

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA

**TÉCNICAS ÓPTICAS PARA CARACTERIZAÇÃO E
DIAGNÓSTICO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS.**

por

DIEGO JOSÉ RÁTIVA MILLÁN

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia Elétrica.

ORIENTADOR: RENATO EVANGELISTA DE ARAUJO

CO-ORIENTADOR: ANDERSON STEVENS LEONIDAS GOMES

Recife, Março de 2008.

M645t

Millán, Diego José Rátiva.

Técnicas ópticas para caracterização e diagnóstico de sistemas biológicos / Diego José Rátiva Millán. - Recife: O Autor, 2008.
99 folhas, il : figs., tabs.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG.
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica, 2008.

Inclui Bibliografia.

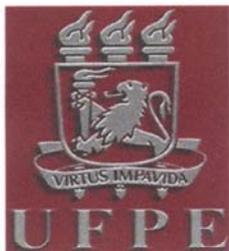
1. Engenharia Elétrica. 2. Biofotônica. 3. Óptica Não Linear.
4. Fluorescência. 5. Sistemas Biológicos. I. Título.

UFPE

621.3

CDD (22. ed.)

BCTG/2008-057



Universidade Federal de Pernambuco

Pós-Graduação em Engenharia Elétrica

PARECER DA COMISSÃO EXAMINADORA DE DEFESA DE TESE DE
DOUTORADO

DIEGO JOSÉ RÁTIVA MILLÁN

TÍTULO

**“TÉCNICAS ÓPTICAS PARA CARACTERIZAÇÃO E
DIAGNÓSTICO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS”**

A comissão examinadora composta pelos professores: RENATO EVANGELISTA DE ARAUJO, DES/UFPE, EDUARDO FONTANA, DES/UFPE, ANDERSON STEVENS LEONIDAS GOMES, DF/UFPE, HUGO ENRIQUE HERNÁNDEZ FIGUEROA, DMO/UNICAMP e JEAN PIERRE VON DER WEID, CTC/PUC sob a presidência do prof. Eduardo Fontana, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica, consideram o candidato **DIEGO JOSÉ RÁTIVA MILLÁN**
APROVADO.

Recife, 14 de março de 2008.

EDUARDO FONTANA

Coordenador e Membro Titular Interno

RENATO EVANGELISTA DE ARAÚJO

Orientador e Membro Titular Interno

HUGO ENRIQUE HERNÁNDEZ FIGUEROA

Membro Titular Externo

ANDERSON STEVENS LEONIDAS GOMES

Co-Orientador e Membro Titular Externo

JEAN PIERRE VON DER WEID

Membro Titular Externo

AGRADECIMENTOS.

Dedico este trabalho aos meus pais, Jairo e Raquel, para quem não consigo poupar palavras, diante de tanto Amor, “as minhas irmãs e a Rebeca” (minhas mulheres), a Família da Rebeca, Sr Dany e Dintinha, o Mago e o Gordo. Agradeço especialmente a todas e cada uma das pessoas que me acompanharam espiritualmente desde a Colômbia.

Agradeço ao Brasil e em especial ao Pernambuco.

A CAPES, que com a ajuda financeira tornou possível este trabalho.

ao Professor Renato, por todos os conselhos, pelas experiências compartilhadas, pelos guiamientos e por sempre ter me ensinado muitas coisas além da pesquisa.

ao Professor Joaquim, seguramente sem o seu apoio e a sua atenção não poderia ter sequer começado meu doutorado.

ao Professor Anderson, pelas suas idéias e por sempre ter oferecido a estrutura de seu laboratório.

aos professores deste departamento, especialmente aos professores Joaquim Martins filho, Frederico Dias Nunes, Antonio Belfort, Élio Meneses pelas disciplinas por estes lecionadas.

ao prof. Cid de Araujo do departamento da Física, pela atenção e apoio aos meus propósitos na pesquisa.

aos funcionários do departamento da Engenharia Elétrica, especialmente a Andréia, e aos funcionários do departamento da Física.

aos colegas de departamento, especialmente ao Helder Fera, Daniel, Douglas, Serginho, Gustavo, Cabeleira, Lucas, Saulo, Marcílio...

a galera da Física, Eroni, Negão, Mariana, João, Tâmara, e o Bernardo.

ao Anderson Barbosa, por sempre estar presente.

A los muchachos, Miguel, Luis Arturo, Hans, al che Esteban, José Barba, Carlitos, Jhon Fredy, Ramon, a Eduardo y a mi primo Miguelito. A las mujeres de los muchachos y en especial a Ana Julia.

a Jhon Fredy e agora os novos companheiros de moradia, Milk, Luis e Bruno, e aos amigos do seminário Terminus.

Enfim, aos que estiveram mais próximos de mim durante este período: Daniel, a quem agradeço pela ajuda, muitas vezes de caráter essencial e por me ensinar a visão do engenheiro, a Luis Arturo por todas as sugestões e explicações, ao Edilson por ter me ensinado as “dicas” nos momentos certos.

Diego Rátiva, março de 2008.

Resumo da Tese apresentada à UFPE como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia Elétrica.

TÉCNICAS ÓPTICAS PARA CARACTERIZAÇÃO E DIAGNÓSTICO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS.

Diego José Rátiva Millán

Março/2008

Orientador: Renato Evangelista de Araujo, Dr.

Co-orientador: Anderson Stevens Leonidas Gomes, Dr.

Área de Concentração: Fotônica.

Palavras-chave: Biofotônica, Óptica Não Linear, Fluorescência, Sistemas Biológicos, Microscopia Multifotônica.

Número de Páginas: 99.

No presente trabalho foram caracterizadas e exploradas as propriedades ópticas lineares e não lineares de sistemas biológicos. A determinação dos aspectos básicos da interação luz-biosistemas é essencial para o desenvolvimento de novas aplicações em Biofotônica. Aqui, foram elaborados novos métodos ópticos para a caracterização e diagnóstico de diferentes sistemas biológicos (aminoácidos e fungos). Em particular, foi desenvolvida uma nova variação da técnica de Varredura Z, denominada de *TMEZ* (“*Thermally managed eclipse Z-scan*”). Com essa técnica, foram determinadas algumas das propriedades ópticas não lineares de diferentes soluções de aminoácidos e biocolóides. Também foi implementada a técnica de microscopia multifotônica de campo aberto. Com esta técnica foi demonstrado que nanopartículas metálicas podem ser usadas como instrumento para o aumento da intensidade de fluorescência de cromóforos celulares. A análise da emissão fluorescente de biosistemas pode ainda ser explorada como ferramenta para diagnóstico clínico. Com excitação por luz ultravioleta, a emissão de diferentes fungos foi caracterizada e um novo dispositivo foi proposto para o auxílio do diagnóstico dermatológico.

Abstract of thesis presented to UFPE as a partial fulfillment of the requirements for the degree Doctor in Electrical Engineering.

OPTICAL TECHNIQUES FOR THE CHARACTERIZATION AND DIAGNOSTIC OF BIOLOGICAL SYSTEMS

Diego José Rátiva Millán

March/2008

Supervisor: Renato Evangelista de Araujo, Dr.

Co-supervisor: Anderson Stevens Leonidas Gomes, Dr.

Area of Concentration: Photonics.

Keywords: Biophotonics, Nonlinear optics, Fluorescence, Biological systems, Multiphoton microscopy.

Number of Pages: 99.

The linear and nonlinear optical properties of biological systems were measured and analyzed. Studies on the interaction of light with biosystems can lead to new findings and application in Biophotonics. New optical methods were introduced for the characterization and diagnostic of biological systems (amino acids and fungi). More specifically, a new variation of the Z-scan technique entitled TMEZ (Thermally managed eclipse Z-scan”) was developed. To demonstrate the method, we explored the large sensitivity of the technique by measuring the nonlinear response of amino acid solutions and biocolloids. Moreover, the wide-field multiphoton microscopy technique was implemented. The nonlinear imaging method allowed the demonstration that multiphoton autofluorescence emission of molecules can be enhanced by metallic nanoparticles. Autofluorescence analysis may also be explored in clinical diagnostic procedures. By exciting several fungi with ultraviolet light, the microorganisms’ fluorescence was observed and characterized, and a new device was proposed for dermatological diagnosis of fungal infection.

SUMÁRIO.

CAPITULO 1. INTERAÇÃO DA LUZ COM MATERIAIS BIOLÓGICOS.

1.1 INTERAÇÃO ENTRE A LUZ E A MATÉRIA A NÍVEL MOLECULAR.	2
1.1.1. Absorção e emissão.	2
1.2. INTERAÇÃO DA LUZ COM A MATÉRIA.	5
1.2.1. Regime óptico linear. (Baixas Intensidades).	5
1.2.2. Regime óptico não linear. (Altas Intensidades).	7
1.2.3. Não linearidades microscópicas.	9
1.2.4. Absorção Multifotônica.	11
1.2.5. Não linearidades ópticas em materiais orgânicos.	12
1.3. CONCLUSÕES.	14
1.4. REFERÊNCIAS.	15

CAPÍTULO 2.

NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM MICROSCOPIA MULTIFOTÔNICA DE CAMPO ABERTO.

2.1. MICROSCOPIA MULTIFOTÔNICA.	18
2.2. MICROSCÓPIA MULTIFOTÔNICA DE CAMPO ABERTO. <i>WFTP</i> .	20
2.2.1. Desenvolvimento do sistema <i>WFTP</i> .	21
2.2.2. Microscopia multifotônica do Triptofano e partículas de prata.	23
2.3. ANÁLISE DA AUTOFLUORESCÊNCIA DE AMINOÁCIDOS NA PRESENÇA DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.	26
2.3.1. Fluorescência do Triptofano.	27
2.3.2. Nanopartículas metálicas e fluorescência.	27
2.3.3. Medida de fluorescência. (Espectro).	31
2.4. CONCLUSÕES.	39
2.5. REFERÊNCIAS.	40

CAPÍTULO 3.

A TÉCNICA DE VARREDURA Z POR ECLIPSE COM CONTROLE DE EFEITOS TÉRMICOS.

3.1. VARREDURA Z.	44
3.1.1. Variação Eclipse Varredura Z.	47
3.1.2. Controle de efeitos térmicos.	49
3.2. TÉCNICA DE VARREDURA Z POR ECLIPSE COM CONTROLE DE EFEITOS TÉRMICOS (<i>TMEZ</i>).	52
3.3. CONCLUSÕES.	56
3.4. REFERÊNCIAS.	57

CAPÍTULO 4.

APLICAÇÕES DA TÉCNICA DE VARREDURA Z POR ECLIPSE COM CONTROLE DE EFEITOS TÉRMICOS (*TMEZ*).

4.1. PROPRIEDADES ÓPTICAS NÃO LINEARES DE AMINOÁCIDOS.	60
3.1.1. Medida do índice de refração não linear de aminoácidos.	62
4.2. PROPRIEDADES ÓPTICAS NÃO LINEARES DE COLOIDES METÁLICOS.	64
4.2.1. Colóides (geometria Maxwell Garnett).	64
4.2.2. Síntese e elaboração das nanopartículas.	65
4.2.3. Absorção Linear.	66
4.2.4. Medida de Índice de refração não linear do Colóide.	68
4.3. PROPRIEDADES ÓPTICAS NÃO LINEARES DE AMINOÁCIDOS E NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.	72
4.3.1. Absorção.	72
4.3.2. Medida do índice de refração não linear.	73
4.4. CONCLUSÕES.	77
4.5. REFERÊNCIAS.	78

CAPITULO 5.

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS POR FLUORESCÊNCIA.

5.1. CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA DE FUNGOS.	83
5.1.1. Fontes de excitação.	83
5.1.2. Sistema de detecção.	84
5.1.3. Fungos.	85
5.1.4. Medida da fluorescência.	85
5.2. DISPOSITIVO ÓPTICO.	90
5.3 CONCLUSÕES.	93
5.4 REFERÊNCIAS.	94

CAPÍTULO 6.

CONCLUSÕES, RESULTADOS E PERSPECTIVAS.

6.1 Conclusões.	96
6.2. Resultados.	97
6.3. Perspectivas.	99

Lista de Figuras.

Figura 1.1. Diagrama de absorção e emissão espontânea.	3
Figura 1.2. Diagrama de Jablonski descrevendo os mecanismos de absorção e de relaxação ao estado fundamental da molécula.	4
Figura 1.3. Geometria da reflexão, refração, absorção e espalhamento.	6
Figura 1.4. Conversão ascendente de energia, por absorção de dois fótons.	11
Figura 1.5. Representação dos orbitais e de ligações π e σ entre átomos de carbono.	13
Figura 2.1. Excitação por um fóton e excitação multifotônica.	18
Figura 2.2. Autofluorescência por excitação de dois fótons da pele humana a diferentes profundidades .	19
Figura 2.3. Comparação da iluminação por microscopia convencional e microscopia <i>WFTP</i> .	21
Figura 2.4. Montagem experimental para a técnica <i>WFTP</i> .	22
Figura 2.5. Imagem de Coumarine 400 por microscopia convencional e pela técnica <i>WFTP</i>	22
Figura 2.6. Espectro de Fluorescência da Coumarine.	23
Figura 2.7. Imagem de Triptofano por microscopia convencional e pela técnica <i>WFTP</i> .	24
Figura 2.8. Relação de intensidades indicando que o processo de excitação envolve três fótons em 800nm.	24
Figura 2.9. Imagens típicas de aglomerados de Triptofano sem e com nanopartículas.	25
Figura 2.10. Histograma para as imagens de Triptofano sem e com nanopartículas.	26
Figura 2.11. Campo elétrico E_0 incidindo em uma esfera dielétrica ϵ_{NP} num meio hospedeiro ϵ_h .	28
Figura 2.12. Diagrama de Jablonski com e sem os efeitos da vizinhança de partículas metálicas.	30
Figura 2.13. Molécula de Lisamina foi ligada a uma nanopartícula de ouro de tamanhos de 1nm ate 30nm.	31

Figura 2.14. Montagem experimental para a medida de fluorescência por absorção de três fótons utilizando laser Ti:Safira e Nd:YAG.	32
Figura 2.15. Fluorescência das biosoluções para diferentes concentrações de nanopartículas de prata de 9nm e 0,65nm.	33
Figura 2.16. Espectro de fluorescência por excitação com dois fótons em 532nm da solução Triptofano, para diferentes concentrações de nanopartículas metálicas.	35
Figura 2.17. Espectro de fluorescência por excitação com três fótons em 800nm da solução de Triptofano, diferentes concentrações de nanopartículas.	36
Figura 2.18. Diagrama de excitação do Triptofano por três fótons de 800nm, com e sem nanopartículas metálicas.	37
Figura 2.19. Intensidade da fluorescência para diferentes concentrações de partículas metálicas de 0,65nm e 9nm.	38
Figura 2.20. Análise temporal da fluorescência do Triptofano com nanopartículas.	38
Figura 3.1. Efeito de auto-focalização e auto-defocalização.	44
Figura 3.2. Experimento Varredura Z.	45
Figura 4.3. Curva de Varredura Z na configuração íris aberta.	46
Figura 4.4. Esquema experimental da variação Eclipse Varredura Z.	48
Figura 4.5. Comparação dos valores Eclipse Varredura Z e Varredura Z convencional.	48
Figura 4.6. Instrumentação de lente térmica de feixe único.	51
Figura 3.7. Montagem experimental para a variação da Varredura Z por eclipse com controle de efeitos térmicos.	52
Figura 3.8. Transiente típico de sinal de lente térmica.	53
Figura 3.9. Evolução temporal da transmissão normalizada e curva de Varredura Z para CS ₂ .	54
Figura 3.10. Medidas de Varredura Z para água.	54
Figura 3.11. Medidas de Varredura Z para o quartzo.	55

Figura 4.1. Estrutura química dos aminoácidos.	60
Figura 4.2. Estrutura dos aminoácidos aromáticos.	61
Figura 4.3. Medida do índice de refração não linear utilizando a técnica “ <i>TMEZ</i> ” para a solução de Triptofano.	62
Figura 4.4. Topologia do composto colóide.	64
Figura 4.5. Histograma de distribuição de tamanho das partículas de prata da Puresst Colloid Inc. de tamanho 0,65nm.	66
Figura 4.6. Imagens por microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas de prata, histograma com a distribuição de tamanho das nanopartículas.	66
Figura 4.7. Espectro de absorção de colóides de prata de tamanho 9nm e 0,65nm.	68
Figura 4.8. Medida do índice de refração não linear utilizando tecnica ‘ <i>TMEZ</i> ’ para água e colóide de prata para 9nm.	70
Figura 4.9. Dependência do índice de refração não linear com o fator de preenchimento f , para partículas de tamanho 9nm e 0,65nm com comprimento de onda de 800nm.	70
Figura 4.10. Espectro de absorção para diferentes concentrações de nanopartículas de pratas de diâmetro $d \sim 9\text{nm}$ e $d \sim 0,65\text{nm}$ em solução de Triptofano.	72
Figura 4.11. Espectro de absorção para diferentes concentrações de nanopartículas de pratas com $d \sim 9\text{nm}$ em diferentes soluções.	73
Figura 4.12. Dependência da não linearidade efetiva com o fator de preenchimento de partículas de $d \sim 0,65\text{nm}$ em diferentes soluções.	75
Figura 4.13. Dependência da não linearidade efetiva com o fator de preenchimento de partículas de $d \sim 9\text{nm}$ em diferentes soluções.	76
Figura 5.1. Espectro das fontes de excitação. (Lâmpada, LED e LASER).	83
Figura 5.2. Montagem experimental para a medida de fluorescência utilizando três diferentes fontes de luz. Lâmpada UV, LED e LASER Nd:YAG (355nm).	84
Figura 5.3. Espectros dos fungos excitados com Lâmpada de Wood.	86
Figura 5.4. Espectros dos fungos excitados com LED UV.	87
Figura 5.5. Espectros dos fungos excitados com LASER UV.	87
Figura 5.6. Dispositivo para caracterização de fungos.	90

Figura 5.7. Curvas de transmissão do Filtro FB430-10 e Filtro FB510-10 da empresa Thorlabs. 91

Figura 5.8. Curvas de responsividade do detector FGAP71. 91

INTRODUÇÃO.

No século passado a humanidade experimentou vários avanços tecnológicos que continuam alterando nossas perspectivas, interações científicas e sociais. Com o desenvolvimento do LASER (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation), na metade do século passado, ampliou-se o uso da luz como ferramenta tecnológica. Dentro das possíveis atuações de técnicas ópticas, a área biológica tem atraído bastante atenção.

A Biofotônica é um termo que refere-se a todas as técnicas que estão relacionadas com a interação de elementos biológicos e fótons, com interessantes aplicações nas ciências da vida, medicina, agricultura e meio ambiente. A Biofotônica oferece grandes oportunidades para desenvolvimentos bio-tecnológicos e de pesquisa fundamental.

Nesta tese foi feito um estudo das propriedades ópticas lineares e não lineares de sistemas biológicos. O que possibilitou a elaboração de novos métodos e técnicas ópticas para a caracterização e diagnóstico de diferentes sistemas biológicos.

No capítulo 1, são apresentados os conceitos fundamentais dos fenômenos ópticos lineares e não lineares utilizados na explicação das técnicas e resultados dos capítulos posteriores.

Em microscopia óptica, particularmente em microscopia de fluorescência multifotônica, agentes de contraste são utilizados para aumentar a qualidade das imagens. No capítulo 2 é mostrado que partículas metálicas de tamanho nanométrico podem ser exploradas em microscopia multifotônica, onde a emissão fluorescente utilizada na formação de imagens biológicas, pode ser aumentada pela presença de nanopartículas metálicas. Para isto é explorada uma técnica recente de microscopia multifotônica conhecida como “Microscopia Multifotônica de campo aberto”. Com essa técnica são feitas imagens de agregados de Triptofano na presença de nanopartículas de prata.

Dentro dos estudos dos fenômenos ópticos não lineares de biosistemas, a técnica de Varredura Z (e suas variações) é bastante explorada. Esta aceitação é devida, principalmente, à simplicidade da técnica como também a fácil interpretação dos seus resultados. A técnica de Varredura Z permite determinar, separadamente e simultaneamente, as propriedades não lineares tanto de índice de refração como também da absorção de sistemas biológicos. No capítulo 3, é apresentada uma nova variação da técnica de Varredura Z chamada de *TMEZ* (“*Thermally managed eclipse Z-scan*”) que mede a absorção não linear e o índice de refração não linear com uma sensibilidade de uma ordem de grandeza maior do que a técnica de Varredura Z convencional. Além de ser capaz de distinguir as contribuições térmicas e não térmicas para as propriedades não lineares dos meios analisados.

Utilizando a grande sensibilidade da técnica *TMEZ*, ideal para caracterização de sistemas orgânicos, no capítulo 4 as propriedades ópticas não lineares de vários aminoácidos são exploradas. O interesse nesse estudo é devido à importância desses componentes biológicos, especialmente o Triptofano, Fenilalanina e Tirosina que apresentam interessantes propriedades ópticas. As propriedades ópticas de um meio biológico podem ser alteradas pela presença de partículas de prata. Esse tipo de modificação pode ser de grande interesse para aplicações em bioimagens e biomedicina. Desta forma, no capítulo 4, é feito um estudo das propriedades ópticas não lineares das partículas metálicas em meios biológicos.

A análise de autofluorescência de sistemas biológicos é um importante instrumento para diagnósticos. A autofluorescência de fungos ‘in vitro’ é estudada no capítulo 5. A autofluorescência, devido à presença de aminoácidos aromáticos em fungos, pode tornar-se uma ferramenta de apoio para os dermatologistas na identificação destes microorganismos. Com a caracterização óptica de fungos é proposto o protótipo de um dispositivo para auxiliar a sua identificação pelos dermatologistas.

CAPÍTULO 1. INTERAÇÃO DA LUZ COM MATERIAIS BIOLÓGICOS.

A Biofotônica é a ciência que trata da interação de fótons com sistemas biológicos. Esta interação luz matéria é a essência de aplicações como diagnósticos ópticos, terapias foto-induzidas, microscopias etc. A maioria dessas interações são induzidas por absorção linear da luz. No entanto, aplicando campos intensos, pode-se induzir processos ópticos não lineares, como absorção de dois ou mais fótons e modificações do índice de refração linear.

Técnicas ópticas possibilitam a observação remota, em tempo real, não destrutiva de eventos vitais em células, tecidos e microorganismos vivos. São varias as suas aplicações nas áreas de ciências da vida, medicina, agricultura e meio ambiente.

Neste capítulo são introduzidos vários conceitos como absorção, espalhamento, fluorescência, fosforescência, absorção multifotônica e conversão ascendente de energia. Tais conceitos são necessários para o entendimento das técnicas experimentais e resultados discutidos nos próximos capítulos.

1.1 INTERAÇÃO ENTRE A LUZ E A MATÉRIA A NÍVEL MOLECULAR.

1.1.1. Absorção e emissão.

A luz é uma radiação eletromagnética constituída por campos elétricos e magnéticos oscilantes. A interação da luz com meios Biológicos pode ser descrita pela geração de uma polarização eletrônica no sistema. Essa descrição é conhecida como aproximação de dipolo elétrico. A resposta a um campo de baixa intensidade é definida por uma dependência linear do momento de dipolo ao campo elétrico, dado pelo momento de dipolo eletrônico $\vec{\mu}_T$ definido pelo produto da carga eletrônica na posição \vec{r} , como mostrado na equação (1.1) [1]:

$$\vec{\mu}_i = -e\vec{r} = \vec{\mu}_i^0 + \zeta_{ij}\vec{E}_j(\omega) \quad (1.1)$$

o termo $\vec{\mu}$ é o dipolo permanente na ausência de campo elétrico e o termo $\zeta_{ij}\vec{E}_j(\omega)$ é o momento de dipolo induzido pelo campo elétrico $\vec{E}(\omega)$ onde ζ é a polarizabilidade linear que relaciona o campo elétrico aplicado ao momento de dipolo.

A interação dipolar V entre a molécula e o campo incidente $\vec{E}(\omega)$ pode ser escrita como [1]:

$$V = -\vec{\mu}_T \cdot \vec{E}(\omega) = -\vec{\mu}_i^0 \cdot \vec{E}(\omega) + \zeta_{ij}\vec{E}(\omega)_i \cdot \vec{E}(\omega')_j \quad (1.2)$$

O primeiro termo da equação 1.2 descreve a interação do dipolo molecular com um fóton de frequência ω do campo aplicado. Esse termo é responsável pelo fenômeno de absorção e emissão de um fóton. O segundo termo representa o espalhamento inelástico e espalhamento Raman, onde um fóton de frequência ω é espalhado inelasticamente (com uma mudança de energia) por uma molécula criando um fóton de frequência ω' , transferindo a diferença de energia com a molécula.

Como se representa na Figura 1.1, o processo de absorção descreve a transição desde um estado quântico inicial de baixa energia, i , a um nível superior de energia, f , sendo a diferença de energia entre níveis igual à energia do fóton incidente. No processo de absorção, geralmente, o nível eletrônico inicial é o estado fundamental (nível de menor energia).

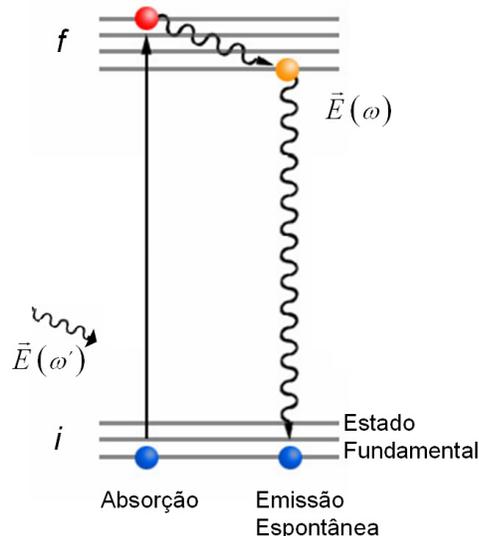


Figura 1.1. Diagrama de absorção e emissão espontânea [2].

