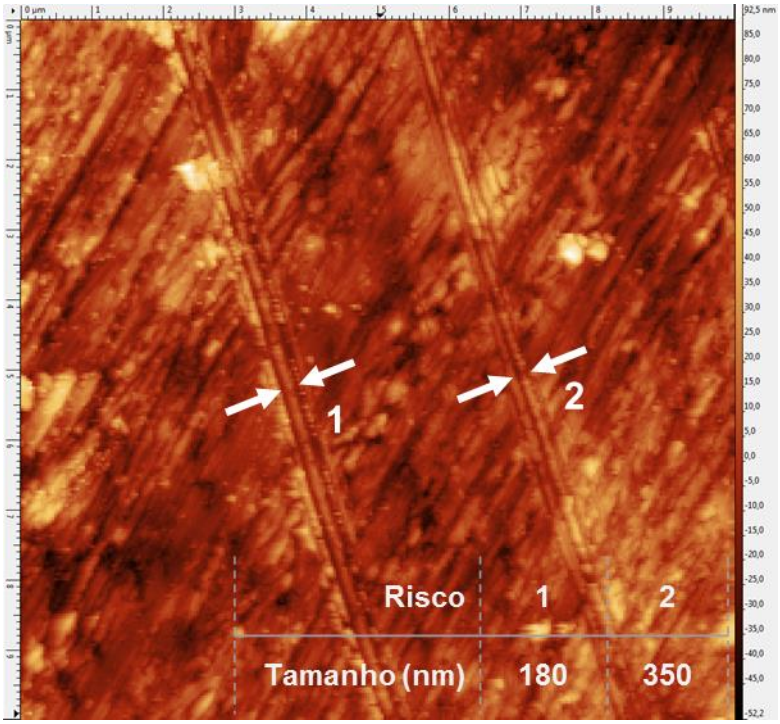

Figura 20 - Análise por AFM de placa de prata polida, indicando os riscos presentes
Fonte: Elaborada pelo autor

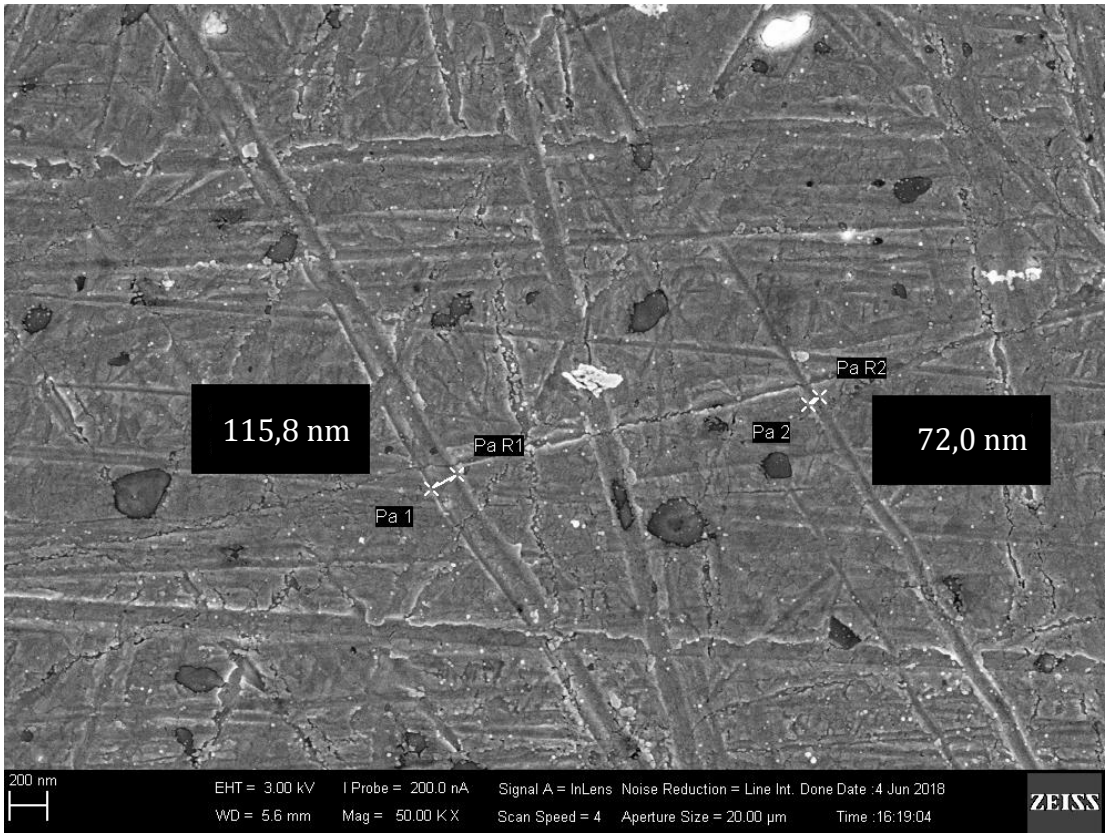

Figura 21 - Análise por MEV de placa de prata polida, indicando os riscos presentes
Fonte: Elaborada pelo autor

Capítulo 6

Marcação à Laser:

procedimentos realizados e resultados para a criação de nanoestruturas

6.1 Características do laser utilizado

Para realização das marcações, foi utilizado o Laser Libra femtossegundo Ti:Saphira da Coherent com frequência de 1 kHz. A Figura 22 apresenta o espectro de emissão do laser utilizado, variando de 785 nm à 815 nm, com máximo em 802 nm. Para a realização da marcação, as amostras foram colocadas sobre suporte com controle de distância. As especificações do laser são apresentadas nas Tabela 1 e Tabela 2.

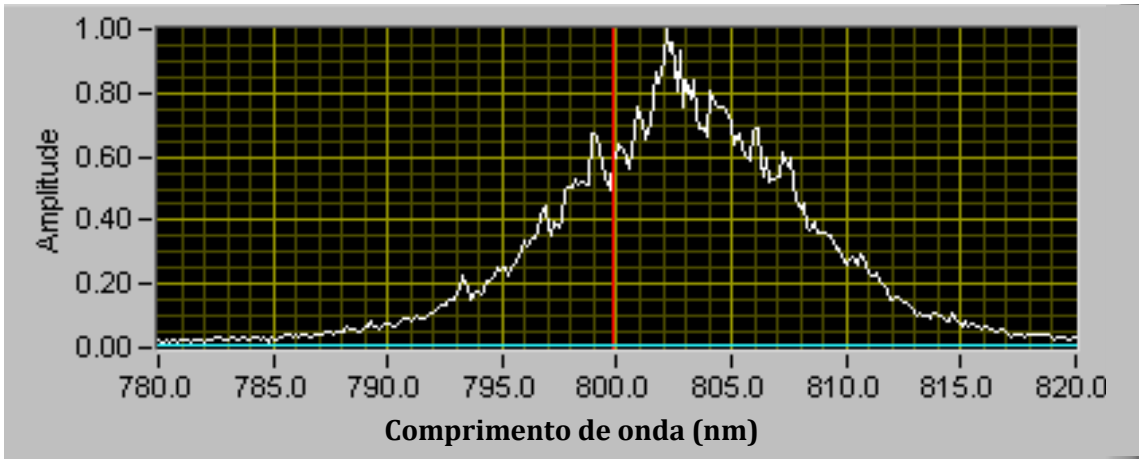

Figura 22 - Banda de emissão do laser Ti:Saphira utilizado
Fonte: Adaptada do espectro fornecido pelo software que acompanha o equipamento

A potência de saída utilizada para todas as marcações foi de 450 mW. O controle dos parâmetros da marcação foram determinados pelo software EZCAD, sendo possível determinar as formas usadas para marcar as amostras, o tamanho

das marcações, formas de preenchimento e parâmetros que implicam diretamente no resultados da marcação.

Tabela 1 - Características de saída do laser Ti:Safira utilizado

Características de Saída	
Taxa de repetição	1 KHz
Largura de pulso	< 100 fs
Potência média	> 1.0 watts
Energia por pulso	> 1.0 mJ
Janela de comprimento de onda	780-820 nm comprimento de onda central determinado de fábrica
Taxa de contraste	Pré pulso >1000:1 Pós pulso > 100:1
Diâmetro do Feixe	6 mm
Estabilidade de energia (+/-%p/p)	< 1% RMS

Fonte: Elaborada pelo autor

Tabela 2 - Características da cabeça de controle do laser Ti:Safira utilizado

Dimensões da cabeça do laser	
Tamanho (LxWxH)	44 x 24.31 x 10.4 in 111.8 x 61.7 x 26.4 m
Peso	400 lbs.
Comprimento	10 ft (3 m)

Fonte: Elaborada pelo autor

6.2 Processos de variação de parâmetros realizados

6.2.1 Variação da distância da amostra ao foco

Paras a verificação dos efeitos do laser sobre a superfície, foi variada a distância entre a amostra e o foco do laser. Esta distância determinou o tamanho do spot do laser e como a energia é distribuída em cada pulso. Quanto mais próximo do foco, menor o spot e mais concentrado o laser, aumentando os efeitos sobre a amostra. Quanto mais distante, menor o spot e também menor a energia transferida para o material. Esta diferença de tamanho e energia de spot, devido à distância, determina a sobreposição dos pulsos em cada região da amostra, implicando diretamente nos efeitos que são observados na mesma. A Figura 23 apresenta um esquema da variação da posição da amostra em relação à posição do foco do laser.

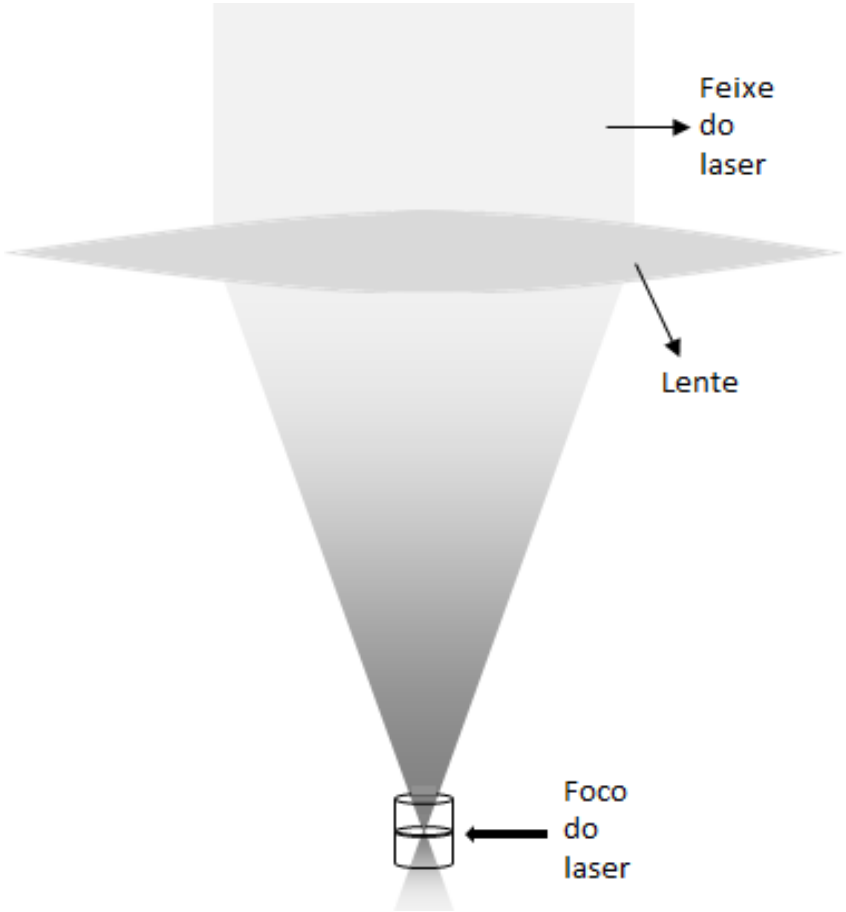

Figura 23 - Esquema do posicionamento da amostra em relação à distância ao foco do laser
Fonte: Elaborada pelo autor

Na Figura 24 pode-se verificar o efeito da variação da distância da amostra ao foco do laser e a influência da mesma sobre a amostra. Quando em a) a amostra está mais afastada, o spot é maior e a energia em cada pulso é menor, mas a sobreposição de pulsos é maior. Já quando a amostra é aproximada do foco (c), há concentração maior de energia na região atingida, mas há menor sobreposição de pulsos consecutivos. As distâncias utilizadas variaram da amostra sobre o foco até 5 mm de distância do mesmo.

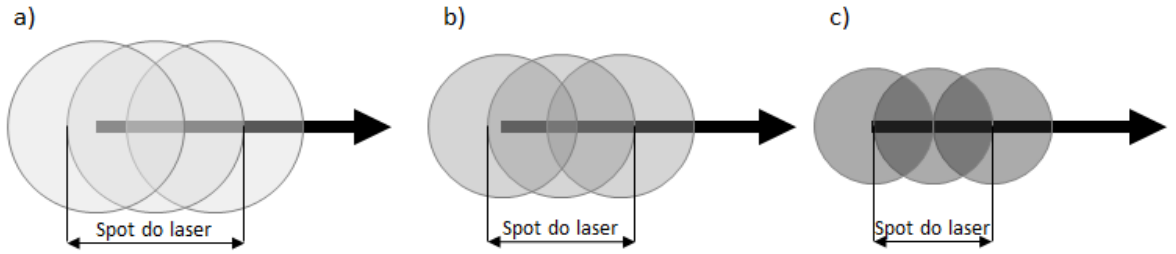

Figura 24 - Esquema do efeito do laser sobre a superfície de acordo com a distância da amostra ao foco do laser

Fonte: Elaborada pelo autor

6.2.2 Variação da velocidade de marcação

Um dos parâmetros fundamentais na determinação dos padrões observados é a velocidade de marcação. Esta velocidade de varredura determinou o quão sobrepostos estavam os pulsos consecutivos. Quanto maior a velocidade, menor a sobreposição dos mesmos, e quanto menor a velocidade, mais sobrepostos eles estarão. Na Figura 25 pode ser observada a diferença da quantidade de pulsos quando a velocidade em (a), onde na região central dos pulsos apresenta 5 pulsos sobrepostos, é dobrada em (b) e a mesma região apresenta 10 pulsos sobrepostos. As velocidades utilizadas para marcação foram variadas de 1 mm/s à 8.000 mm/s.

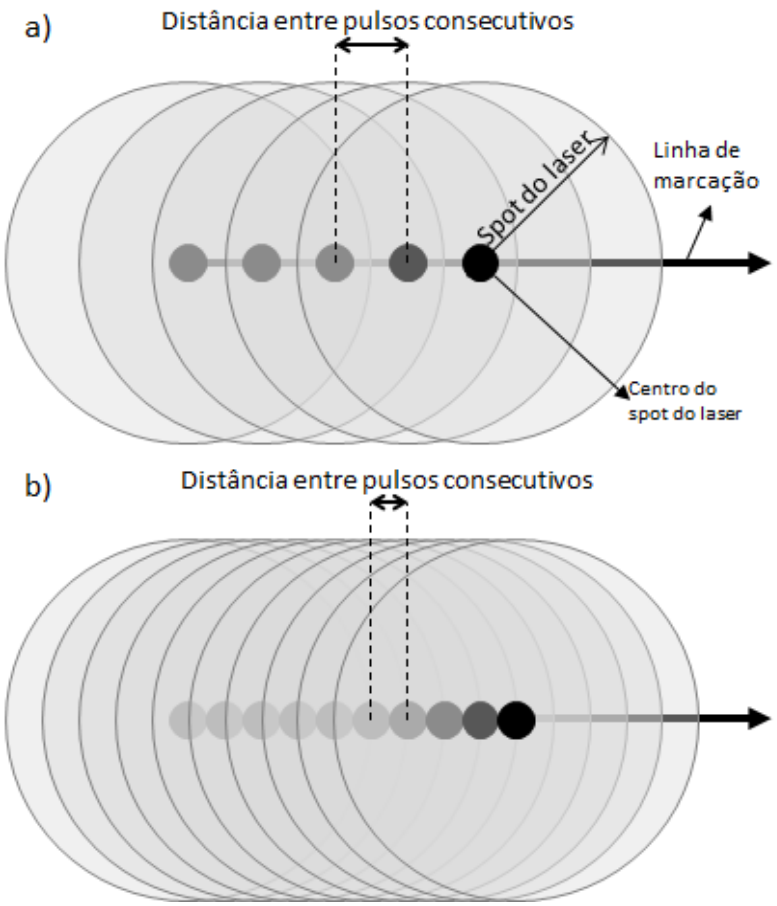

Figura 25 - Esquema representativo da sobreposição horizontal dos spots do laser de acordo com a alteração da velocidade

Fonte: Elaborada pelo autor

6.2.3 Variação da distância entre linhas

Outro parâmetro determinante do resultado da marcação foi a distância entre linhas consecutivas de marcação. Esta distância indica o grau de sobreposição no sentido perpendicular à velocidade. Quanto menor este distanciamento, maior a energia transferida para a região do laser. Na Figura 26, a região em destaque ilustra a sobreposição devida aos pulsos que ocorrem do percurso do laser pela linha de marcação. Esta distância pode ser variada a partir de 0,0001 mm, e a máxima utilizada foi de 0,1 mm.

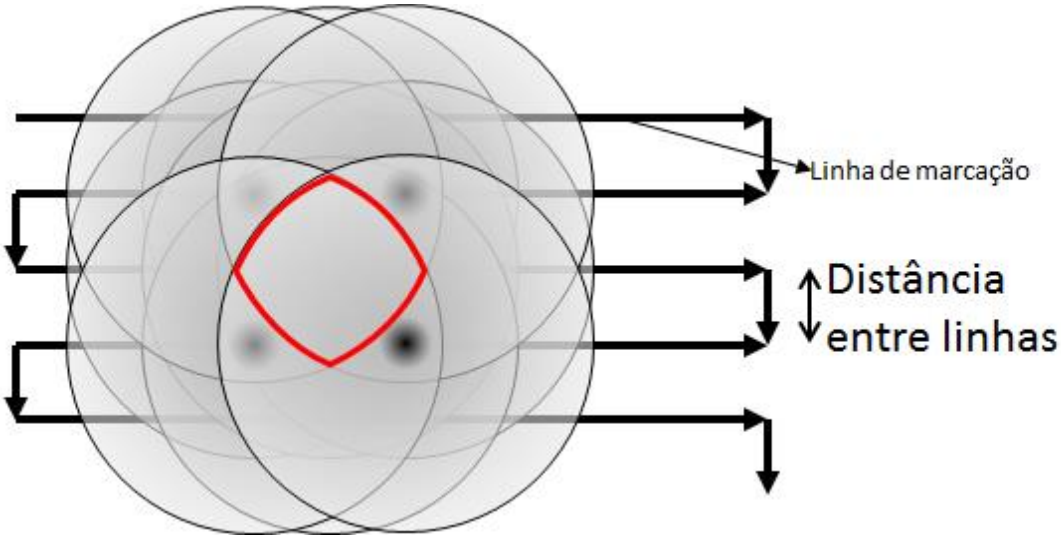

Figura 26 - Esquema representativo da sobreposição vertical e horizontal de spot do laser de acordo com a alteração da distância entre linhas de marcação

Fonte: Elaborada pelo autor

6.2.4 Alteração na quantidade de varreduras do laser

Além da velocidade e distanciamento entre as linhas, foi possível aumentar o número de varreduras sobre a marcação, que representa a quantidade de vezes que o laser varre a amostra toda para realizar a marcação desejada pela mesma linha de marcação. Aumentar o número de varreduras aumenta a energia que é transmitida para a superfície, tendo maior amplificação dos efeitos de alteração do material. Para a maior parte das marcações, foi utilizada apenas uma varredura do laser.

6.2.5 Testes de marcação em linhas

Utilizando os parâmetros citados, foi realizada a marcação em uma única linha, variando-se a quantidade de repetições realizadas. Esta repetição implica em remoção de grandes quantidade de material de uma determinada região, o que gera fissuras sobre as superfícies, delimitadas pelo tamanho do spot do laser utilizado. Foram feitas marcações variando-se de 1 a 1000 repetições sobre a mesma região da amostra. As linhas tinham 0,5 cm em tamanho e estavam a cerca de 0,5 mm de distância umas das outras, de forma a não se observar proximidade entre os efeitos nos arredores sobrepondo as marcações.

6.2.6 Marcação com jato de gás

Além da marcação à laser direta sobre as amostras, foi realizada a marcação combinada com jato de gás não-reagente (nitrogênio gasoso - N_2) para verificar a formação de nanoestruturas soltas sobre a superfície e que ficariam suspensas até a resolidificação sobre a mesma. Portanto, o gás foi soprado no fluxo de $3\,L/min$, mantendo este fluxo constante sobre a região que estava sendo marcada.

Com este jato, espera-se a formação de um rastro na direção oposta a ele composto pelas partículas soltas formadas durante a marcação. Assim, com este procedimento, as marcações nesta modalidade foram feitas de forma que o rastro de partículas não fossem depositadas sobre outras marcações.

6.2.7 Finalização e limpeza das amostras

Após realizada as marcações, as placas foram limpas com etanol absoluto em banho ultrasônico por cerca de 5 minutos e armazenadas em ambiente fechado até a realização das análises. Apenas as amostras marcadas com jato de ar não foram limpas antes das análises, uma vez que era esperada a presença de partículas soltas sobre a superfície e o processo as removeria.

6.3 Resultados da marcação à laser

As superfícies já polidas foram submetidas à marcação à laser. Nas amostras utilizadas, foram variados os parâmetros possíveis (distância ao foco, velocidade de varredura, distância entre linhas e número de varreduras), de forma a se obter a melhor combinação dos mesmos, além de se testar a variação da distância da amostra ao foco e verificar os efeitos sobre a superfície e tamanho do spot do laser, assim como diferentes formas de marcação.

6.3.1 Alteração da distância ao foco

Realizando-se a marcação de linhas com apenas uma varredura do laser, e variando-se a distância da amostra ao ponto de foco do laser, foi constatado que

quanto mais próximo do foco, menor o spot do laser devida à junção dos raios do laser, aumentando a energia transferida para aquela região da amostra e consequentemente maiores são os efeitos sobre o metal. Os resultados do tamanho da região marcada de acordo com a distância ao foco podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3 - Variação do tamanho do spot do laser em relação à distância da amostra ao foco

Amostra	Distância ao Foco (mm)	Tamanho do Spot (μm)
L01	2	37,4
L02	1,8	34,39
L03	1,6	34,39
L04	1,4	31,14
L05	1,2	29,91
L06	1	26,96
L07	0,8	27,07
L08	0,6	25,95
L09	0,5	24,14
L10	0,4	24,3
L11	0,3	23,12
L12	0,2	23,83
L13	0,1	22,18
L14	0	21,35
L15	-0,1	19,05
L16	-0,2	20,23
L17	-0,3	17,52
L18	-0,4	16,22

Fonte: Elaborada pelo autor

A Figura 27 apresenta a curva obtida das medidas, com uma linha de tendência para os pontos obtidos. Esta linha foi utilizada para determinar o tamanho do spot do laser em cada situação em que a distância da amostra ao ponto focal tenha sido alterada.