A emissão espontânea descreve o retorno da molécula do estado excitado, f , ao estado fundamental, i , emitindo um fóton de energia correspondente à diferença de energia entre esses estados [2]. Os processos de absorção e emissão acontecem entre estados eletrônicos e vibracionais das moléculas.

Após a absorção de um fóton, a molécula no estado excitado retorna ao estado fundamental por diferentes processos. Um deles é o radiativo, onde um fóton é emitido e o outro é o processo não radiativo, onde a energia do estado excitado é dissipada como calor ou gera uma reação química (fotoquímica). O retorno ao estado fundamental pode ser uma combinação dos dois últimos processos [2].

O estado fundamental da maioria das moléculas (orgânicas em particular) envolve elétrons emparelhados com spin total $S=0$, conhecido como estado Singlete. Por notação S_0 representa o estado fundamental das moléculas orgânicas. Uma das exceções é a molécula de oxigênio O_2 , cujo estado fundamental corresponde a um estado Triplete com spin $S=1$.

As regras de transição mostram que para uma excitação a um mesmo estado orbital, a energia correspondente ao estado excitado Tripleto (T_1) é menor que a do Singlete (S_1) [1].

Os vários processos radiativos e não radiativos e de transferência de energia entre estados são representados em um diagrama de Jablonski, como mostra a Figura 1.2 [1].

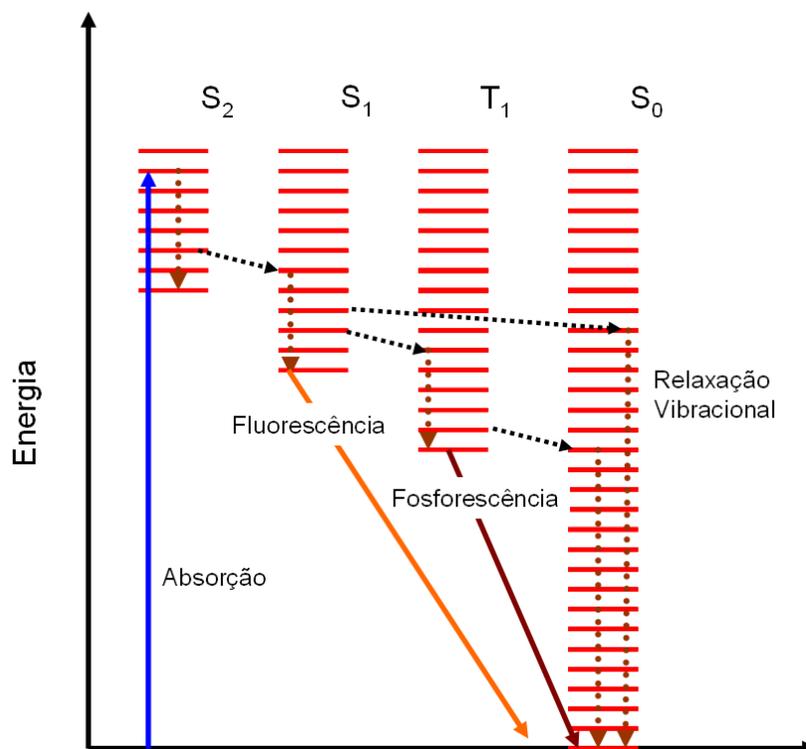


Figura 1.2. Diagrama de Jablonski descrevendo os mecanismos de absorção e de relaxação ao estado fundamental da molécula [1]. Os processos radiativos são representados com uma seta contínua e os processos não radiativos por uma seta tracejada.

No processo de transferência de energia entre o estado S_2 e o estado S_1 , geralmente, o mecanismo não radiativo é dominante. Após uma relaxação rápida vibracional, onde o excesso de energia é dissipado em calor, a molécula pode retornar ao seu estado fundamental emitindo um fóton, conhecido como processo de fluorescência. Essa emissão tem um tempo de vida curto (nanossegundos, 10^{-9} s). Por outro lado, pode existir um processo de relaxação cruzada entre os níveis de energia de diferentes estados de spin, S_1 e T_1 . Após uma relaxação rápida vibracional, um processo de emissão pode acontecer levando o sistema do estado T_1 ao estado fundamental S_0 . Esse processo é conhecido como

Fosforescência. De acordo com as regras de transição, essa transição (de um estado Triplete T_1 a um estado Singlete S_0) é proibida, assim ela é menos provável de acontecer. Como consequência, a fosforescência é uma emissão fraca e com um longo tempo de vida (segundos). Pode existir também relaxação não radiativa do estado T_1 para o estado fundamental S_0 [1].

As moléculas orgânicas presentes em células e em tecidos têm fluorescência natural e são conhecidos como fluoróforos endógenos. Esses fluoróforos são extremamente úteis para gerar imagens biológicas [3].

1.2. INTERAÇÃO DA LUZ COM A MATÉRIA.

1.2.1. Regime óptico linear (Baixas intensidades).

A interação da luz com a matéria leva a efeitos de refração, reflexão, absorção e espalhamento durante a propagação da luz através de um meio. A reflexão e a refração linear estão associadas ao índice de refração do material por onde a luz se propaga [4]. Em aplicações ópticas na medicina a refração linear é importante para caracterizar e estudar tecidos transparentes como os tecidos da córnea [5]. Devido aos efeitos de absorção e espalhamento, há dificuldade na medição do efeito de refração em tecidos escuros.

Como se observa na Figura 1.3, só parte do feixe não absorvido, não espalhado e não refletido é transmitido pelo meio biológico. A absorção, reflexão e espalhamento dependem, primordialmente, do tipo do material e do comprimento de onda utilizado.

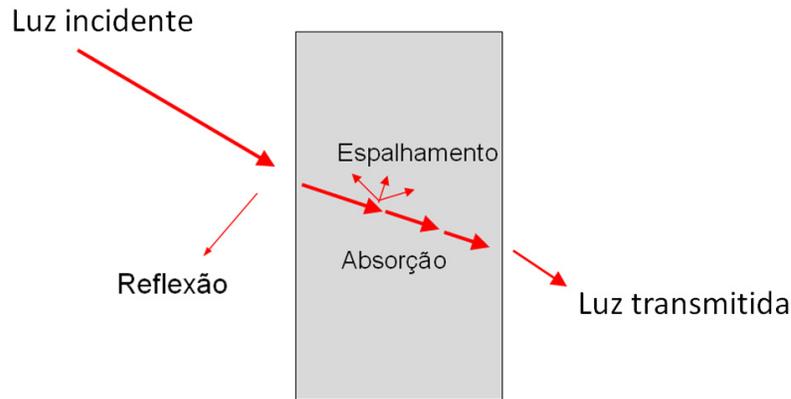


Figura 1.3. Geometria da reflexão, refração, absorção e espalhamento [1].

Quando um campo elétrico é aplicado em um material, ocorre uma separação de cargas. No caso de materiais dielétricos, uma polarização elétrica é induzida [6]. No regime óptico (frequências $\sim 10^{13}$ - 10^{17} Hz) e com campos harmônicos, a contribuição no deslocamento das cargas é, praticamente, do tipo dipolar elétrico. A polarização elétrica é definida como a média do momento dipolar elétrico por unidade de volume. Dessa forma, estabelece-se a relação entre a polarização, \vec{P} , e o campo elétrico externo, \vec{E} . Para baixas intensidades, a relação linear:

$$\vec{P}_i(\omega) = \varepsilon_0 \left(\chi_{ij}^{(1)}(\omega) \vec{E}_j(\omega) \right) \quad (1.3)$$

descreve perfeitamente a polarização induzida por uma componente espectral da luz incidente, onde ε_0 é a permissividade elétrica do vácuo, $\chi_{ij}^{(1)}$ é o tensor de susceptibilidade de primeira ordem cujos sub-índices representam os eixos do sistema cartesiano [7]. Para um meio isotrópico, a permissividade elétrica $\varepsilon(\omega)$ e a susceptibilidade estão relacionadas por:

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_0 (1 + \chi(\omega)) \quad (1.4)$$

A razão entre $\varepsilon(\omega)/\varepsilon_0$ é chamada de constante dielétrica ou permissividade elétrica relativa [4]. Nesse meio isotrópico, o índice de refração $n(\omega)$ está associado à susceptibilidade elétrica por:

$$n(\omega)^2 = \varepsilon(\omega) = \varepsilon_0(1 + \chi(\omega)) \quad (1.5)$$

o índice de refração $n(\omega)$ descreve a resposta óptica do meio à propagação do feixe, determinando a fase e a velocidade de propagação. O índice de refração pode apresentar componentes real e imaginária, ou seja:

$$n(\omega) = n_R(\omega) - jn_I(\omega) \quad (1.6)$$

a parte real $n_R(\omega)$ determina a refração e o espalhamento, enquanto que a parte imaginária $n_I(\omega)$ descreve a absorção da luz no meio [1]. Pode-se relacionar a parte imaginária $n_I(\omega)$ com o coeficiente de absorção linear, α , como:

$$\alpha = 2n_I(\omega)\omega/c \quad (1.7)$$

1.2.2. Regime óptico não linear (Altas intensidades).

Todas as relações até agora estudadas são válidas quando os campos que interagem com o meio são relativamente fracos. No entanto, quando a intensidade de luz incidente é capaz de gerar campos elétricos da ordem dos campos internos associados aos elétrons opticamente ativos do material, essa aproximação linear deixa de ser válida. Neste caso, descreve-se a amplitude da polarização induzida $P_i(\omega)$ como uma expansão não linear do tipo [8]:

$$P_i(\omega) \propto \varepsilon_0 \left(\chi_{ij}^{(1)}(\omega)E_j(\omega) + \chi_{ijk}^{(2)}(\omega)E_j(\omega)E_k(\omega) + \chi_{ijkl}^{(3)}(\omega)E_j(\omega)E_k(\omega)E_l(\omega) + \dots \right) \quad (1.8)$$

onde $\chi_{ij}^{(1)}$ é a susceptibilidade linear, $\chi_{ijk}^{(2)}$ é o tensor que representa a susceptibilidade não linear de segunda ordem, e os demais tensores $\chi_{ijkl}^{(n)}$ são as susceptibilidade não lineares de ordem n.

Para meios com simetria de inversão e desprezando termos de altas ordens, a amplitude da polarização pode ser reescrita em termos das amplitudes do campo como:

$$P_i(\omega) = \varepsilon_0 \left(\chi_{ij}^{(1)}(\omega) E_j(\omega) + \chi_{ijkl}^{(3)}(\omega) E_j(\omega) E_k(\omega) E_l(\omega) \right) \quad (1.9)$$

Assim, à polarização linear do material é acrescentada uma quantidade igual a $\chi_{ijkl}^{(3)eff} E_j E_k E_l$. Onde $\chi_{ijkl}^{(3)eff}$ é definido como a soma de todas as componentes da susceptibilidade elétrica de terceira ordem que contribuem para um determinado processo. A susceptibilidade elétrica de terceira ordem é um termo complexo. A parte real de $\chi_{eff}^{(3)}$ está relacionada ao índice de refração não linear, enquanto que a parte imaginária está relacionada ao coeficiente de absorção não linear do material α_2 [8]. O índice de refração do material pode ser reescrito como:

$$n = n_0 + n_2 I \quad (1.10)$$

sendo n_0 é o índice de refração linear e n_2 corresponde ao índice de refração não linear, que está relacionado com a susceptibilidade elétrica de terceira ordem segundo a equação [9]:

$$n_2 = \frac{1}{2n_0^2 c \varepsilon(\omega)} \text{Re} \left(\chi_{eff}^{(3)}(\omega) \right) \quad (1.11)$$

As unidades do índice de refração não linear são \mathbf{m}^2/\mathbf{W} (ou cm^2/W) no sistema SI, contudo o n_2 também pode ser escrito em unidades **esu**. Para converter o valor de n_2 entre estas unidades pode-se utilizar a relação $n_2 \left(\text{m}^2/\text{W} \right) = 4,19 \times 10^{-7} n_2 \left(\text{esu} \right) / n_0$.

Pode-se ainda, expressar a absorção do material como a soma da absorção linear α_0 mais a parte não linear α_2 :

$$\alpha = \alpha_0 + \alpha_2 I \quad (1.12)$$

Esse processo não tem restrição de simetria e pode acontecer em qualquer meio, simétrico ou não simétrico [8]. Com esse formalismo da susceptibilidade elétrica, podemos analisar uma grande variedade de fenômenos não lineares, como a absorção linear e não linear [10].

Outros mecanismos, além do processo eletrônico de deslocamento de cargas podem gerar uma mudança no índice de refração não linear. Entre estes efeitos tem-se o efeito térmico devido ao aquecimento do material (causando alterações na densidade do meio) pela absorção da luz que nele se propaga, modificando o índice de refração. Os diferentes efeitos que determinam a variação do índice de refração acontecem com diferentes velocidades. A medida do tempo de resposta da não linearidade do material é usada para determinar a contribuição relativa dos efeitos na não linearidade de um material. A Tabela 1.1 mostra valores típicos do índice de refração não linear e do tempo de resposta oriundos de diferentes fenômenos físicos. Enquanto a deformação da nuvem eletrônica gerada pela separação das cargas costuma ocorrer em menor escala de tempo [10], os efeitos térmicos, que induzem altas não linearidades, possuem um tempo de resposta bastante lento.

Tabela 1.1. Valores típicos para índice de refração não linear e tempo de resposta [10].

Mecanismo Físico	$n_2(\text{esu})$	$n_2(\text{m}^2/\text{W})$	$\tau(\text{s})$
Deformação eletrônica	$10^{-12}-10^{-14}$	$10^{-19}-10^{-21}$	10^{-15}
Reorientação Molecular	$10^{-10}-10^{-13}$	$10^{-17}-10^{-20}$	$10^{-8}-10^{-12}$
Redistribuição Molecular	$10^{-12}-10^{-13}$	$10^{-19}-10^{-20}$	10^{-13}
Efeito térmico	$10^{-5}-10^{-8}$	$10^{-12}-10^{-15}$	$10^{-8}-1$

1.2.3. Não linearidades microscópicas.

Para campos com altas intensidades a amplitude do momento de dipolo induzido pode ser descrito através de uma expansão em termos de potências da amplitude do campo incidente.

$$\mu_i = \mu_i^0 + \zeta_{ij} E_j + \beta_{ijk} E_j E_k + \gamma_{ijkl} E_j E_k E_l + \dots \quad (1.13)$$

onde μ_0 é o momento de dipolo permanente e ζ representa a polarizabilidade linear, o coeficiente da parte não linear β é chamado de primeira hiperpolarizabilidade, que esta associada aos efeitos não lineares de segunda ordem, e a segunda hiperpolarizabilidade γ associada aos efeitos não lineares de terceira ordem. A equação (1.13) é a análoga microscópica da equação (1.8), e as suscetibilidades macroscópicas $\chi^{(1)}$, $\chi^{(2)}$ e $\chi^{(3)}$, tem origem em suas correspondentes microscopias ζ , β , e γ . Uma forma simples de expressar essa relação é [9]:

$$\chi^{(i)}(\omega) = N \delta^{(i)}(\omega) \prod_{k=1}^{i+1} C_k L_k(\omega) \quad (1.14)$$

onde N é a densidade de moléculas, $\delta^{(i)}(\omega)$ é ζ , β , e γ , $L_k(\omega)$ é o fator de correção de campo local e C_k expressa a relação entre o sistema de coordenadas do laboratório e os eixos moleculares. A função $L_k(\omega)$ é introduzida, pois os campos experimentados pela molécula de interesse são diferentes do campo aplicado no meio. Isto se deve as interações com o meio ao seu redor. Nessa situação, para líquidos, se considera um fator de correção de Lorentz, dado por [11]:

$$L(\omega) = \frac{n(\omega)^2 + 2}{3} \quad (1.15)$$

onde $n(\omega)$ é o índice de refração linear do meio onde se encontra a molécula. No caso de um liquido isotrópico, em que as moléculas estão orientadas aleatoriamente, a susceptibilidade de terceira ordem do sistema é dada por:

$$\chi^{(3)}(\omega) = NL^4 \langle \gamma(\omega) \rangle \quad (1.16)$$

com $\langle \gamma \rangle$ sendo o valor médio de segunda hiperpolarizabilidade γ .

1.2.4. Absorção Multifotônica.

A parte imaginária de $\chi^{(3)}$ está relacionada com a absorção de dois fótons, α_2 . A primeira predição de absorção de dois fótons foi feita por Göppert-Mayer (1931). Ela propôs, como uma consequência do princípio da incerteza de Heisenberg, que um átomo ou molécula poderia absorver dois fótons no mesmo evento quântico dentro de um intervalo de tempo de 10^{-16} - 10^{-17} s [12]. Sendo esse um evento pouco provável de ocorrer com o uso de fontes de luz ordinárias. Somente em 1960, depois do desenvolvimento de fontes LASER que a predição foi verificada [12].

A absorção multifotônica é um processo de absorção óptica não linear no qual mais do que um fóton é absorvido, até excitar um nível de energia real. Como se representa na Figura 1.4, a absorção direta de dois fótons com energia $h\omega_a$ cria uma excitação de um estado Singlete S_2 , a qual decai para o estado singlete S_1 . Decaindo ao estado fundamental emitindo um fóton de maior energia $h\omega_e$, processo conhecido como conversão ascendente de energia.

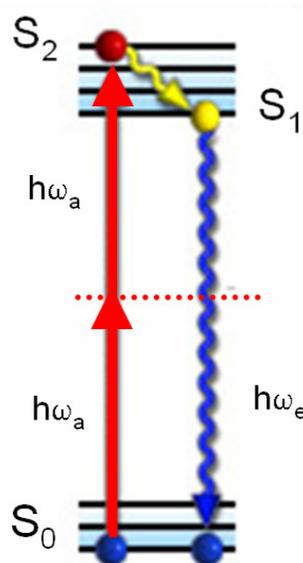


Figura 1.4. Conversão ascendente de energia, por absorção de dois fótons [1].

Em 1961 Kaiser e colaboradores reportaram fluorescência por excitação de dois fótons em $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{2+}$ [6]. Posteriormente, Sing (1964) [13] estimou a seção transversal de choque para absorção de três fótons em cristais de naftalina. Rentzepis (1970) [14]

observou fluorescência por excitação de três fótons de corantes orgânicos. Em 1976, Berns observou fluorescência por excitação de dois fótons, como um resultado da focalização de um feixe de luz laser intenso nos cromossomos de células vivas [15]. A primeira aplicação de fluorescência por emissão de dois fótons à microscopia de fluorescência foi apresentada no início dos anos 90 por Denk e colaboradores [16]. Eles demonstraram que imagens com excelentes seções ópticas poderiam ser obtidas sem agredir as células.

A probabilidade de absorver dois fótons simultaneamente é pequena, assim é necessário uma alta potência de pico e um feixe LASER altamente focalizado para ter uma intensidade que permita ter um processo multifotônico eficiente.

Analisando a dependência da intensidade de fluorescência com a intensidade do feixe de excitação, pode-se determinar o número de fótons necessários envolvidos numa excitação multifotônica. A relação das intensidades da fluorescência com a intensidade de excitação é dada por [1]:

$$I_{Fluorescencia} = AI_{excitação}^n \quad (1.17)$$

onde A é uma constante de proporcionalidade e n é o número de fótons no processo de conversão ascendente de energia.

1.2.5. Não linearidades ópticas em materiais orgânicos.

Os compostos ou moléculas orgânicas são substâncias químicas que contém na sua estrutura principal Carbono e Hidrogênio. Os átomos de carbono são muito versáteis a formar ligações estáveis entre si e com vários outros elementos. O átomo de carbono tem configuração eletrônica $1s^2 2s^2 2p^2$, número atômico 6 e quatro elétrons de valência nos orbitais 2s e 2p. O carbono pode fazer quatro ligações simples, envolvendo os orbitais sp^3 , formado pela superposição dos orbitais 2s e 2p num processo conhecido como hibridização. As ligações e os elétrons envolvidos nesta configuração são chamados de ligações σ e elétrons σ , respectivamente. Outra forma de hibridização é a do tipo sp^2 , em que os orbitais 2s e 2p se superpõem dando origem a três orbitais híbridos sp^2 , que podem

formar três ligações do tipo σ , ficando um elétron no orbital não híbrido 2p. Dois átomos de carbono podem ainda se ligar através dos orbitais 2p, formando uma ligação π . Na Figura 1.5 são representados os orbitais e as ligações π e σ entre átomos de carbono.

Em geral, as distribuições de carga devido aos elétrons π são facilmente deformáveis, gerando altas hiperpolarizabilidades, responsáveis pela alta não linearidade das estruturas. As contribuições à hiperpolarizabilidade devida a ligações do tipo σ são consideravelmente menores [6].

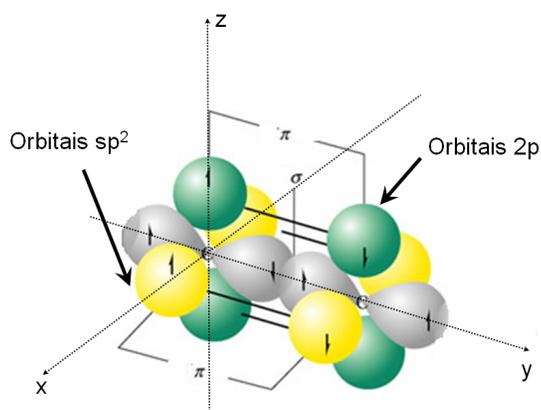


Figura 1.5. Representação dos orbitais e de ligações π e σ entre átomos de carbono.

1.3. CONCLUSÕES.

Neste capítulo foram apresentados os princípios básicos do processo de fluorescência e de óptica não linear, necessários para o entendimento das técnicas e resultados a serem discutidos nos próximos capítulos. Uma análise mais detalhada da óptica não linear pode ser encontrada nas referências [6,11].

1.4. REFERÊNCIAS.

- [1]. PARAS N. PRASAD, *Introduction to Biophotonics*, John Wiley & Sons, New York, 2003.
- [2]. LAKOWICZ. J. R. “Radiative Decay Engineering: Biophysical and Biomedical Applications”. *Analytical Biochemistry*, Vol. 298, pp. 1–24. 2001.
- [3]. GIEPMANS. B, ADAMS. S, ELLISMAN. M, TSIEN. R. ‘The Fluorescent Toolbox for Assessing Protein Location and Function’ .*Science*, Vol 312, pp. 217 – 224. 2006.
- [4]. J.D. JACKSON, *Classical Electrodynamics*, Wiley-Interscience.3rd ed, USA, 1998.
- [5]. MARKOLF H. NIEMZ. *Laser-Tissue Interactions: Fundamentals and Applications*. Springer.Germany. 2002.
- [6]. PARAS N. PRASAD, DAVID J. WILLIAMS. *Introduction to Nonlinear Optical Effects in Molecules and Polymers*. Wiley-Interscience February 1, 2001.
- [7]. SHEIK-BAHAE. M, SAID. A.A., WEI. T.H, HAGAN. D.J., VAN STRYLAND. E.W. "Sensitive Measurement of Optical Nonlinearities Using a Single Beam". *IEEE Journal of Quantum Electronics*, QE-26, pp.760-769 1990.
- [8]. SHEIK-BAHAE. M, SAID. A.A., WEI. T.H, HAGAN. D.J., VAN STRYLAND. E.W. "Nonlinear Refraction and Optical Limiting in Thick Media". *Optical Engineering*, Vol 30, No 8 pp. 1228-1232. 1991.
- [9]. A. YARIV. *Quantum electronics*, John Wiley & Sons, New York, 1989.
- [10]. BRIDGES. R, FISCHER. G, BOYD, R. "Z-scan measurement technique for non-Gaussian beams and arbitrary sample thicknesses". *Optics Letters*, Vol 20, pp. 1821-1823. 1995.

- [11]. ROBERT BOYD. *Nonlinear optics*, 2nd edition, USA, 2003.
- [12]. DENK W, SVOBODA K. 'Photon upmanship: why multiphoton imaging is more than a gimmick'. *Neuron*, Vol 18. pp. 351-357. 1997.
- [13]. SINGH. S, BRADLEY, L. 'Three-Photon Absorption in Napthalene Crystals by Laser Excitation'. *Physical Review Letters*, Vol 12, pp. 612 – 614. 1964.
- [14]. RENTZEPIS. P, MITSCHELE. C, SAXMAN. A. 'Measurement of ultrashort laser pulses by three-photon fluorescence'. *Applied Physics Letters*, Vol 17, No 3, pp. 122-125. 1970.
- [15]. BERNIS, M. 'A possible two-photon effect in vitro using a focused laser beam'. *Biophysical Journal*, Vol 16, No 8, pp. 973–977. 1976.
- [16]. DENK.W, DELANEY. R, GELPERIN. A, KLEINFELD. D, STROWBRIDGE. B, TANK. D, YUSTE. R. 'Anatomical and functional imaging of neurons using 2-photon laser scanning microscopy'. *Journal of Neuroscience Methods*. Vol 54, pp. 151-162. 1994.

CAPÍTULO 2. NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM MICROSCOPIA MULTIFOTÔNICA DE CAMPO ABERTO.

Bioimagens ópticas podem ser utilizadas para análise de uma ampla variedade de espécies biológicas, desde células até amostras de tecido *'in vitro'* e *'in vivo'*. Entre as diferentes técnicas de microscopia óptica, a microscopia de fluorescência tem ganhado uma maior atenção. Isso se deve ao desenvolvimento de novos marcadores com alta fluorescência, utilizados seletivamente para investigar partes específicas de espécimes [1]. Fluorescência também pode ser induzida por processos de absorção simultânea de vários fótons. Esse processo é explorado na técnica de microscopia multifotônica para geração de imagens.

Neste capítulo, se explora uma técnica recente de microscopia não linear conhecida como Microscopia multifotônica de campo aberto (*"Wide-Field two-photons microscopy"*), *WFTP* [2]. Nesta tese foi desenvolvido um sistema *WFTP* para a obtenção de bioimagens por fluorescência com processos de excitação de dois até três fótons, utilizando uma fonte de luz LASER em 800nm.

Também neste capítulo, utilizando a técnica de *WFTP*, mostra-se que nanopartículas de prata podem ser utilizadas como ferramenta para o aumento de intensidade da autofluorescência de biosistemas. As nanopartículas de prata foram amplamente estudadas no mundo da biofotônica nos últimos anos, isso devido a sua baixa toxicidade em contato com os seres vivos [3]. Partículas menores são mais finamente dispersas e podem circular pelas membranas celulares sem ocasionar danos aos seres vivos. Pensando em aplicações biológicas, partículas de prata de 0.65nm e 9nm foram escolhidas para análise da interação aminoácido-partícula metálica.

Esse aumento de fluorescência é explicado analisando o comportamento das propriedades espectrais da emissão de aminoácidos.

2.1. MICROSCOPIA MULTIFOTÔNICA.

A primeira aplicação de fluorescência por absorção de dois fótons em microscopia óptica foi apresentada no início dos anos 90 por Denk e colaboradores [4]. A óptica para microscopia multifotônica (não linear) é similar à microscopia convencional (confocal), mas requer fontes de laser pulsadas para ter altas intensidades de pico de bombeio [5].

A excitação multifotônica só acontece em uma região, onde o fluxo de fótons é grande o suficiente para permitir uma absorção simultânea de mais de um fóton. A fluorescência por dois fótons tem uma dependência quadrática com a intensidade de luz incidente, que decresce, aproximadamente, com o quadrado da distância ao centro da região focal [6].

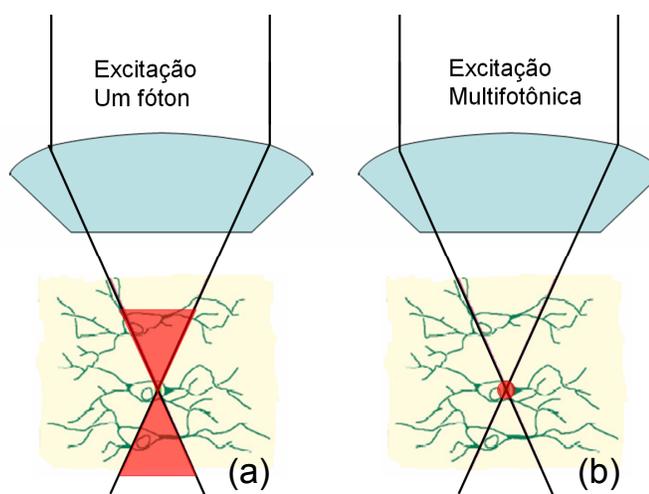


Figura 2.1. Na excitação por um fóton (a), a fluorescência e a fotodegradação acontecem através do caminho óptico do feixe de excitação dentro da amostra. A excitação multifotônica (b) está limitada ao foco do feixe de excitação, resultando numa imagem com melhor contraste [6].

Como se observa na Figura 2.1 (a), num processo de excitação por um fóton, à luz de excitação que passa através da amostra, pode ser absorvida ou espalhada antes de atingir o foco. Já na microscopia multifotônica, Figura 2.1 (b), devido ao processo de absorção ser não linear, só aqueles cromóforos que estão muito próximos do ponto focal são excitados. Nas regiões acima e embaixo do plano focal, os fótons não são absorvidos e não geram efeitos de fotodegradação.

Imagens tridimensionais, baseadas em processos de excitação de cromóforos por dois e três fótons não ressonantes, requerem luz de intensidades da ordem dos MW/cm^2 até GW/cm^2 , obtidas com LASER pulsados [7]. Embora a amplitude pico do pulso de luz seja grande, a potência média do feixe é da ordem dos miliwatts, que não é suficiente para esquentar a amostra [8].

Em geral, fontes LASER pulsadas com comprimento de onda na região do infravermelho são utilizados em microscopia multifotônica. Devido à alta profundidade de penetração de fótons no infravermelho próximo em tecidos, imagens ópticas não-invasivas podem ser obtidas em pacientes e tecidos *'ex vivo'*, como se observa na Figura 2.2.

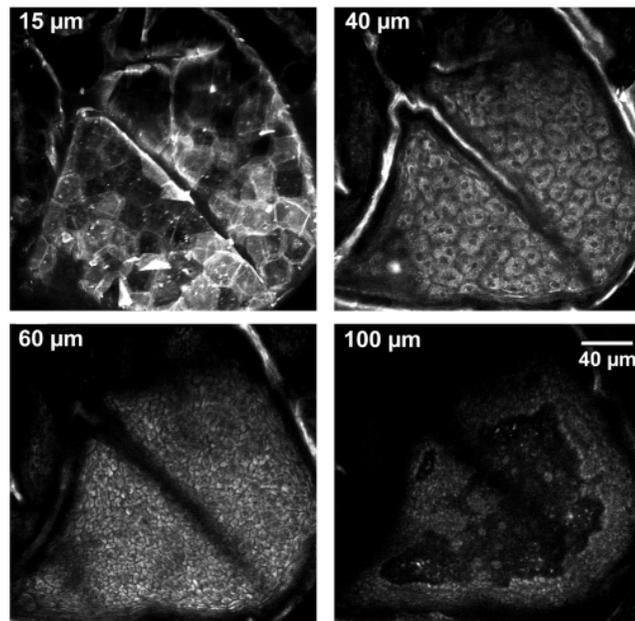


Figura 2.2. Autofluorescência por excitação de dois fótons da pele humana a diferentes profundidades [8].

Alguns exemplos de aplicações biológicas da microscopia multifotônica são: o acompanhamento da dinâmica do cálcio em regiões de diferentes profundidades de fatias de cérebro *'in vitro'* [9] ou *'in vivo'* [10]. Na Figura 2.2 pode-se observar a autofluorescência da pele por excitação multifotônica em diferentes profundidades do tecido, onde são claramente identificadas as estruturas intracelulares, morfologia celular e localização dos núcleos em diferentes camadas da pele [7]. Em pesquisas do câncer, esta técnica tem sido utilizada para estudos de metástases [11]. Avanços em microscopia

multifotônica estão encaminhados na elaboração e implementação de endoscópios para explorar órgãos internos do corpo humano [12]. Recentes aplicações botânicas de microscopia multifotônica incluem imagens, com alta resolução e grande profundidade de pigmentos como clorofila e proteínas fluorescentes.

2.2. MICROSCÓPIA MULTIFOTÔNICA DE CAMPO ABERTO. *WFTP*.

A técnica de microscopia multifotônica convencional consiste em focalizar um feixe de excitação na região da amostra desejada, coletar a fluorescência e deslocar o feixe ou amostra (varredura) para construir uma imagem. Nesse tipo de sistemas se exploram fontes LASER em 800nm ou 1064nm, com uma taxa de repetição de 70-100MHz e uma potencia meia de 50mW [5].

A obtenção de uma imagem por microscopia multifotônica convencional é um método relativamente lento (limitado pela velocidade do sistema de varredura) e não pode ser utilizado para monitorar processos rápidos. Existem algumas variações da técnica para incrementar a velocidade de varredura, como dividir o feixe de excitação em um arranjo multifocal ou a utilização de um arranjo de microlentes [13]. Enquanto esses métodos aumentam a velocidade de varredura diminuem o campo de visão e a resolução da imagem.

Numa nova técnica de microscopia multifotônica conhecida como Microscopia multifotônica de campo aberto, *WFTP*, a excitação multifotônica é feita iluminando uma grande área da amostra, (obtida com aumento da potencia LASER), onde o mecanismo de varredura não é necessário. Como se representa na Figura 2.3, na técnica *WFTP* se focaliza o feixe relativamente paralelo (colimado) na amostra, com um tamanho do feixe de 50-100 μ m. A amostra é iluminada pelo feixe (campo aberto), obtendo uma imagem multifotônica com resolução óptica definida pela objetiva.

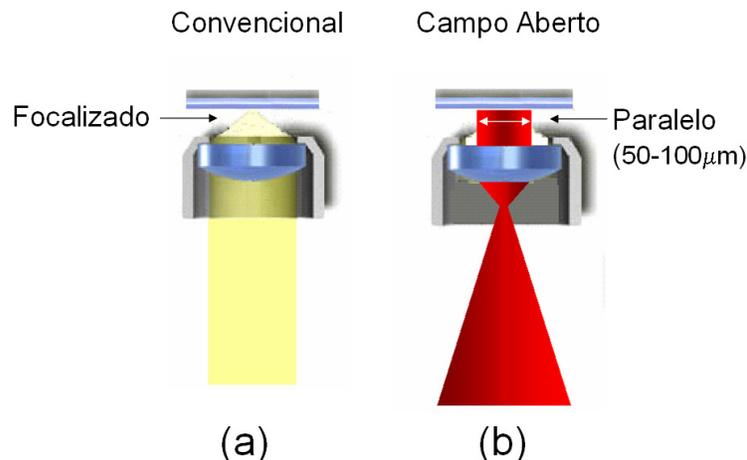


Figura 2.3. Comparação da iluminação por microscopia convencional (a) e a microscopia *WFTP* (b). Na microscopia convencional o feixe de excitação é focalizado, fazendo uma varredura da amostra ou do feixe é construída uma imagem por fluorescência. Na microscopia *WFTP* a amostra é iluminada pelo feixe paralelo obtendo uma imagem da área iluminada com resolução óptica definida pela objetiva.

2.2.1. Desenvolvimento do sistema *WFTP*.

Na base de um microscópio NIKON (TE2000-PFS) foi adaptado um sistema para microscopia de transmissão. Como dispositivo de iluminação foi utilizado um LED de luz branca e a imagem é obtida por meio de uma câmera CCD (sencicam qe).

Para medidas de fluorescência com excitação multifotônica, foi utilizado como excitação um LASER Ti:Safira com comprimento de onda de 800nm e uma taxa de repetição de 76Mhz. No sistema, é utilizado um jogo de lentes L1 (5cm) e L2 (10cm) tal que, o feixe é expandido numa relação aproximada de 1:3, uma terceira lente L3 (15cm) focaliza o feixe no plano anterior à objetiva (Nikon 40x, 1.3NA, Óleo). A fluorescência coletada pela mesma objetiva atravessa o espelho dicróico (que filtra a região do infravermelho) e prossegue para a câmera CCD (sencicam qe). Um LED de luz branca é utilizado para obtenção de imagens por microscopia de transmissão. Permitindo obter de maneira simultânea imagens da mesma área por microscopia convencional e por microscopia de fluorescência. A montagem experimental da técnica *WFTP* é representada na Figura 2.4.

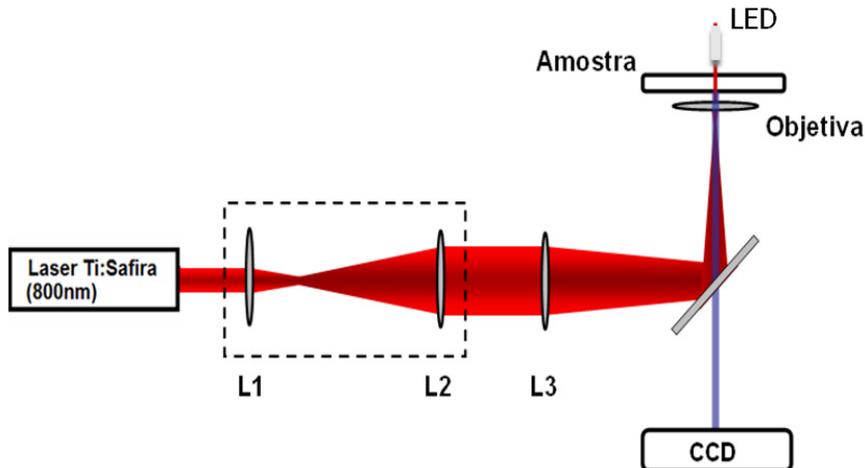


Figura 2.4. Montagem experimental para a técnica *WFTP* [2].

A potencia média do LASER de excitação na região anterior da objetiva utilizada para a obtenção de imagens foi de 350mW. Essa potencia é alta comparada com a potencia utilizada em microscopia multifotônica convencional. Esse aumento de potencia é necessário para compensar os efeitos de se ter uma menor intensidade do feixe LASER (maior área de iluminação) e uma grande absorção da objetiva em 800nm.

Na Figura 2.5 se observa a imagem de uma agregação de coumarina 400, obtida utilizando microscopia de transmissão (a) e a técnica *WFTP* (b). A coumarina tem uma absorção na região dos 350nm e fluorescência acima dos 420nm, cromóforo ideal para absorção de dois fótons em 800nm, como se observa na Figura 2.6.(a).

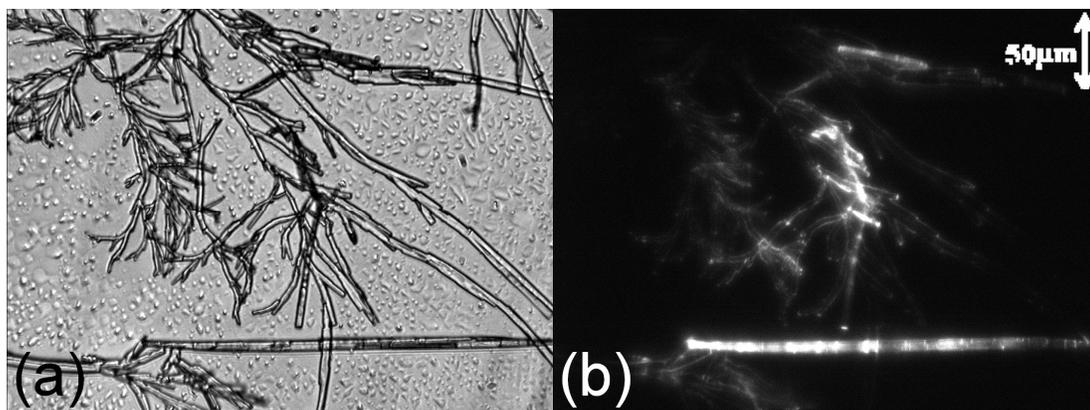


Figura 2.5. Imagem de Coumarina 400 por microscopia convencional (a), e pela técnica *WFTP* (b).

Analisando a intensidade de fluorescência em relação à intensidade do feixe de excitação, pode-se determinar o número de fótons necessários envolvidos numa excitação multifotônica, observar equação 1.17. Como se observa na Figura 2.6.(b), a dependência medida da intensidade da fluorescência é, aproximadamente, quadrática. Conseqüentemente o processo de fluorescência envolve a absorção de dois fótons simultaneamente. A intensidade do bombeamento foi controlada mediante a utilização de filtros neutros na saída do LASER.

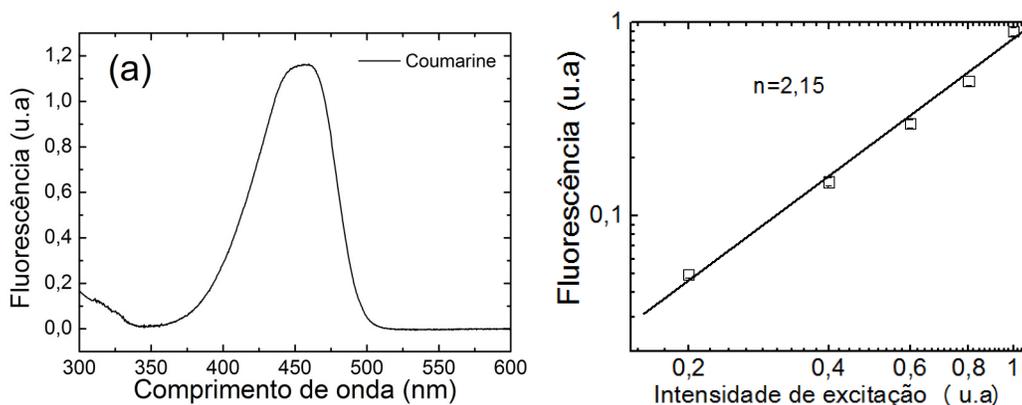


Figura 2.6. Espectro de Fluorescência (a) da Coumarina. Relação de intensidades (b) indicando que o processo de excitação envolve dois fótons.

2.2.2. Microscopia multifotônica do Triptofano e partículas de prata.

Em microscopia óptica, agentes de contraste são utilizados para aumentar a qualidade da imagem [13]. Nesta seção é mostrado que a emissão da fluorescência multifotônica de moléculas biológicas pode ser aumentada pela presença de nanopartículas metálicas.

A autofluorescência de aglomerados de Triptofano foi aqui observado pelo sistema de microscopia *WFTP*. Um pequeno volume de uma solução aquosa de triptofano com concentração de $56\mu\text{M}$, foi depositada em uma lamina de microscópio. Após a secagem da amostra, foram obtidas imagens de diferentes regiões desse material. A Figura 2.7 (a) mostra a imagem do aglomerado por microscopia de transmissão e (b) a imagem de autofluorescência obtida por microscopia *WFTP*. Como é apresentado na Figura 2.8

analisando a relação da intensidade da fluorescência das imagens com a intensidade de excitação, pode-se afirmar que a fluorescência do Triptofano acontece por uma excitação simultânea de três fótons em 800nm.

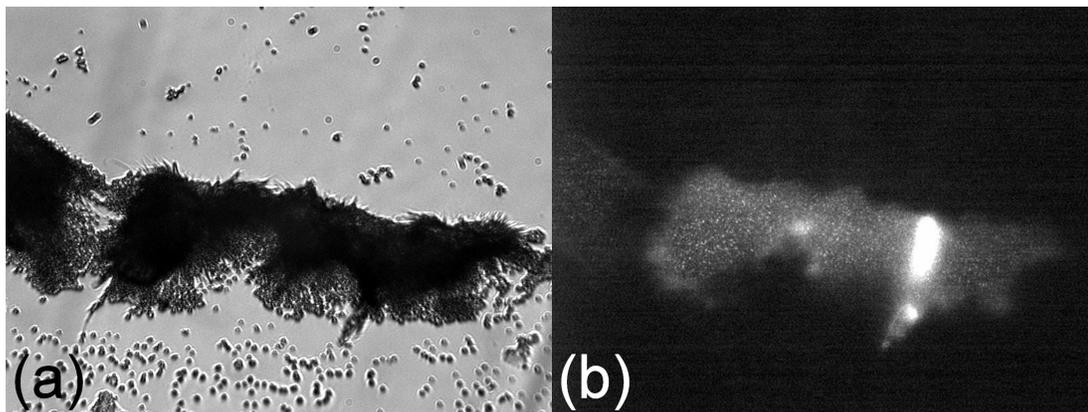


Figura 2.7. Imagem de Triptofano por microscopia convencional (a), e pela técnica *WFTP* (b).

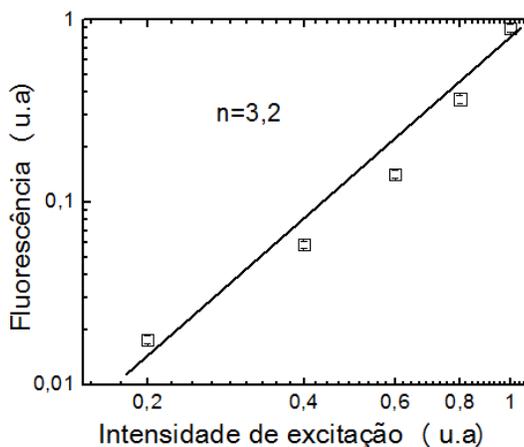


Figura 2.8. Relação de intensidades indicando que o processo de excitação envolve três fótons em 800nm.

Em uma nova etapa, na solução Triptofano foram adicionadas nanopartículas de prata em altas concentrações. Após uma secagem natural foram obtidas imagens para diferentes regiões do Triptofano e da solução Triptofano com partículas de prata. Um resultado típico da imagem do Triptofano (a) e do Triptofano com partículas de prata (b) é apresentado na Figura 2.9.

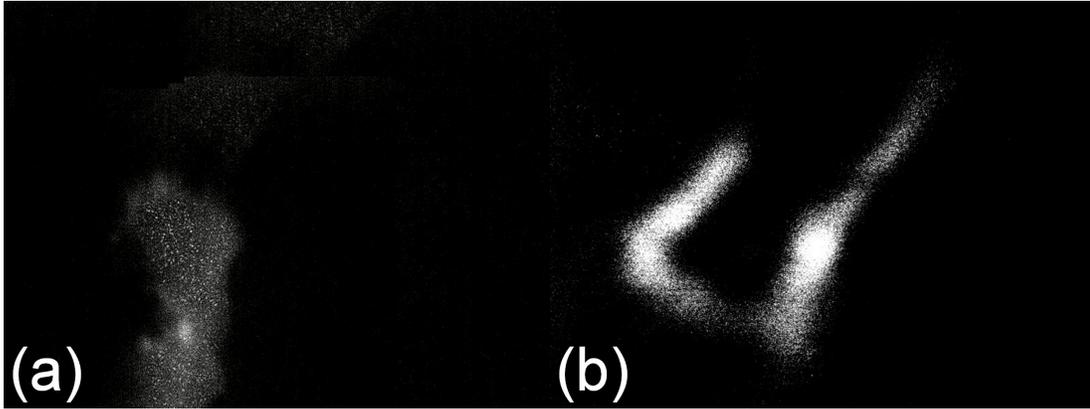


Figura 2.9. Imagens típicas de aglomerados de Triptofano sem (a) e com (b) nanopartículas.

Analisando a relação média do número de pixels na escala de níveis de cinza (intensidade), para a região de 0-125 ($N_oPixels_{(0-125)}^{Trip}$) e para a região de 125-250 ($N_oPixels_{(>125)}^{Trip}$), obtida dos histogramas das imagens para cinco regiões representativas diferentes de Triptofano e para outras cinco regiões com Nanopartículas de prata, se pode afirmar que a intensidade de fluorescência do Triptofano aumentou até por um fator de dois na presença de nanopartículas de prata. Na Figura 2.10 são apresentados o Histograma médio para as imagens obtidas do Triptofano (a) e o Histograma médio para as imagens obtidas na presença de nanopartículas de prata (b). Pode-se observar como o número de pixels com uma intensidade acima de 125 aumenta na presença das partículas de prata.

$$Aumento = \frac{N_oPixels_{(0-125)}^{Trip} \times N_oPixels_{(>125)}^{Trip-Prata}}{N_oPixels_{(0-125)}^{Trip-Prata} \times N_oPixels_{(>125)}^{Trip}} \approx 3 \quad (2.1)$$

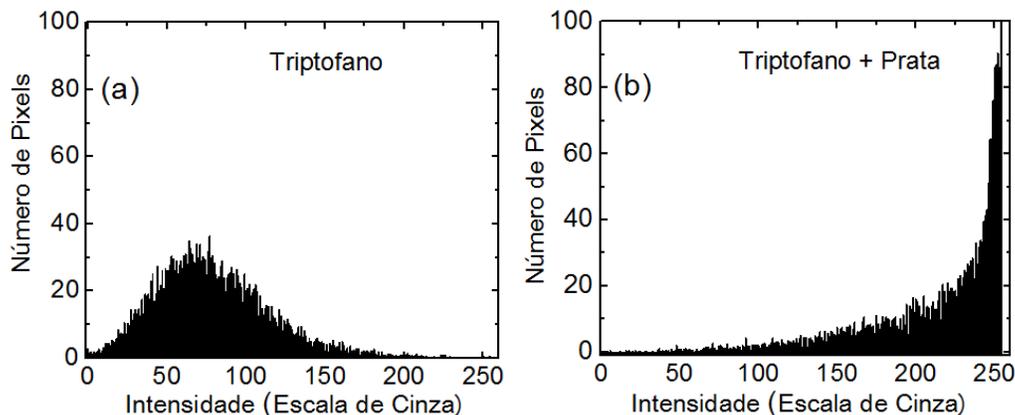


Figura 2.10. Histograma médio para as imagens de Tryptofano (a) e de Tryptofano na presença de partículas de prata.

2.3. ANÁLISE DA AUTOFLUORESCÊNCIA DE AMINOÁCIDOS NA PRESENÇA DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.

Para entender a razão do aumento das intensidades de autofluorescência do Tryptofano na presença de partículas metálicas observadas com microscopia *WFTP* excitando por um processo de três fótons, nesta seção do capítulo estuda-se o comportamento das propriedades de fluorescentes dos aminoácidos na presença de nanopartículas de prata em solução.

A fluorescência do Tryptofano é muito utilizada como ferramenta espectroscópica e suas propriedades são descritas na próxima seção do capítulo. No caso da Fenilalanina e a Tirosina o espectro de emissão está na faixa de 290nm que se sobrepõe com o espectro de absorção do Tryptofano, permitindo a transferência de energia destes aminoácidos para o Tryptofano. Podem-se acompanhar processos metabólicos analisando a fluorescência do NADH na região dos 480nm. O Colágeno fluoresce em 380nm, a Elastina em 400nm e a Flavina nos 550nm.