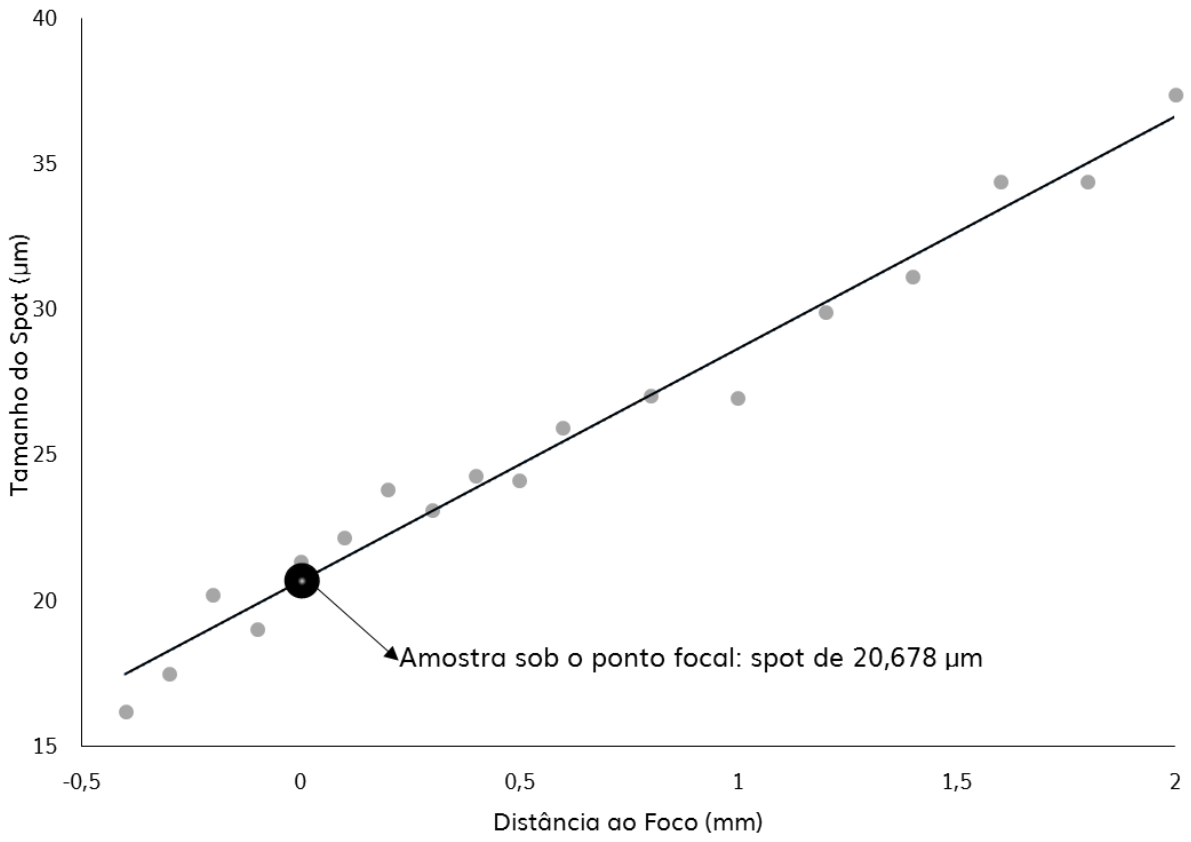

Figura 27 - Variação do tamanho do spot do laser em relação à distância da amostra ao foco
Fonte: Elaborada pelo autor

Foi realizada a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das linhas feitas, onde pode ser observada a variação da espessura das marcas de acordo com a distância da amostra ao foco. Estas marcas podem ser verificadas na Figura 28. O resultado segue o esperado: quanto maior a proximidade da amostra ao foco do laser, menor o tamanho da marcação devido à maior convergência dos feixes, levando a uma transmissão de energia mais concisa e em uma região menor. Na imagem 14 da Figura 28 vemos o perfil apresentado com a amostra sobre o foco do laser. Quando extrapolamos o limite da superfície e posicionamos a amostra de forma ao foco do laser se localizar dentro da amostra, vemos um efeito superficial menos uniforme e marcações irregulares, que não puderam ser medidas com muita precisão (imagens 15-18 da Figura 28).

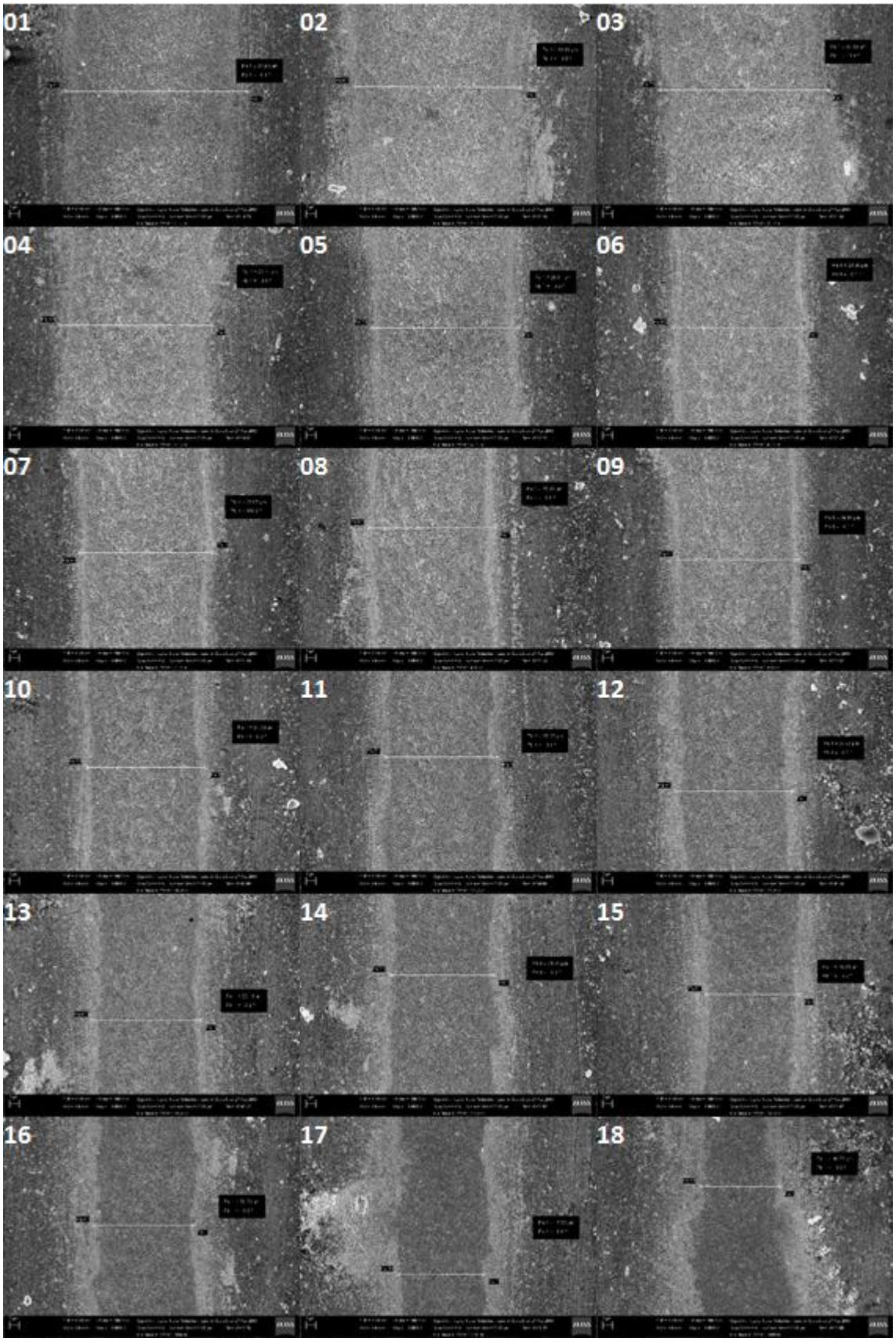

Figura 28 - Imagem de MEV de linhas marcadas variando-se a distância da superfície ao foco do laser
Fonte: Elaborada pelo autor

Para distâncias maiores que 2 mm, as marcas apresentadas tiveram tão pouco efeito sobre o metal que não foi possível realizar a medida das mesmas. A maioria das marcações foi feita com a amostra sobre o foco e o spot do laser considerado foi de 20,678 µm.

6.3.2 Parâmetros de baixa intensidade

Foi utilizado parâmetros de maior distância entre amostra e foco do laser, maior distância entre linhas ou menor velocidade, com isso houve a formação de estruturas periódicas no metal, que podem ser observadas diretamente pela coloração da região marcada, onde a luz é difratada devido à presença das nanoestruturas, conforme visto na Figura 29, tanto a olho nu quanto pela utilização de lupas. Nestas amostras, os parâmetros utilizados foram conforme a Tabela 4, todas com apenas uma varredura do laser.

Tabela 4 - Parâmetros utilizados na marcação das amostras com baixa intensidade

Amostra	Velocidade (mm/s)	Distância entre linhas (mm)	Distância ao foco (mm)	Tamanho do spot do laser* (µm)
a	5	0,005	1,5	32,64
b	5	0,0005	1	28,65
c	1	0,001	1	28,65
d	1	0,0001	1	28,65

** Valores calculados a partir da linha de tendência obtida na Figura 27*

Fonte: Elaborada pelo autor

Na Figura 29 vemos uma mesma amostra (apresentada no canto inferior direito) apresentando as diferentes cores observadas com diferentes ângulos de iluminação. Estas imagens foram tiradas com auxílio de lupa de aumento e ponte de iluminação LED com diferentes ângulos de incidência.

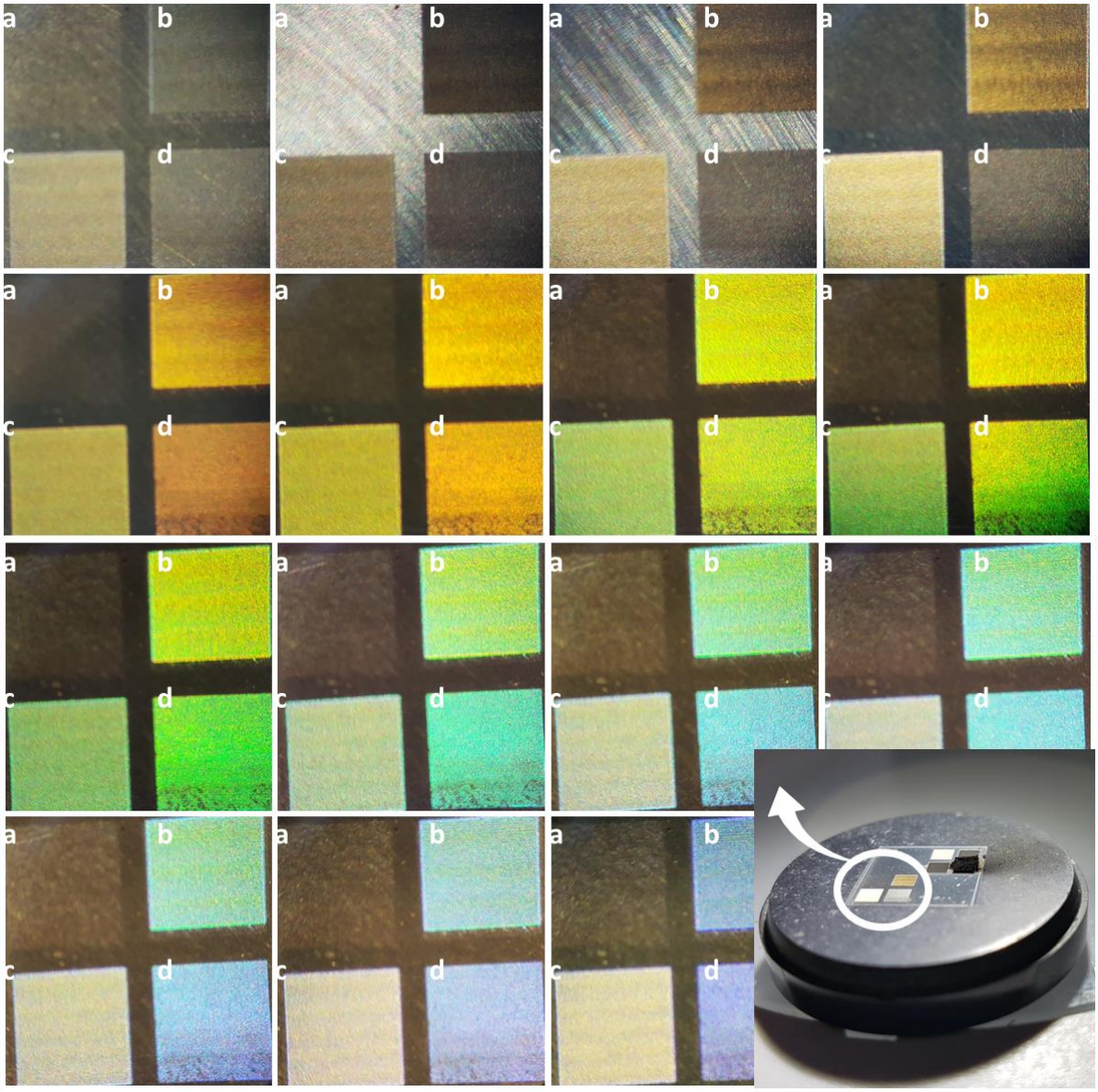

Figura 29 - Imagens da variação de cores devido à difração da luz de placa marcada com parâmetros de baixa intensidade

Fonte: Elaborada pelo autor

As amostras apresentaram o fenômeno de iridescência, que é a observação de diferentes cores de acordo com o ângulo de observação da superfície.

Na Figura 30 observou-se a criação de nanoestruturas formadas com estes parâmetros. As imagens de MEV foram tomadas das regiões coloridas da figura anterior (Figura 29), que se apresentaram periódicas, com aproximadamente 480-500 nm. Esta imagem foi criada utilizando os parâmetros da Tabela 4-b, com spot do laser de aproximadamente 28,65 µm, conforme a curva da Figura 27.

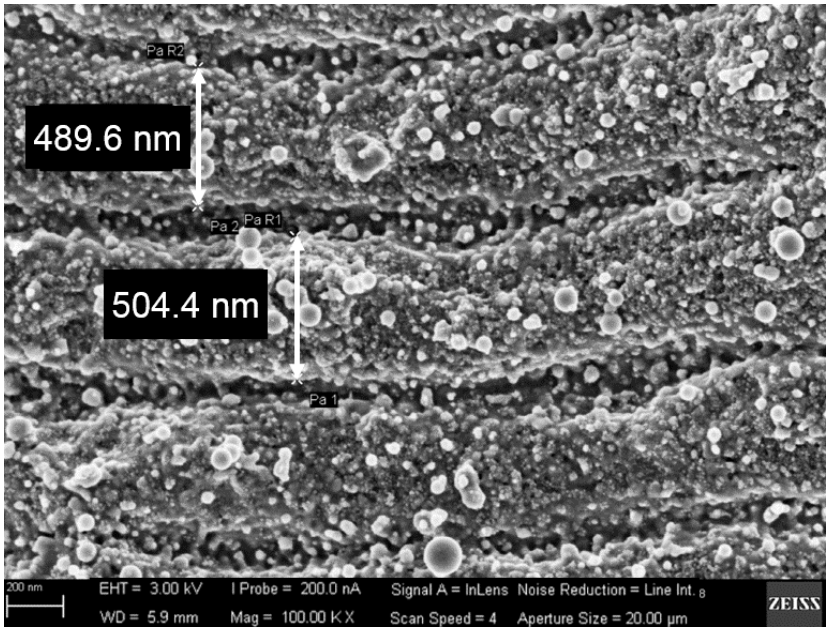

Figura 30 - Imagem de MEV de nanoestruturas periódicas geradas pela marcação à laser com parâmetros de baixa intensidade

Fonte: Elaborada pelo autor

Também foram observadas alterações na superfície, que a torna rugosa, além das estruturas periódicas, como ilustrado na Figura 31. Os parâmetros utilizados para a formação destas estruturas foram os da Tabela 4-a.

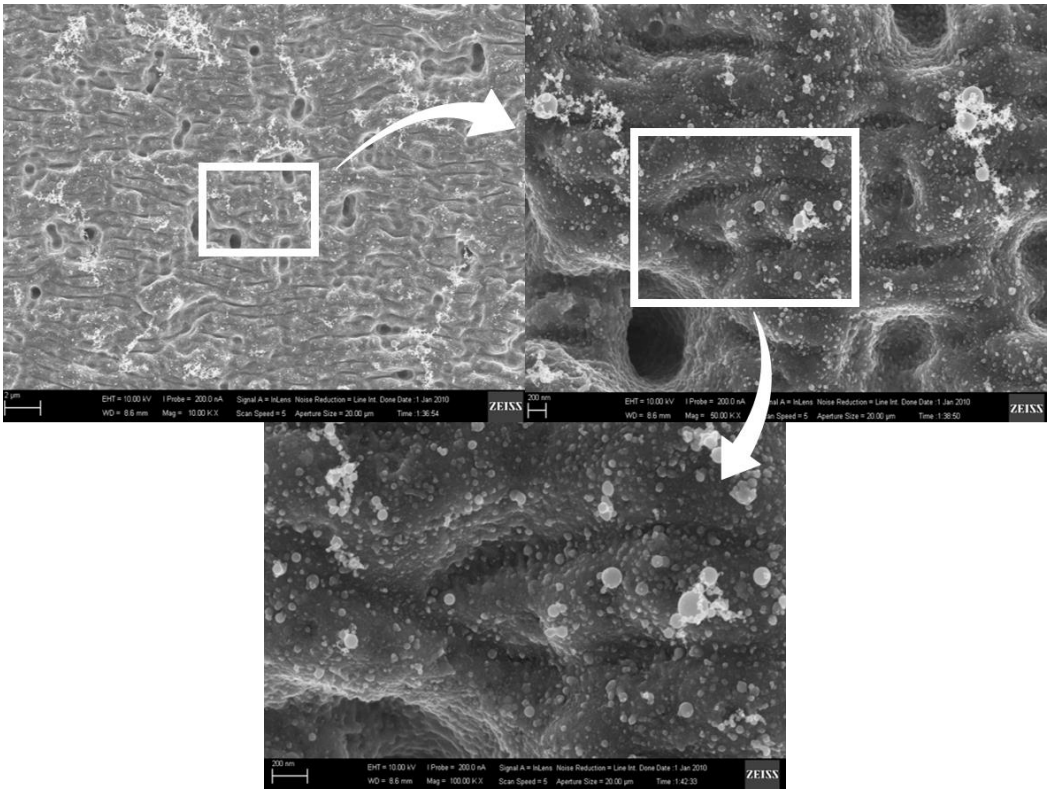

Figura 31 - Imagem de MEV de nanoestruturas não-periódicas geradas pela marcação à laser com parâmetros de baixa intensidade

Fonte: Elaborada pelo autor

6.3.3 Análise da placa marcada por AFM

Utilizando-se microscopia de força atômica, foi analisada a formação de nanoestruturas periódicas ao longo das marcações com os parâmetros de baixa intensidade como mostrado na Figura 32. Foi verificada a formação de nanoestruturas periódicas (LIPSS) na superfície do material, com periodicidade de aproximadamente 500-600 nm. Estas estruturas são similares às apresentadas na Figura 30, com mesmos parâmetros de marcação.

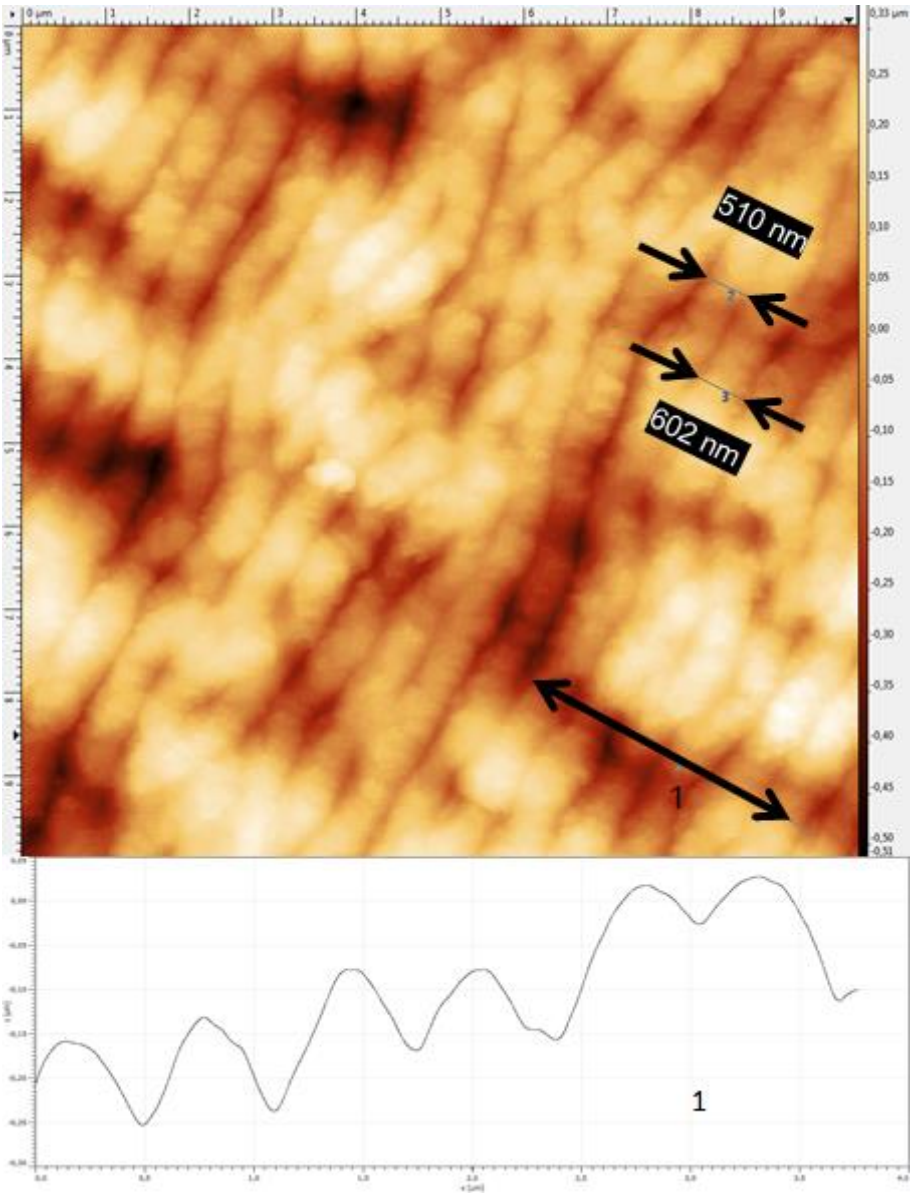

Figura 32 - Imagem de AFM de nanoestruturas periódicas geradas pela marcação à laser com parâmetros de baixa intensidade

Fonte: Elaborada pelo autor com o software Gwyddion

Também foi observado que as estruturas formadas tem profundidade aproximada de 80 µm, conforme observado na Figura 33.

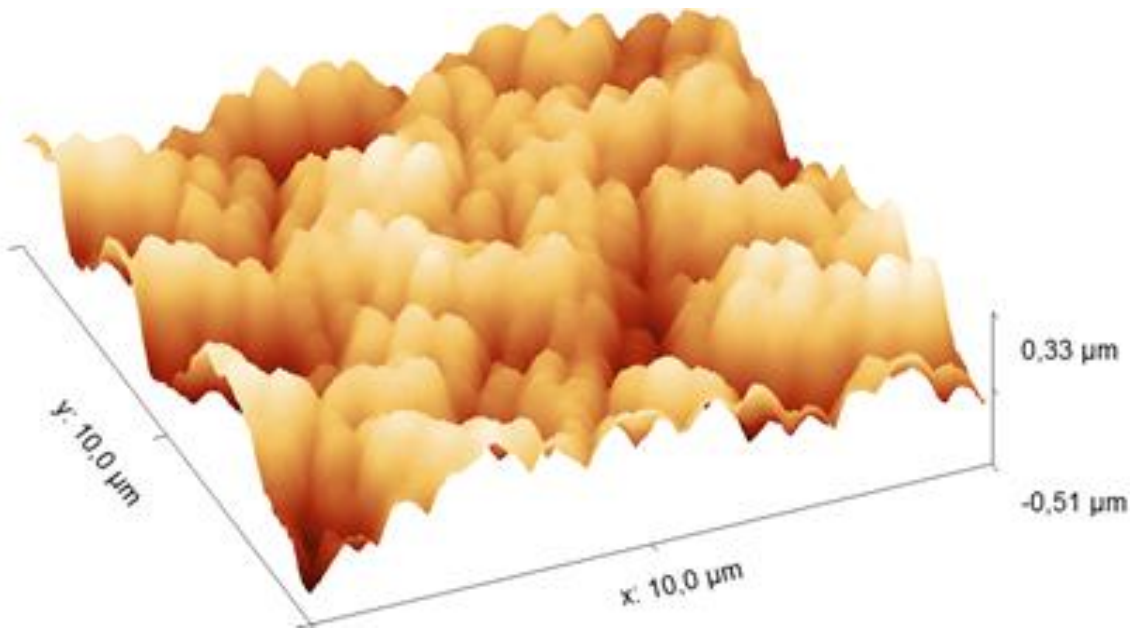

Figura 33 - Imagem de AFM de nanoestruturas periódicas geradas pela marcação à laser com parâmetros de baixa intensidade

Fonte: Elaborada pelo autor com o software Gwyddion

6.3.4 Parâmetros de alta intensidade

Quando foram utilizados parâmetros de alta intensidade, mais energia foi transmitida à superfície. Estes parâmetros foram definidos localizando a amostra sobre o foco do laser, assim como a velocidade de marcação e a distância entre linhas são menores. Nestas condições, foram obtidas marcações que absorvem grande parte da radiação incidente, apresentando coloração escura quando observadas a olho nu ou através da lupa. A Figura 34 apresenta a aparência de uma marcação com parâmetros de alta intensidade observadas com uso de lupa.

Na Figura 34:a pode ser observado quatro marcações, que seguem os parâmetros da Tabela 5. Em Figura 34:b, a amostra com parâmetros mais intensos (linha iv, da tabela) demonstrou um aspecto totalmente diferente das demais devido ao grande acúmulo de fluência pelos repetidos pulsos de laser sobre a superfície. Também pode ser observado que há uma elevação da superfície do metal, e esta elevação possivelmente está relacionada com as estruturas formadas, de forma macroscópica, conforme a Figura 34:c-d. Comparando, na Figura 34-d foi possível

comparar a altura da baquelite (5,5 mm) com a estrutura formada com o laser e com isso pôde-se estimar que esta tem cerca de 0,53 mm na parte mais elevada da placa.