2.3.1. Fluorescência do Triptofano.

Vários artigos por ano são relatados em revistas biológicas explorando a fluorescência do Triptofano em proteínas como uma ferramenta na Microscopia e análise de proteínas [14]. Mudanças nas intensidades de fluorescência, deslocamentos dos comprimentos de onda máximos (λ_{max}) da emissão, diminuição nos tempos de vida da fluorescência, alargamentos e mudanças no formato do espectro de excitação, anisotropia e transferência de energia são algumas das propriedades associadas à microscopia de fluorescência que são utilizadas para monitorar mudanças nas proteínas e inferir indiretamente estruturas locais e processos dinâmicos [15].

2.3.2. Nanopartículas metálicas e fluorescência.

Quando cromóforos estão nas proximidades de nanopartículas metálicas e esse sistema é excitado opticamente, dois processos podem levar a mudanças na intensidade de fluorescência do meio. Aumento de campo local induzindo aumento de fluorescência e transferência não radiativa de energia induzindo supressão da fluorescência.

- **Aumento de campo local.**

A resposta eletromagnética das partículas metálicas ao campo aplicado é a oscilação coletiva dos elétrons de condução no metal, chamado de ressonância de plasmon localizado. Essas ressonâncias induzem um aumento do campo eletromagnético nas vizinhanças das nanopartículas.

Como se observa na Figura 2.11, para o caso em que uma luz polarizada na direção z (E_0) incide numa partícula de diâmetro $2a$, a magnitude do campo elétrico é constante nas imediações da nanopartícula o que permite resolver as equações de Maxwell utilizando uma aproximação quase estática [16]. A solução do campo elétrico sentido na vizinhança devido à presença da partícula metálica de diâmetro $2a$ é dada por:

$$E = E_0 + \left(\frac{\varepsilon_{NP} - \varepsilon_h}{\varepsilon_{NP} + 2\varepsilon_h} \right) \left(\frac{a}{a+r} \right)^3 E_0 \quad (2.2)$$

onde ε_{NP} e ε_h são as permissividades elétricas da partícula e do meio respectivamente.

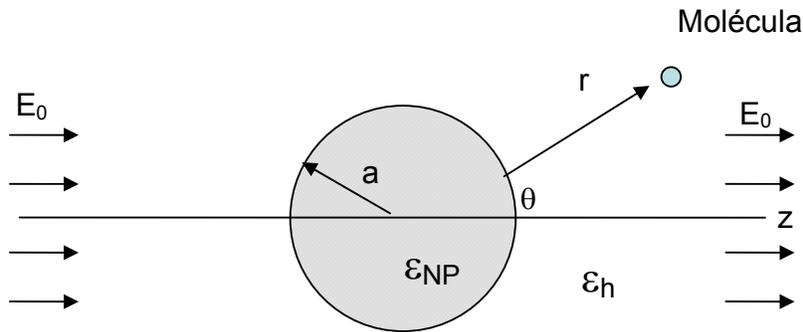


Figura 2.11. Campo elétrico E_0 incidindo em uma esfera dielétrica ε_{NP} num meio hospedeiro ε_h .

Devido a que a permissividade elétrica da partícula tem uma dependência forte com o comprimento de onda, o primeiro termo em parêntesis da equação (2.2) determina a condição de ressonância dielétrica da partícula. Quando a permissividade dielétrica do metal aproxima-se de $-2\varepsilon_h$, o campo elétrico é aumentado em relação ao campo incidente. O fator de aumento de campo local, $A(\omega)$, é a razão entre o campo elétrico na posição da molécula e o campo incidente:

$$A(\omega) = \frac{E(\omega)}{E_0(\omega)} \sim \frac{\varepsilon_{NP} - \varepsilon_h}{\varepsilon_{NP} + 2\varepsilon_h} \left(\frac{a}{a+r} \right)^3 \quad (2.3)$$

Adicionalmente, para ter um aumento intenso de campo local, em um meio que não absorve campos com frequência ω , a parte imaginária da permissividade elétrica precisa ser pequena. Essa condição descreve a excitação ressonante dos plásmons por dipolo da partícula metálica [17].

No caso da prata e o ouro, o aumento de campo local é grande na região visível do espectro. O tamanho a da partícula e a permissividade elétrica do hospedeiro ε_h tem um papel importante na determinação do campo elétrico fora da partícula. Valores reportados

de aumento dos campos eletromagnéticos para colóides de nanopartículas de prata e de ouro são da ordem de 10^6 - 10^7 [16-17].

O aumento na intensidade da fluorescência de cromóforos na vizinhança de nanopartículas metálicas pode ser expresso por um fator de aumento Y . Ele é definido como a razão entre a intensidade de fluorescência do cromóforo na presença de uma partícula metálica e a intensidade de fluorescência do cromóforo [18]. Utilizando o modelo de Gersten e Nitzan [19] o fator de aumento de campo local é o produto de dois fatores:

$$Y = Y_{exc}(\omega_{exc})Y_{emis}(\omega_{fluo}) \quad (2.4)$$

onde $Y_{exc}(\omega_{exc})$ descreve a excitação dos cromóforos pelo campo local ao redor das nanopartículas metálicas. O segundo fator $Y_{emis}(\omega_{fluo})$ descreve a partição de energia em radiativa e não radiativa na presença das nanopartículas. O fator de excitação $Y_{exc}(\omega_{exc})$ na relação (2.4) é igual a $|A(\omega_{exc})|^2$ para a fluorescência por excitação com um fóton e $|A(\omega_{exc})|^4$ excitando com dois fótons. Assim, os aumentos de campo local são maiores para processos multifotônicos.

Num experimento recente, a presença de nanopartículas de ouro em membranas celulares, mostrou um aumento na geração de segundo harmônico [20]. Embora tivessem trabalhado com um laser fora da ressonância por plasmons, observam aumento na geração do terceiro harmônico da célula NIH3T3, quando a membrana celular foi marcada com partículas de ouro de 10nm.

- **Supressão da fluorescência.**

A capacidade de emissão de um meio fluorescente pode ser caracterizada pela eficiência quântica do sistema $\gamma(r)$. Para um biocolóide composto de cromóforos e partículas metálicas separadas por uma distância r , a eficiência quântica de fluorescência é definida como $Y_{emis}(\omega_{fluo})$. Essa eficiência depende das taxas adicionais radiativas e dos

processos não radiativos induzidos pela presença das nanopartículas metálicas. A eficiência quântica de fluorescência do biocolóide é definida por:

$$\gamma(r) = \frac{k_r + \Gamma_r(r)}{k_r + \Gamma_r(r) + k_m + \Gamma_m(r)} \quad (2.5)$$

onde a fluorescência do cromóforo é governada pelas magnitudes das taxas de decaimento radiativo $\Gamma_r(r)$ e a soma das taxas de decaimento não radiativo, $k_r(r)$. A presença de partículas metálicas vizinhas (m) adiciona novas taxas de decaimento radiativo e não radiativo, $\Gamma_m(r)$ e $k_m(r)$ respectivamente. Para se ter um aumento da fluorescência é necessário que a presença de partículas metálicas vizinhas (m) aumente a taxa de decaimento radiativo e diminuam os efeitos não radiativos.

Na Figura 2.12 representa-se o Diagrama de Jablonski para os mecanismos de excitação e relaxação do cromóforo (a), e do cromóforo na presença das partículas metálicas adicionando novos mecanismos de relaxação para o estado fundamental (b).

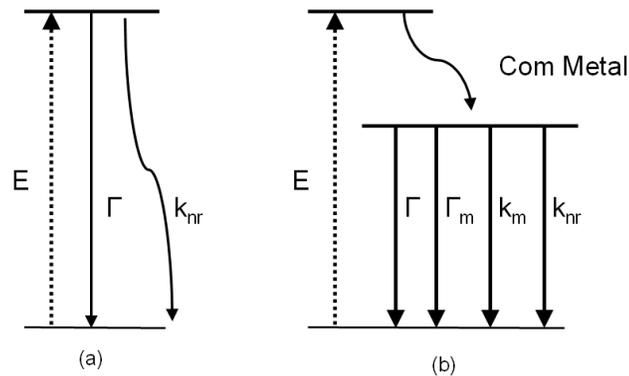


Figura 2.12. Diagrama de Jablonski com (a) e sem (b) os efeitos da vizinhança de partículas metálicas.

Os canais adicionais não radiativos associados com a presença da nanopartícula surgem das componentes dipolares fora de fase da nanopartícula metálica. A taxa de decaimento radiativo, $\Gamma_m(r)$, adicionada com a presença da nanopartícula metálica varia com r^{-3} e atinge valores muito altos a pequenas distâncias das nanopartículas. Esses

processos não radiativos são diretamente responsáveis pela supressão da fluorescência da fluorescência para pequenas distâncias de separação entre cromóforo e partícula metálica.

O Pascal Anger e colaboradores estudaram a fluorescência de uma molécula de corante como uma função da distância a uma partícula metálica de ouro, com técnicas de microscopia de campo próximo, observaram o aumento da fluorescência do cromóforo até uma ordem de grandeza a uma distância de 20nm [21].

Um estudo da supressão da fluorescência foi realizado pelo Dulkeith e colaboradores [22], para nanopartículas de ouro ligadas ao cromóforo Lisina através de um ligante a uma distância de 1nm. Na Figura 2.13, representa-se a funcionalização da partícula de ouro no cromóforo Lisina. Neste caso a distância da partícula é pequena o suficiente para apresentar unicamente efeitos de supressão da fluorescência. Os tempos de vida de fluorescência da Lisina estão ao redor de 1,5ns, mas quando o cromóforo é ligado a uma partícula de ouro de 1nm até 30nm, o tempo de vida da fluorescência cai para 72ps. Estes efeitos são devidos a aumentos na taxa de decaimento não radiativo pela presença da partícula metálica.

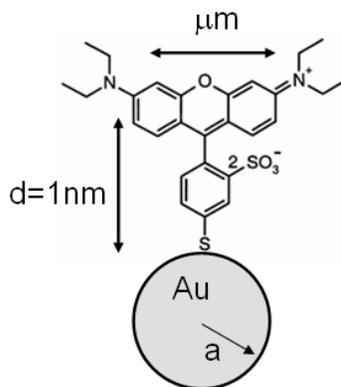


Figura 2.13. Molécula de Lisamina foi ligada a uma nanopartícula de ouro de tamanhos de 1nm até 30nm [22].

2.3.3. Medida de fluorescência. (Espectro).

Para obter o espectro de fluorescência dos biocolóides, três fontes de luz de excitação foram utilizadas. Para excitar na região do infravermelho próximo, onde os aminoácidos são transparentes, foi utilizado um Laser Ti:Safira pulsado a 76MHz em

800nm, com pulsos de duração de 150fs e potência média de 500mW. Para excitar na região do visível se utilizou o Segundo Harmônico do Laser pulsado Nd:YAG, em 532nm, com pulsos de duração de 8ns. Para a excitação na região ultravioleta se utilizou uma lâmpada (180-375nm). Para a excitação LASER o feixe de luz foi focalizado na amostra com uma lente de distancia focal de 10cm. A luminescência foi coletada ao longo da direção perpendicular ao feixe incidente. Todos os experimentos de fluorescência foram feitos com uma cubeta de quartzo de 10mm de largura, a temperatura ambiente.

Na Figura 2.14 pode-se observar a montagem experimental utilizada para as medidas de fluorescência com LASER Ti:safira e Nd:YAG.

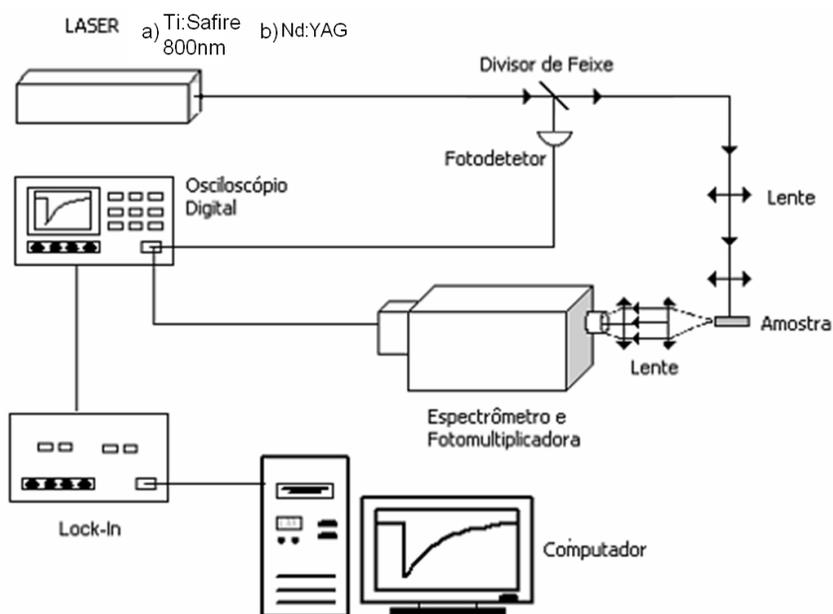


Figura 2.14. Montagem experimental para a medida de fluorescência por absorção de três fótons utilizando Ti:Safira (a) e Nd:YAG (b).

Os biocolóides foram preparados em solução de aminoácido Triptofano, Tirosina, Fenilalanina, Histidina e Prolina. As soluções aminoácidos são altamente concentradas limitadas pelo ponto de solubilidade, observar Tabela 2.1. A essas soluções foram adicionadas partículas metálicas de prata, com fatores de preenchimento da ordem de 10^{-6} e 10^{-7} para partículas de 9nm e 0,65nm respectivamente.

Tabela 2.1. Concentração das soluções aminoácidos utilizadas para estudo de fluorescência.

Aminoácido	pH	Concentração (μM)
Triptofano	$5,5 \pm 0,5$	55,3
Fenilalanina	$5,0 \pm 0,5$	179,2
Tirosina	$5,5 \pm 0,5$	2,5
Prolina	$5,0 \pm 0,5$	363,1
Histidina	$7,0 \pm 0,5$	270,2

O uso de diferentes fontes de luz permitiu o estudo da fluorescência do biocolóide a partir da excitação pelos processos de absorção de um, dois e três fótons.

▪ **Excitação por um fóton. (270nm).** Na Figura 2.15, observa-se um efeito de supressão da fluorescência (quenching) do aminoácido com o incremento da concentração das nanopartículas de 9nm e 0,65nm. Este efeito de supressão da fluorescência pode ser entendido como amortecimentos das oscilações dipolares pela presença das partículas metálicas vizinhas, expressado por um incremento na taxa de decaimento não radiativo e uma diminuição na taxa de decaimento radiativo do aminoácido [23].

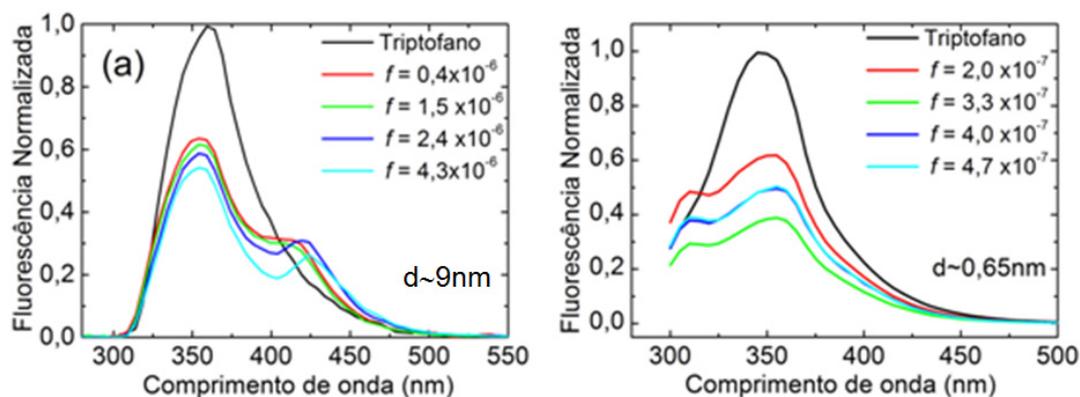


Figura 2.15.a. Fluorescência da solução de Triptofano (a) para diferentes concentrações de nanopartículas de prata de 9nm (esquerda) e 0,65nm (direita).

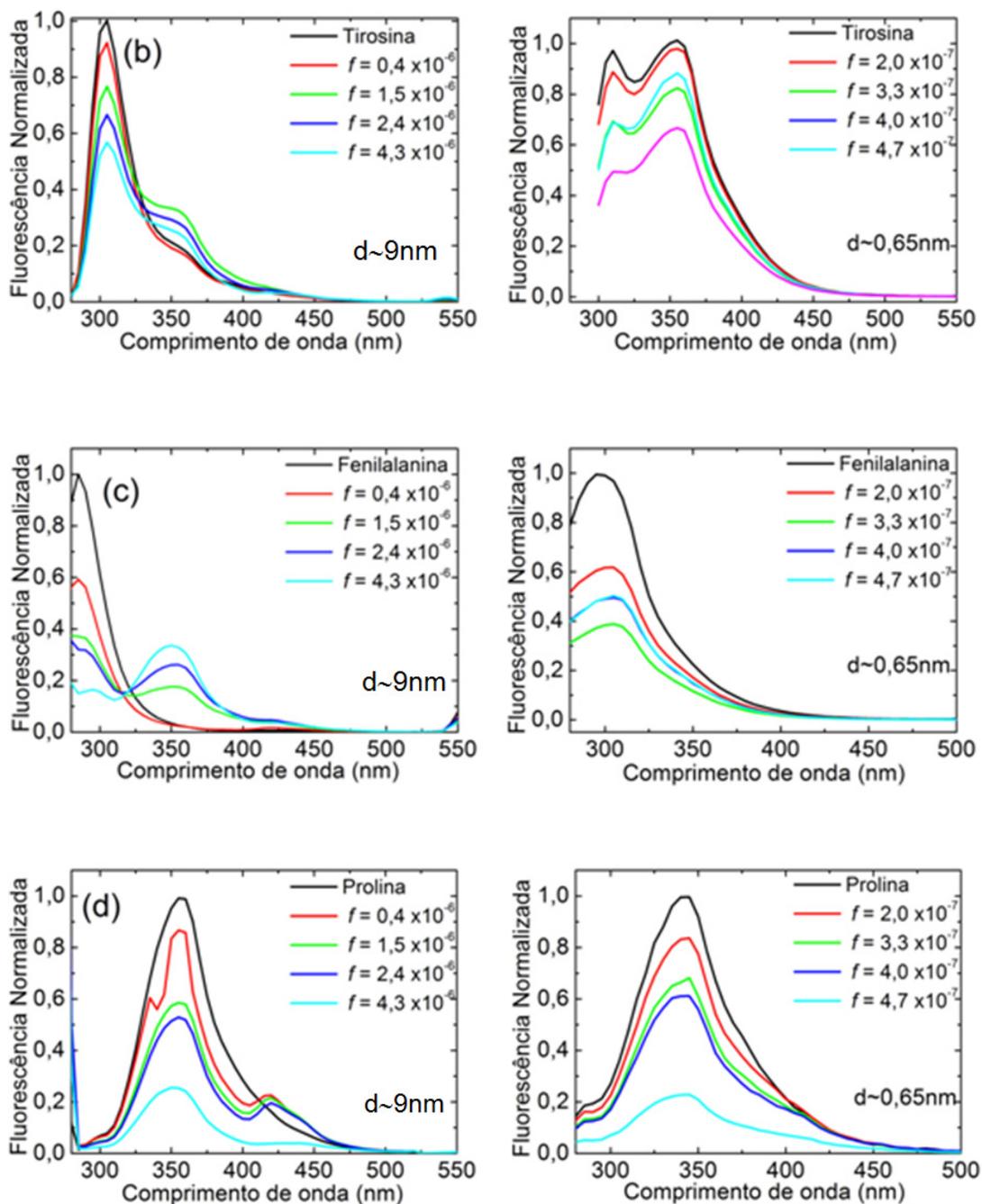


Figura 2.15.b. Fluorescência das soluções de Tirosina (b), Fenilalanina (c) e Prolina (d), para diferentes concentrações de nanopartículas de prata de 9nm (esquerda) e 0,65nm (direita).

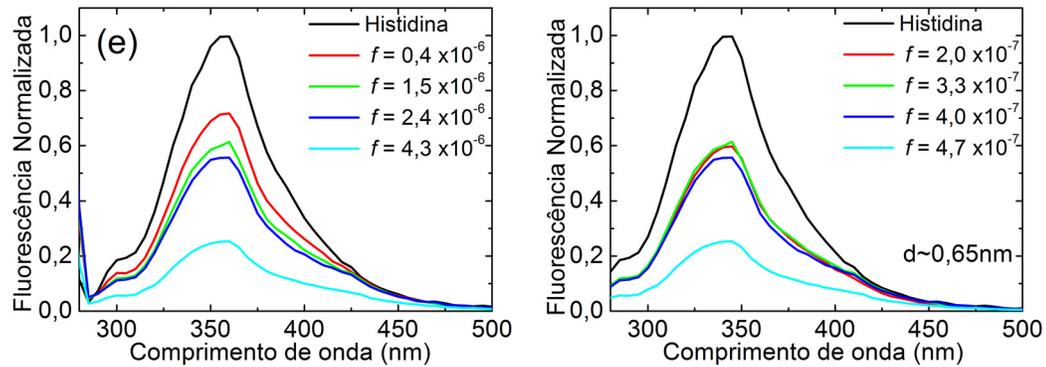


Figura 2.15.c. Fluorescência da solução de Histidina (e) para diferentes concentrações de nanopartículas de prata de 9nm (esquerda) e 0,65nm (direita).

De acordo com Lakowicz e colaboradores [24], o efeito quenching acontece quando as partículas metálicas se encontram a uma distância de 1-8nm dos cromóforos.

- **Excitação por dois fótons (532nm).** Utilizando o laser Nd:YAG ($\lambda=532\text{nm}$) observa-se fluorescência por dois fótons para a solução Triptofano. Foi acompanhando o comportamento da fluorescência da solução Triptofano com a adição de nanopartículas metálicas de 9nm e 0,65nm. Na Figura 2.16, observa-se o efeito de supressão da fluorescência similar ao verificado por um processo de excitação de um fóton.

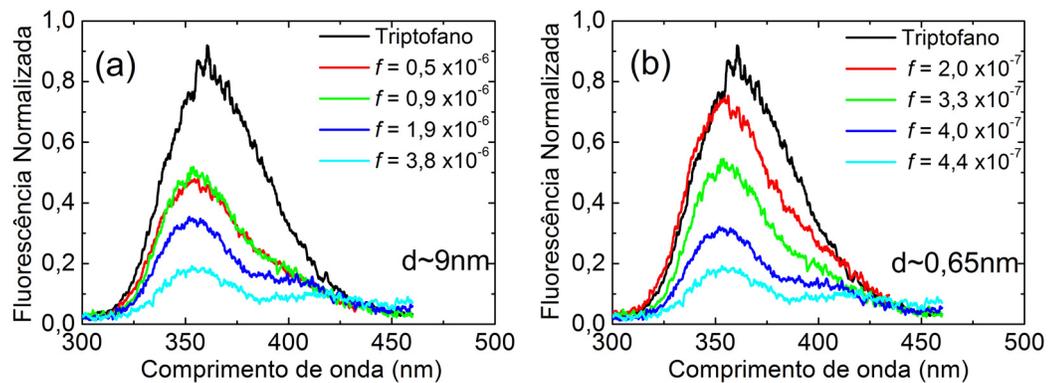


Figura 2.16. Espectro de fluorescência por excitação com dois fótons em 532nm da solução Triptofano, para diferentes concentrações de nanopartículas metálicas de 9nm e 0,65nm.

- **Excitação por três fótons (800nm).** Utilizando um laser Ti:Safira ($\lambda=800\text{nm}$), é observado fluorescência do Triptofano devido ao mecanismo de absorção de três fótons. Neste caso, diferentemente dos efeitos anteriores, como se observa na Figura 2.17, a fluorescência do Triptofano aumenta com a adição de nanopartículas metálicas.

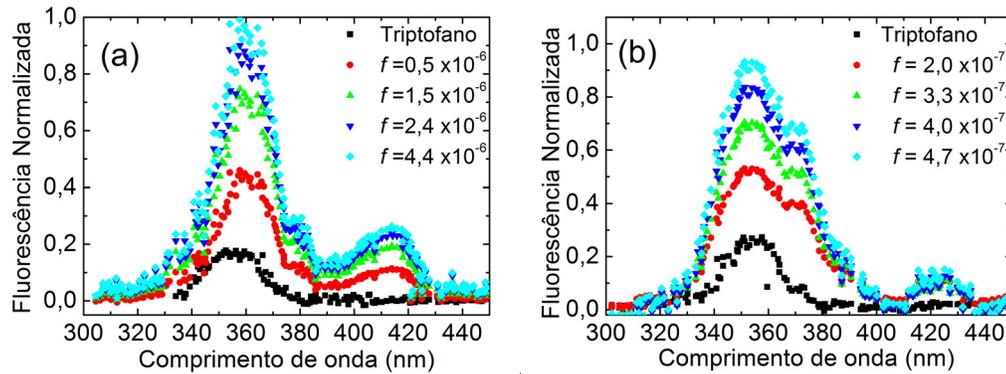


Figura 2.17. Espectro de fluorescência por excitação com três fótons em 800nm da solução de Triptofano, diferentes concentrações de nanopartículas com tamanho de 9nm (a) e 0,65nm (b).

Neste caso a presença das nanopartículas introduz um novo nível de energia no sistema biológico que está em ressonância com a energia de dois fótons de 800nm. Na Figura 2.18 representa-se o processo de excitação do Triptofano por três fótons em 800nm na presença das partículas metálicas, onde a absorção de dois fótons pelo nível do plasmon possibilita a excitação do Triptofano por um terceiro fóton o que induz um aumento da fluorescência do aminoácido.

O processo de absorção de dois fótons do colóide está relacionado com a parte imaginária da susceptibilidade de terceira ordem do meio, $\chi_{eff}^{(3)}$, que incrementa com a adição das nanopartículas metálicas. A dependência do $\chi_{eff}^{(3)}$ com o fator de preenchimento do colóide pode ser entendida pelo modelo generalizado de Maxwell-Garnett.

No regime não linear é possível mostrar que a susceptibilidade elétrica de terceira ordem, para pequenas concentrações é dada por [25]:

$$\chi_{eff}^{(3)} = f \left| \frac{\epsilon_{eff} + 2\epsilon_h}{\epsilon_{NP} + 2\epsilon_h} \right|^2 \left[\frac{\epsilon_{eff} + 2\epsilon_h}{\epsilon_{NP} + 2\epsilon_h} \right]^2 \chi_{NP}^{(3)} + \chi_h^{(3)} \quad (2.6)$$

onde $\chi_{NP}^{(3)}$ e $\chi_h^{(3)}$ correspondem, respectivamente, às susceptibilidades não lineares das nanopartículas e do meio hospedeiro, f é o fator de preenchimento, definido como a razão entre o volume total das pequenas partículas e o volume do meio hospedeiro, ϵ_h é a permissividade elétrica do meio hospedeiro e ϵ_{eff} é a permissividade elétrica do meio hospedeiro com nanopartículas de prata. A dependência do $\chi_{eff}^{(3)}$ efetivo com o tamanho das nanopartículas não está explícito no modelo de Maxwell-Garnett. Um estudo mais detalhado acerca desse modelo é apresentado no Capítulo 4.

No entanto, sabe-se da equação (2.6) que o valor de $\chi_{NP}^{(3)}$ das nanopartículas aumenta de forma inversamente proporcional ao seu raio. O que leva a um aumento de $\chi_{eff}^{(3)}$ do colóide com a redução do tamanho das nanopartículas metálicas.

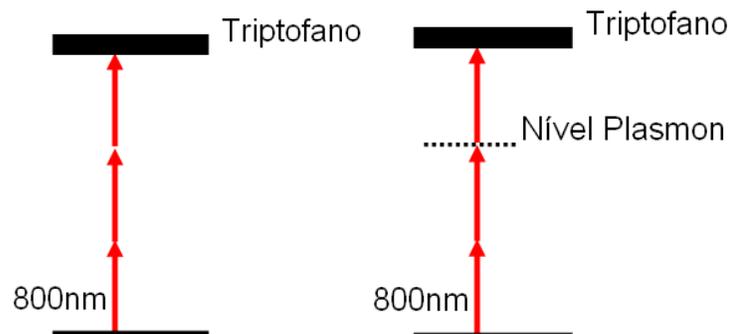


Figura 2.18. Diagrama de excitação do Triptofano por três fótons de 800nm, com (a) e sem nanopartículas metálicas (b). A absorção de dois fótons pelo nível do plasmon auxilia a excitação do Triptofano por um terceiro fóton.

Como é verificado na Figura 2.19, comparando as soluções aminoácido com nanopartículas de 9nm e 0,65nm, é possível obter os mesmos aumentos na intensidade de

fluorescência para concentrações de uma ordem de grandeza menor de nanopartículas metálicas de 0,65nm em relação às partículas de 9nm.

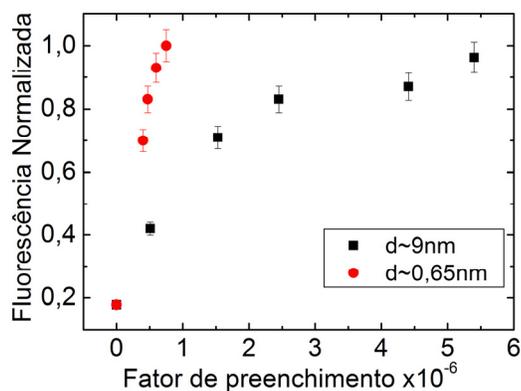


Figura 2.19. Intensidade da fluorescência para diferentes concentrações de partículas metálicas de 0,65nm e 9nm.

Utilizando um sistema de câmera ultra-rápida (*LaVision's PicoStar*) com resolução temporal de 200 picosegundos, foi medido o tempo de vida da fluorescência para a solução de Triptofano com e sem partículas de prata. Como se observa na Figura 2.20(a) a emissão do pulso observado em $t=0$ não pode ser estudada devido à resolução do sistema (200ps) e este é devido a processos de Raman Superficial para partículas metálicas [26]. O tempo de vida da solução Triptofano é de 4ns. Na Figura 2.20(b) numa análise temporal da emissão mostra-se que o tempo de vida do estado excitado do Triptofano não muda na presença das nanopartículas metálicas em solução.

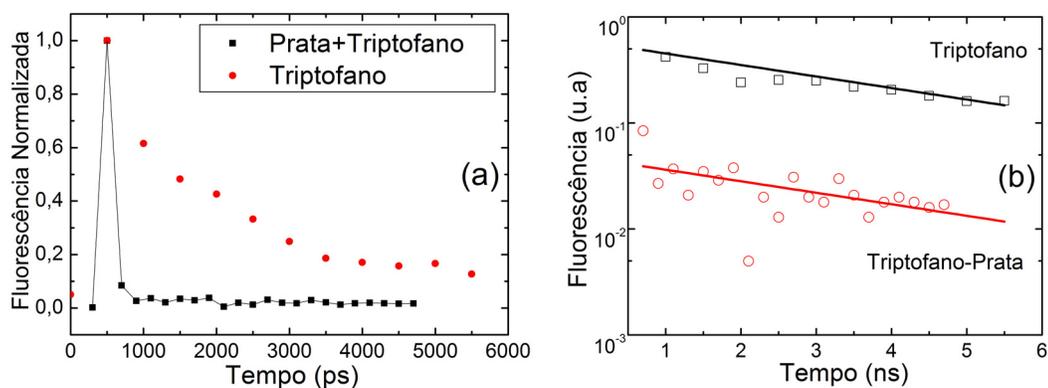


Figura 2.20. (a) Análise temporal da fluorescência do Triptofano e a Prata+Triptofano com excitação em 800nm log. (b) Tempo de vida do Triptofano e o Triptofano com partículas metálicas próximas.

2.4. CONCLUSÕES.

- Foi desenvolvida uma técnica de microscopia multifotônica *WFTP*. Nessa técnica não é necessário um sistema de varredura para a geração de imagens, permitindo acompanhar processos dinâmicos.
- Foi demonstrado que nanopartículas metálicas podem ser usadas em microscopia não linear como ferramenta para o aumento da intensidade de cromóforos celulares.
- Foi identificado que o aumento da fluorescência da solução de Triptofano nas proximidades de partículas de prata advém da presença de um nível do plasmon intermediário (da prata) que auxilia a excitação por três fótons em 800nm. Aumento da fluorescência não foi observado para excitações do biocolóide por um e dois fótons.

2.5. REFERÊNCIAS.

- [1]. GIEPMANS. B, ADAMS. S, ELLISMAN. M, TSIEN. R. ‘The Fluorescent Toolbox for Assessing Protein Location and Function’. *Science*, Vol 312, pp. 217 – 224. 2006.
- [2]. WACHSMANN-HOGIU. S, HWANG.J, LINDSLEY. E, FARKAS. D. ‘Wide-field two-photon microscopy: features and advantages for biomedical applications’. *Proceedings of the SPIE*, Vol 6441, pp. 64411B1-64411B8.2007.
- [3]. PARAS N. PRASAD, *Introduction to Biophotonics*, John Wiley & Sons, New York, 2003.
- [4]. DENK.W, DELANEY.K, GELPERIN. A, KLEINFELD, D, STROWBRIDGE. B, TANK. D, YUSTE. R. ‘Anatomical and functional imaging of neurons using 2-photon laser scanning microscopy’. *Journal of Neuroscience Methods*, Vol 54, pp. 151-162. 1994.
- [5]. GRATTON. E, BARRY. P, BERETTA. S, CELLI, A. ‘Multiphoton Fluorescence Microscopy’. *Methods*, Vol. 25, No. 1, pp. 1-118. 2001.
- [6]. STEVE M. POTTER. ‘Two photons are better than one’. *Current Biology*, Vol 6, pp.1595–1598. 1996.
- [7]. ARNDT-JOVIN. DJ, ROBERT-NICOUD. M, KAUFMAN. SJ, JOVIN. TM. ‘Fluorescence digital imaging microscopy in cell biology’. *Science*, Vol 230, pp. 247-256. 1985.
- [8]. CENTONZE VE, WHITE JG. ‘Multiphoton excitation provides optical sections from deeper within scattering specimens than confocal imaging’. *Biophysics Journal*, Vol 75, pp. 2015-24. 1998.

- [9]. MAINEN. ZF, MALINOW. R, SVOBODA. K. “Synaptic calcium transients in single spines indicate that NMDA receptors are not saturated”. *Nature*, Vol 399, pp.151-155. 1999.
- [10]. HELMCHEN. F, WATERS. J. “Ca²⁺ imaging in the mammalian brain in vivo”. *European Journal of Pharmacology*, Vol 447, pp. 119-123. 2002.
- [11]. WANG, W.G ET AL. “Single Cell Behavior in Metastatic Primary Mammary Tumors Correlated with Gene Expression Patterns Revealed by Molecular Profiling”. *Cancer Research*, Vol 62, pp. 6278–6288, 2002.
- [12]. JUERGENM. C, SCHNITZER. M. “Multiphoton endoscopy”. *Optics Letters*, Vol 28, pp. 902-904.2003
- [13]. FITTINGHOFF.D, WISEMAN.P, SQUIER, J. “Widefield multiphoton and temporally decorrelated multifocal multiphoton microscopy”. *Optics Express*, Vol 7, pp. 273-278. 2000.
- [14]. KOENING. K, BECKER. W, FISCHER. P, RIEMANN. I, HALBHUBER, K. “Pulse-length dependence of cellular response to intense near-infrared laser pulses in multiphoton microscopes”. *Optics Letters*, Vol 24, pp. 113-115. 1999.
- [15]. VIVIAN, JAMES T, CALLIS, PATRIK R. “Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins”. *Biophysical Journal*, Vol 80, pp. 2093–2109. 2001.
- [16]. KELLY. K, CORONADO. E, ZHAO. L, SCHATZ. GC. “The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric environment”. *The Journal of Physical and Chemistry B*, Vol 107, pp. 668–677. 2003.
- [17]. PARAS N. PRASAD. “*Nanophotonics*”. John Wiley & Sons, New York, 2004.

- [18]. LE MOAL. E, FORT. S, LÉVÊQUE-FORT. A, JANIN. H, MURATA. F, CORDELIÈRES, P. “Enhanced fluorescence cell imaging with metal-coated slides”. *Proceedings of SPIE*, Vol 6630, pp. 6630-6636. 2007.
- [19]. GERSTEN. J, NITZAN. A. “Spectroscopic properties of molecules interacting with small dielectric particles”. *Journal of Chemical Physical*, Vol 75, pp. 1139-1152. 1981.
- [20]. YELIN. D, ORON. D, THIBERGE. S, MOSES. E, SILBERBERG. Y. “Multiphoton plasmon-resonance microscopy”. *Optics Express*, Vol 11, No 12, pp. 1385-1391. 2003.
- [21]. ANGER. P, BHARADWAJ. P, NOVOTNY, L. “Enhancement and Quenching of Single-Molecule Fluorescence”. *Physical Review Letters*, Vol 96, pp. 113002 (1-4). 2006.
- [22]. DULKEITH. E, MORTEANI. A, NIEDEREICHHOLZ. T, KLAR. T, FELDMANN. J, LEVI. S, VAN. A. “Fluorescence Quenching of Dye Molecules near Gold Nanoparticles: Radiative and Nonradiative Effects”. *Physical Review Letters*, Vol 96, pp. 203002 (1-4). 2006.
- [23]. LAKOWICZ. J.R. “Radiative decay engineering 5: metal-enhanced fluorescence and plasmon emission”. *Analytical Biochemistry*, Vol 337, pp. 171–194. 2005.
- [24]. LAKOWICZ. J. R. “Radiative Decay Engineering: Biophysical and Biomedical Applications”. *Analytical Biochemistry*, Vol 298, pp. 1–24. 2001.
- [25]. BOYD. R, RUSSELL. J, FISCHER. G, SIPE J. “Nonlinear optical properties of nanocomposite materials”. *Journal of the European Optical Society Part A*, Vol 5, pp. 505-512. 1996.
- [26]. RICARD. D, ROUSSIGNOL. PH, FLYTZANIS. CR. “Surface-mediated enhancement of optical phase conjugation in metal colloids”. *Optics Letters*, Vol 10, pp. 511-515. 1985.

CAPÍTULO 3. A TÉCNICA DE VARREDURA Z POR ECLIPSE COM CONTROLE DE EFEITOS TÉRMICOS.

Existe um interesse pela procura de materiais para aplicações em dispositivos, em sensores ópticos, em fibras ópticas de alta qualidade e chaves ópticas. Processos ópticos não lineares são importantes para biofotônica. A caracterização das propriedades ópticas não lineares de biosistemas é essencial para o desenvolvimento de novas técnicas ópticas de diagnóstico [1].

Existem diversos experimentos a partir dos quais é possível determinar as propriedades ópticas não lineares de meios biológicos. Os métodos mais utilizados para medir coeficientes não lineares de terceira ordem são: mistura de quatro ondas [2], chave Kerr [2] e a técnica de Varredura Z [3]. A técnica de Varredura Z tem tido uma grande e rápida aceitação pela comunidade de óptica não linear, como uma técnica padrão que determina, separadamente e simultaneamente, mudanças não lineares tanto de índice de refração como de absorção. Esta aceitação é devida, principalmente, à simplicidade da técnica como também por sua fácil interpretação. Esse método é sensível a todos os mecanismos físicos que alteram as propriedades ópticas não lineares dos materiais, como por exemplo, efeitos térmicos gerados com fontes de luz de alta taxa de repetição (MHz) [4]. Assim, é necessário cuidado para poder determinar e classificar os fenômenos físicos presentes que atuam na mudança das características ópticas de um meio.

Neste capítulo, é analisada a técnica de Varredura Z e algumas de suas variações. Para a caracterização das propriedades ópticas não lineares de biosistemas foi proposta e desenvolvida uma nova variação da técnica de Varredura Z com alta sensibilidade e capaz de diferenciar as contribuições térmicas e não térmicas para o índice de refração não linear. Esse sistema tem uma sensibilidade de uma ordem de grandeza maior do que a técnica de Varredura Z convencional. O sistema estabelecido é capaz de caracterizar materiais como a Água e o Quartzo. A referida técnica foi denominada de “Técnica de Varredura Z por eclipse com controle de efeitos térmicos”, ou abreviadamente como *TMEZ*. (“*Thermally Managed Eclipse Z-scan*”).

3.1. VARREDURA Z.

Um feixe óptico com perfil espacial gaussiano ao se propagar por um meio não linear, modifica, de forma não homogênea, o índice de refração do material. Como o índice de refração do material é função da intensidade do feixe propagante, equação (1.10), a região do material atingida pelo centro do feixe (parte mais intensa do feixe) sofre uma maior variação do índice de refração do que as regiões exteriores. A variação espacial do índice de refração faz o meio funcionar como uma lente convergente se $n_2 > 0$, ou divergente se $n_2 < 0$, ver Figura 3.1.

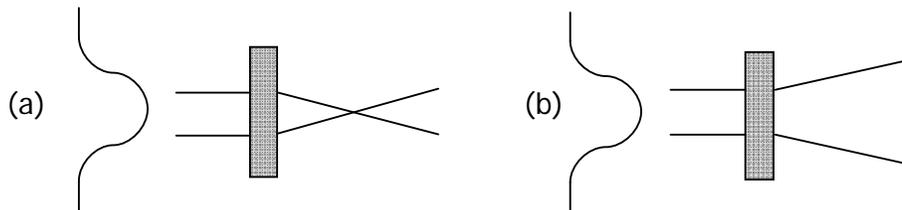


Figura 3.1. Comportamento do material como uma lente. Efeito de auto-focalização $n_2 > 0$ (a), e efeito de auto-defocalização $n_2 < 0$ (b).

A técnica chamada de Varredura Z, proposta por M. Sheik-Bahae e colaboradores [3], consiste em mover a amostra ao longo do eixo focal de uma lente (direção Z), que focaliza um feixe LASER, ver Figura 3.2. No percurso do feixe, numa região distante do foco é posicionado um fotodetector antecedido por uma íris. O que se detecta é a energia transmitida através da íris, em função da posição da amostra.

Nas proximidades do foco, onde a intensidade da luz incidente é maior, a contribuição do termo não linear altera a propagação, modificando a fase do feixe propagante. Esta modificação de fase está associada a uma alteração do perfil espacial do feixe, conforme pode ser visto na Figura 3.2 (para $n_2 < 0$).

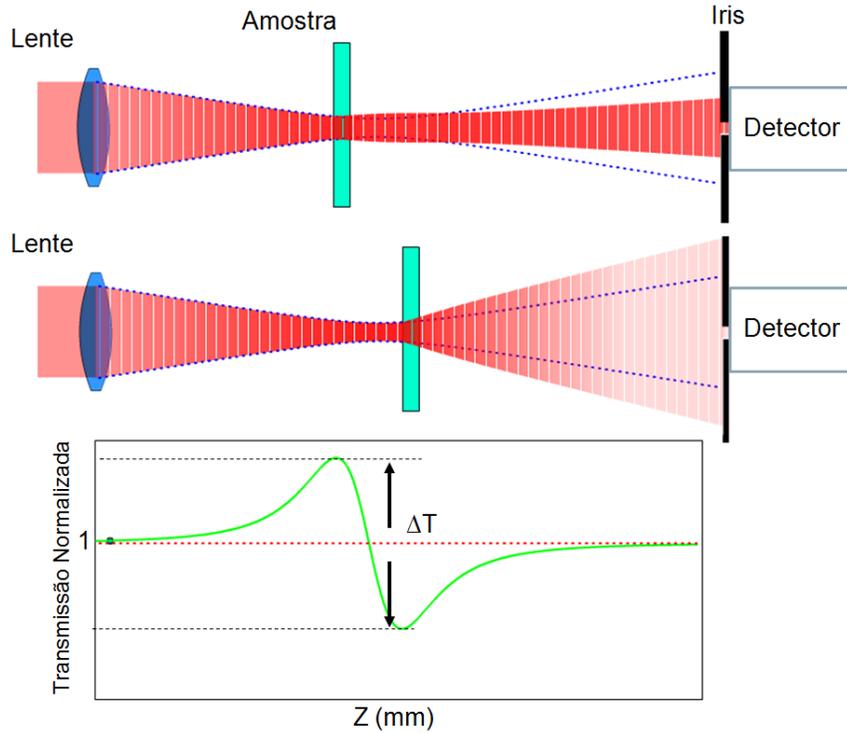


Figura 3.2. Experimento Varredura Z em uma amostra $n_2 < 0$. A linha tracejada indica a propagação do feixe sem amostra.

Assim, pode-se relacionar o raio de abertura da íris, r_a , à transmitância, S , por meio da expressão: $S = 1 - \exp(-2r_a^2/w_a^2)$, onde w_a é a cintura do feixe na posição da íris [3]. Por convenção, valores negativos de Z correspondem às posições entre a lente focalizadora e seu plano focal.

Dois tipos de medidas são feitas neste experimento, uma com a íris totalmente aberta ($S = 1$) e outra se utilizando a íris parcialmente fechada ($S \leq 1$). Na configuração íris fechada, o efeito de autofocalização ou auto-desfocalização altera a transmitância do feixe pela abertura da íris. Para este caso, também chamado de limite de pequenas mudanças na fase do feixe, $|\Delta\phi_0| \ll 1$, mostra-se que a transmissão do feixe pode ser escrita de forma bem simplificada por [3]:

$$T(z, \Delta\phi_0) = 1 - \frac{4x\Delta\phi_0}{(x^2+9)(x^2+1)} \quad (3.1)$$

onde $x = \frac{z}{z_0}$, z_0 é o parâmetro confocal, definido por $z_0 = kw_0^2/2$, e w_0 é a cintura do feixe no foco. Daí é fácil verificar que a diferença na transmissão do pico e do vale da curva de Varredura Z é:

$$\Delta T_{p,v} \cong 0,406(1-S)^{0,27} |\Delta\Phi_0| \quad (3.2)$$

com

$$\Delta\Phi_0 = \frac{2\pi}{\lambda} n_2 I_0 L_{eff} \quad (3.3)$$

onde $k = 2\pi/\lambda$ e $\Delta T_{p,v}$ é a diferença na transmissão entre o pico e o vale da curva de Varredura Z normalizada, $L_{eff} = [1 - \exp(-\alpha_0 L)] / \alpha_0$, L é a espessura e I_0 é a intensidade de pico no foco. Nas regiões distantes do foco, a intensidade do feixe de luz é menor e os efeitos não-lineares são desprezíveis. No caso de uma amostra com $n_2 > 0$, o sinal de Varredura Z é semelhante ao da Figura 3.2, mas com as posições do pico e do vale trocadas, ou seja, primeiro diminui a transmissão e logo aumenta.

Com a configuração íris aberta, todo o feixe é transmitido pela íris. Analisando-se a variação total na transmitância do feixe pela amostra em função da posição. Utilizando esta configuração mede-se o coeficiente de absorção não linear, α_2 , que está relacionado à variação total na transmitância normalizada, ΔT , como é apresentado na Figura 3.3 por [3]:

$$\Delta T = (2)^{-\frac{3}{2}} L_{eff} \alpha_2 I_0 \quad (3.4)$$

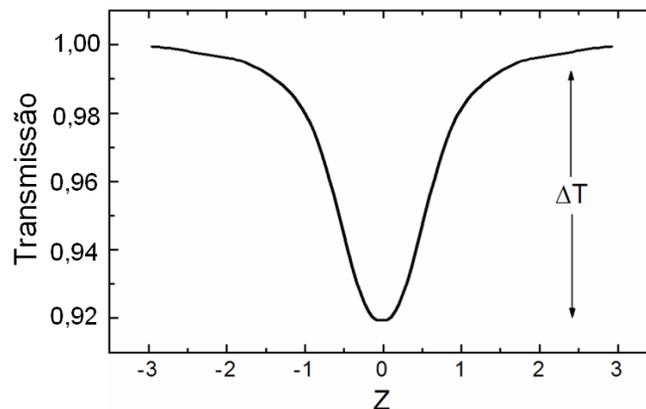


Figura 3.3. Curva de Varredura Z na configuração íris aberta, para uma amostra com absorção não linear $\alpha_2 > 0$. Neste caso ΔT é a diferença de transmissão associada ao pico da curva.

Apesar da simplicidade da técnica de Varredura Z, devem-se ter alguns cuidados na realização da montagem experimental. Esse tipo de medição pode ser feita apenas em amostras que não gerem espalhamento de luz. O não alinhamento da íris com o centro do feixe LASER ou o uso de um feixe cuja forma espacial seja muito diferente de um perfil gaussiano leva a uma deformação do gráfico de Varredura Z. A utilização de amostras cuja espessura é maior que o limite de ‘amostra delgada’ distorce também a figura de Varredura Z e exige uma teoria um pouco mais refinada [5]. Pode-se superar estas limitações comparando diretamente o valor de $\Delta T_{p,v}$ com o valor $\Delta T_{p,v}^{(r)}$ de um material de referência [6]. Desta forma tem-se:

$$n_2 = n_2^{(r)} \frac{\Delta T_{p,v}}{\Delta T_{p,v}^{(r)}} \frac{L^{(r)}}{L} \frac{P^{(r)}}{P} \quad (3.5)$$

onde L é a espessura efetiva, e P a potência incidente na amostra. Nesta tese, a determinação de n_2 de diferentes materiais foi obtida utilizando o método comparativo da equação (3.5). O material padrão utilizado foi o CS_2 cujo índice de refração não linear é conhecido na literatura, $n_2^{(\text{CS}_2)} = 3,1 \pm 0,6 \times 10^{-14} \text{ cm}^2/\text{W}$ em 800nm [7].

3.1.1. Variação Eclipse Varredura Z.

Sheik-Bahae e colaboradores [7], reportaram uma variação da técnica convencional de Varredura Z que proporciona uma maior sensibilidade na determinação do n_2 . Eles demonstram que a sensibilidade às variações de fase pode ser aumentada detectando-se as partes mais externas do feixe e não as partes centrais do feixe como na técnica de Varredura Z convencional. Como mostrado na Figura 3.4, introduz-se no sistema um disco que bloqueia a parte central do feixe e a luz que “vaza” pelas bordas do anteparo é focalizada por uma lente no detector. A imagem formada pelo bloqueio da parte central do feixe se assemelha a um eclipse. Por isso a técnica é denominada Eclipse Varredura Z.