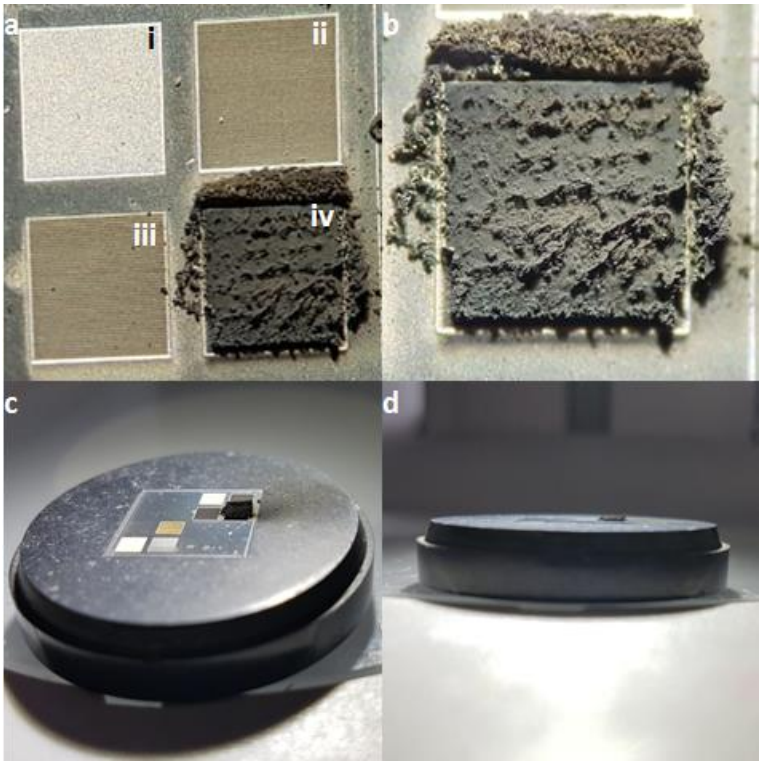

Figura 34 - Aparência da placa marcada com parâmetros de alta intensidade
Fonte: Elaborada pelo autor

Tabela 5 - Parâmetros utilizados na marcação das amostras com alta intensidade

Amostra	Velocidade (mm/s)	Distância entre linhas (mm)	Distância ao foco (mm)	Spot do laser (µm)
i	5	0,005	0	20,68
ii	5	0,0005	0	20,68
iii	1	0,001	0	20,68
iv	1	0,0001	0	20,68

Fonte: Elaborada pelo autor

No caso de uso de parâmetros similares às amostras ii e iii da Tabela 5, foram observadas regiões com certa periodicidade nas amostras quando olhadas com menor grau de aumento. Estas regiões têm dimensões de aproximadamente 50 µm, e são regulares pela marcação. A Figura 35 apresenta a imagem feita por MEV destas regiões.

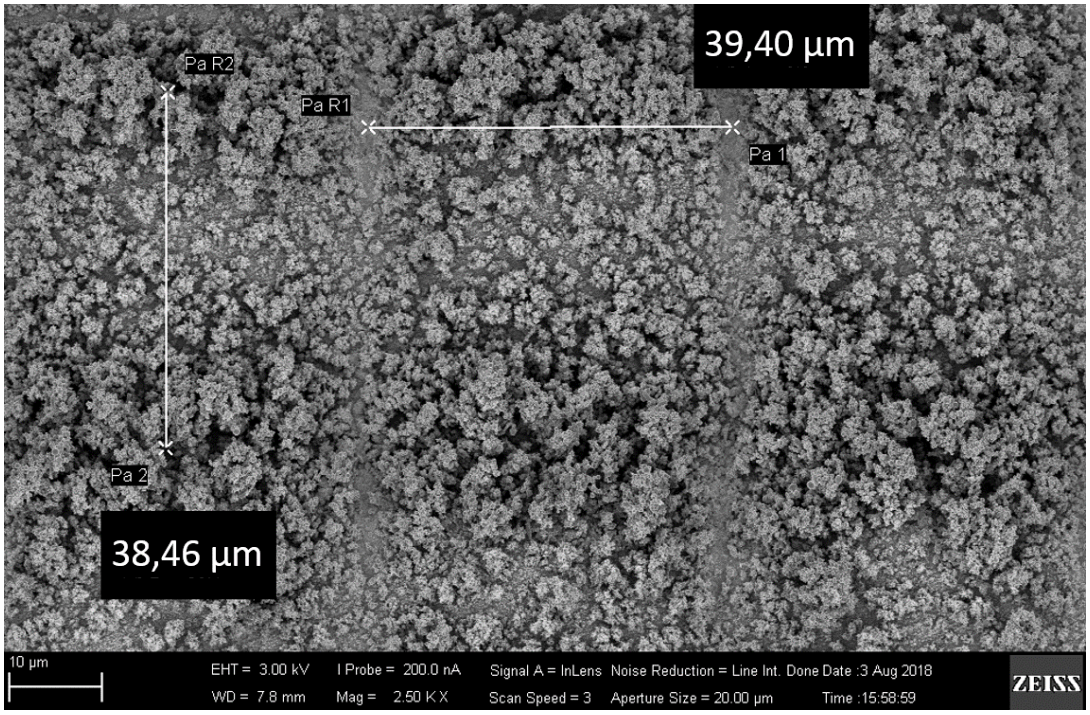

Figura 35 - Imagem de MEV da placa marcada com parâmetros de alta intensidade, mostrando regiões de repetições e respectivos tamanhos

Fonte: Elaborada pelo autor

Para a amostra com os parâmetros iv da Tabela 5, quando analisada por MEV, as estruturas na superfície se apresenta como na Figura 36, com a formação ainda mais complexa, devido ao acúmulo de fluência sobre as regiões marcadas.

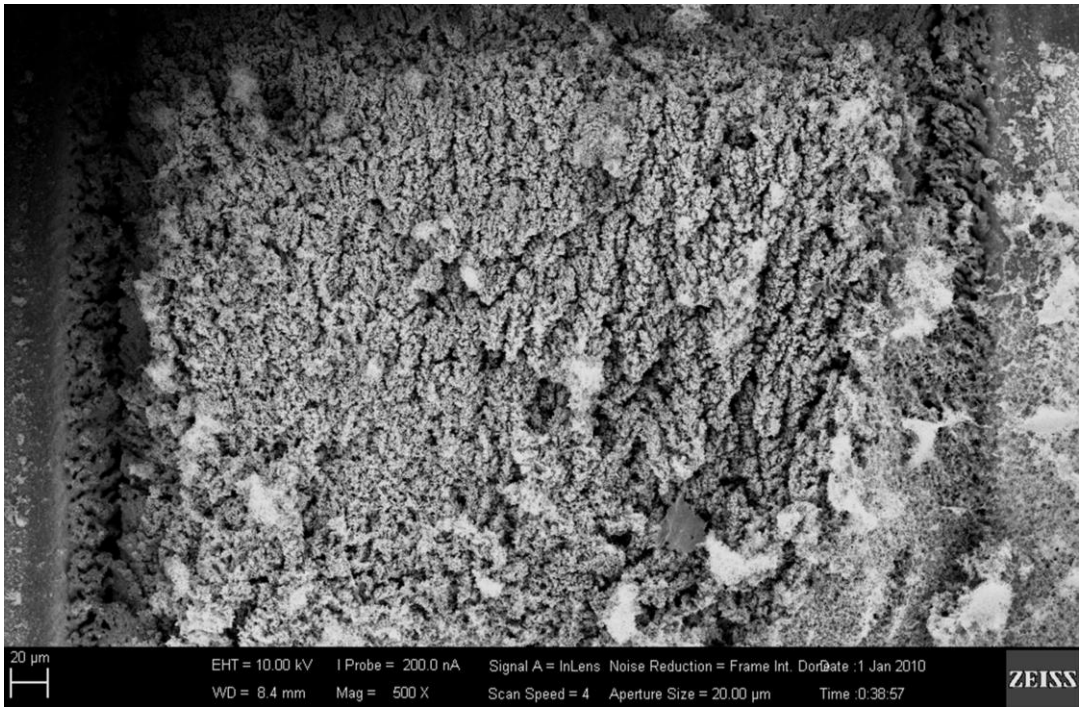

Figura 36 - Imagem de MEV da placa marcada com parâmetros de alta intensidade, mostrando o perfil caótico que a superfície possui

Fonte: Elaborada pelo autor

Estas estruturas se mostram como resultado das interações consecutivas entre os pulsos do laser que varrem a superfície. Isto causa acúmulo de fluência e como consequência, mudanças graduais na superfície, modificando o material e gerando estas estruturas.

Quando analisadas com o MEV, as estruturas apresentaram esferas e estruturas na ordem de nanômetros, sem qualquer ordem específica, espalhadas pela região da marcação de forma caótica. As estruturas observadas variam, em tamanho, de 10 a 500 nm. Estas estruturas se caracterizam como aglomerados caóticos de esferas, e nas Figura 37 e Figura 38 podem ser observadas algumas das formas com que as mesmas se apresentam.

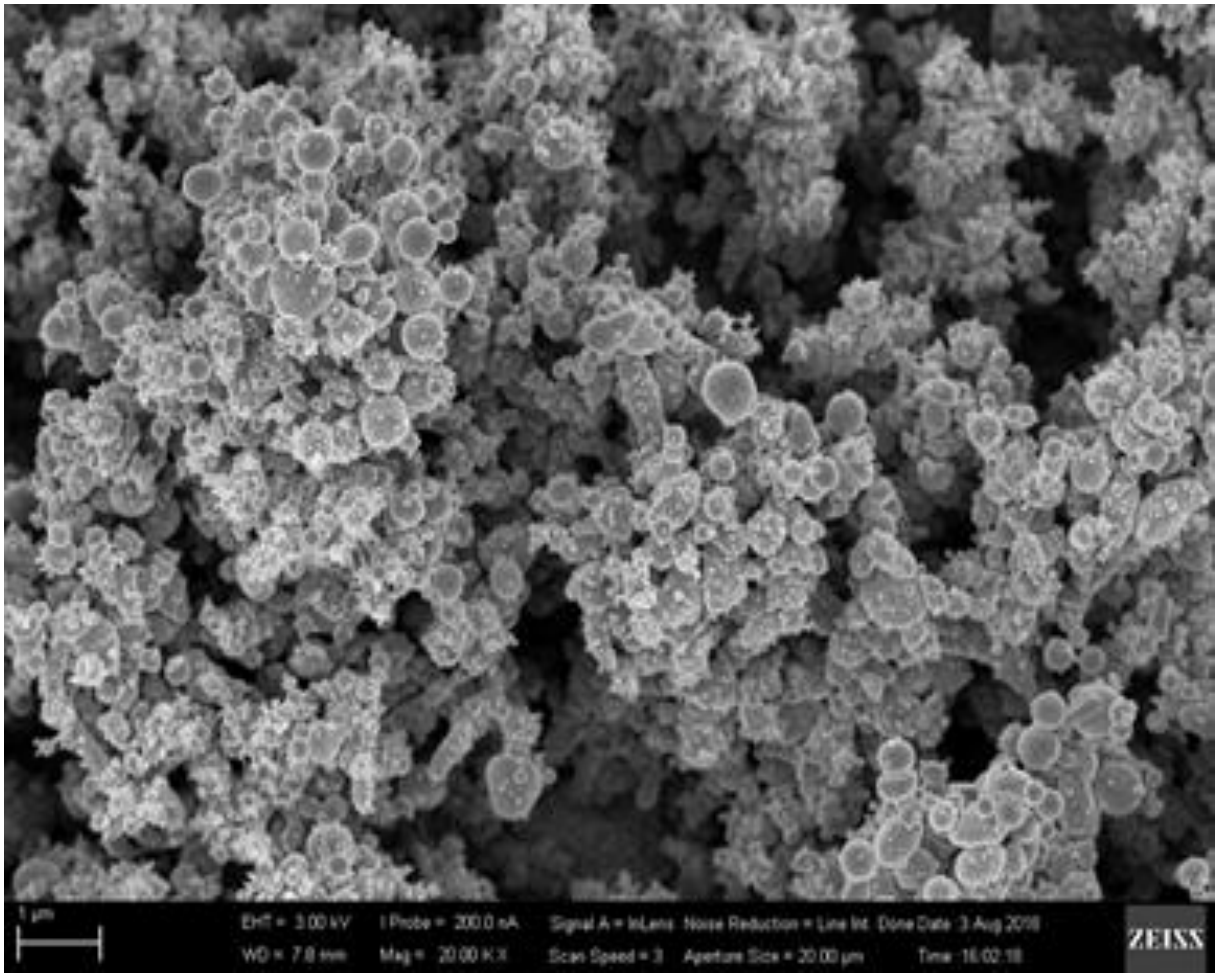

Figura 37 - Imagem de MEV da placa marcada com parâmetros de alta intensidade, mostrando aglomerados de nanoestruturas

Fonte: Elaborada pelo autor

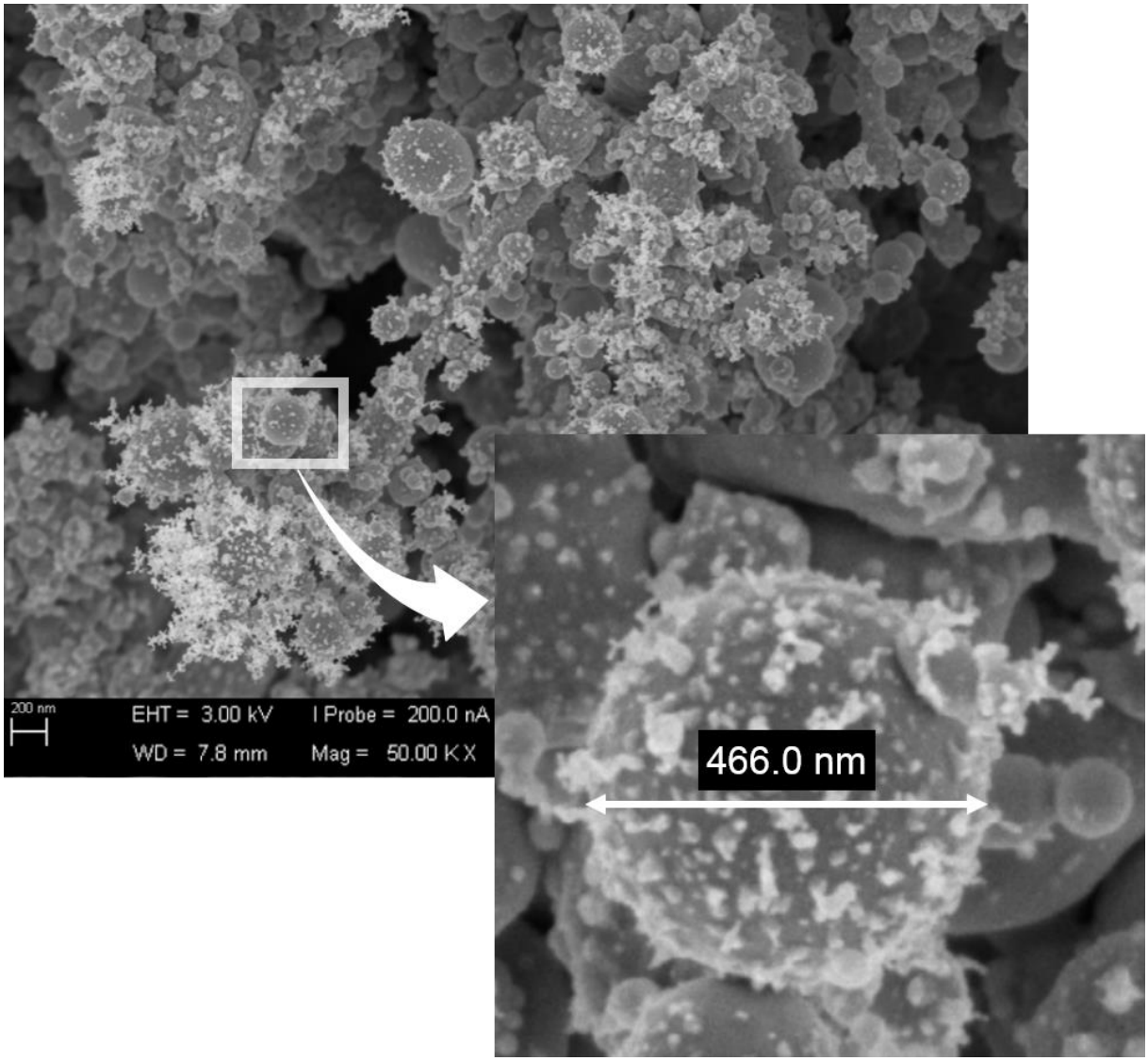

Figura 38 - Imagem de MEV da placa marcada com parâmetros de alta intensidade, com destaque para uma das estruturas esféricas observadas

Fonte: Elaborada pelo autor

Além destas formações, pode-se observar que sobre as estruturas há algumas formações de prata menores, que se acumulam ao redor das esferas. Estes aglomerados possuem tamanhos que variam de 10 a 15 nm, como observado no destaque da Figura 39.

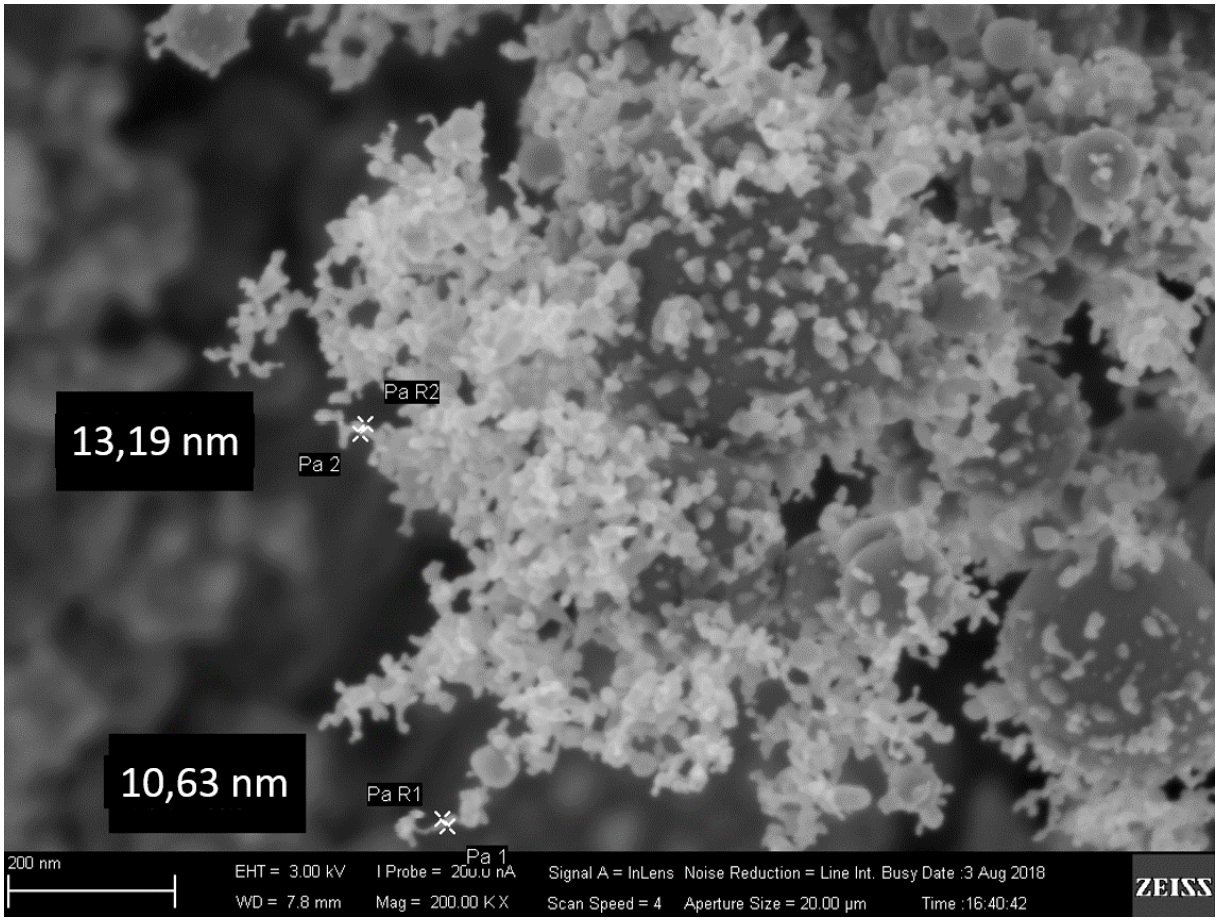

Figura 39 - Imagem de MEV da placa marcada com parâmetros de alta intensidade, com destaque para uma das formações sobre as estruturas esféricas observadas

Fonte: Elaborada pelo autor

6.3.5 Análise por microscopia confocal

Com a microscopia confocal, foi possível a obtenção do perfil tridimensional das superfícies marcadas com parâmetros de alta intensidade, baseado na reflexão de cada plano da amostra. A Figura 40 apresenta os perfis de 16 planos entre o extremo inferior e superior de uma amostra.

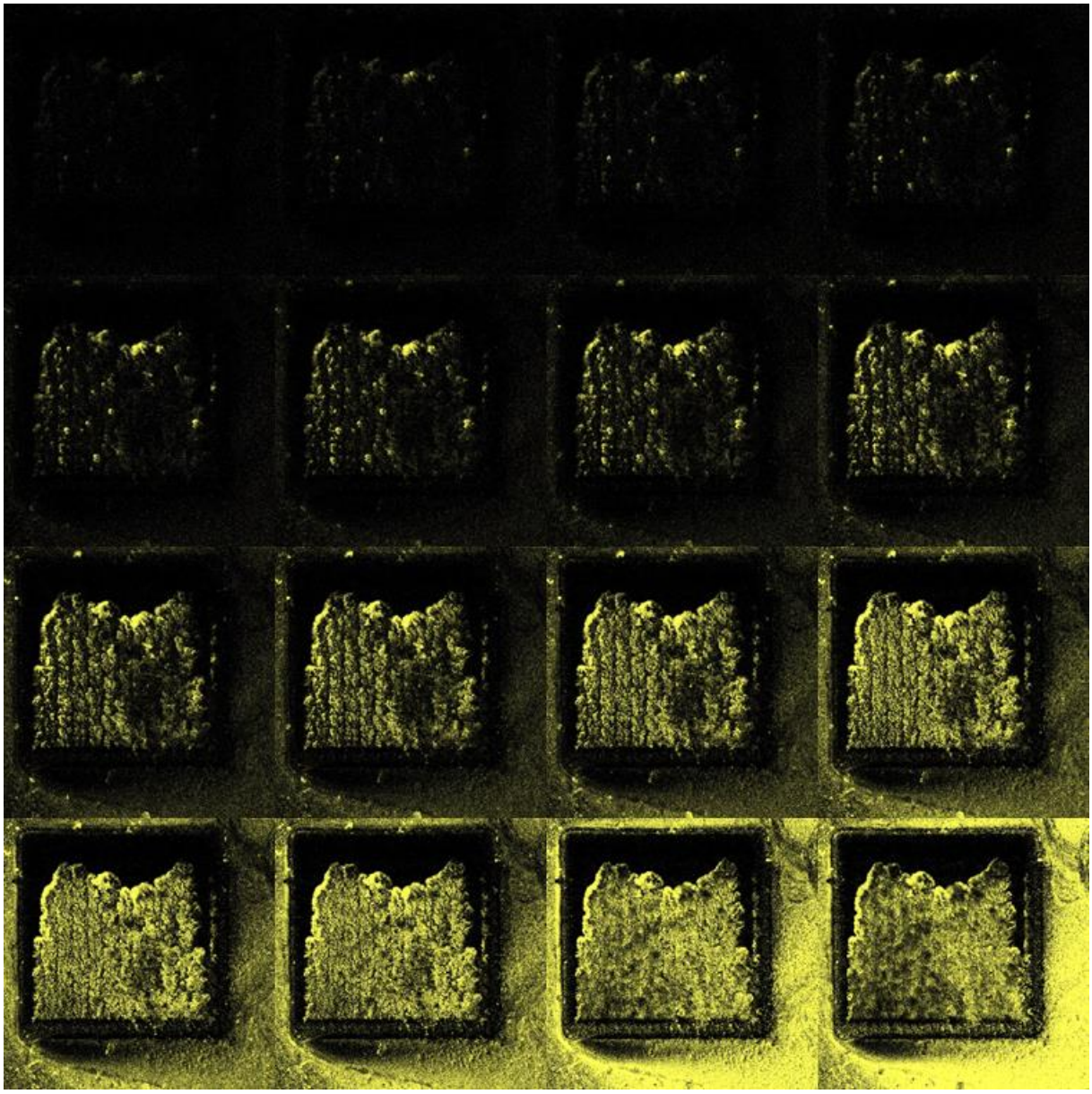

Figura 40 - Imagem de microscopia confocal da placa marcada com parâmetros de alta intensidade, mostrando os diferentes planos de reflexão da luz sobre a amostra

Fonte: Elaborada pelo autor com o software ZEN 2.3 SP1

Com o uso do Software para criação destas imagens, também foi possível a medida da superfície apresentada na Figura 40. Conforme apresentado na Figura 41, a região mais alta da superfície (pontos vermelhos da figura) estão a cerca de 30 µm da parte não marcada (região azul).

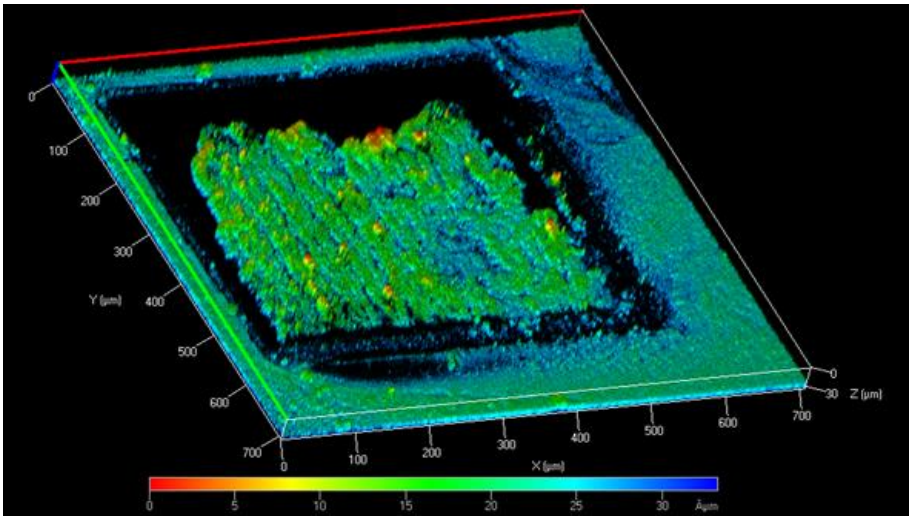

Figura 41 - Imagem de microscopia confocal da placa marcada com parâmetros de alta intensidade, mostrando de forma tridimensional a superfície formado pelos planos apresentados na Figura 40

Fonte: Elaborada pelo autor com o software ZEN 2.3 SP1

Outra amostra amostra marcada foi analisada e pode-se observar os perfis dos diversos planos que estão presentes na superfície. A Figura 42 mostra estes perfis.

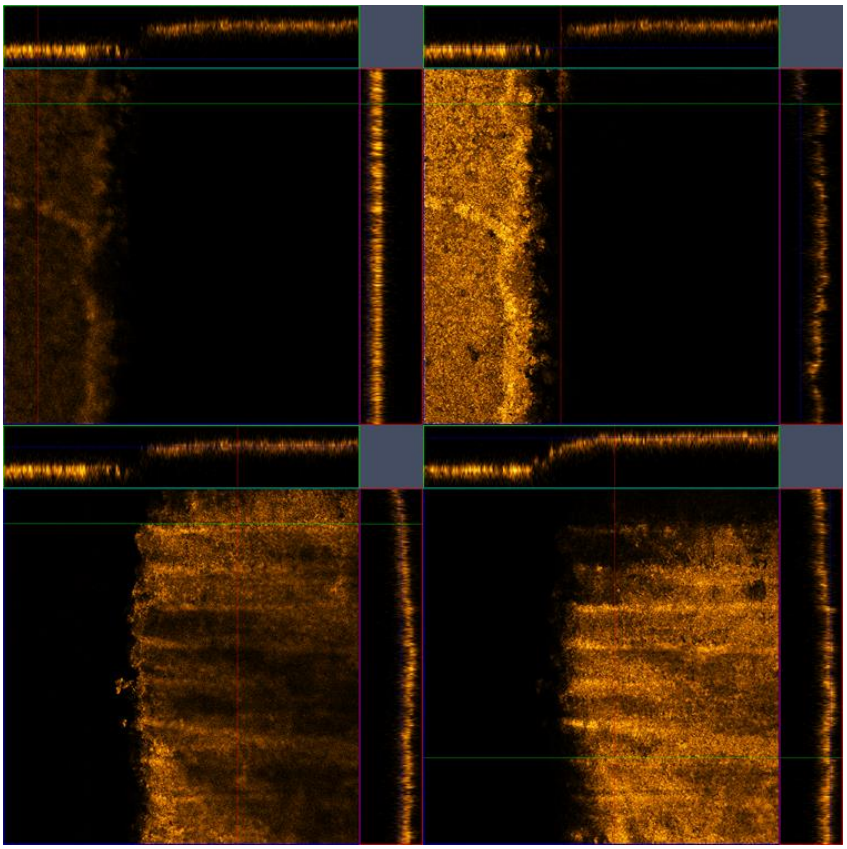

Figura 42 - Imagem de microscopia confocal da placa marcada com parâmetros de alta intensidade, mostrando os planos que a formam, com a região em verde o plano xz, em vermelho o yz e no centro o plano xy

Fonte: Elaborada pelo autor com o software ZEN 2.3 SP1

O perfil tridimensional da amostra apresentada na Figura 42 pode ser visto na Figura 43. Nesta marcação, a diferença de medida entre o ponto mais alto e o inferior é de aproximadamente 86.65 µm, segundo medida direta pelo software de análise das imagens do próprio microscópio.

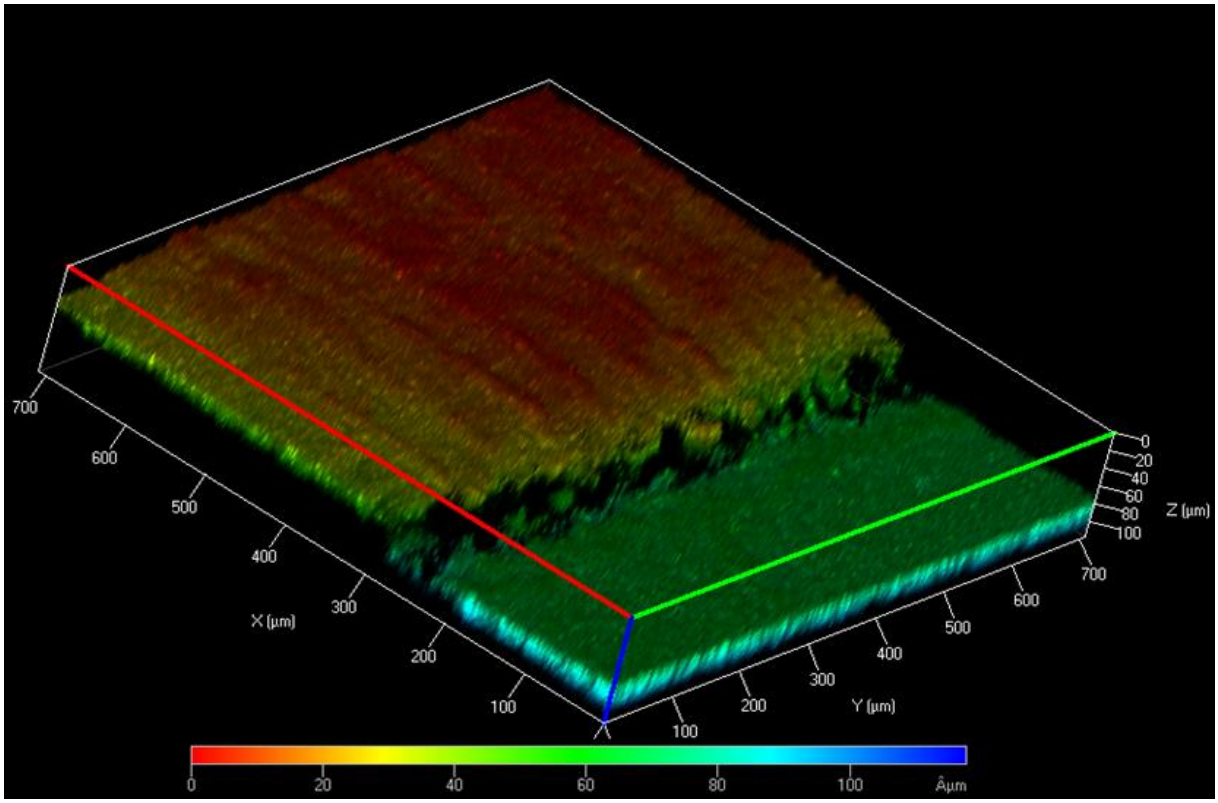

Figura 43 - Imagem de microscopia confocal da placa marcada com parâmetros de alta intensidade, mostrando de forma tridimensional a superfície apresentada na Figura 42

Fonte: Elaborada pelo autor com o software ZEN 2.3 SP1

6.3.6 Marcação com jato de gás

Quando utilizado aparato com jato de gás (N_2), as marcações à laser geraram nanoestruturas similares às apresentadas anteriormente. Entretanto, a forma como elas se agregam foi ligeiramente diferente. A Figura 44 apresenta uma região marcada de aproximadamente 6x6 mm, cuja marcação foi realizada com o jato de gás vindo da região superior direita da imagem, em direção à região inferior esquerda, onde aparece uma espécie de rastro devido às partículas soltas geradas na marcação, não depositadas sobre a região marcada.

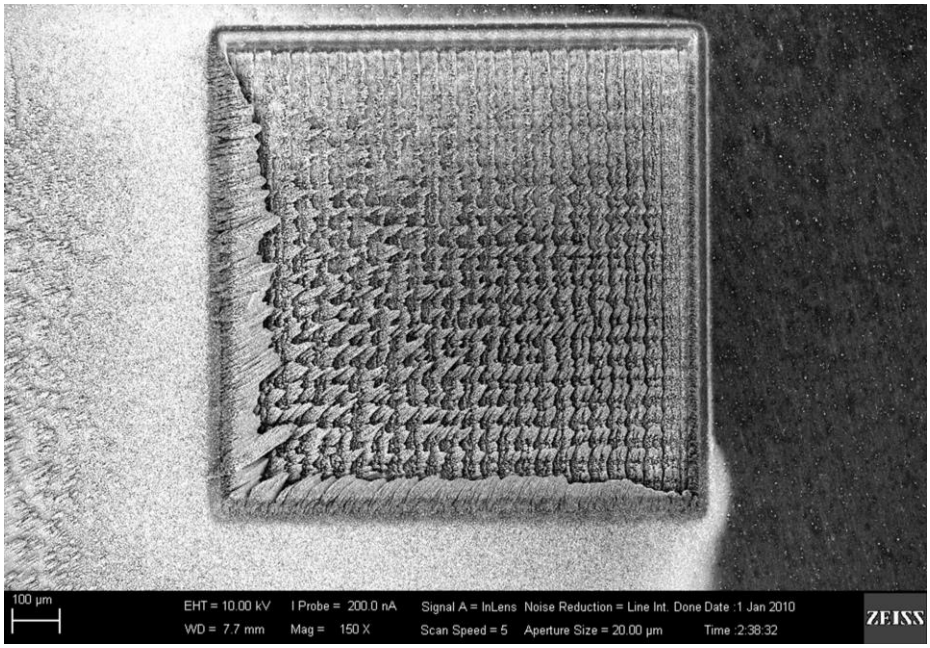

Figura 44 - Imagem de MEV da placa marcada com combinado com jato de nitrogênio, com destaque para o rastro gerado pelas partículas sopradas assim que liberadas da região onde o laser percorreu (canto inferior esquerdo)

Fonte: Elaborada pelo autor

Na Figura 45 observa-se um destaque da forma e como as nanoestruturas estão aglomerados. Essa agregação se dá como se as estruturas se direcionassem à fonte do jato, e estas estruturas também são formadas por aglomerados de esferas nanométricas, similar à formação de estalagmites, a partir do acúmulo gradual de material.

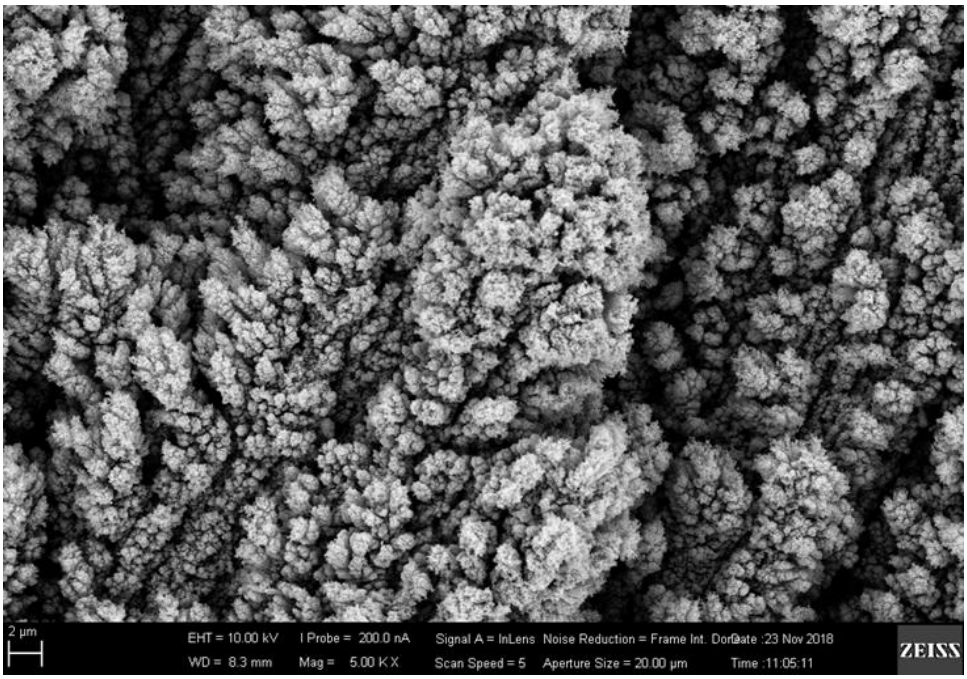

Figura 45 - Imagem de MEV de destaque das estruturas formadas com jato de nitrogênio

Fonte: Elaborada pelo autor

Ao analisar a placa com maior aumento, verificamos que os aglomerados de nanoesferas são de certa forma similares àqueles sem a presença do jato de gás, porém as esferas apresentaram uma forma de rugosidade em suas superfície. A Figura 46 apresenta o perfil destes aglomerados, com o tamanho de duas esferas, indicando cerca de 200 nm.

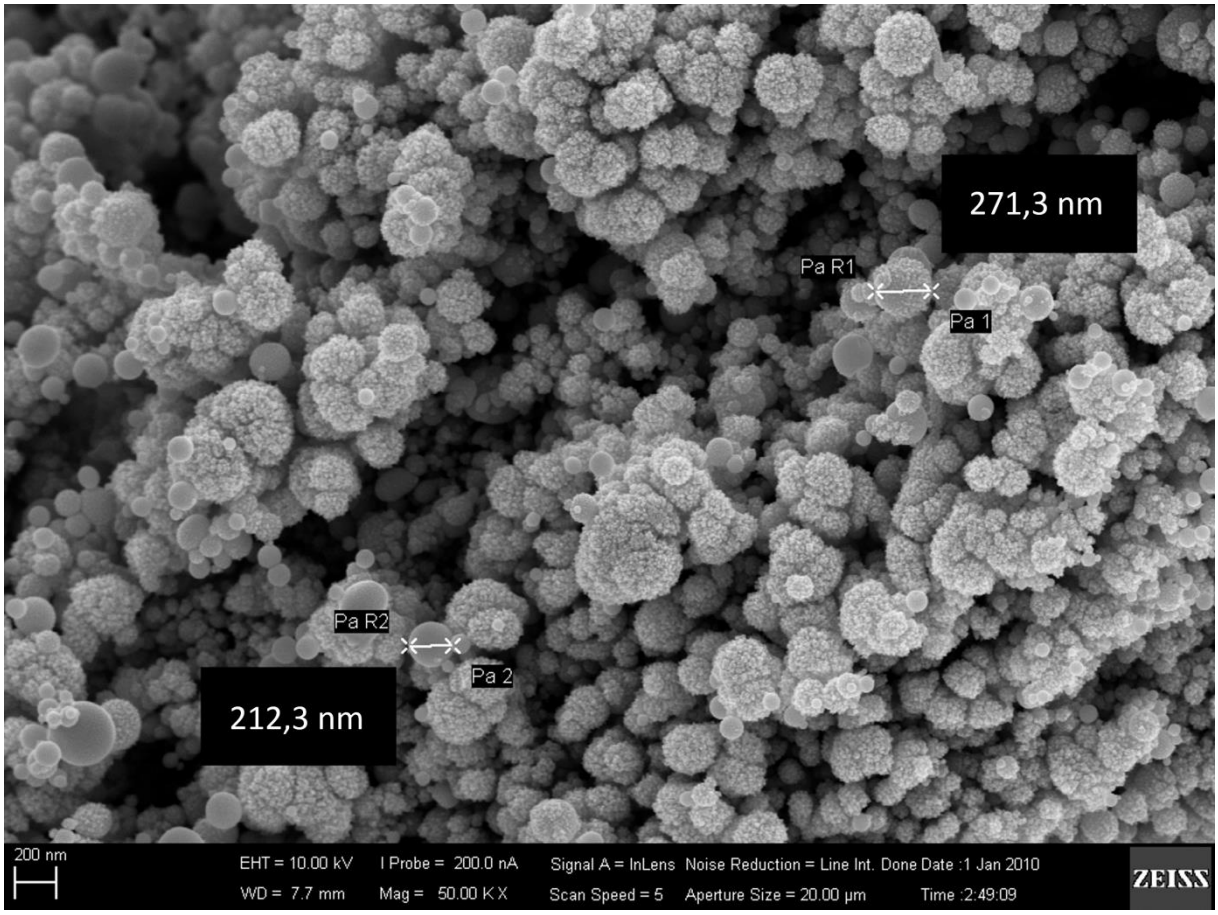

Figura 46 - Imagem de MEV de destaque das estruturas formadas com jato de nitrogênio, evidenciando o tamanho das esferas formadas

Fonte: Elaborada pelo autor

Na Figura 47 pode-se observar um destaque sobre as superfícies das esferas, e a aparência de rugosidades sobre as mesmas, além do empacotamento maior das estruturas.

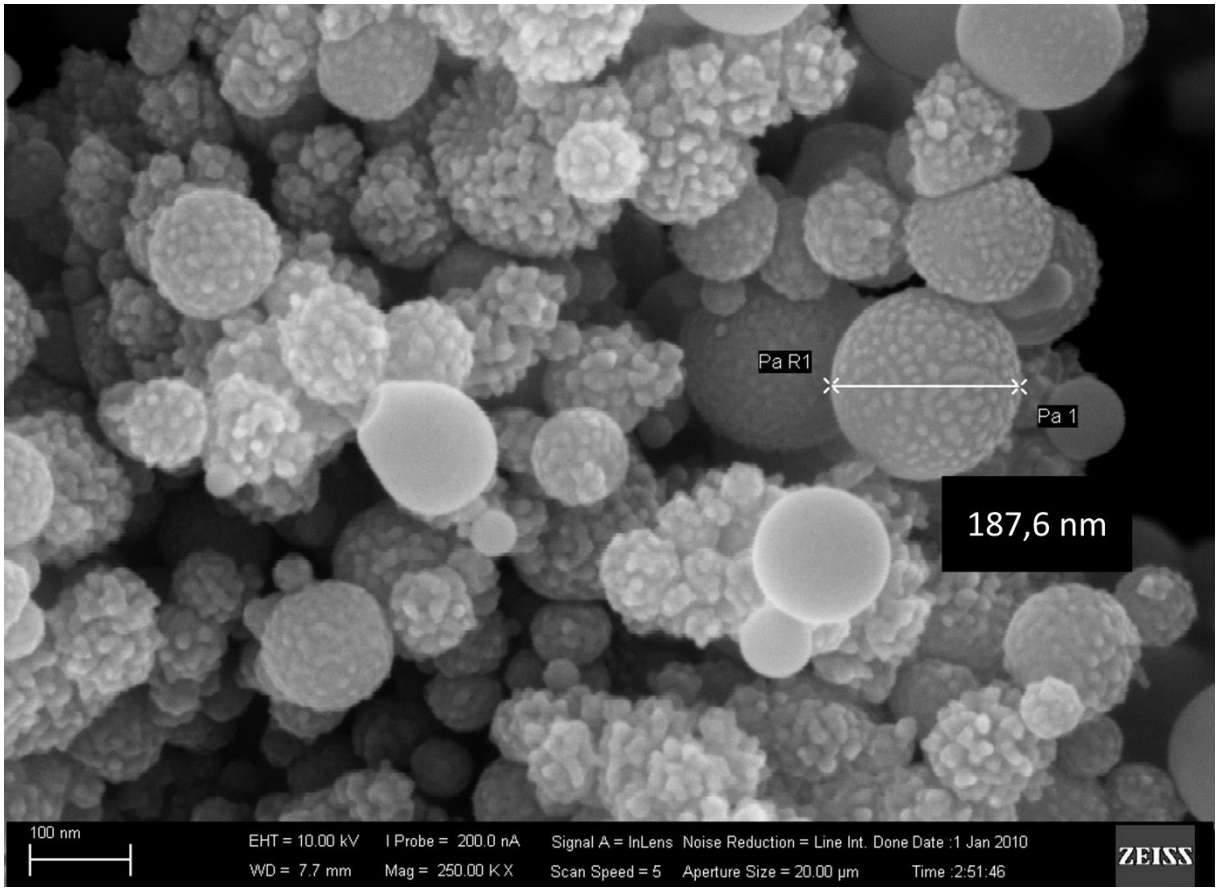

Figura 47 - Imagem de MEV de destaque das estruturas formadas com jato de nitrogênio, evidenciando a superfície das esferas formadas

Fonte: Elaborada pelo autor

Além disso, foi observado que as nanoestruturas são formadas com a interação do metal com o laser, e estas estão desligadas da superfície. Tal fato foi evidenciado através do rastro deixado pela marcação acompanhada de jato de ar, apresentado na Figura 44 na região inferior esquerda. Ao analisar esta região onde não foi incidido o laser, verificou-se a formação de nanoestruturas da mesma forma, mas estas desligadas da superfície de marcação. A imagem destas formações pode ser vista na Figura 48. Nota-se aqui que a aglomeração das mesmas não é tão organizada quanto na região marcada.

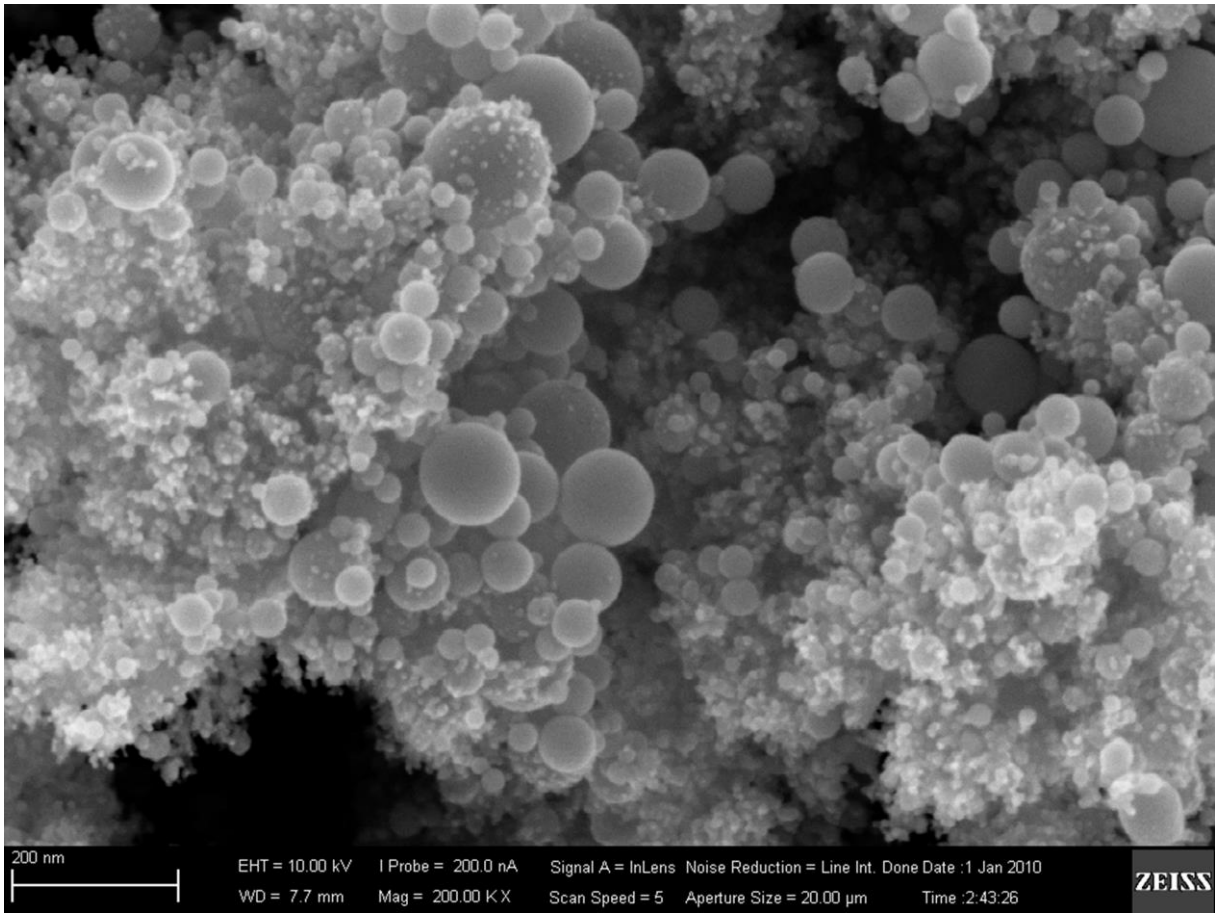

Figura 48 - Imagem de MEV do rastro gerado pelo jato de nitrogênio durante a marcação, evidenciando as estruturas formadas

Fonte: Elaborada pelo autor

6.3.7 Marcação em linhas

A marcação repetida em linha única com várias repetições apresenta efeitos diversos sobre a placa. Na Figura 49, pode-se observar que de 1 a 50 varreduras (Figura 49:a-c) quase não há alteração da estrutura na região que o laser percorre. Entretanto, no caso de 50 repetições, é verificada a presença de eventos na região exterior à marcação, onde surgem estruturas devido à retirada de material na região que o laser varre, e deposição deste material nas redondezas (Figura 49:c). Em linhas com muitas varreduras (acima de 100) pode-se observar um sulco profundo no metal, indicando uma remoção de grande quantidade de material. Entretanto, não há grandes variações na estrutura do fundo da marcação, independente da quantidade de pulsos.