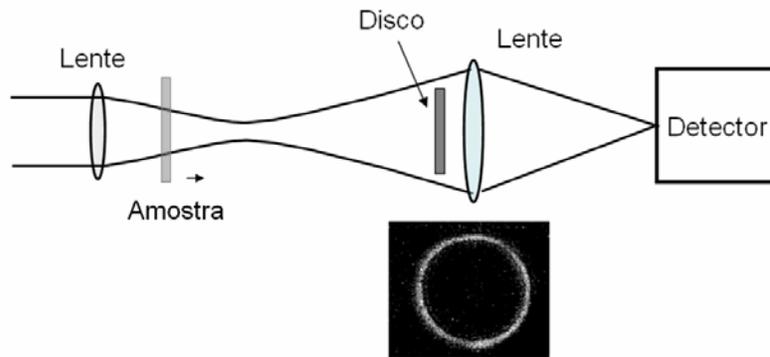


Figura 3.4. Esquema experimental da varredura Eclipse Varredura Z [7].

Uma expressão empírica análoga à equação (3.2) para o Eclipse Varredura Z é:

$$\Delta T_{p,v} \cong 0,68(1 - S_d)^{-0.44} |\Delta\Phi_0| \quad (3.6)$$

neste caso S_d é a transmitância que relaciona a cintura do feixe com o raio do disco, $S_d = 1 - \exp(-2r_a^2/w_a^2)$, onde w_a é a cintura do feixe na posição do disco, e r_a é agora o raio do disco anteparo. É evidente pela última relação que quando $S_d \rightarrow 1$ (disco maior), a sensibilidade incrementa significativamente. Como mostrado na Figura 3.5, com esta variação da técnica pode-se obter aumentos de até 13 vezes no valor $\Delta T_{p,v}$ obtido pela técnica de Varredura Z convencional [7].

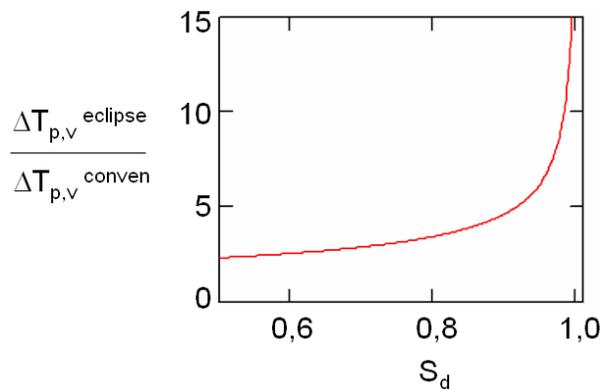


Figura 3.5. Comparação dos valores de $\Delta T_{p,v}$ para Eclipse Varredura Z e Varredura Z convencional, para diferentes valores de transmitâncias S_d (relação entre a cintura do feixe e o raio do disco anteparo) [7].

3.1.2. Controle de efeitos térmicos.

A configuração de íris fechada também é sensível às mudanças no índice de refração devido às variações de densidade no material, por exemplo, oriundas de efeitos térmicos [8]. Por essa razão, até pouco tempo, os experimentos de Varredura Z eram feitos utilizando fontes de luz LASER contínuas (CW) de baixa potência ou LASER com um seletor de pulsos obtendo taxas de repetição de (10~100Hz) [9].

Efeitos térmicos acontecem quando a amostra é iluminada por um trem de pulsos cujo espaçamento é mais curto que o tempo térmico característico do material. De acordo com a Tabela 1.1, os tempos térmicos característicos que contribuem para mudanças no índice de refração não linear acontecem desde os nanosegundos até alguns segundos dependendo do material.

A variação da mudança no índice de refração não linear por efeitos térmicos é conhecida como lente térmica [10]. O efeito de lente térmica induzida por uma fonte de luz LASER de alta repetição e, em especial, no experimento de Varredura Z com LASER de femtosegundos, tem sido relatado por vários autores [11,12]. Possuindo a intensidade do feixe de excitação um perfil radial gaussiano, de forma que os gradientes de temperatura e do índice de refração gerados seguem a mesma simetria do feixe (maiores variações no centro do feixe).

Efeitos de difusão térmica, em relação à duração do pulso LASER, têm sido estudados teoricamente [13] e experimentalmente utilizando fontes LASER de alta taxa de repetição [14]. Estes efeitos acontecem quando a amostra é iluminada por um trem de pulsos cujo espaçamento entre pulsos é mais curto que o tempo de difusão térmica característico $t_c = \omega_0^2 / 4D$, onde $D(\text{cm}^2\text{s}^{-1})$ é o coeficiente de difusão térmica do material da amostra e ω_0 é a cintura do feixe. Os valores do coeficiente de difusão estão na ordem dos $10^{-3}\text{cm}^2\text{s}^{-1}$ em líquidos e em vidros ópticos. Para esses materiais o tempo térmico característico tem valores superiores a $40\mu\text{s}$. Para fontes de luz LASER com taxa de repetição de algumas dezenas de KHz (separação entre pulsos na ordem nos μs). Neste

regime a amostra não retorna a temperatura de equilíbrio entre pulsos, gerando efeitos cumulativos de calor [14].

Mauro Falconieri modelou o efeito termo-óptico [13] descrevendo a mudança do índice de refração gerado pelo aumento de temperatura, devido á absorção da luz. Neste modelo a intensidade da luz normalizada, depois da amostra ser submetida a um trem de pulsos LASER, pode ser descrita por [13]:

$$\frac{I(x,t)}{I(x,0)} = 1 + \frac{V(q)}{q} \frac{1}{(1+x^2)^{q-1}} \tan^{-1} \left(\frac{2qx}{[(2q+1)^2 + x^2] \frac{t_c}{2qt} + 2q+1+x^2} \right) \quad (3.7)$$

onde x é a posição normalizada z/z_0 , q é a ordem do processo multifotônico (no caso de dois fótons $q=2$), t_c é o tempo característico do material, e $V(q)$ é a intensidade de lente térmica definida para um processo de absorção de dois fótons como:

$$V(2) = \frac{P^2 d_c \beta L}{\lambda \kappa} \frac{dn}{dT} \frac{2}{\pi w_0^2} \quad (3.8)$$

onde P é a potência média do LASER, d_c é a razão entre a largura do pulso LASER e a separação entre pulsos, w_0 é a cintura do feixe no foco, L é a espessura da amostra, λ é o comprimento de onda, κ é a condutividade térmica e dn/dT é a derivada do índice de refração com a temperatura.

A equação (3.7) é a expressão para a dependência temporal das mudanças nas propriedades ópticas não lineares, devidas a efeitos térmicos. Como se observa na Figura 3.6, quando uma amostra é submetida a um trem de pulsos, existe uma variação temporal do valor de intensidade de luz transmitida pela amostra. Esta variação temporal depende também da posição da amostra, x , sendo mais intensa para regiões perto do foco e especificamente nas posições normalizadas $x = 1,7$ e $-1,7$ [11].

De acordo com a idéia de Falconieri [13], uma forma de se controlar os efeitos térmicos é posicionar no caminho óptico do LASER um “*chopper*” que permite selecionar o tempo de exposição da amostra ao feixe. Assim, os efeitos térmicos acontecem durante

um tempo de iluminação onde os efeitos térmicos acontecem e logo existe um tempo de escuro para permitir o “esfriamento” da amostra. Pode-se modelar o efeito termo-óptico ou efeito de lente térmica pela equação (3.7) durante o tempo de iluminação, permitindo a obtenção da contribuição não térmica no índice de refração não linear, $I(x,0)$.

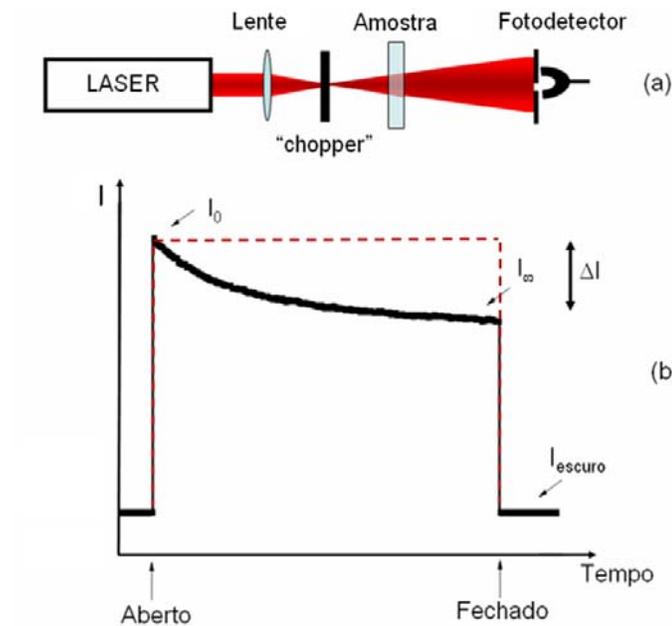


Figura 3.6. (a). Instrumentação de lente térmica de feixe único, (b) Transiente típico de sinal de lente térmica (Intensidade vs tempo). A linha tracejada indica o formato do tempo de iluminação sem amostra.

3.2. TÉCNICA DE VARREDURA Z POR ECLIPSE COM CONTROLE DE EFEITOS TÉRMICOS (TMEZ).

Neste trabalho é introduzido uma nova combinação da técnica de Eclipse-Varredura Z [7] com o controle de efeito térmico [13], aumentando em sensibilidade da medida simultânea das contribuições térmicas e não térmicas ao índice de refração dos materiais.

A técnica proposta foi elaborada utilizando um LASER Ti:Safira com comprimento de onda de 800nm e uma taxa de repetição de 76MHz. Na saída do LASER, utilizou-se um “*chopper*”, como modulador, permitindo a passagem do feixe durante 1ms (tempo de iluminação) a cada 48ms (tempo de escuro). No sistema, é utilizado um conjunto de lentes L1 (7,5cm) e L2 (10cm) tal que a interação permita uma modulação retangular com uma resolução temporal de 18 μ s. Um disco de 1,7cm serve como anteparo (correspondendo a um valor de $S_d = 0,99$), bloqueando a parte do feixe central. Uma lente L3 de 10cm (Figura 3.7) focaliza o feixe na amostra. A luz que “vaza” pelas bordas do disco é focalizada por meio de uma lente L4 de 10cm. A informação do detector é processada por um osciloscópio digital (TDS 3052B Tektronix). Parte do feixe é dirigido para o segundo detector, por meio de um divisor de feixe, e focalizado por uma lente L5 de 10cm (Figura 3.7), fornecendo a informação da absorção não linear. A amostra é deslocada ao longo do eixo de propagação do feixe por um motor (Thorlabs Z625B). A Figura 3.7 apresenta a configuração experimental da técnica.

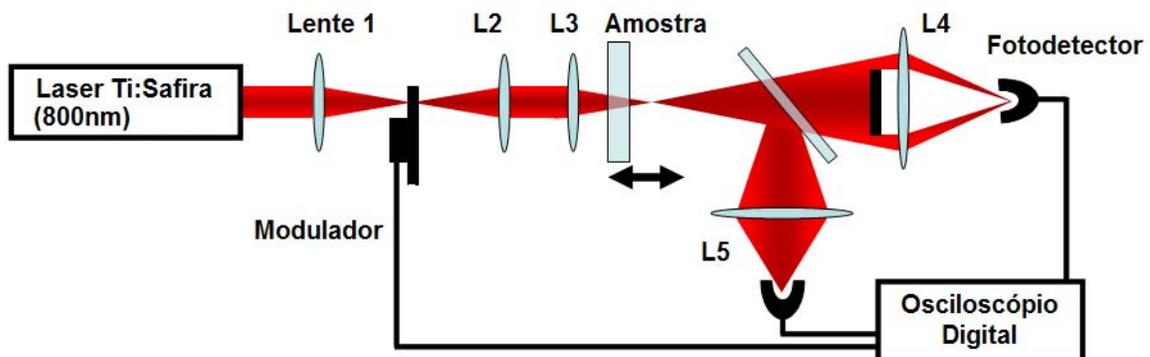


Figura 3.7. Montagem experimental para a variação da Varredura Z com controle de efeitos térmicos.

Para cada posição da amostra, uma medição temporal foi realizada. Na Figura 3.8, para cada posição fixa x da amostra, acompanha-se o efeito termo-óptico analisando a intensidade da transmissão em relação ao tempo durante 1ms (tempo de iluminação) através da equação (3.7). Com este modelo acompanha-se o comportamento da intensidade, com um ajuste teórico estimando o valor da intensidade $I_0(t=0)$ quando os efeitos de focalização são puramente eletrônicos. Do mesmo modo, se obtém as mudanças na intensidade do detector gerado pelos efeitos térmicos ($t > 0$), determinando o valor de lente térmica V , associado às características de absorção e condutividade térmica do material.

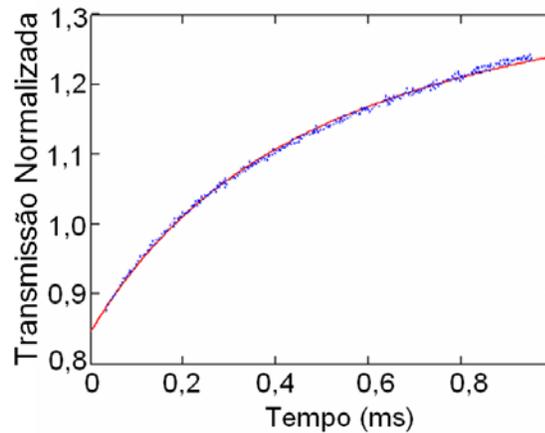


Figura 3.8. Transiente típico de sinal de lente térmica. Os valores experimentais (pontos) correspondem ao CS_2 . O ajuste teórico (linha) é feito utilizando a equação (3.7) [13].

Na Figura 3.9 (a), apresenta-se o comportamento temporal do índice de refração não linear do material de referência CS_2 . Como tal comportamento temporal é definido pela equação (3.7), extrapola-se o comportamento da intensidade de transmissão para $t=0$. Como se observa na Figura 3.9 (b) extrapolando o comportamento temporal da lente térmica para cada posição da amostra é possível obter a curva típica de Varredura Z para $t=0$. Permitindo obter, por meio da equação (3.7), a diferença entre o pico e o vale da curva de Varredura Z, $\Delta T_{p,v}$, onde o índice de refração não linear depende unicamente das contribuições eletrônicas. Para tempos acima de $100\mu\text{s}$, o sinal do valor do índice de refração linear muda e cresce até atingir um valor dominado pela contribuição térmica.

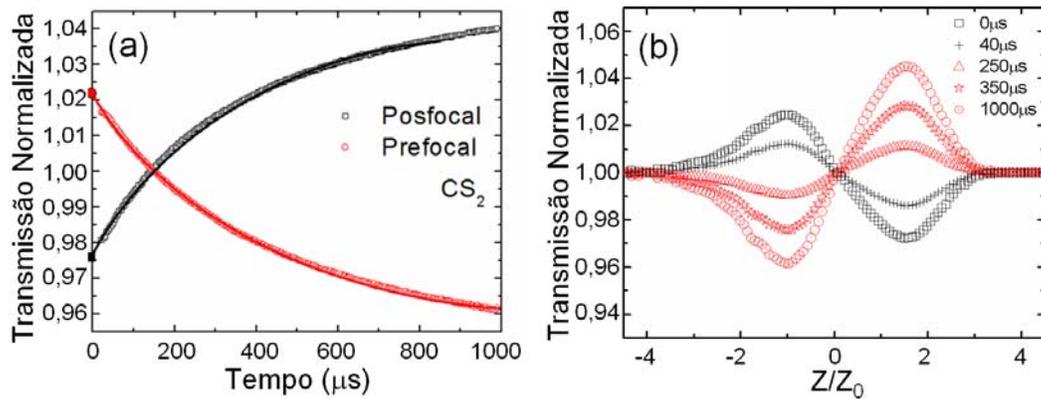


Figura 3.9. Evolução temporal da transmissão normalizada (a) e curva de Varredura Z para CS_2 (b), acompanhando os efeitos térmicos no tempo.

A técnica *TMEZ* permitiu estabelecer os valores de índice de refração não linear para amostras como o quartzo e a água, com até duas ordens de grandeza menores que a referência CS_2 ($n_2=(2,2\pm 0,5)\times 10^{-15} \text{ cm}^2/\text{W}$), projetando-se como uma técnica eficiente, utilizando fontes de luz de baixa intensidade, para caracterização de materiais orgânicos que têm valores de propriedades ópticas não lineares similares aos da água.

Na Figura 3.10 (a), a curva de varredura Z obtida pelo controle do efeito térmico (b), permitiu estimar o valor do índice de refração não linear para a água sem contribuições térmicas ($n_2=(1,6\pm 0,5)\times 10^{-16} \text{ cm}^2/\text{W}$).

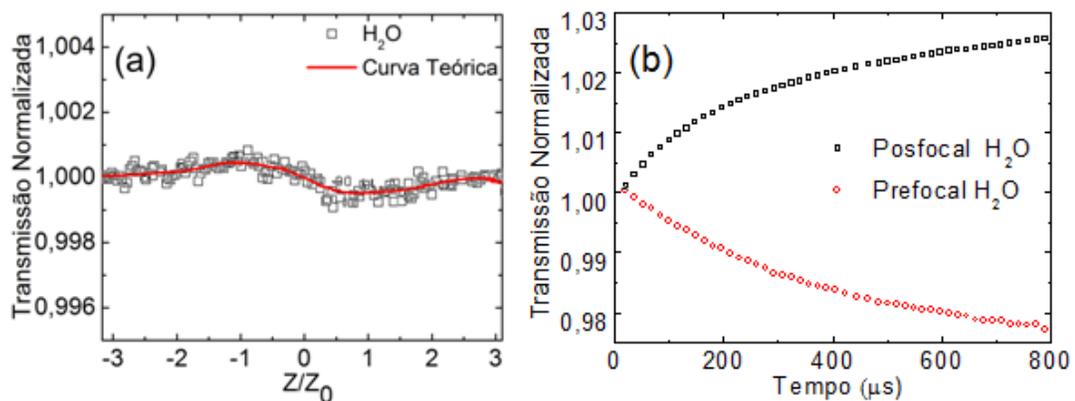


Figura 3.10. Curva de varredura Z para água (a) sem contribuições térmicas, modelando por médio da equação (3.7) o efeito termo-óptico acontecendo no tempo de iluminação (b).

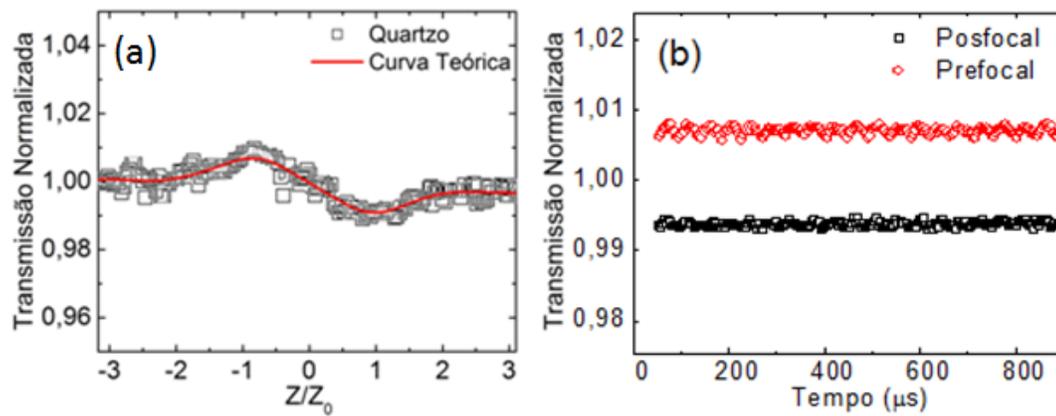


Figura 3.11. Curva de varredura Z para o quartzo (a) sem contribuições térmicas. O quartzo não apresenta efeito termo-óptico, as contribuições não térmicas permanecem constantes no tempo de iluminação (b).

O quartzo não apresenta efeitos de lente térmica e o valor do índice de refração não linear é $(n_2=(2,1\pm 0,1)\times 10^{-16}\text{ cm}^2/\text{W})$. A inexistência de efeitos térmicos no quartzo permite utilizar cuvetas desse material para análises de efeitos térmicos e não térmicos de diferentes materiais orgânicos em fase líquida. Tanto o valor de n_2 da água e do quartzo estão de acordo com os valores reportados na literatura [15].

3.3. CONCLUSÕES.

Uma nova variação da técnica de Varredura Z foi apresentada, intitulada Varredura por Eclipse com controle de efeitos térmicos, *TMEZ*. Esta é uma técnica mais sensível que caracteriza, simultaneamente, os efeitos térmicos e não térmicos das amostras. Este método pode converter-se em uma técnica muito útil para aqueles grupos de pesquisa e em especial em Biofotônica, com recursos limitados e que não podem ter acesso a um LASER de relativa alta potência ou a um seletor de pulsos que evite os efeitos térmicos.

3.4. REFERÊNCIAS.

- [1]. RAMASWAMI. R, SIRVARAJAN. K. *Optical Networks*. Academic Press. USA. 2002.
- [2]. SMITH. P, TOMLINSON. W, EILENBERGER. D, MALONEY. P. "Measurement of electronic optical Kerr coefficients". *Optics Letters*, Vol 6, No 12, pp. 581-583. 1981.
- [3]. SHEIK-BAHAE. M, SAID. A, WEI. T, HAGAN. D, VAN STRYLAND. E. "Sensitive Measurement of Optical Nonlinearities Using a Single Beam". *IEEE Journal of Quantum Electronics*, Vol 26, pp.760-769.1990.
- [4]. VAN STRYLAND. W, SHEIK-BAHAE. M. "Z-Scan Measurements of Optical Nonlinearities". *Characterization Techniques and Tabulations for Organic Nonlinear Materials*, pp. 655-692, Marcel Dekker, Inc, 1998
- [5]. SHEIK-BAHAE. M., SAID. A, HAGAN. J, VAN STRYLAND. E. "Nonlinear Refraction and Optical Limiting in Thick Media". *Optical Engineering*, Vol 30, No 8, pp. 1228-1235. 1991.
- [6]. BRIDGES. R, FISCHER. G, BOYD. R."Z-scan measurement technique for non-Gaussian beams and arbitrary sample thicknesses". *Optics Letters*, Vol 20, pp. 1821-1823. 1995.
- [7]. SHEIK-BAHAE. M., SAID. A, HAGAN. J, VAN STRYLAND. E. "High Sensitivity, Single Beam n_2 Measurements". *Optics Letters*, Vol 14, pp. 955-957. 1989.
- [8]. J.D. JACKSON, "*Classical Electrodynamics*", Wiley-Interscience.3rd ed, USA, 1998.
- [9]. AAMODT. L, MURPHY. J. "Thermal effects in photothermal spectroscopy and photothermal imaging". *Journal of Applied Physics*, Vol 54, pp. 581-591. 1983.

- [10]. PETROV. D, GOMES. A, DE ARAÚJO. C. “Spatial phase modulation due to the thermal nonlinearity in semiconductor-doped glasses”. *Physical Review B*, Vol 50, pp. 9092-9097. 1994.
- [11]. FALCONIERI. M, SALVETTI. G., “Simultaneous measurement of pure-optical and thermo-optical nonlinearities induced by high-repetition-rate, femtosecond laser pulses: application to CS₂”. *Applied Physics B*, Vol 69, pp. 133-136. 1999.
- [12]. MIAN. S, MCGEE. S, MELIKECHI. N. “Experimental and theoretical investigation of thermal lensing effect in mode-locked femtosecond Z-scan experiments”. *Optics Communication*, Vol 207, pp. 339-345. 2002.
- [13]. FALCONIERI. M. “Thermo-optical effects in Z -scan measurements using high-repetition-rate”. *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics*, Vol 1, pp. 662-667.1999.
- [14]. GNOLI. A, RAZZARI. L, RIGHINI. M. “Z-scan measurements using high repetition rate lasers: how to manage thermal effects”. *Optics Express*, Vol, 13, pp. 7976-7981. 2005.
- [15]. RODRIGUES. JR, SILVA. C, ZÍLIO. S, MISOGUTI. L, MENDONÇA. C. “Femtosecond Z-scan measurements of nonlinear refraction in amino acid solutions”. *Optical Materials*, Vol 20, pp. 153-157. 2002.

CAPÍTULO 4. APLICAÇÕES DA TÉCNICA DE VARREDURA Z POR ECLIPSE COM CONTROLE DE EFEITOS TÉRMICOS (*TMEZ*).

Aproveitando a grande sensibilidade da técnica *TMEZ*, desenvolvida neste trabalho, ideal para caracterização de sistemas orgânicos, se explora neste capítulo as propriedades ópticas não lineares dos seguintes aminoácidos: Triptofano, Fenilalanina, Tirosina, Histidina e Prolina. O interesse neste estudo radica na importância destes componentes biológicos, especialmente o Triptofano, Fenilalanina e Tirosina, nas propriedades ópticas celulares, ferramentas importantes em microscopia e espectroscopia celular. A Histidina e Prolina foram escolhidas por terem várias das suas propriedades ópticas conhecidas [1].

O estudo de materiais nanométricos tem se intensificado, não só devido ao interesse nos processos físicos relacionados com a interação da radiação com nanopartículas (confinamento quântico, confinamento dielétrico, interações entre partículas e o meio em que se encontram), como também em função do potencial de aplicação que elas apresentam em sistemas biológicos [2]. Na atualidade, a pesquisa básica relacionada às nanopartículas metálicas é principalmente centrada, no estudo da influência do tamanho e da forma das nanopartículas e suas propriedades ópticas [3], como também no estudo da possibilidade das aplicações em fotônica [4]. Utilizando a técnica *TMEZ* caracterizam-se as propriedades ópticas não lineares de partículas de prata de tamanho nanométrico numa geometria coloidal.