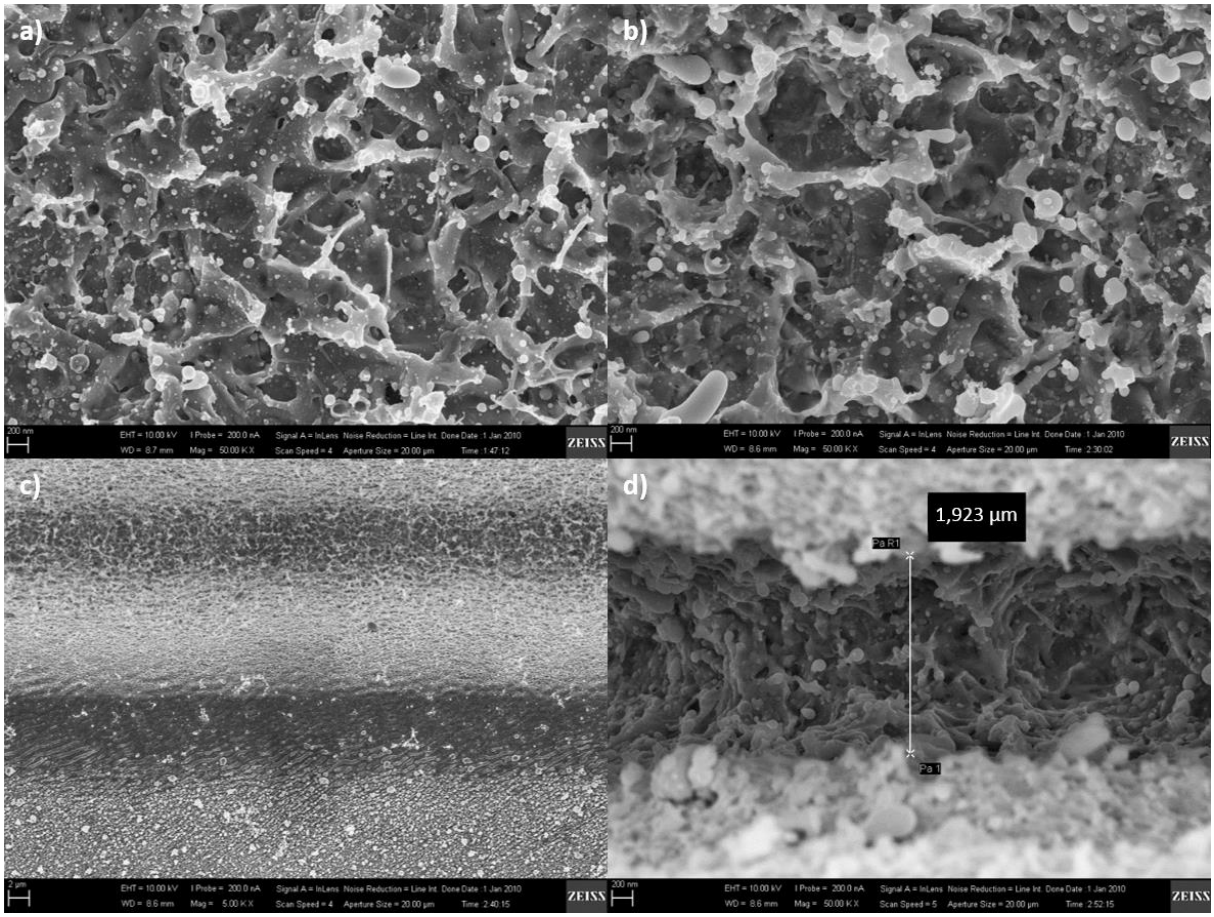

Figura 49 - Imagem de MEV de linhas marcadas variando-se a quantidade de varreduras do laser, com uma repetição em a, 40 em b, 50 em c e 200 em d

Fonte: Elaborada pelo autor

Para linhas com altas quantidades de varreduras, pode-se observar quatro estruturas distintas devida às varreduras do laser e a deposição do material nos arredores. Estas estruturas são apresentadas na Figura 50. A primeira estrutura (região destacada em a) é onde o laser atua diretamente, no fundo da fissura, apresentando mesmo padrão que em marcações com menos varreduras. Logo em seguida (b) verifica-se uma estrutura que apresenta uma disposição de camadas de remoção do material, formação esta que indica o quão profundo o sulco é, devida à distância do foco do microscópio entre o fundo (região onde o laser varre) e partes posteriores. Após esta, segue-se a região onde o laser não atua, apenas apresenta leve deposição de material suspenso (c). Por fim, a região apresentada em (d) apresenta grande quantidade de material, devido às seguidas varreduras pelo laser e redeposição sobre a superfície.

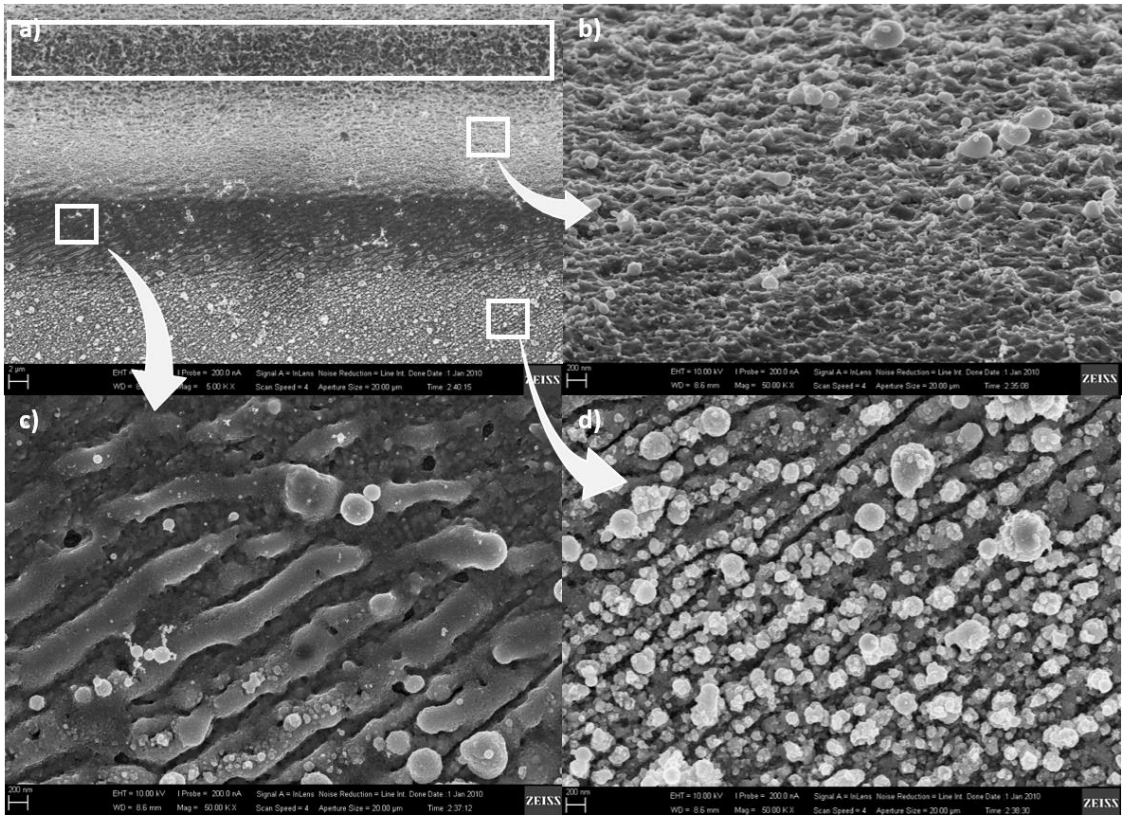

Figura 50 - Imagem de MEV de linhas marcadas com 50 varreduras do laser, com destaque para as três regiões logo externas ao percurso do laser

Fonte: Elaborada pelo autor

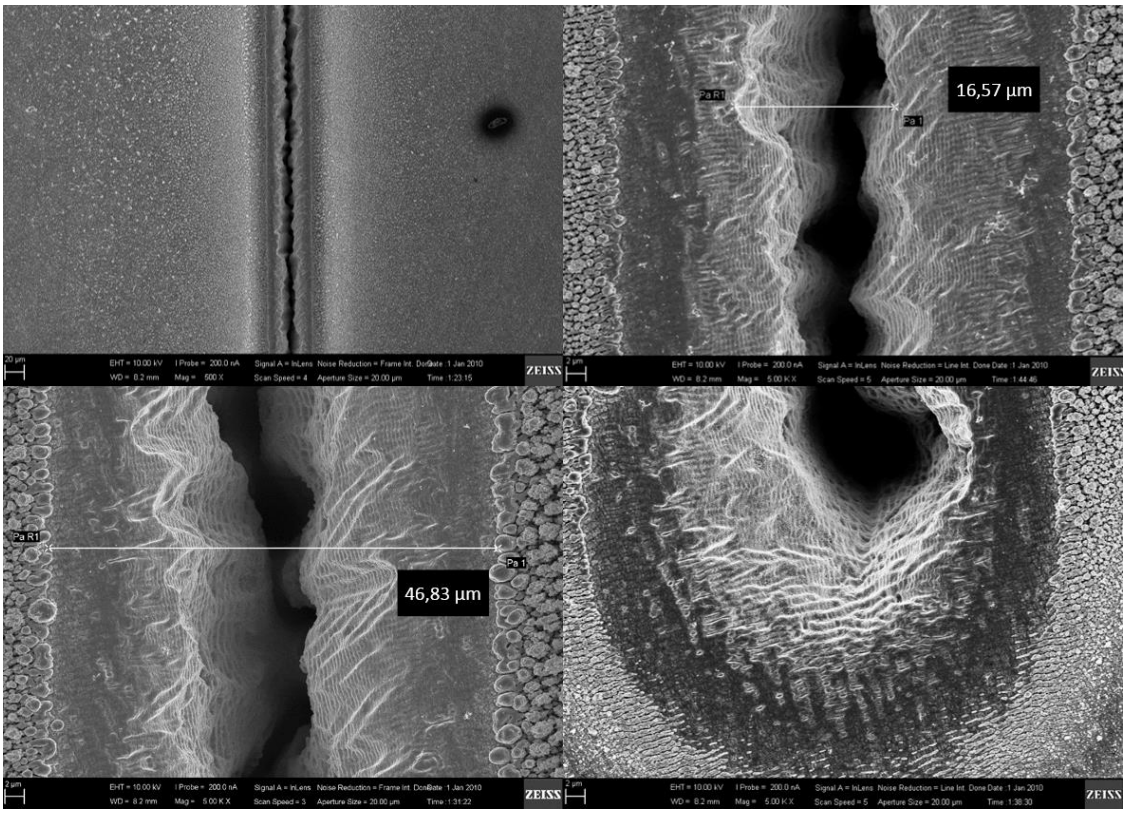

Figura 51 - Imagem de MEV de linhas marcadas com 500 varreduras do laser, apresentando a profundidade dos sulcos formados

Fonte: Elaborada pelo autor

Em linhas com cerca de 500 varreduras, o perfil apresentado quando analisado por MEV é de um sulco profundo, com ao menos 50 µm de profundidade. A Figura 51 apresenta o perfil destes sulcos.

Além das formações apresentadas, observa-se a criação de buracos no interior dos sulcos principais. Estes apresentam cerca de 10% do tamanho do sulco, com repetição que ocorre de acordo com a distância entre dois pulsos consecutivos (determinada pela velocidade da varredura). Na Figura 52 pode-se verificar um destes buracos formados.

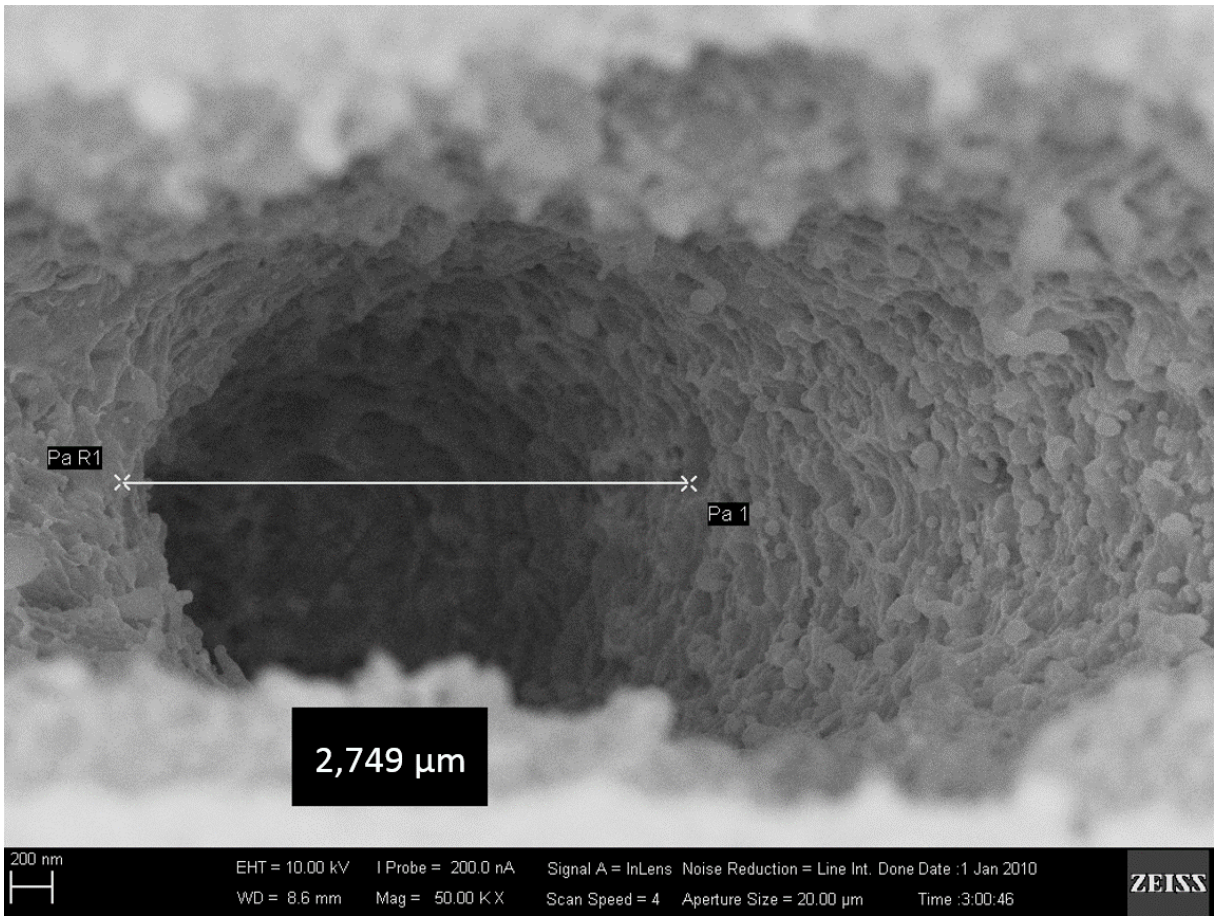

Figura 52 - Imagem de MEV de fundo da da linha, evidenciando o buraco formado no ponto do pulso do laser

Fonte: Elaborada pelo autor

6.4 EDX das placas polidas e marcadas

Analisando a placa marcada através da Dispersão de Raio-X, pode-se observar que a composição da superfície não é alterada devido ao processo de marcação, indicando que mesmo após dois dias da marcação, a amostra continua

apresentando um percentual alto (99,1%) de prata e o único outro elemento apresentado é Cobre (0,9%), que está presente provavelmente devido ao processo de produção da amostra (do fornecedor do material), uma vez que a mesma proporção é apresentada em regiões não marcadas. A Figura 53 apresenta o resultado do EDX de uma região marcada.

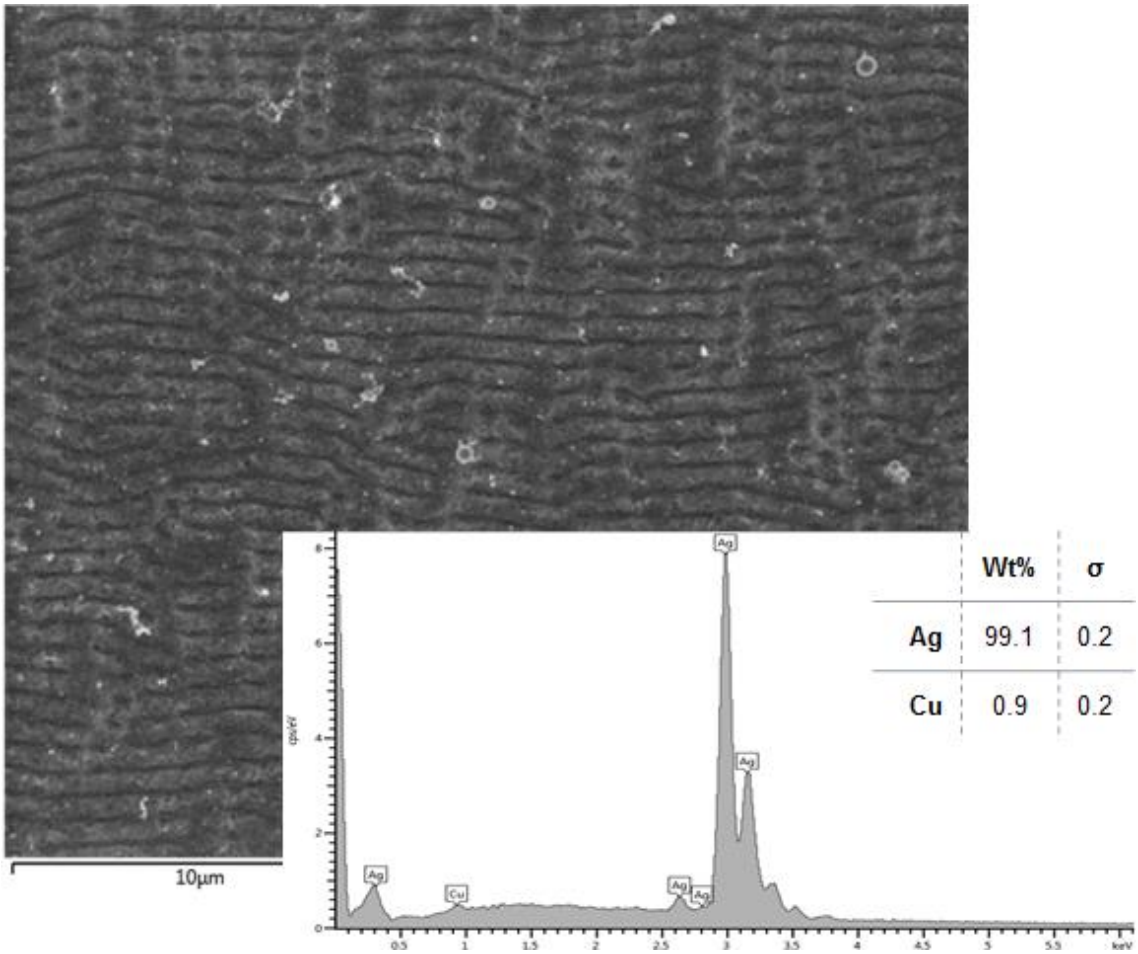

Figura 53 - EDX de placa marcada à laser, apresentando a composição da mesma após uma semana da marcação, sem sinais de oxidação (presença de Oxigênio sobre a mesma)

Fonte: Elaborada pelo autor

Por outro lado, após cerca de um mês de placa polida e não marcada, pode-se notar a oxidação primeiramente pela forma visual ao notar uma cor amarelada na placa, como observado na Figura 54.

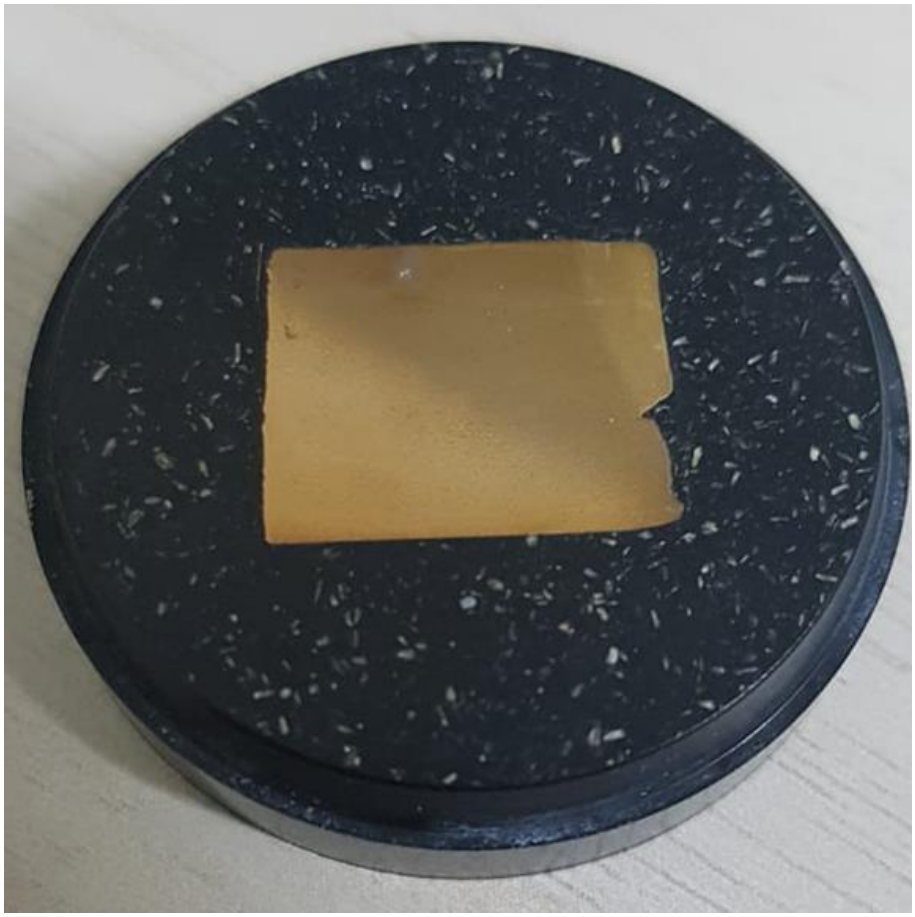

Figura 54 - Placa de prata polida e oxidada após um mês de exposição à atmosfera. A cor amarelada se deve à oxidação

Fonte: Elaborada pelo autor

Fazendo a análise por EDX da placa oxidada, observa-se a presença maior de Oxigênio na composição da mesma, indicando a oxidação, conforme a tabela apresentada na Figura 55. Já a presença do Alumínio se deve ao processo de polimento feito com alumina coloidal aderido ao metal. Na análise por EDX da placa após um mês da marcação também foi verificada a oxidação da mesma pela coloração amarelada. As medidas realizadas por EDX mostraram a presença do elemento Oxigênio, o que comprova a oxidação inclusive na região marcada. O resultado da medida pode ser observado na Figura 56.

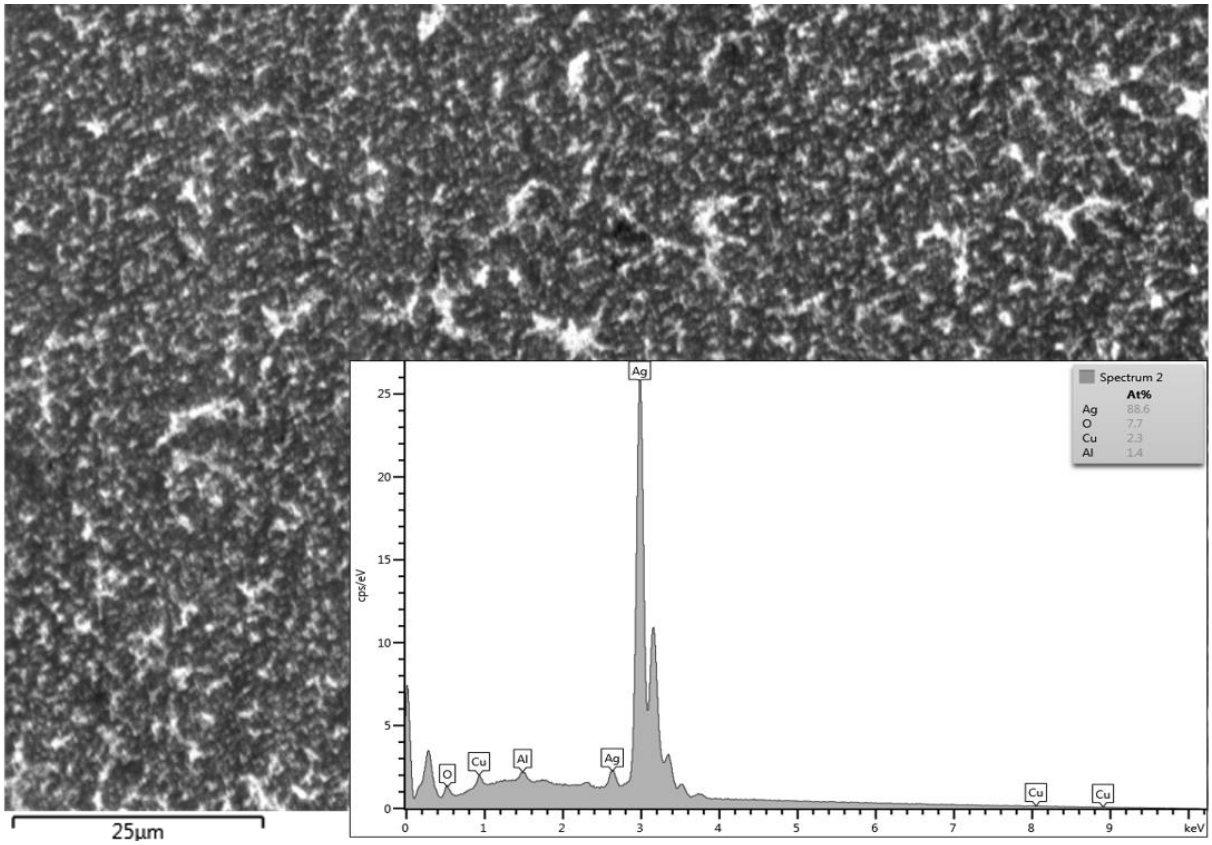

Figura 55 - EDX de placa polida e oxidada (após um mês do polimento), apresentando a presença de Oxigênio sobre a mesma devido ao processo de oxidação

Fonte: Elaborada pelo autor

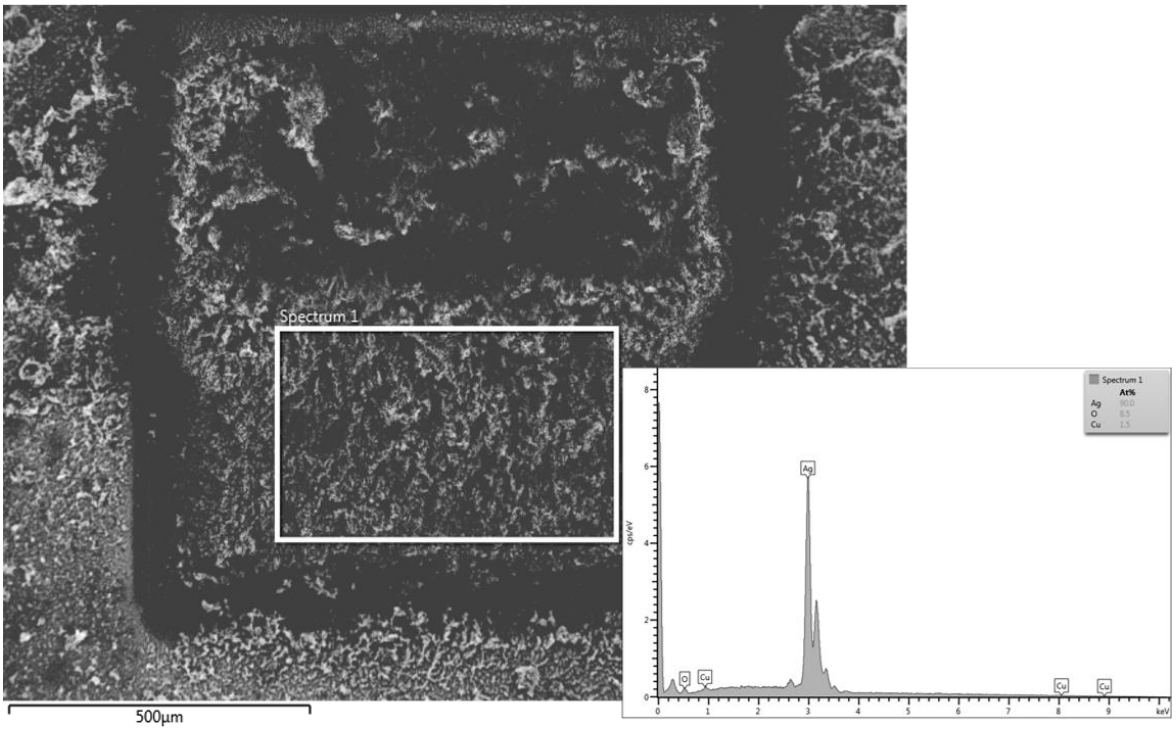

Figura 56 - EDX de placa marcada e oxidada (após um mês da marcação), apresentando a presença de Oxigênio sobre a mesma devido ao processo de oxidação

Fonte: Elaborada pelo autor

Capítulo 7

Interação Fluoróforo-nanoestruturas: procedimentos e resultados obtidos

7.1 Caracterização da Protoporfirina IX (PpIX)

7.1.1 Espectroscopia de absorção

Para caracterização da amostra de PpIX utilizada, foi realizada a diluição da mesma em etanol na concentração de 5 µg/mL. Esta concentração foi utilizada de forma a se obter uma solução diluída do fluoróforo, de forma a não saturar os sinais que seriam observados. Foi utilizado o Espectrômetro Varian Cary 50 Bio que atua no intervalo de 190 -1100 nm. O espectros observado é apresentado na Figura 57.

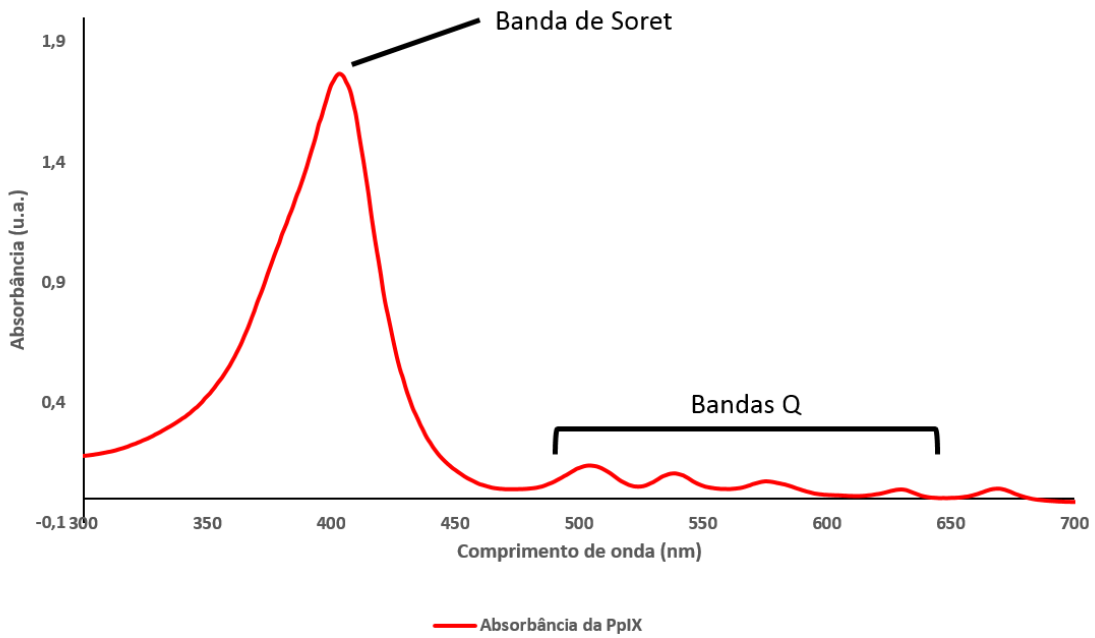

Figura 57 - Espectro de absorção da PpIX, indicando a banda de Soret (mais intensa) e as bandas-Q presentes

Fonte: Elaborada pelo autor

7.1.2 Espectroscopia de fluorescência

Para análise do perfil de fluorescência do fluoróforo e posterior comparação com o sinal deste na amostra dentro do polímero, e verificar a diferença do mesmo em relação à sua versão em solução, foi medido o espectro de fluorescência da PpIX na solução em etanol utilizando-se do sistema de espectroscopia de fluorescência acoplado em maleta desenvolvido no Grupo de Óptica (CEPOF) com excitação em 405 nm. O espectro obtido é apresentado na Figura 58.

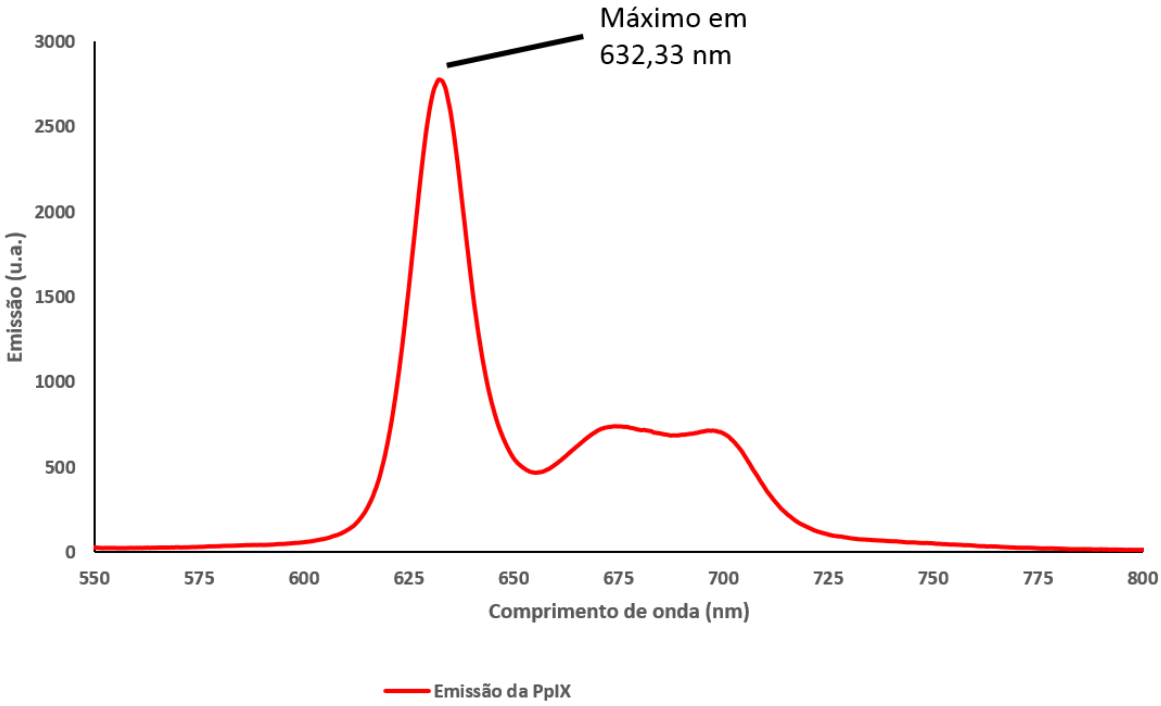

Figura 58 - Espectro de emissão da PpIX quando excitada em 405 nm. O pico máximo se apresenta em 635 nm

Fonte: Elaborada pelo autor

7.2 Deposição do fluoróforo sobre a superfície

A técnica de deposição da PpIX sobre a superfície marcada foi realizada com a adição sobre a superfície utilizando-se a técnica de spinning, que rotaciona a amostra em alta velocidade de forma a se homogeneizar a mesma, com um filme fino sobre a superfície metálica. A velocidade de rotação foi de 3000 rpm por 60 segundos. Também foi feita uma mistura da porfirina com o polímero

polimetilmetacrilato (PMMA) de forma a se tentar uma deposição mais homogênea sobre a marcação.

Com o uso da técnica de spin-coating, há uma maior aproximação entre o metal e as amostras com os compostos que a formam devido ao processo de rotação em alta velocidade, ou seja, trazendo uma distância ótima entre as nanoestruturas e as moléculas de protoporfirina que estão no etanol ou adicionadas ao PMMA.

7.3 Análise de fluorescência

7.3.1 Microscopia Confocal por Fluorescência

As amostras foram analisadas utilizando o microscópio confocal de fluorescência Zeiss (modelo LSM 780 invertido) com excitação por um fóton (LASER Diodo 405 nm; LASER Argônio: 458/488/514 nm; LASER HeNe: 543/594/633 nm) ou dois fótons (LASER Ti:Safira (emissão: 690-1050 nm) do Laboratório de Microscopia Confocal (IFSC/USP).

Todas as análises realizadas foram feitas primeiramente sem, e logo após com o fluoróforo depositado sobre toda a superfície, e foi comparada a diferença de sinal de fluorescência entre a região marcada (com nanoestruturas) e as regiões de periferia não marcadas e sem a presença de nanoestruturas soltas.

7.3.2 Fluorescência da superfície marcada

Ao analisar a superfície marcada por excitação por dois fótons, utilizando laser de 800 nm, sem a presença do fluoróforo, foi obtido o espectro das regiões destacadas na Figura 59. Os espectros por excitação de dois fótons podem ser observados na Figura 60. A placa marcada apresentada na figura é a mesma apresentada na Figura 44, por MEV, feitas com jato de gás Nitrogênio.

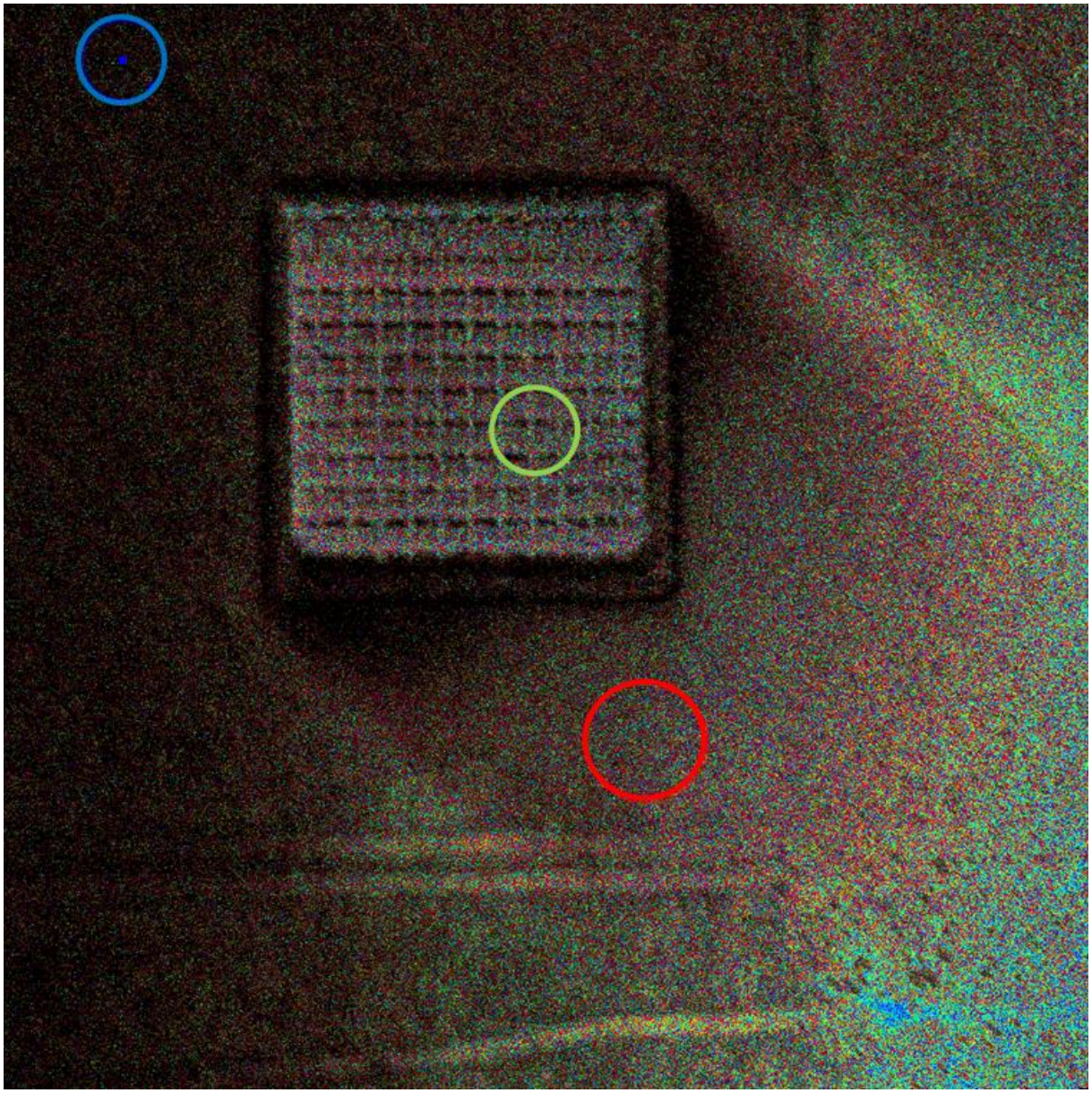

Figura 59 - Espectro de auto emissão da placa marcada quando excitada em 800 nm (excitação por dois fótons). O pico máximo se apresenta por volta dos 635 nm

Fonte: Elaborada pelo autor

A Figura 60 mostra que a região marcada possui o espectro mais intenso (curva verde), quando comparado com as outras duas regiões. Na região do rastro de nanoestruturas (vermelha), nota-se que a presença das mesmas implicam em um sinal de fluorescência, devido às estruturas o sinal é quase tão alto quanto o da região marcada. Já na região sem nanoestruturas onde o laser não varreu (azul), o espectro é menos intenso que os demais. A relação do espectro com nanoestruturas (verde) em relação à sem nanoestruturas (azul), é de cerca de 15 vezes mais intenso, ou seja, as próprias estruturas já geram um aumento do sinal de fluorescência.

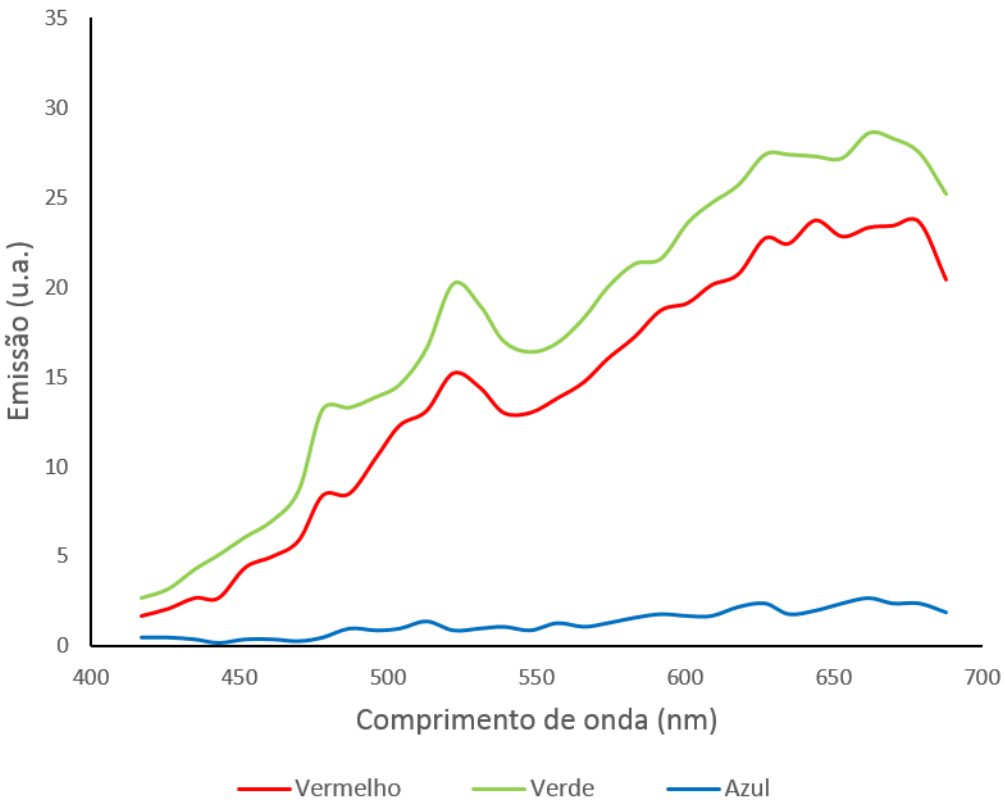

Figura 60 - Curva dos epectros de auto emissão da placa marcada quando excitada em 800 nm (excitação por dois fótons) das regiões apresentadas na Figura 59

Fonte: Elaborada pelo autor

7.3.3 Resultado do Aumento de fluorescência

Quando utilizada a técnica de spin-coating para deposição do fluoróforo em PMMA, o resultado de aumento se mostrou relevante para a excitação em 405 nm. A Figura 61 apresenta uma região marcada com a deposição de PpIX na concentração de 5 µg/mL com o PMMA na concentração de 0,82 mg/mL.

A Figura 62 apresenta os espectros obtidos das regiões destacadas na Figura 61. Através dos espectros é possível observar que o aumento do sinal da região marcada em relação à não marcada foi de cerca de seis vezes.

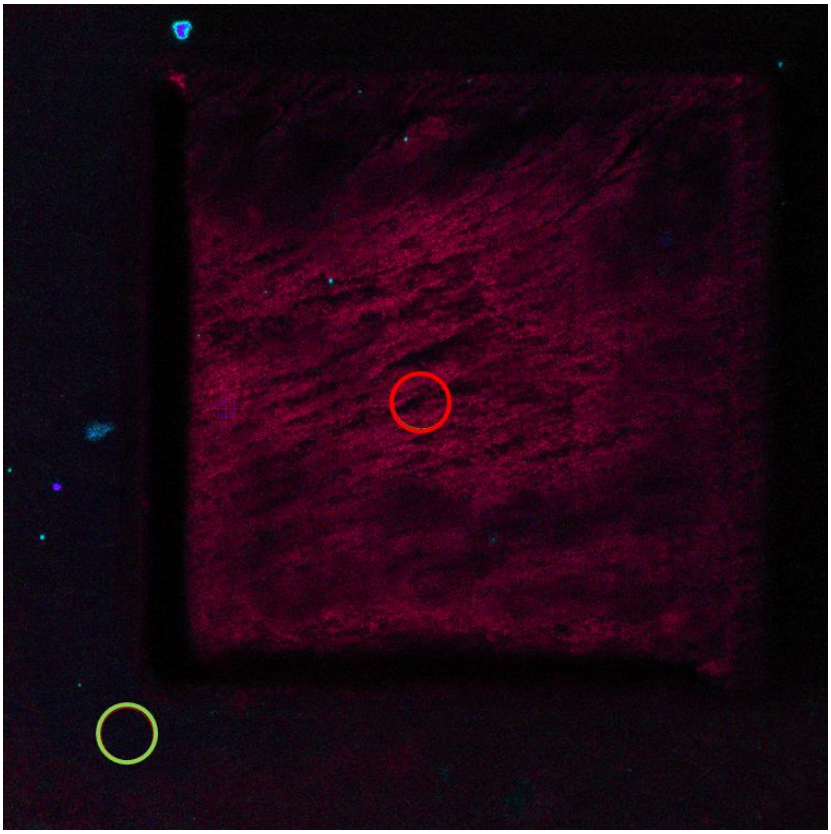

Figura 61 - Emissão da PpIX em PMMA quando excitada em 405 nm (um fóton) sobre a superfície marcada (vermelho) em relação à não marcada (verde)

Fonte: Elaborada pelo autor

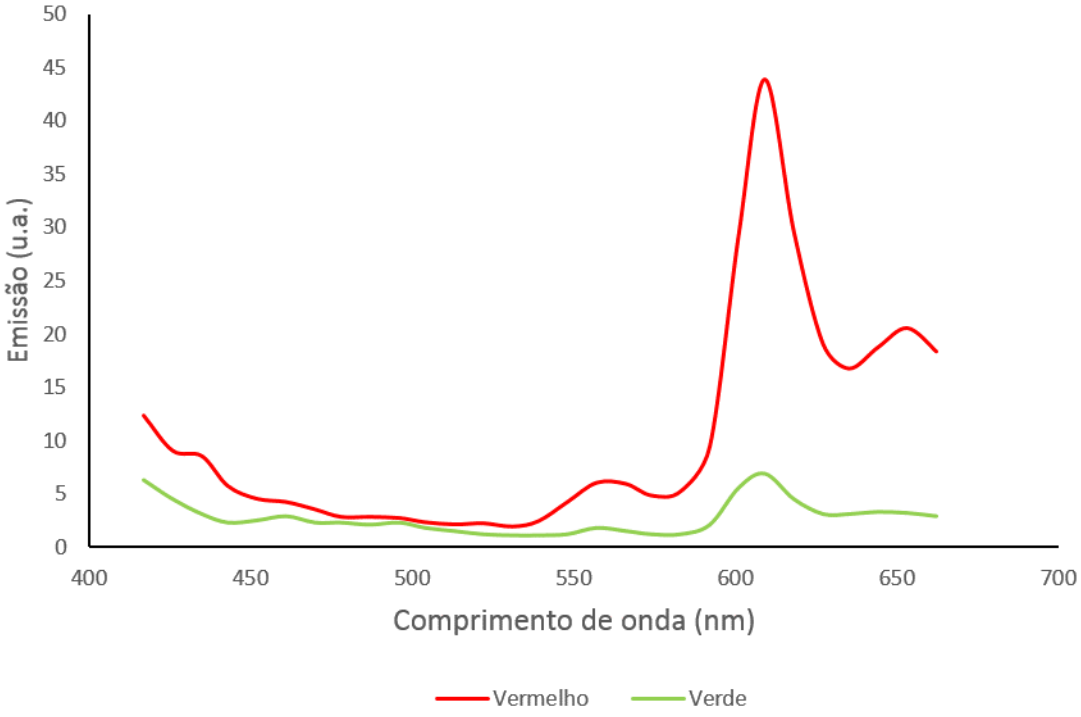

Figura 62 - Espectros de emissão da PpIX sobre a placa marcada quando excitada em 800 nm (excitação por dois fótons) das regiões apresentadas na Figura 61

Fonte: Elaborada pelo autor

Ao utilizar a excitação em 405 nm, foi obtido aumento no sinal de fluorescência com a presença da Protoporfirina IX diluida em etanol, quando comparada uma região marcada da placa (vermelho) com a não marcada (verde). Este resultado pode ser observado visualmente na Figura 63. Na figura, pontos azuis são observados devido à saturação do sinal refletido pela superfície.