Por último, se procede a adicionar as partículas de prata, com baixas concentrações em soluções de aminoácido, analisando as modificações geradas pela presença das partículas nas propriedades ópticas não lineares dos aminoácidos. Lembrando que as nanopartículas de prata são exploradas nesta tese devido a sua baixa toxicidade em contato com os seres vivos [5].

Estes estudos mostram a importância da técnica desenvolvida e permitirão identificar e entender as mudanças nas propriedades ópticas para aplicações em imagens obtidas por microscopia multifotônica no capítulo 4.

4.1. PROPRIEDADES ÓPTICAS NÃO LINEARES DE AMINOÁCIDOS.

As proteínas são espécies químicas bastante abundantes nas células biológicas. Elas exibem uma diversidade de funções, como transportar oxigênio e fornecer uma resposta neurológica induzida por luz para a visão. As proteínas são macromoléculas formadas por uma sucessão de moléculas menores conhecidas como aminoácidos, que são os blocos constituintes dos seres vivos. A maioria dos seres vivos incluindo o homem utiliza somente vinte tipos diferentes de aminoácidos para a construção de suas proteínas.

Os diferentes aminoácidos possuem uma estrutura básica, como se observa na Figura 4.1. Todo aminoácido é composto de um átomo de carbono, ao qual estão ligados uma **carboxila**, uma **amina** e um **hidrogênio**. A quarta ligação **R**, chamada de radical, é a porção variável, pode ser ocupada por um hidrogênio, ou por um metil ou por outro radical [5].

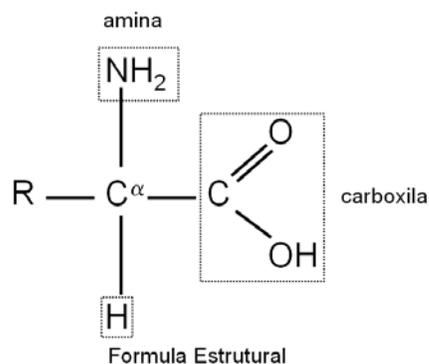


Figura 4.1. Estrutura química dos aminoácidos. Porções comuns nos aminoácidos em tracejado. Radical R é a parte variável de cada aminoácido.

Os aminoácidos ligam-se uns aos outros, formando moléculas denominadas de peptídeos. A união de um aminoácido com outro ocorre através de uma ligação peptídica. Para simplificar, os compostos formados por um pequeno número de aminoácidos são chamados de peptídeos, moléculas compostas por mais de uns 60 aminoácidos são chamados de proteínas [5].

Os aminoácidos podem ser classificados quanto ao radical como básicos, ácidos, polares neutros, apolares e aromáticos (contendo anéis benzênicos). Na Figura 4.2 se observa a conformação benzênica dos aminoácidos aromáticos, associados às ligações duplas de carbono.



Figura 4.2. Estrutura dos aminoácidos aromáticos.

Os aminoácidos aromáticos são: a Fenilalanina, a Tirosina e o Triptofano, que absorvem em comprimentos de onda próximos de 270nm. Os aminoácidos não aromáticos absorvem luz ultravioleta em comprimentos de onda menores que 240nm. A absorção depende das estruturas eletrônicas, especificamente da quantidade de transições associadas a enlaces duplos C=C ou C=O [5].

A Fenilalanina, a Tirosina e o Triptofano fluorescem. Em particular o Triptofano fluoresce quando é excitado em 280nm. Para um meio hidrofóbico a fluorescência é observada em 310nm e para um meio polar em 350nm. A eficiência quântica do Triptofano é de ~ 0.13 [6]. No caso da Fenilalanina e a Tirosina o espectro de emissão está na faixa de 290nm que se sobrepõe com o espectro de absorção do Triptofano, permitindo a transferência de energia desses aminoácidos para o Triptofano. Assim o cromóforo dominante no processo de fluorescência na maioria das proteínas é o Triptofano, mesmo com uma pequena concentração de 1mol% [7].

4.1.1. Medida do índice de refração não linear de aminoácidos.

Nesta seção, relata-se varias medições feitas explorando a técnica *TMEZ* para medir o índice de refração não linear para os aminoácidos escolhidos. Todas as medidas com a técnica *TMEZ* em 800nm foram feitas numa cubeta de quartzo de 1mm. A Figura 4.3 mostra os resultados do método empregado obtidos para uma solução aquosa de Triptofano. Acompanhando o efeito térmico da solução aminoácido gerado pela alta taxa de repetição laser (a), mede-se somente a contribuição eletrônica ao índice de refração não linear (b).

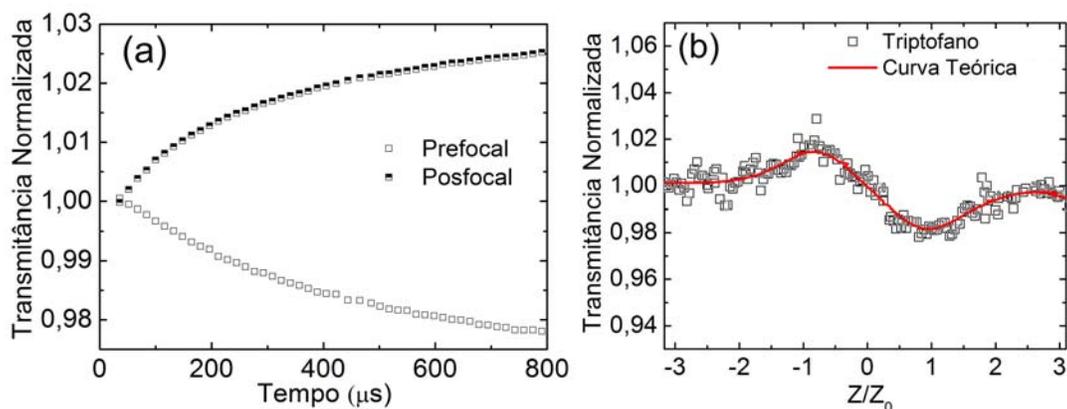


Figura 4.3. Medida do índice de refração não linear utilizando a técnica “*TMEZ*” para a solução de Triptofano. Evolução temporal (a). Varredura Z para $t=0$ da solução Triptofano (Curva teórica da equação 2.1) (b).

Como os aminoácidos foram estudados em água, para obter o valor de hiperpolarizabilidade de cada aminoácido foi necessário subtrair a contribuição da água no índice de refração não linear para cada solução [1,8].

No caso de um líquido isotrópico, em que as moléculas estão orientadas aleatoriamente, a susceptibilidade de terceira ordem está relacionada com a hiperpolarizabilidade de segunda ordem, γ . A hiperpolarizabilidade de segunda ordem pode ser diretamente inferida, pela equação 1.17. Os resultados experimentais de n_2 e γ para as diferentes soluções de aminoácidos são apresentados na Tabela 4.1.

Apesar de a molécula (aminoácido) ser relativamente complexa, utiliza-se um modelo simples para explicar a dependência da não linearidade de terceira ordem em função da geometria da molécula. Pode-se imaginar uma molécula como sendo uma caixa unidimensional em que os elétrons π se deslocam, sujeitos à presença de um campo elétrico. Em princípio, quanto maior a molécula, maior a deslocalização eletrônica e, conseqüentemente, maior o momento de dipolo induzido. De acordo com o capítulo 1, existe uma dependência da hiperpolarizabilidade de segunda ordem γ com o tamanho da molécula, ou comprimento de conjugação, que por sua vez está associado ao número de elétrons π .

Analisando a estrutura dos aminoácidos, como se apresenta na Figura 4.2 é esperado que a hiperpolarizabilidade de segunda ordem do Triptofano fosse a maior entre os aminoácidos estudados. O resultado de γ obtido para a Prolina está de acordo com o valor experimental e teórico, obtidos por J.J Rodrigues e colaboradores [1], valor da ordem dos 2×10^{-35} esu. Os valores das hiperpolarizabilidades e índices de refração não linear em 800nm para os outros aminoácidos não estão relatados na literatura.

Tabela 4.1. Valores medidos da hiperpolarizabilidade de segunda ordem para os aminoácidos estudados.

Aminoácido	n_2 (10^{-20}[m²/W])	pH	Concentração (10^{20}mol/cm³)	γ (10^{-35} esu)
Triptofano	$8,7 \pm 0,2$	$5,5 \pm 0,5$	0,4	$16,0 \pm 0,1$
Fenilalanina	$5,5 \pm 0,2$	$5,0 \pm 0,5$	0,4	$9,0 \pm 0,1$
Tirosina	$6,4 \pm 0,2$	$5,5 \pm 0,5$	0,3	$14,0 \pm 0,1$
Prolina	$3,2 \pm 0,2$	$5,0 \pm 0,5$	66,0	$0,2 \pm 0,1$
Histidina	$2,0 \pm 0,2$	$7,0 \pm 0,5$	1,3	$3,0 \pm 0,1$
Água	$1,6 \pm 0,2$	7	---	--

4.2. PROPRIEDADES ÓPTICAS NÃO LINEARES DE COLÓIDES METÁLICOS.

4.2.1. Colóides (geometria Maxwell Garnett).

Um Colóide consiste de pequenas inclusões de partículas embebidas em um material hospedeiro. Utilizando a técnica *TMEZ* estudam-se nesta seção as propriedades ópticas não lineares de partículas de prata de tamanho nano métrico numa geometria coloidal. Esse estudo é um passo na interpretação dos resultados da interação das partículas de prata e do sistema biológico.

Na Figura 4.4 se representa a geometria coloidal também chamada de geometria Maxwell-Garnett [9]. Nessa geometria a distância entre as partículas é menor que o comprimento de onda óptico. Nestas condições, a propagação da luz pode ser descrita pelo valor da permissividade elétrica efetiva, ϵ_{eff} , que é obtida como o valor médio de um volume da resposta óptica local do material.

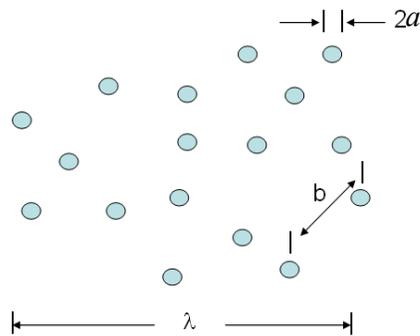


Figura 4.4. Topologia do compósito colóide. Nesta Geometria Maxwell Garnett o tamanho da partícula $2a$ é menor que a distância entre as inclusões b e muito menor que o comprimento de onda óptico λ .

Neste colóide as nanopartículas de prata são esferas de raio 'a' embebidas em um meio hospedeiro de permissividade elétrica ϵ_h . O meio é considerado como sendo macroscopicamente isotrópico e a distância característica entre as nanopartículas é b , tal que $a < b < \lambda_{ex}$. Neste contexto, a permissividade elétrica efetiva pode ser escrita como [9]:

$$\epsilon_{eff} = \epsilon_h \left[1 + \frac{3\beta f}{1 - \beta f} \right] \quad (4.1)$$

onde f é o fator de preenchimento, definido como a razão entre o volume total das pequenas partículas e o volume do meio hospedeiro. O fator de campo local β , é dado por:

$$\beta = \frac{\varepsilon_{NP} - \varepsilon_h}{\varepsilon_{NP} + 2\varepsilon_h} \quad (4.2)$$

Para um meio que não absorve campos com frequência ω , $\beta(\omega)$ é particularmente intenso quando a parte real de ε_{NP} é igual a $-2\varepsilon_h$. Essa condição descreve a excitação ressonante dos plásmons por dipolo da partícula metálica [10].

4.2.2. Síntese e elaboração das nanopartículas.

Partículas de prata de diâmetro de 0,65nm foram adquiridas da Purest Colloids, Inc [11]. Partículas essencialmente esféricas, com um tamanho médio de 9 nm, são elaboradas pelo grupo de C. B. de Araújo, e sintetizadas de acordo com o procedimento descrito na referência [12]. Assim, uma solução de 90 mg de AgNO_3 , diluída em 500 ml de água, foi levada a temperatura de 100°C. Para a redução da prata foi adicionado 10 ml de uma solução a 1% de citrato de sódio. A mistura foi, então, mantida durante 1h sob forte agitação e a temperatura de 100°C. Finalizada esta etapa, o colóide obtido possui uma coloração acinzentada e nanopartículas de prata com uma grande dispersão de forma e tamanho. Nas Figuras 4.5 e 4.6 observa-se a distribuição volumar para as partículas de prata de 0,65nm e 9nm respectivamente.

Para reduzir a dispersão de nossa amostra, subseqüentemente, submetemos o colóide prístino a um processo de foto-fragmentação (ablação laser). Esse procedimento leva tipicamente algumas horas (dependendo do volume a ser tratado) e é executado irradiando-se o colóide com o segundo harmônico de um laser de Nd:YAG (532 nm), operado “Q-switched”, com pulsos de 8 ns, a uma taxa de repetição de 10 Hz. Durante o tratamento a laser, o colóide é mantido sob uma agitação de moderada a lenta.

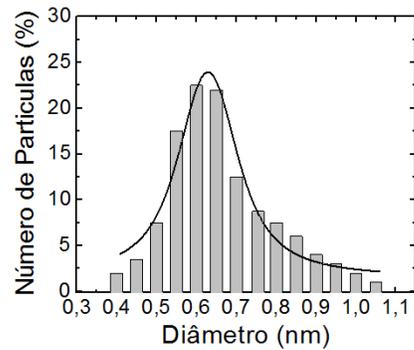


Figura 4.5. Histograma de distribuição de tamanho das partículas da Purest Colloid Inc. de tamanho 0,65nm [11].

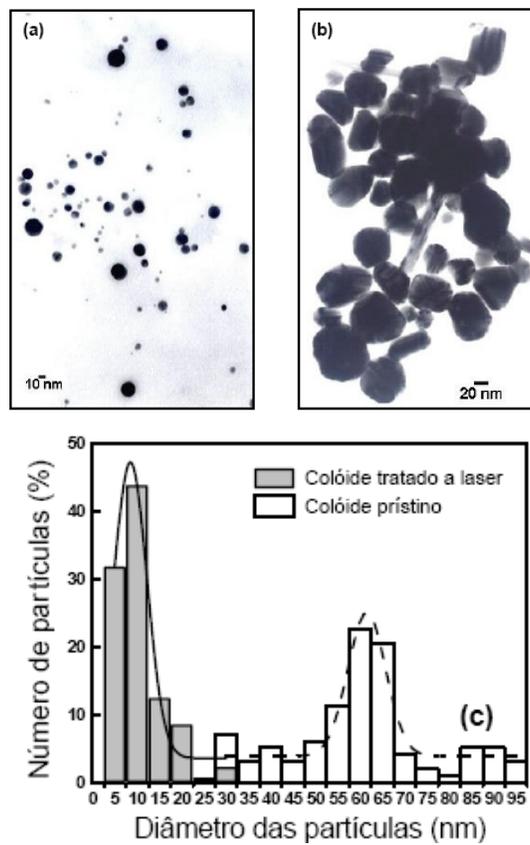


Figura 4.6. Imagens por microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas de prata: (a) colóide foto-fragmentado, (b) colóide prístino, (c) Histograma com a distribuição de tamanho das nanopartículas [12].

4.2.3. Absorção Linear.

Para sistemas com nanopartículas embebidas uniformemente em um hospedeiro não absorvente, como vidro ou água com permissividade elétrica ε_h , o coeficiente de absorção pode ser obtido pela teoria de dispersão de Mie [13] definida por:

$$\alpha = \frac{18\pi\varepsilon_h^{3/2} f}{\lambda} \frac{\varepsilon_{2NP}(\lambda, a)}{[2\varepsilon_h + \varepsilon_{1NP}(\lambda, a)]^2 + [\varepsilon_{2NP}(\lambda, a)]^2} \quad (4.3)$$

A permissividade elétrica da nanopartícula ($\varepsilon_{NP} = \varepsilon_{1NP} + i\varepsilon_{2NP}$) tem uma componente real ε_{1NP} e uma componente imaginária ε_{2NP} . As duas componentes são dependentes do tamanho da partícula (confinamento dielétrico). Pela equação (4.3) a absorção aumenta na medida em que o denominador diminui, seu máximo valor (condição de ressonância) é dado quando:

$$2\varepsilon_h + \varepsilon_{1NP}(\lambda, a) = 0 \quad (4.4)$$

O pico de ressonância para partículas metálicas de ouro esta na região dos 530nm para partículas com diâmetro de 10 a 50nm e em 600nm para partículas de diâmetro de 100nm, efeito conhecido como “*red shift*” [14]. Esse efeito é devido à dependência da permissividade elétrica com o tamanho das partículas [10].

Como se observa na Figura 4.7, a condição de ressonância para nanopartículas metálicas de prata embebidas em água está na região dos 400nm. Com os valores das permissividades elétricas para ‘bulk’ encontrados experimentalmente por Johnson e Christy [15] em filmes de prata de 50nm e considerando que os efeitos de confinamento quântico para esferas metálicas de tamanho nanométrico [16] modificam os valores das permissividades elétricas, pode-se modelar o comportamento da absorção utilizando a teoria de dispersão de Mie. Assim determina-se simultaneamente os valores do fator de preenchimento e o valor da permissividade elétrica para as nanopartículas metálicas no meio. Os valores dos fatores de preenchimento, f , obtidos são da ordem de 10^{-6} . O valor obtido da permissividade elétrica da nanopartícula de prata em 800nm é:

$$\varepsilon_{prata}(800nm) = -28,4 - 7,493j$$

Este valor difere do valor ‘bulk’, dado por $\varepsilon_{NP}(800nm) = -32,797 - 0,458j$. O efeito de confinamento quântico para a permissividade elétrica, gerado pelo tamanho da nanopartícula, é maior na parte imaginária.

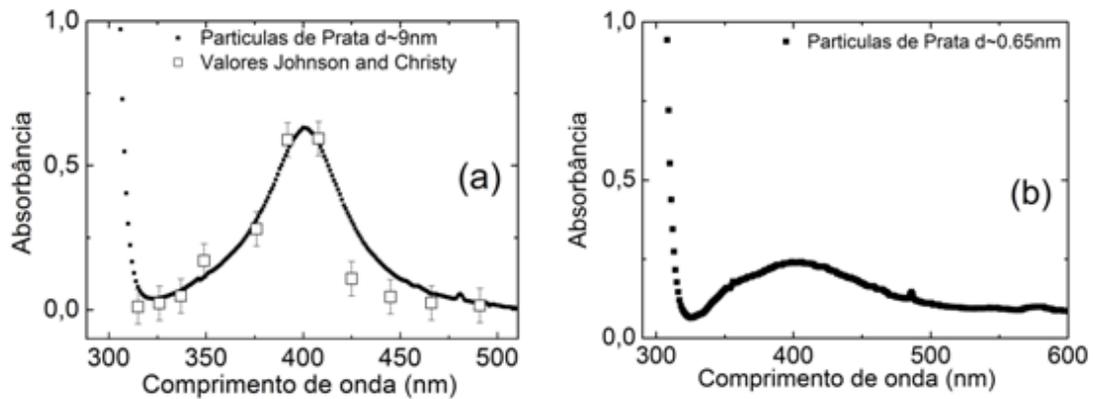


Figura 4.7. Espectro de absorção de colóides de prata de tamanho 9nm (a). Com os valores de Johnson e Christy e considerando efeitos de confinamento quântico (pontos abertos) pode-se determinar o valor de permissividade elétrica da nanopartícula. Espectro de absorção de colóides de prata de tamanho 0,65nm(b).

4.2.4. Medida de índice de refração não linear do Colóide.

O comportamento não linear do colóide é relacionado à variação espacial do campo local, visto que o campo elétrico mesoscópico induzido é diferente do campo médio do colóide [9]. Assim, para descrevermos a dependência da susceptibilidade elétrica de terceira ordem com o fator de preenchimento f , utiliza-se a generalização do modelo de Maxwell Garnett proposta por Sipe e Boyd [9].

No regime não linear é possível mostrar que a susceptibilidade elétrica de terceira ordem, para pequenos valores de f , é dada por [9]:

$$\chi_{eff}^{(3)} = f \left| \frac{\varepsilon_{eff} + 2\varepsilon_h}{\varepsilon_{NP} + 2\varepsilon_h} \right|^2 \left[\frac{\varepsilon_{eff} + 2\varepsilon_h}{\varepsilon_{NP} + 2\varepsilon_h} \right]^2 \chi_{NP}^{(3)} + \chi_h^{(3)} \quad (4.5)$$

onde $\chi_{NP}^{(3)}$ e $\chi_h^{(3)}$ correspondem, respectivamente, às susceptibilidades não lineares das nanopartículas e do meio hospedeiro. O modelo de Maxwell-Garnett, não tem uma dependência explícita com o tamanho da nanopartícula, desde que se conserve a condição $a < b < \lambda_{ex}$.

Hache e colaboradores [17] desenvolveram um modelo teórico para a susceptibilidade elétrica não linear da nanopartícula $\chi_{NP}^{(3)}$, onde a principal contribuição é dada pelas transições inter-bandas das nanopartículas metálicas, com uma dependência de tamanho e de frequência do tipo:

$$\chi_{NP}^{(3)} = -i \frac{0,45}{\pi} \frac{1}{a^3} \frac{1}{\omega^7} \left(\frac{e^4 E_F^4}{m^2 \hbar^5} \right) \quad (4.6)$$

onde E_F é a energia de Fermi da partícula, e é a carga do elétron, m é a massa do elétron, e \hbar é a constante de Planck. Assim, para partículas pequenas a principal dependência do $\chi_{NP}^{(3)}$ é do tipo a^{-3} . No entanto, para partículas de raio aproximadamente menores que 3nm e maiores que 30nm as contribuições intra-bandas começam a ser relevantes, modificando os valores de $\chi_{NP}^{(3)}$. Assim a equação (4.6), só é válida para partículas de raio aproximado de 3 a 30nm. Em trabalhos pioneiros, Flytzanis e co-autores, em experiências com colóides de prata e de ouro, observaram um grande aumento da susceptibilidade de terceira ordem devido á contribuição de plasmons superficiais nas partículas metálicas [17].

Neste trabalho, exploram-se a técnica *TMEZ* em 800nm, para estudar a resposta não linear de colóides de nanopartículas de diâmetro de 9nm e 0,65nm, com fatores de preenchimento da ordem dos 10^{-6} e 10^{-7} respectivamente. Observa-se na Figura 4.8 as curvas típicas de Varredura Z para o colóide de prata.

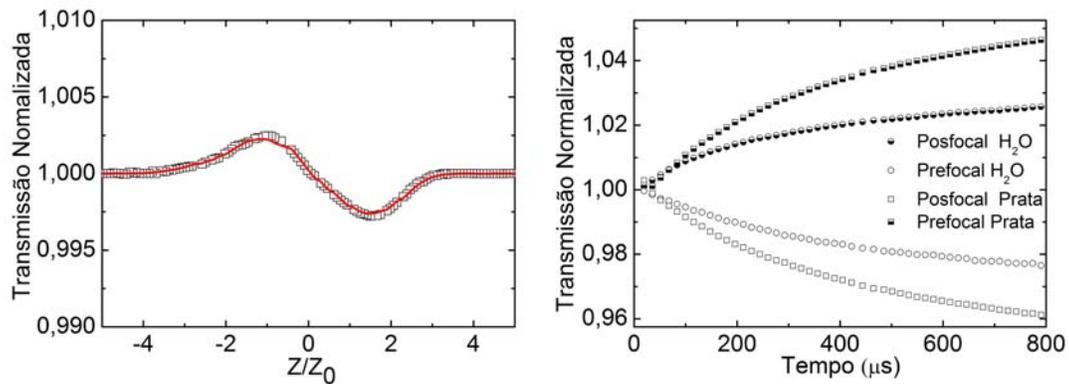


Figura 4.8. Medida do índice de refração não linear utilizando técnica 'TMEZ' para água e colóide de prata para 9nm. (a) Varredura Z para colóide de prata e (b) Evolução temporal do efeito térmico para água e colóide de prata.

Pode-se ver na Figura 4.9 a dependência do índice de refração não linear com o fator de preenchimento. Fatores de preenchimento de ordem superiores não foram explorados e isso é devido aos altos efeitos térmicos gerados nos colóides de prata [18].

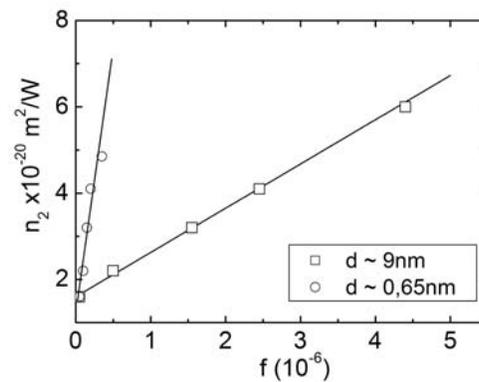


Figura 4.9. Dependência do índice de refração não linear com o fator de preenchimento f , para partículas de tamanho 9nm e 0,65nm com comprimento de onda de 800nm.