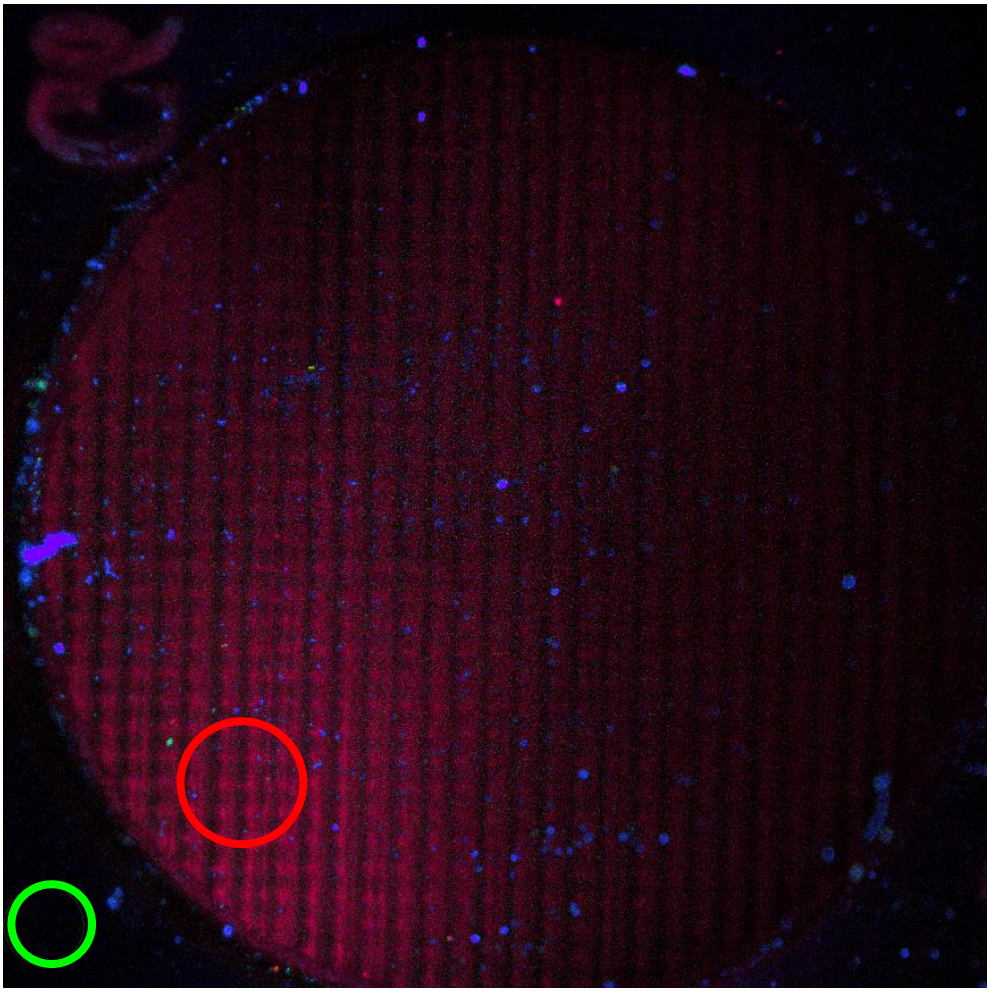

Figura 63 - Emissão da PpIX em etanol quando excitada em 405 nm (um fóton) sobre a superfície marcada (vermelho) em relação à não marcada (verde)

Fonte: Elaborada pelo autor

A Figura 64 apresenta a relação de aumento das regiões da Figura 63, indicando um aumento de aproximadamente 25 vezes. Este aumento se deve à deposição das moléculas fluorescentes por spin-coating, que facilita a entrada das mesmas no interior da região com nanoestruturas. As estruturas responsáveis pela interação com a PpIX apresentada na Figura 63 são as apresentadas Figura 37.

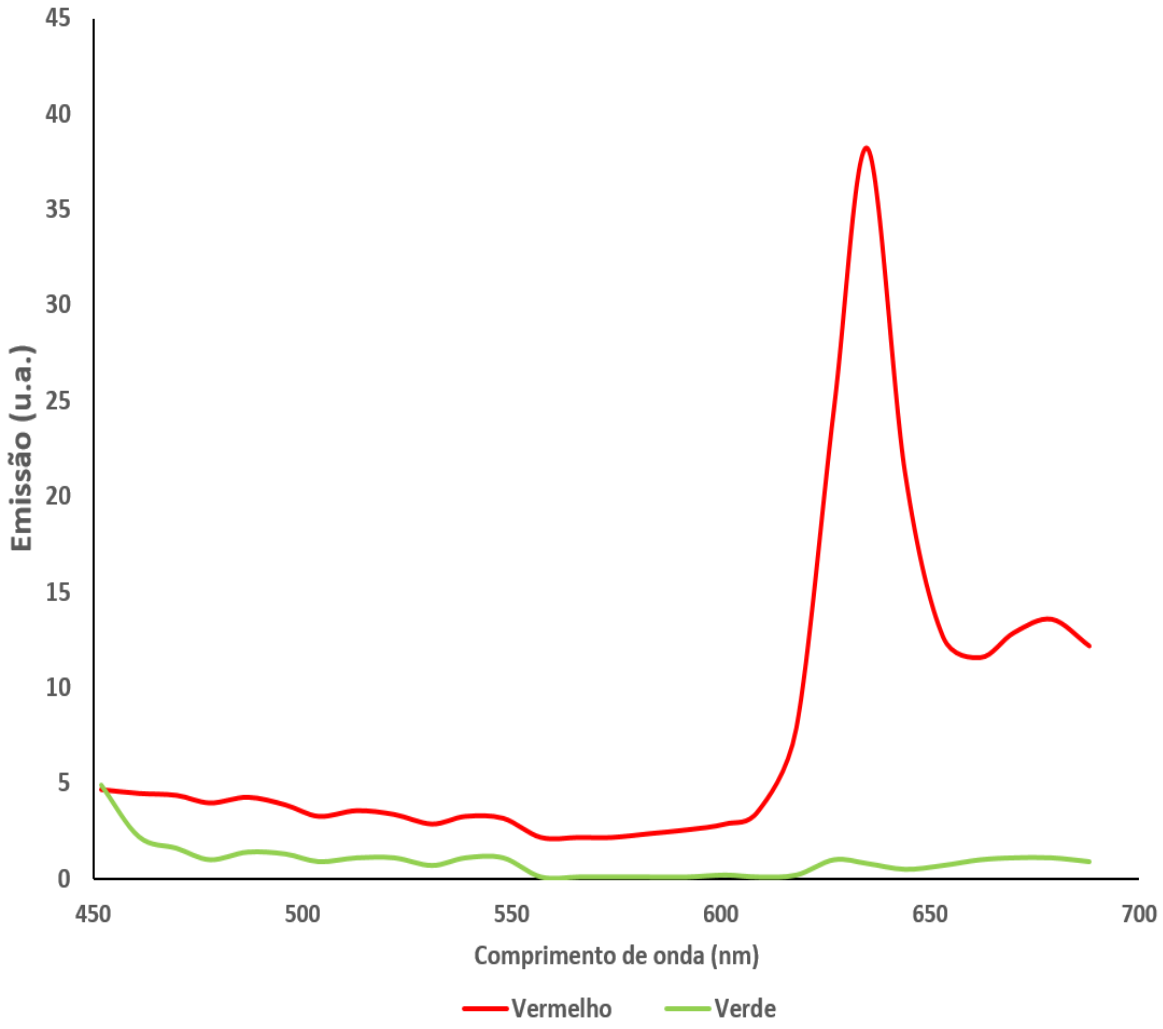

Figura 64 - Expectro de emissão da PpIX em etanol quando excitada em 405 nm (um fóton) sobre a superfície marcada (vermelho) em relação à não marcada (verde) da Figura 63

Fonte: Elaborada pelo autor

Ao analisar a deposição direta de PpIX em etanol (5 µg/mL) sobre a superfície, constatou-se um aumento significante do sinal em relação à região não marcada. Na Figura 65 pode-se observar o sinal de emissão da porfirina, para a excitação de dois fótons (excitação em 800 nm) sobre a região marcada em relação à não-marcada. Pela imagem, já se pode observar que o sinal na região das nanoestruturas (vermelha) é um sinal de emissão muito mais alto do que nas regiões de borda da marcação (azul) ou fora dela (verde). A Figura 66 apresenta as intensidades de emissão das regiões destacadas na Figura 65.

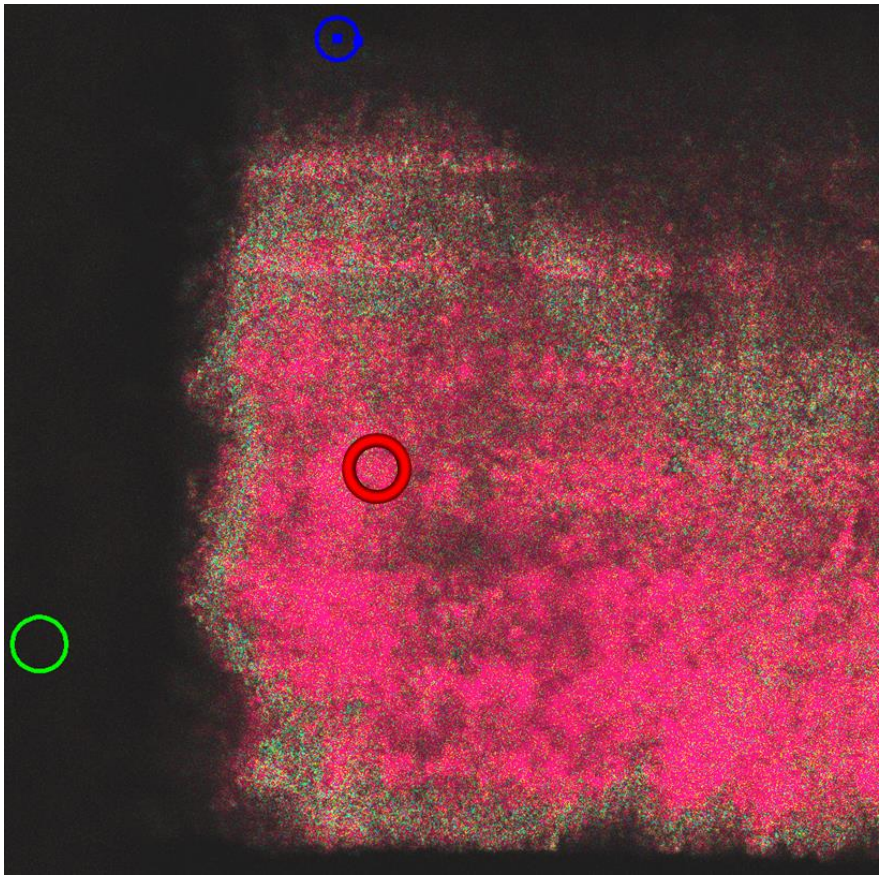

Figura 65 - Emissão da PpIX quando excitada em 800 nm (dois fótons) sobre a superfície marcada
Fonte: Elaborada pelo autor

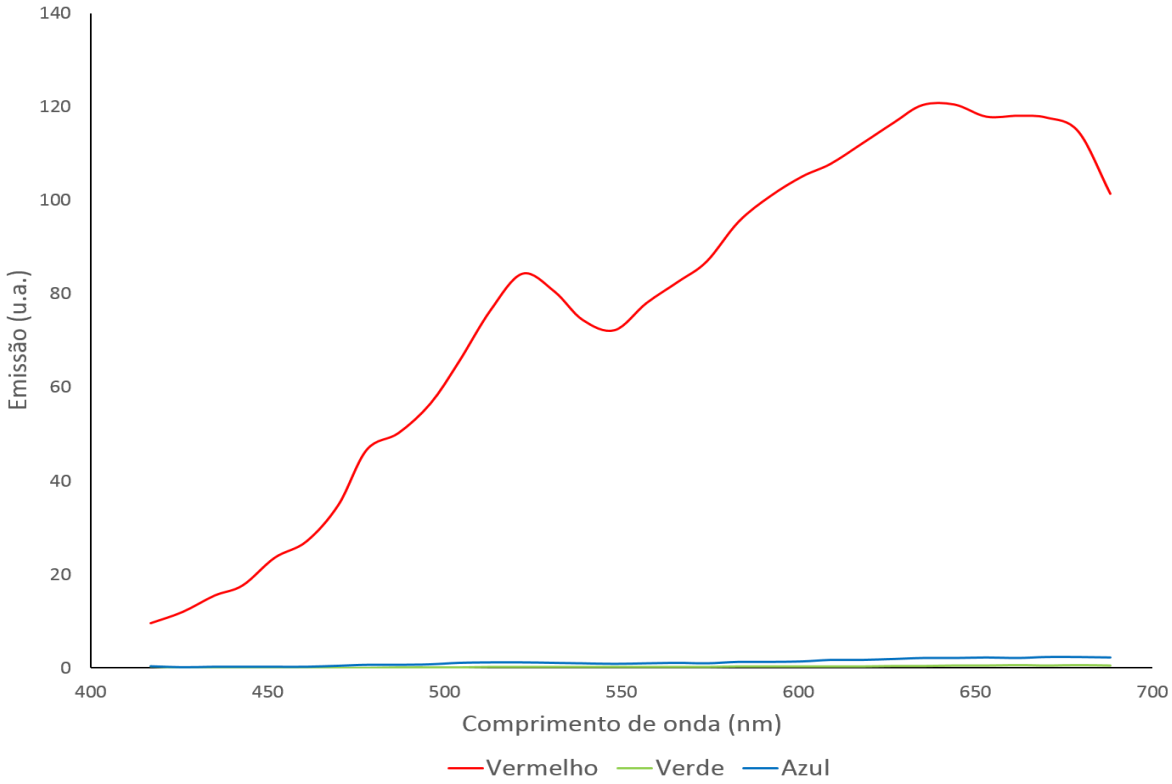

Figura 66 - Espectros de emissão da PpIX sobre a placa marcada quando excitada em 800 nm (excitação por dois fótons) das regiões apresentadas na Figura 65

Fonte: Elaborada pelo autor

Pode-se observar que o sinal sobre as nanoestruturas é muito maior do que o apresentado externamente. O valor de aumento é de aproximadamente 300 vezes, quando comparada a região marcada (vermelha) com a não marcada (verde). As estruturas presentes na superfície da região destacada na Figura 65 são os aglomerados de nanoesferas, como apresentado na microscopia da Figura 38, e os perfis desta região estão apresentados de forma tridimensional na Figura 43. A região do gráfico em azul é a parte da superfície que se apresenta mais baixa no mapeamento tridimensional.

Capítulo 8
Discussões, Conclusões Gerais e Perspectivas Futuras

8.1 Preparação da superfície de prata

Ao utilizar as técnicas de polimento apropriadas para metais moles como a prata, com auxílio de equipamentos específicos, foi possível obter superfícies com riscos pequenos, não interferindo na mesma, como observado nas Figura 20 e 21.

O polimento por si elimina a camada mais externa da superfície, removendo impurezas aderidas, camada de óxidos que podem ter se formado além de resíduos gerados pelo processo de embutimento. A eliminação de riscos se faz necessária, uma vez que o trabalho com estruturas formadas na superfície dependem muito do estado desta. A presença dos riscos poderia afetar a interação do laser com o material, uma vez que esta é dependente da distância entre a superfície e o ponto focal do laser, e este se localiza numa região muito específica, o que causa diferentes efeitos a pequenas variações da mesma, como pode ser observado na medida do tamanho do spot e os efeitos desta variação sobre a superfície na Figura 27. Com isto, riscos que se apresentassem com grande tamanhos (maiores que as estruturas de interesse da ordem de 500 nm) iriam gerar interação na superfície de forma imprecisa, por fornecer mais ou menos intensidade devido às variações na superfície, obtendo assim resultado final diferente do esperado.

Com a superfície polida pelo processo empregado, não houve alterações sobre a superfície que atrapalharam a formação das nanoestruturas de interesse.

8.2 Processo de marcação à laser

A marcação à laser com os diversos parâmetros forneceu diferentes estruturas de acordo com os parâmetros utilizados em cada amostra. Estruturas de LIPSS foram formadas quando os parâmetros de marcação foram mais brandos

(Figura 30-33), enquanto estruturas caóticas e com maior quantidade de nanoestruturas foram formadas com parâmetros de maior intensidade de marcação (Figura 35-39).

As estruturas se mostraram com propriedades ópticas específicas, e isso se reflete diretamente na reação que as mesmas terão em relação à radiação incidente, tanto para análise quanto para os efeitos sobre o aumento de sinal de fluorescência obtido. Quando são geradas estruturas periódicas, para o uso de parâmetros de marcação com menor intensidade, as mesmas agem como grades de difração, e a cor observada sobre a superfície se altera conforme o ângulo de incidência, conforme observado na Figura 29, e este efeito é denominado iridescência. Este efeito na prata ainda deve ser investigado para verificação mais apurada de como o mesmo ocorre, além de futuras aplicações.

O efeito de geração destes LIPSS se devem à interação do campo elétrico do laser femtossegundo com a superfície, e os resultados obtidos foram similares a de Vorobyev e Guo (2018), que utilizam as nanoestruturas criadas em prata para a alterações de propriedades ópticas do metal, para potenciais aplicações em fotônica, plasmônica, optoeletrônica, e outras áreas. (39)

Por outro lado, utilizando os parâmetros de maior intensidade sobre a superfície, são observadas estruturas caóticas e desordenadas, com aglomerados periódicos em nanoescala. O acúmulo de fluência devido aos repetidos pulsos sobre estas regiões fazem com que a mesma se altere de forma significativa, acumulando alterações na camada mais externa do material, o que gera estruturas na escala nanométrica.

Chimmalgi, Grigoropoulos e Komvopoulos utilizaram da técnica para a nanoestruturação de superfícies de ouro e silício, criando nanocanais e nanocrateras nos materiais. Nas simulações realizadas verificaram que o aumento do campo elétrico na região de incidência do laser é o principal mecanismo para a nanoestrutuação da mesma. Além disso, os autores apresentam possibilidades de aplicação de superfícies nanoestruturadas por lasers de pulsos curtos para nanolitografia de alta resolução, nanodeposição, nanoeletrônica e nanofotônica, além de outras áreas. (40)

A forma como o efeito de repetidas interações do laser com os LIPPS já formados das primeiras interações com o material ainda não estão totalmente elucidados, e estudos buscando-se entender como as estruturas volumétricas

geradas neste trabalho são formadas se fazem necessários. Entretanto, pela análise das mesmas, é possível verificar que na estrutura são formados sulcos grandes, e os mesmos são espaçosos o bastante para a adesão de moléculas de interesse.

Assim como mostrado por Brancato et al, polímeros com superfícies nanoestruturadas aumentam a adesão de diferentes proteínas do plasma sanguíneo, devido à alteração da hidrofobicidade da superfície. (41) A nanoestruturação nas superfícies possibilitam o estudo de diversas outras técnicas onde é necessário um ambiente com maior hidrofobicidade. A análise das superfícies geradas por interação com laser podem ser investigadas neste contexto, através da busca de moléculas com interesse para a verificação da interação das mesmas com as superfícies nanoestruturadas.

Também pode-se testar o uso das estruturas para moléculas ainda maiores que fluoróforos isolados, como proteínas, fitas de DNA ou até mesmo células inteiras. Estudos futuros poderão indicar se a interação de macromoléculas com as superfícies nanoestruturadas aqui descritas geram aumento de sinal de fluorescência como ocorreu para a porfirina utilizada. Estes estudos podem se direcionar para a geração de novos sensores para diferentes alvos biológicos com interesse comercial.

8.3 Análises da alteração das superfíceis com a atmosfera

As amostras apresentaram uma composição contante de prata pura por ao menos duas semanas após o processo de polimento e marcação das mesmas, entretanto, apresentaram oxidação após cerca de um mês de exposição à atmosfera.

A oxidação da prata se dá de forma consistente, entretanto, o processo de marcação da mesma não acelera o processo, conforme observado. Amostras polidas e marcadas ao mesmo tempo apresentaram a mesma constância no processo de oxidação, e oxidaram após basicamente o mesmo intervalo de tempo (aproximadamente um mês após ambos processos).

Um modelo para a oxidação da prata é apresentado por Rooij, onde há o transporte de oxigênio através de uma camada de óxido sobre o metal, onde os mecanismos de fluxo de gás por microporos ou a difusão de Fickian são

responsáveis pela oxidação do material. (42) O processo de oxidação se dá de forma contínua, e a exposição à atmosfera, principalmente associado à umidade e radiação aumentam ainda mais os efeitos de oxidação sobre as amostras.

As nanoestruturas presentes na superfície se mostram fixas e bastante aderidas à mesma, e mesmo testes de banho ultra-sônico após o processo de marcação, elas se mostraram presentes e sem alterações significativas, apenas com a remoção de camadas superiores, mantendo as inferiores, altamente aderidas à base da placa. Entretanto, com o processo de oxidação ocorrendo, a utilidade das mesmas tende a diminuir, uma vez que em placas oxidadas não foi observado qualquer sinal de aumento do sinal de fluorescência em moleculas sobre as mesmas.

Portanto, novos estudos com materiais mais nobres, como ouro, por exemplo, são necessários para verificação da reutilização da superfície para uso da técnica em longo prazo, como em sensores reutilizáveis.

8.4 Análises do aumento de fluorescência

O sinal de autofluorescência das superfícies marcadas, quando excitadas à 800 nm, apresenta aumento em relação à regiões não marcadas em cerca de 15 vezes. Quando é feita a deposição da PpIX em PMMA por spin-coating e analizada com excitação em 405 nm o aumento do sinal é de 6 vezes. Quando a deposição é feita com diluição diretamente em etanol para excitação de um fóton chega a 25 vezes. Já quando o fluoróforo é adicionado diretamente sobre a superfície e faz-se a análise por excitação por dois fótons (800 nm), é observado um aumento de 300 vezes no sinal.

Shtoyko et al utilizaram estruturas fractais feitas de prata para aumento do sinal de fluorescência e obtiveram aumento de cerca de 100 vezes para o antígeno IgG de coelhos associadas ao antigeno conjugado marcado com rodamina. O aumento se deveu à proximidade da molécula fluorescente com as estruturas metálicas fractais. (43)

Quando o fluoróforo foi inserido em meio a um polímero, observou-se um aumento de sinal menor que o observado à deposição da PpIX diretamente diluída em etanol. Este efeito pode ter ocorrido devido à presença do polímero em si, que

pode ter distanciado as moléculas de interesse das superfícies metálizas, o que justifica a diferença de aumento dos dois casos.

Ao analisar o aumento do sinal para a excitação de dois fótons (800 nm), observou-se o aumento ainda maior de sinal quando uma região não marcada foi comparada com a região de nanoestruturas. A taxa de aumento entre as duas regiões foi de aproximadamente 300 vezes. Este efeito se deveu à alta proximidade entre as nanoestruturas formadas e os fluoróforos adicionados, além do efeito já observado para a excitação das nanoestruturas sem qualqer molécula adicionada. A combinação dos fatores, com as estruturas caóticas gerando espaços para que as moléculas de interesse adentrassem e estivessem localizadas de forma muito próxima ao metal, faz com que o objetivo de se aumentar o sinal de fluorescência tenha sido alcançado com sucesso.

Considerando o fato de que as moléculas obtiveram um aumento tão significativo de sinal quando comparado à regiões sem nanoestruturas, é necessário o estudo do limite da técnica, utilizando-se amostras de fluoróforos ainda mais diluídas, para verificação do efeito em condições extremas.

8.5 Conclusões gerais

Com a combinação de superfícies polidas, e uma marcação com geração de nanoestruturas capazes de aumentar o sinal de fluorescência de forma significativa de moléculas fluorescentes em concentrações de micromolar, é possível concluir que a técnica se mostra apropriada para a análise de fluorescência de amostras diluídas. A interação entre o fluoróforo e como ele se localiza sobre o metal ainda é incerto, mas futuros estudos poderão propor formas de se verificar a adesão das mesmas sobre as nanoestruturas e as formas de acoplamento entre ambos.

O efeito de oxidação é um fator limitante para a técnica, uma vez que a prata é um metal que apresenta grande grau de oxidação após certo período de tempo, então mesmo que as nanoestruturas formadas estejam bastante aderidas à superfície, a reutilização de amostras feitas para tal fim diminuiria o efeito devido à formação de óxidos, impedindo o aumento do campo elétrico local, sendo necessária a investigação de outros materiais.

8.6 Aplicação da técnica para sensores

Com os resultados obtidos, é possível traçar uma rota para próximas investigações baseando-se no aumento de sinal de fluorescência que foi possível de se obter. Com isto, é possível utilizar as mesmas estruturas para a identificação de outras moléculas e verificar melhores formas de funcionalização da superfície, em diferentes substratos. Esta funcionalização poderia se dar através da adesão de anticorpos específicos para certos alvos e verificação da estabilidade dos mesmos, de forma a obter-se identificação de moléculas-alvo com maior complexidade, como DNA, proteínas e outras, além da análise do efeito para células inteiras.

Além disso, é necessária uma investigação de evidenciação de sinal em concentrações ainda menores, como nano e pico molar, para detecção de moléculas em níveis ainda mais baixos, para rastreamento do limite da técnica de amplificação uma vez que amostras biológicas, que são tipicamente os alvos para detecção, se apresentam em concentrações muito baixas.

Também é necessária a investigação da marcação em superfícies de ouro, uma vez que o metal apresenta menor taxa de oxidação e possível menor efeito de redução do campo com o passar do tempo.

As superfícies criadas podem ter diferentes efeitos de aumento, inclusive para o espalhamento Raman, que pode ser uma técnica-alvo de estudo com o uso das mesmas estruturas geradas por este trabalho, de forma a observar o efeito SERS (Surface Enhancement of Raman Spectroscopy - Espectroscopia Raman de Superfície Aumentada). Esta outra técnica de espectroscopia também se apresenta como uma ótima ferramenta de investigação de moléculas de interesse biológico, também utilizado para diversas áreas, como em ciência forense, qualidade de alimentos, armamentos e outras.

REFERÊNCIAS

1 JEONG, Y. et al. Metal enhanced fluorescence (MEF) for biosensors: general approaches and a review of recent developments. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 111, p. 102-116, 2018. doi: 10.1016/j.bios.2018.04.007.

2 VOROBYEV, A. Y.; MAKIN, V. S.; GUO, C. Periodic ordering of random surface nanostructures induced by femtosecond laser pulses on metals. **Journal of Applied Physics**, v. 101, n. 3, p. 034903, 2007.

3 BRASLAVSKY, S. E. et al. **Glossary of terms used in photochemistry**. Germany: Pure and Applied Chemistry, 2006.

4 VALEUR, B. **Molecular fluorescence**: principles and applications. Weinheim: Wiley-VCH, 2001.

5 HIBBS, A. R. **Confocal microscopy for biologists**. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2004.

6 BELFIELD, K. D. et al. New two-photon absorbing fluorene derivatives: synthesis and nonlinear optical characterization. **Organic Letters**, v. 1, n. 10, p. 1575-1578, 1999.

7 DENK, W.; SVOBODA, K. Photon upmanship: why multiphoton imaging is more than a gimmick. **Neuron:** cell press, v. 18, n. 3, p. 351-357, 1997.

8 LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy.** 3rd ed. Berlin: Springer Science, 2006.

9 BIESAGA, M.; PYRZYŃSKA, K.; TROJANOWICZ, M. Porphyrins in analytical chemistry: a review. **Talanta**, v. 51, n. 7, p. 209-224, 2000.

10 RAE, M.; FEDOROV, A.; BERBERAN-SANTOS, M. N. Fluorescence quenching with exponential distance dependence: application to the external heavy-atom effect. **Journal of Chemical Physics**, v. 119, n. 4, p. 2223-2231, 2003.

11 HELMS, V. **Fluorescence resonance energy transfer:** principles of computational cell biology: from protein complexes to cellular networks. Weinheim: Wiley-VCH, 2008.

12 VALENTINE, R. M. et al. Modelling fluorescence in clinical photodynamic therapy. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 12, n. 1, p. 203-213, 2013

13 BILLES, F.; VÁRADY, B. A DFT study on the vibrational spectroscopy of protoporphyrin IX. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 70, n. 4, p. 729-734, 2008.

14 LOVELL, J. F. et al. Activatable photosensitizers for imaging and therapy. **Chemical Reviews,** v. 110, n. 5, p. 2839-2857, 2010.

15 LISMONT, M.; FRANÇOIS, A.; MONRO, T.M. Metal enhanced fluorescence: effect of surface coating. In: INTERNATIONAL CONFERENCE SPIE WEST, 2014, San Francisco. **Proceedings**… San Francisco: SPIE, 2014. doi: 10.1117/12.2040788.

16 DENG, W., et al. Metal-enhanced fluorescence in the life sciences: here, now and beyond. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 15, n. 38, p. 15695. 2013.

17 DENG, W. **Metal nanostructure-enhanced fluorescence and its applications in bioassays and bioimaging**. 2010. 183 p. Thesis (PhD) - Faculty of Science - Department of Physics and Engineering, Macquarie University, Sydney, 2010.

18 CAMACHO, S. A. et al. Plasmon-enhanced luminescence with shell-isolated nanoparticles. In: GEDDES, C. D. (ed.). **Surface plasmon enhanced, coupled and controlled fluorescence.** Hoboken: Wiley, 2017. cap. 16, p. 257-270.

19 GEDDES, C. D.; PARFENOV, A.; LAKOWICZ, J. R. Photodeposition of Silver Can Result in Metal-Enhanced Fluorescence. **Applied Spectroscopy**, v. 57, n. 5, p. 526-531, 2003.

20 AHMMED, K. M. T.; GRAMBOW, C.; KIETZIG, A. Fabrication of Micro/Nano Structures on Metals by Femtosecond Laser Micromachining. **Micromachines**, v. 5, n. 4, p. 1219-1253, 2014.

21 CHEN, Y. et al. Enhanced fluorescence effect from complex nanostructure decorated with the native oxide layer. **Journal of Optics**, v47, n. 3, 2017. doi: 10.1007/s12596-017-0423-0.

22 PARFENOV, A. et al. Enhanced fluorescence from fluorophores on fractal silver surfaces. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 34, p. 8829-8833, 2003.

23 BAGNATO, V. S. **Laser e suas aplicações em ciência e tecnologia**. São Paulo: Livraria da Física, 2008.

24 PASCHOTTA, R. **Femtosecond lasers**: the encyclopedia of laser physics and technology. RP photonics consulting GmbH. Disponível em <https://www.rp-photonics.com/femtosecond_lasers.html>. Acesso em: 29 maio 2019.

25 SUNDARAM, S.K.; MAZUR, E. Inducing and probing non-thermal transitions in semiconductors using femtosecond aser pulses. **Nature Materials**, v. 1, n. 4, p. 217-224, 2002.

26 PASCHOTTA, R. **Titanium–sapphire lasers**: the encyclopedia of laser physics and technology. RP photonics consulting GmbH. Disponível em <https://www.rp-photonics.com/titanium_sapphire_lasers.html> Acesso em: 29 maio 2019.

27 PHILLIPS, K. C. et al. Ultrafast laser processing of materials: a review. **Advances in Optics and Photonics**, v. 7, n. 4, p. 684-712, 2015.

28 PERRY, M. Multilayer dielectric gratings: increasing the power of light. **Science & Technology Review**, 1995. Disponível em: <https://str.llnl.gov/str/pdfs/09_95.2.pdf>. Acesso em 30 abr. 2019.

29 WILEY, B. J., et al. Maneuvering the surface plasmon resonance of silver nanostructures through shape-controlled synthesis. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 32, p. 15666-15675, 2006.

30 MAYERGOYZ, I. D. **Plasmon resonances in nanoparticles**. New York: World Scientific, 2013.

31 SKOLSKI, J. Z. P. Modeling Laser-induced Periodic Surface Structures: An Electromagnetic Approach. Thesis (PhD) - University of Twente, Enschede, The Netherlands. 2014.

32 NIVAS, J. J. J. et al. Surface structuring with polarization-singular femtosecond laser beams generated by a q-plate. **Scientific Reports**, v. 7, 2017. doi: 10.1038/srep42142.

33 TOYSERKANI, E.; RASTI, N. Ultrashort pulsed laser surface texturing. **Surface Laser Engineering**, p. 441-453, 2015. doi: 10.1016/B978-1-78242-074-3.00018-0.

34 GUREVICH, E.L.; GUREVICH, S.V. Laser induced periodic surface structures induced by surface plasmons coupled via roughness. **Applied Surface Science**, v. 302, p. 118-123, 2014. doi: 10.1016/j.apsusc.2013.10.141

35 RYCENGA, M. et al. Controlling the synthesis and assembly of silver nanostructures for plasmonic applications. **Chemical Reviews,** v. 111, n. 6, p. 3669-3712, 2011.

36 DOWNS, R.T.; HALL-WALLACE, M. The American mineralogist crystal structure database. **American Mineralogist**, v. 88, n. 1, p. 247-250, 2003.

37 VOORT, G. F. V. **Metallography, principles and practice**. New York: AMS International, 1999.

38 GOLDSTEIN, J. et al. **Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis**. New York: Microanalysis, 2003.

39 VOROBYEV, A. Y.; GUO, C. Spectral and polarization responses of femtosecond laser-induced periodic surface structures on metals. **Journal of Applied Physics**, v. 103, n. 4, p. 043513, 2008.

40 GRIGOROPOULOS, C. P.; CHIMMALGI, A.; KOMVOPOULOS, K. Surface nanostructuring by nano-/femtosecond laser-assisted scanning force microscopy. **Journal of Applied Physics**, v. 97, n. 10, p. 104319, 2005.

41 BRANCATO, L. et al. Surface nanostructuring of parylene-C coatings for blood contacting implants. **Materials**, v. 11, n. 7, 2018. doi: 10.3390/ma11071109.

42 ROOIJ, A. The oxidation of silver by atomic oxygen. **ESA Journal**, v. 13, p. 363, 1989. Disponível em:<http://www.esmat.esa.int/Atox_on_Ag.PDF.> Acesso em: 23 jan. 2018.

43 SHTOYKO, T. et al. Enhanced fluorescent immunoassays on silver fractal-like structures. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 6, 2008. doi: 10.1021/ac7019915.

44 SHTOYKO, T. et al. Enhanced fluorescent immunoassays on silver fractal-like structures. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 6, 2008. doi: 10.1021/ac7019915.

45 BOS, D. C.; DE RANITZ-GREVEN, W.L.; DE VALK, H. W. Advanced glycation end products, measured as skin autofluorescence and diabetes complications: a systematic review. **Diabetes Technology & Therapeutics**, v. 13, n. 7, p. 773, 2011.

46 PAOLILLO, F. R. et al. Noninvasive assessments of skin glycated proteins by fluorescence and Raman techniques in diabetics and nondiabetics. **Journal of Biophotonics,** v. 12, n. 1, 2018. doi: 10.1002/jbio.201800162.

47 PAOLILLO, F. R. et al. Advanced glycation endproducts as biomakers for risk of diabetes and cardiovascular diseases by skin autofluorescence: a noninvasive optical screening. **Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery**, v. 37, n. 3, 2019. doi: 10.1089/photob.2018.4563

48 AL-OGAIDI, I. et al. A gold@silica core–shell nanoparticle-based surfaceenhanced Raman scattering biosensor for label-free glucose detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 811, p. 76-80, 2014. doi: 10.1016/j.aca.2013.12.009.

49 PAOLILLO, F. R. et al. Short-term and long-term efects of osteoporosis on incisor teeth and femoral bones evaluated by Raman spectroscopy and energy dispersive X-ray analysis in ovariectomized rats. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 37, n. 1, p. 18-27, 2018.

50 SOUZA, R. F. S.; CASTRO NETO, J. C. **Influência da radiação ultravioleta no envelhecimento do cristalino humano e na formação da catarata relacionada à idade**. São Carlos: Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 2017.

51 MOVASAGHI, Z., REHMAN, S. REHMAN, I. U. Raman spectroscopy of biological tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 42, n. 5, p. 493-541, 2007.

APÊNDICE

Aplêndice A - Análise de produtos finais de glicação avançada (AGEs) em pele utilizando espectroscopia Raman e de fluorescência

O Diabetes Melittus é uma doença crônica caracterizada por hiperglicemia e associada com um conjunto de disfunções metabólicas decorrente de alterações no mecanismo de produção e/ou ação da insulina que pode conduzir para complicações do sistema cardiovascular, neural, renal, ocular, entre outros, e o aumento do número de diabéticos está relacionado com a obesidade, sedentarismo, estilo de vida e hábitos pouco saudáveis. No ano de 2015, foram diagnosticadas aproximadamente 382 milhões de pessoas (5,23% da população mundial) com diabetes em todo o mundo, e a estimativa é que este número será por volta de 471 milhões no ano de 2035. (45) O diagnóstico de diabetes é um alvo de diversos estudos, principalmente na busca de ferramentas de acompanhamento não invasivas, como através de medida de glicose na pele e olhos. (46)

Para a investigação de produtos finais de glicação avançados (do inglês - *Advanced Glycation End-products*, ou AGEs), cujo acúmulo está relacionado ao estado hiperglicêmico causado pela diabetes, foi desenvolvido um projeto no início do programa de mestrado para a investigação, de forma não invasiva, dos AGEs na pele. Foi então utilizada a medida da autofluorescência da pele, utilizando-se o espectrômetro comercial AGE Reader mu (DiagnOptics Technologies B.V., Groningen, the Netherlands) que apresenta um score de risco cardiovascular ao paciente; e um espectrômetro Raman portátil (Ocean Optics, Inc., Dunedin, Florida) com excitação por laser de diodo (785 nm), que apresenta o espectro de espalhamento Raman das moléculas no tecido.

O estudo clínico foi conduzido com 94 voluntários com idade entre 20 e 80 anos. Os pacientes foram classificados de acordo com grupos de idade (adultos, meia idade e idosos), condição de saúde (saudáveis, pré-diabéticos ou diabéticos) e tipo de pele segundo a escala Fitzpatrick (grupo de pele negra - V e VI na escala).

Foi coletado a autofluorescência e o espectro Raman do antebraço de todos os voluntários, além de realizar anamnese.

Foi obtido alta autofluorescência na pele para voluntários dos grupos de meia-idade e idosos, assim como para pré-diabéticos e diabéticos. Para a espectroscopia Raman, foi observada a alteração no estado de hidratação da pele, degradação do colágeno tipo I e aumento da glicação relacionado com diabetes e envelhecimento. Também foi obtida correlação fraca e positiva da autofluorescência e a razão de picos (855/876) do Raman, relacionada com a glicação de proteínas. Estes resultados foram publicados na forma de artigo com o título "*Noninvasive assessments of skin glycated proteins by fluorescence and Raman techniques in diabetics and nondiabetics*" no *Jornal of Biophotonics*. (47)

Também foram obtidas correlações positivas entre o aumento da autofluorescência da pele com a idade, índice de massa corporal, gordura corporal, circunferência da cintura e pressão sanguínea sistólica. Estes resultados mostram que o acúmulo de proteínas glicadas e o aumento do risco de doenças cardiovasculares nos pacientes estão relacionados à obesidade, envelhecimento, diabetes e síndrome metabólica. Estas análises foram descritas no artigo "*Advanced Glycation Endproducts as Biomakers for Risk of Diabetes and Cardiovascular Diseases by Skin Autofluorescence: A Noninvasive Optical Screening*", publicado no *Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery*. (48)

Apêndice B - Detecção de glicose em soluções diluidas utilizando espectroscopia Raman

O tema relacionado ao diabetes e análises por espectroscopia Raman levou à investigação de amostras diluídas de glicose, de forma a se obter uma forma de diagnóstico e acompanhamento de diabetes não invasivo vislumbrando o estudo de amostras biológicas (saliva e lágrima). Para tanto, foi primeiro investigado o limite do espectrômetro Raman utilizado, analisando-se amostras de glicose diluídas em água. Este estudo mostrou que o limite para detecção sem qualquer amplificação foi a concentração de 1 g/dl, como indicado na Figura 67,que é uma concentração ao menos 1.000 vezes maior que a encontrada em lágrima e saliva (5-30 mg/dl). Portanto fez-se necessário a busca por formas de amplificação do sinal de espalhamento Raman.

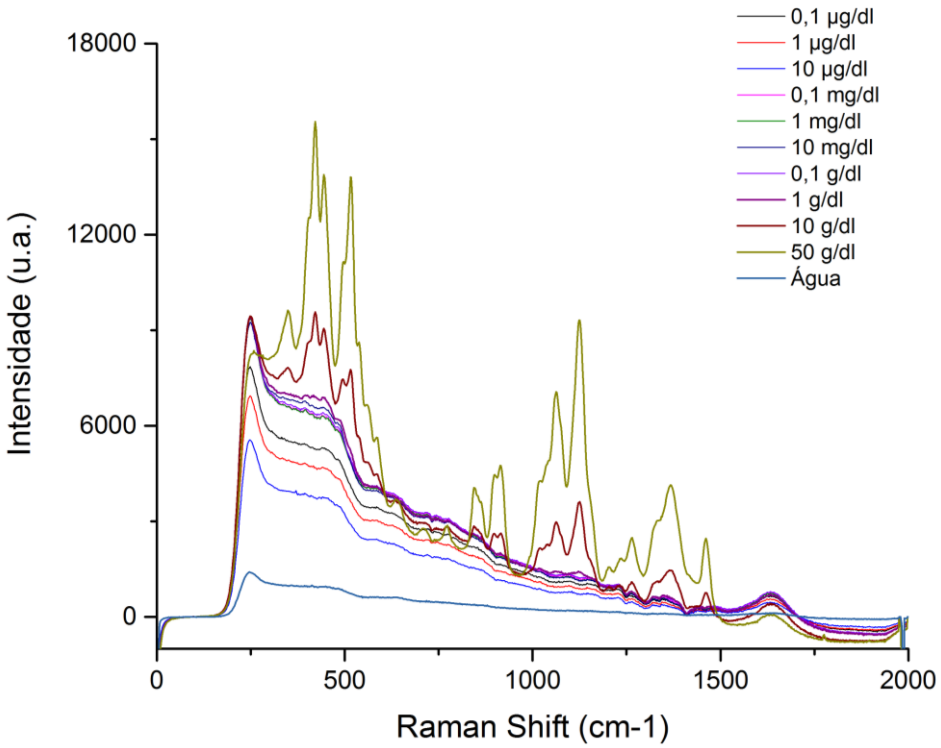

Figura 67 - Espectro Raman de amostras de glicose diluídas em água, indicando a identificação apenas até a concentração de 1 g/dl

Fonte: Elaborada pelo autor

Uma ferramenta para amplificar o sinal de espalhamento é através do aumento da superfície sobre qual a amostra será adicionada. SERS é um acrônimo da palavra em inglês surface-enhanced Raman scattering e sua tradução para o português significa espectroscopia Raman de superfície aumentada. A técnica SERS é uma forma de análise de espectros Raman com melhoramento do sinal obtido através da adição de nanopartículas à amostra, o que reduz os efeitos da água apresentados no espectro na região do infravermelho, e aumenta a sensibilidade do equipamento, uma vez que para as análises são utilizadas amostras com quantidade de analito muito baixa. Esta técnica possibilita a detecção de concentrações muito baixa de determinados compostos, uma vez que a adição da amostra em análise em nanoestrutura rugosa de metal tem o sinal de espalhamento inelástico (espalhamento Raman) aumentado. (49)

Para a criação de superfícies capazes de aumentar o efeito, foi investigada a utilização de superfícies de prata marcada com laser femtossegundo. Esta tentativa levou à possibilidade de aumento de fluorescência pelo efeito MEF, já descrito anteriormente, entretanto, os testes para efeito SERS ainda serão realizados em futuros trabalhos.

Apêndice C - Identificação de AGEs em diferentes tecidos biológicos

Também foram feitas análises de comparação do espectro Raman em diferentes tecidos. Estas análises foram realizadas utilizando como base trabalhos realizados anteriormente no Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica (CEPOF) do Instituto de Física de São Carlos (IFSC/USP).

Os espectros da pele coletados foram analisados em conjunto com espectros de osso de ratas de um estudo de efeitos de curto e longo prazo em ratas com (OV) e sem (CV) osteoporose, (50) e também com espectros de cristalino de olhos de porco, tomados para análise do desenvolvimento de catarata por exposição à radiação UV (CIC) e cristalinos sem indução (SIC). (51) Os espectros podem ser observados na figura 68.

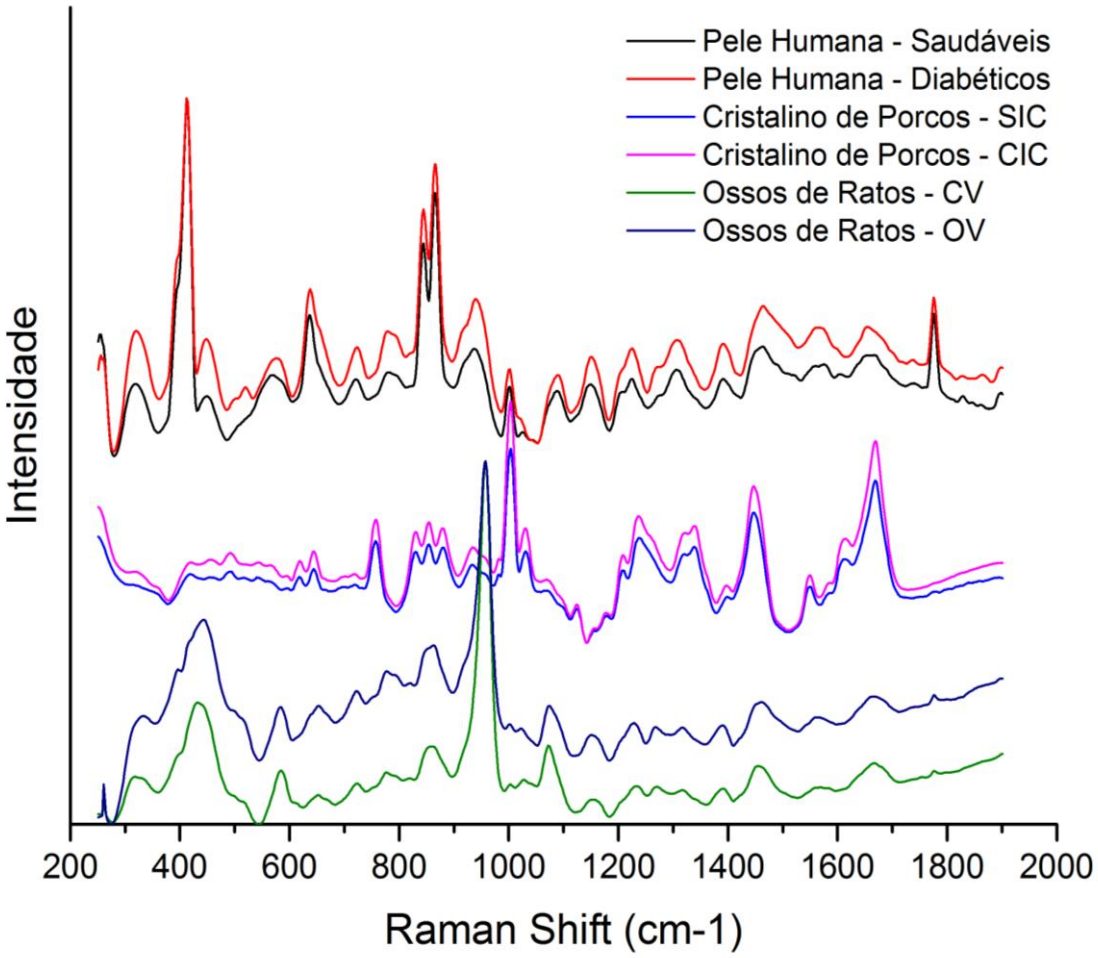

Figura 68 - Espectros Raman para comparação dos efeitos de doenças relacionadas ao envelhecimento em pele, cristalino e ossos

Fonte: Elaborada pelo autor

A comparação se baseou em buscar nos espectros para os três tecidos marcadores moleculares de envelhecimento. Entre eles, foram selecionados picos correspondentes à prolina e hidroxiprolina (derivados da glicação do colágeno tipo I), petosidina da matrix extracelular e glucosepano, amida I relacionada ao colágeno e diferentes confomações dele, amida III como contribuinte para a formação das estruturas proteicas, além de carboidratos relacionados à ligações não-enzimáticas com proteínas ou lipídeos devido ao processo de envelhecimento e/ou hiperglicemia gerando AGEs. (52)