A dependência do índice de refração não linear com o fator de preenchimento pode ser descrita pelo modelo de Maxwell Garnett, equação (4.5), medindo os valores da susceptibilidade elétrica não linear para as nanopartículas. Sabe-se pela equação (1.11) que a parte real da susceptibilidade elétrica de terceira ordem está relacionada com o índice de refração não linear, n_2 e após a introdução dos valores numéricos para a permissividade elétrica da água, $\epsilon_m = n_0^2$, ($n_0 = 1.33$), da permissividade elétrica das nanopartículas ϵ_{NP} , e

do fator de preenchimento f , com o coeficiente angular da Figura 4.9, foi possível estimar o valor para a parte real de $\chi_{NP}^{(3)}$ para partículas de 9nm, com um valor de

$$\left| \chi_{NP}^{(3)} (esu) \right| \approx 2.43 \times 10^{-8} (esu) \quad (4.7)$$

O resultado apresentado está de acordo com os valores obtidos para a susceptibilidade elétrica de terceira ordem para partículas de prata reportada pelo grupo de Flytzanis utilizando a técnica de chaveamento Kerr em 400nm [19]. O valor obtido da susceptibilidade elétrica não linear $\chi_{NP}^{(3)}$ do colóide de prata é um resultado novo, tanto na utilização da técnica Z, para a medição do índice de refração em 800nm como na utilização do modelo de Maxwell-Garnett.

Pela equação (4.6), a principal dependência do $\chi_{NP}^{(3)}$ é do tipo a^{-3} . Assim, os valores do índice de refração não linear para partículas de prata de 0,65nm são similares aos obtidos com partículas de 9nm, no entanto, o colóide de 0,65nm é muito mais diluído, com um fator de preenchimento de uma ordem de grandeza menor, como pode se ver na Figura 4.9. Por isso, se espera que o valor de $\chi_{NP}^{(3)}$ para as partículas de 0,65nm seja maior que o valor para partículas de 9nm. Contudo para partículas muito pequenas, diâmetros menores de 3nm, a equação (4.6) deixa de ser válida [19], e os valores obtidos para $\chi_{NP}^{(3)}$ não são coerentes com os valores teóricos.

A parte imaginária da susceptibilidade de terceira ordem associada com a absorção não linear foi desprezada, porque a sensibilidade de fenda aberta de nosso sistema de Varredura Z é menor que os valores esperados de absorção não linear para fatores de preenchimento de essa ordem.

4.3. PROPRIEDADES ÓPTICAS NÃO LINEARES DE AMINOÁCIDOS E NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.

A associação da nanociência e da nanotecnologia às áreas de pesquisas biológicas tem gerado uma revolução de alto impacto na área de biotecnologia. Em particular, o interesse nas propriedades não lineares de meios com nanopartículas metálicas aumentou, após a demonstração de um aumento gigante ($\sim 10^6$), da não linearidade do material hospedeiro devido aos efeitos de campo local [19]. Nesta última seção relatam-se as modificações geradas pela presença das partículas metálicas nas propriedades ópticas não lineares dos aminoácidos.

4.3.1. Absorção.

A Figura 4.10 mostra que o espectro de absorção linear para diferentes fatores de preenchimento de nanopartículas de prata de 9nm (esquerda) e partículas de 0,65nm (direita) numa solução de Triptofano. No espectro de absorção, o pico centrado em 405nm é devido à presença das nanopartículas de prata de 9nm na solução. No caso das soluções de Triptofano com partículas metálicas de 0,65nm o pico de ressonância é mais largo.

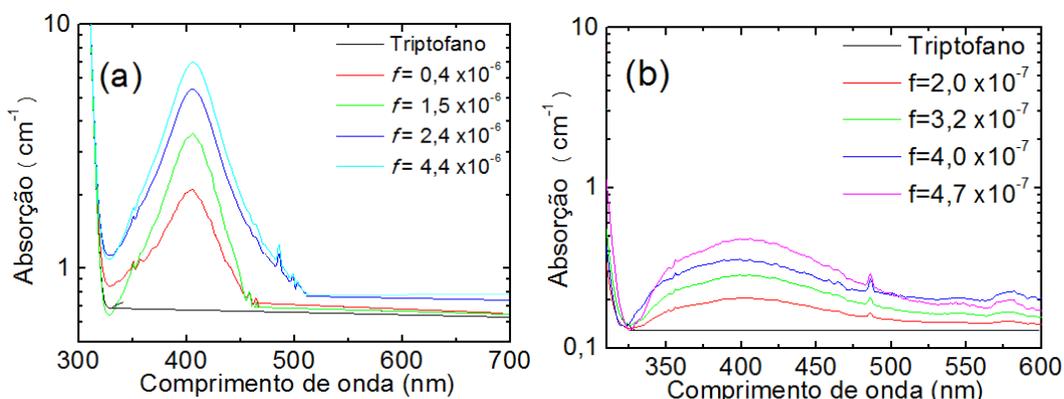


Figura 4.10. Espectro de absorção para diferentes concentrações de nanopartículas de pratas de diâmetro $d \sim 9\text{nm}$ (a) e $d \sim 0,65\text{nm}$ (b) em solução de Triptofano.

A condição de ressonância de plasmon depende sensivelmente das permissividades elétricas do meio. Assim, similar aos casos de interfaces planas [20], uma partícula

metálica pode ser utilizada como um sensor que sofre deslocamentos de ressonância sobre mudanças dielétricas locais [21,22].

Como se observa na Figura 4.11, os espectros de absorção das soluções de alguns aminoácidos (Triptofano, Tirosina, Fenilalanina) com nanopartículas de prata de 9nm apresentam um deslocamento no pico de absorção de $\Delta\lambda \sim 5\text{nm}$ em relação ao pico de absorção das nanopartículas de prata em água. Estes deslocamentos acontecem pela aproximação dos aminoácidos à superfície das nanopartículas metálicas modificando a permissividade elétrica das mesmas.

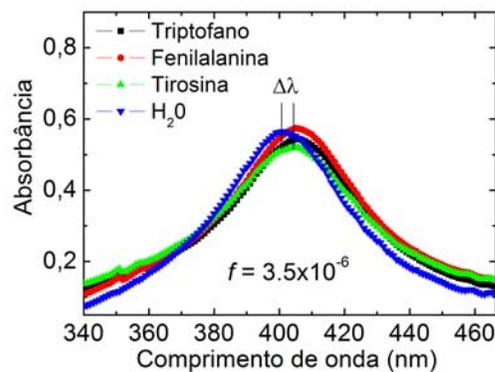


Figura 4.11. Espectro de absorção para diferentes concentrações de nanopartículas de pratas com $d \sim 9\text{nm}$ em diferentes soluções.

4.3.2. Medida do índice de refração não linear.

A alta sensibilidade da técnica *TMEZ*, foi explorada para estudar a resposta não linear dos aminoácidos na presença das nanopartículas de prata de $d \sim 9\text{nm}$ e $d \sim 0,65\text{nm}$. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.2, mostrando que existe um aumento no índice de refração não linear efetivo do biosistema quando é adicionado nanopartículas metálicas à solução.

Tabela 4.2.a. Índice de refração não linear para diferentes concentrações de partículas metálicas de 9nm.

Aminoácido	n_2 $10^{-20} [\text{m}^2/\text{W}]$	$f=0,45 \times 10^{-6}$	$f=1,50 \times 10^{-6}$	$f= 2,40 \times 10^{-6}$	$f= 4,35 \times 10^{-6}$
Triptofano	$8,7 \pm 0,2$	$9,5 \pm 0,2$	$11,2 \pm 0,2$	$13,9 \pm 0,2$	$15,0 \pm 0,2$
Fenilalanina	$5,5 \pm 0,2$	$7,3 \pm 0,2$	$8,2 \pm 0,2$	$9,0 \pm 0,2$	$9,6 \pm 0,2$
Tirosina	$7,0 \pm 0,2$	$9,2 \pm 0,2$	$10,8 \pm 0,2$	$12,0 \pm 0,2$	$12,6 \pm 0,2$
Prolina	$3,6 \pm 0,2$	$4,2 \pm 0,2$	$4,7 \pm 0,2$	$5,0 \pm 0,2$	$6,1 \pm 0,2$
Histidina	$2,5 \pm 0,2$	$4,5 \pm 0,2$	$5,4 \pm 0,2$	$6,2 \pm 0,2$	$7,0 \pm 0,2$

Tabela 4.2.b. Índice de refração não linear para diferentes concentrações de partículas metálicas de 0,65nm.

Aminoácido	n_2 $10^{-20} [\text{m}^2/\text{W}]$	$f=2,00 \times 10^{-7}$	$f=3,25 \times 10^{-7}$	$f=4,00 \times 10^{-7}$	$f= 4,75 \times 10^{-7}$
Triptofano	$8,7 \pm 0,2$	$11,2 \pm 0,2$	$13,1 \pm 0,2$	$14,2 \pm 0,2$	$15,5 \pm 0,2$
Fenilalanina	$5,5 \pm 0,2$	$6,5 \pm 0,2$	$7,0 \pm 0,2$	$8,0 \pm 0,2$	$8,8 \pm 0,2$
Tirosina	$6,4 \pm 0,2$	$8,5 \pm 0,2$	$11,0 \pm 0,2$	$11,7 \pm 0,2$	$12,3 \pm 0,2$
Prolina	$3,2 \pm 0,2$	$4,1 \pm 0,2$	$5,2 \pm 0,2$	$5,7 \pm 0,2$	$6,1 \pm 0,2$
Histidina	$2,0 \pm 0,2$	$3,7 \pm 0,2$	$5,7 \pm 0,2$	$6,5 \pm 0,2$	$7,1 \pm 0,2$

Aumento no índice de refração não linear até um fator de dois é observado para os aminoácidos com colóides de partículas de 9nm e 0,65nm. No entanto, a concentração de partículas metálicas de 0,65nm necessária para ter um aumento similar ao apresentado pelas partículas de 9nm é de uma ordem de grandeza menor. Como se representa na Figura 4.12, a dependência do índice de refração não linear com o fator de preenchimento pode ser descrita pelo modelo de Maxwell Garnett, para partículas de 0,65nm e a linearidade da dependência é verificada.

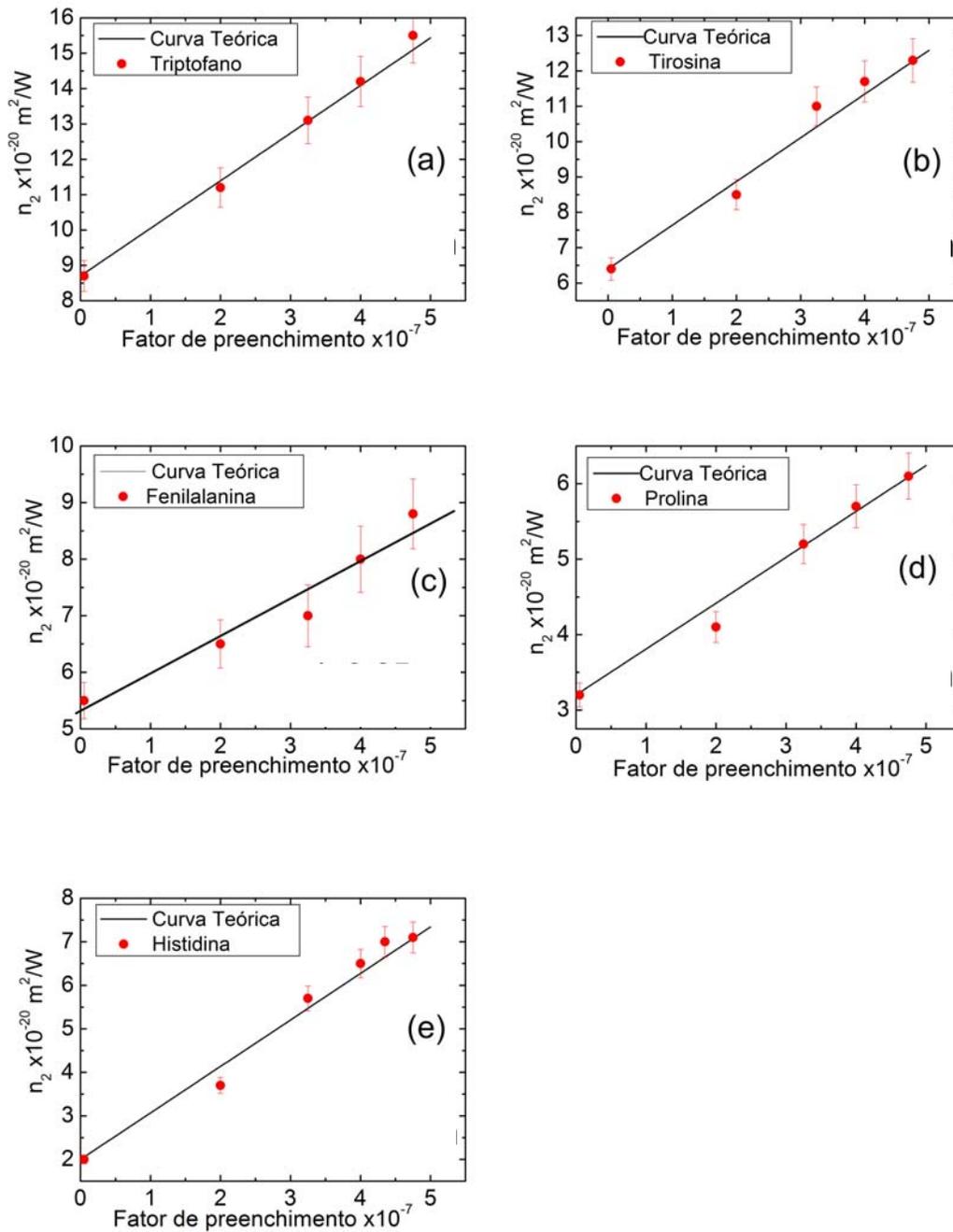


Figura 4.12. Dependência da não linearidade efetiva com o fator de preenchimento de partículas de $d \sim 0,65 \text{ nm}$ em solução Triptofano (a), Tirosina (b), Fenilalanina (c), Prolina (d) e Histidina (e).

Já a dependência do índice de refração não linear para as partículas de 9 nm em função do fator de preenchimento numa solução aminoácido não tem um comportamento linear como se mostra na Figura 4.13. Os deslocamentos do pico da ressonância do

biocolóide no espectro de absorção (Figura 4.11), sugerem que os aminoácidos podem estar se ligando às partículas metálicas. Assim, acima de certos valores de concentração de partículas metálicas de 9nm na solução aminoácido, pode existir um processo de aglomeração induzido pela presença dos aminoácidos. Ditas aglomerações modificam o valor da susceptibilidade elétrica efetiva de terceira ordem. O modelo de Maxwell-Garnett também pode deixar de ser válido na existência de aglomerações.

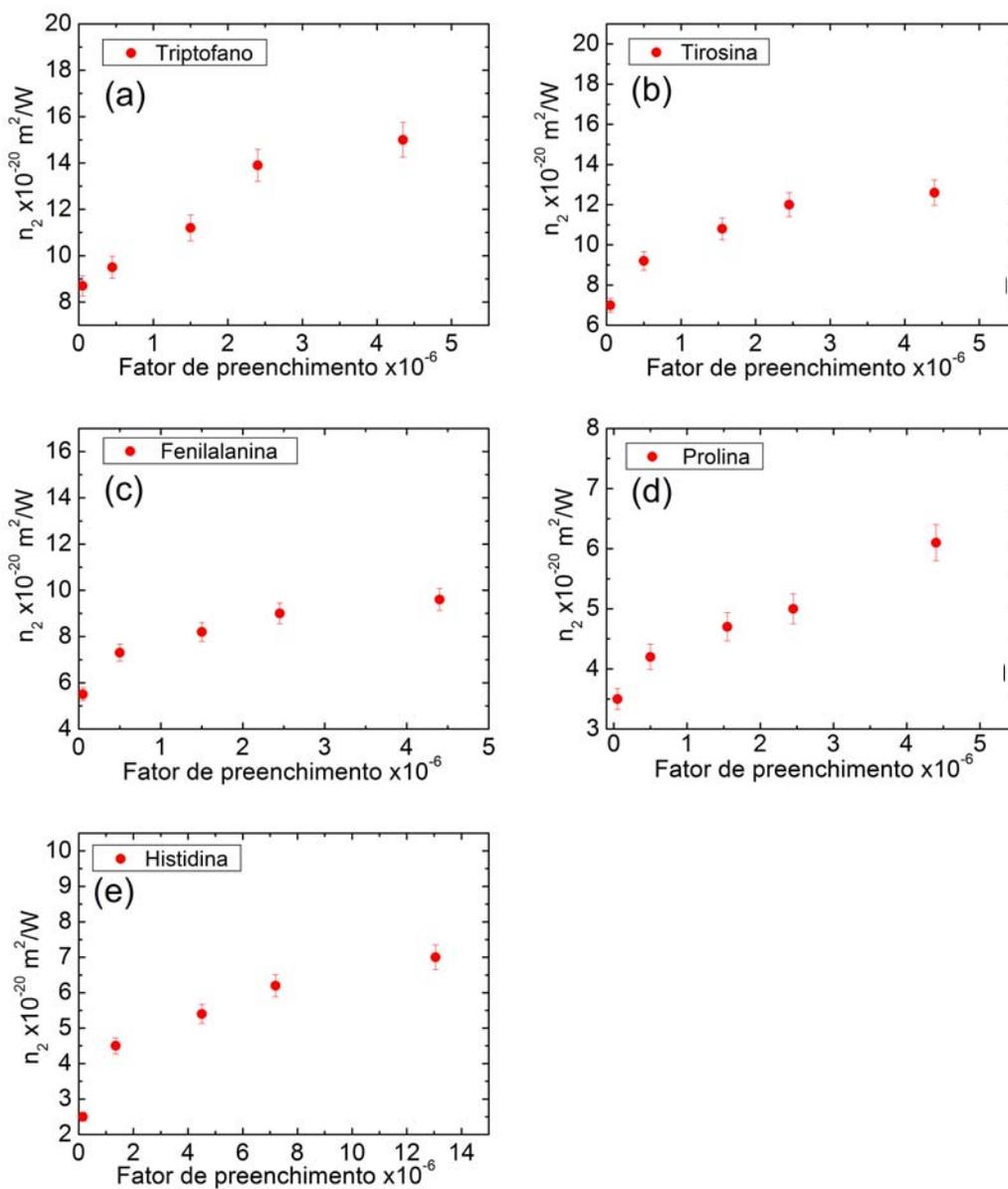


Figura 4.13. Dependência da não linearidade efetiva com o fator de preenchimento de partículas de $d \sim 9\text{nm}$ em solução Triptofano (a), Tirosina (b), Fenilalanina (c), Prolina (d) e Histidina (e).

4.4. CONCLUSÕES.

- A susceptibilidade não linear de um aminoácido em solução aquosa depende da sua estrutura eletrônica e de sua geometria.
- Explorar novas técnicas para incrementar os valores da susceptibilidade efetiva do meio geraria novos métodos para estudos de autofluorescência e imagens multifotônicas. Uma destas novas técnicas pode ser a presença de partículas metálicas na vizinhança dos aminoácidos, que modificam as características ópticas do meio.
- A não linearidade do colóide demonstrou ser uma função linear da fração volumétrica (fator de preenchimento) e pode ser analisada usando uma generalização do modelo de Maxwell-Garnett, que permitiu quantificar a susceptibilidade não linear das nanopartículas. Este passo foi fundamental para explicar a inclusão de nanopartículas metálicas em aminoácidos em soluções.
- O valor das permissividades elétricas das nanopartículas, considerando efeitos de confinamento quântico, diferem do valor volumar da prata.
- A presença de partículas metálicas de 9nm e 0,65nm em uma solução biológica aumentam o valor do índice de refração não linear por um fator de dois.

4.5. REFERÊNCIAS.

- [1]. RODRIGUES. JR, SILVA. C, ZÍLIO. S, MISOGUTI. L, MENDONÇA. C. “Femtosecond Z-scan measurements of nonlinear refraction in amino acid solutions”. *Optical Materials*, Vol 20, pp. 153-157. 2002.
- [2]. YELIN. D, ORON. D, THIBERGE. S, MOSES.E, SILBERBERG. Y. “Multiphoton plasmon-resonance microscopy”. *Optics Express*, Vol. 11, No 12, pp. 1385-1391. 2003.
- [3]. DRACHEV. V, KHALIULLIN. E, KIM. W, ALZOUBI. F, RAUTIAN. S, SAFONOV. V, ARMSTRONG. R, SHALAEV M. “Quantum size effect in two-photon excited luminescence from silver nanoparticles”. *Physical Review B*, Vol 69, pp. 035318-035318-5 .2004.
- [4]. ANTONOV. I, BASS. F, KAGANOVSKII. Y, ROSENBLUH. M, LIPOVSKII. E. “Fabrication of microlenses in Ag-doped glasses by a focused continuous wave laser beam”. *Journal of Applied Physics*, Vol 93, No 5, pp. 2343-2348, 2003.
- [5]. PARAS N. PRASAD, *Introduction to Biophotonics*, John Wiley & Sons, New York, 2003.
- [6]. TEALE. J, WEBER. G. ‘Ultraviolet fluorescence of the aromatic amino acids’. *Biochemical Journal*, Vol 3, pp. 476-482. 1985.
- [7]. BUEHLER. C, DREESSEN. J, MUELLER. K, SO. P, SCHILB. A, HASSIEPEN. U, K.STOECKLI, AUER. M. “Multi-Photon Excitation of Intrinsic Protein Fluorescence and Its Application to Pharmaceutical Drug Screening”. *ASSAY and Drug Development Technologies*. Vol 3, No 2, pp. 155 -167. 2005.

- [8]. ROCKWELL. B, ROACH. W, ROGERS.M, MAYO. M, TOTH. C, CAIN. C, NOOJIN. G. “Nonlinear refraction in vitreous humor”. *Optics Letters*, Vol 18, No 21. pp 1792-1794. 1993.
- [9]. BOYD. R, RUSSELL. J, FISCHER.G, SIPE J. “Nonlinear optical properties of nanocomposite materials”. *Journal of the European Optical Society Part A*, Vol 5, pp. 505-512. 1996.
- [10]. PARAS N. PRASAD. *Nanophotonics*. John Wiley & Sons, New York, 2004.
- [11]. PUREST COLLOIDS, INC. Disponível em: <http://www.purestcolloids.com/mesosilver.htm>. Acesso em Novembro 2007.
- [12]. E. FALCÃO FILHO. “Propriedades não lineares de compósitos e vidros especiais”. *Teses de Doutorado*. Departamento de Física. 2006.
- [13]. H. C. VAN DE HULST. *Light Scattering by Small Particles*. John Wiley & Sons, New York, 1957.
- [14]. EL-SAYED M.A. “Some interesting properties of metal confined in time and nanometer space of different shapes”. *Accounts of Chemical Research*, Vol 34, pp. 257-264. 2001.
- [15]. JOHNSON. P, CHRISTY R. “Optical Constants of the Noble Metals”. *Physical Review B*. Vol 12, No 12, pp. 4370- 4379. 1972.
- [16]. HUANG. W, LUE. J. “Quantum size effect on the optical properties of small metallic particles”. *Physical Review B*, Vol 49, No 24, pp. 17279-17285. 1994.
- [17]. HACHE. F, RICARD. D, FLYTZANIS. C. “Optical nonlinearities of small metal particles: surface-mediated resonance and quantum size effects”. *Journal Optical Society of America B*, Vol 3, No 12, pp. 1647-1655. 1996.

- [18]. GANEEV. R, BABA. M, RYASNYANSKY. A, SUZUKI. KURODA H. “Characterization of optical and nonlinear silver nanoparticles prepared by laser various liquids”. *Optics Communications*, Vol 240, pp. 437–448. 2004.
- [19]. RICARD. D, ROUSSIGNOL. P, FLYTZANIS. C. “Surface-mediated enhancement of optical phase conjugation in metal colloids”. *Optics Letters*, Vol 10, No 10, pp. 511-513. 1985.
- [20]. OLDENBURG. S, GENICK. C, CLARK. K, SCHULTZ. D. “Base pair mismatch recognition using plasmon resonant particle labels”. *Analytical Biochemistry*, Vol 309, pp. 109-116. 2002.
- [21]. HUANG.W, LUE. J. “Quantum size effect on the optical properties of small metallic particles”. *Physical Review B*, Vol 49, No 24, pp. 17279-17285. 1994.
- [22]. NOVOTNY. L, HECHT. B. “Principles of Nano-Optic”. *Cambridge University Express*. 2006.

CAPITULO 5. DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS POR FLUORESCÊNCIA.

Existem, na natureza, mais de um milhão de espécies conhecidas de fungos [1]. Os fungos podem ser identificados utilizando técnicas de análise morfológica, baseadas em aspectos microscópicos e macroscópicos. Técnicas de bioquímica e de biologia molecular também são exploradas como ferramentas para identificação de fungos [2].

A primeira tentativa de explorar a fluorescência para identificação de fungos na dermatologia foi em 1925 [3]. Verificou-se que regiões do couro cabeludo afetadas por fungos exibem uma fluorescência quando excitados por luz ultravioleta (UV).

Essa excitação com luz UV para identificação de fungos é conhecida como método Wood [3]. A lâmpada de Wood é uma lâmpada fluorescente de mercúrio, cujo espectro de emissão encontra-se limitado entre 320nm e 400nm e com pico em 365nm. A intensidade típica de uma lâmpada de Wood é de alguns mW/cm^2 . A lâmpada de Wood não é só usada na determinação de infecções por fungos ou bactérias como também pode ser usada na detecção de distúrbios na pigmentação da pele, como o vitiligo [4].

Fluorescência é comumente observada em dermatófitos do gênero *Microsporum*. Estudos in vitro mostram que o cromóforo Peridina é a substância química responsável pela fluorescência do *Microsporum canis* e do *Microsporum gypseum* [5, 6]. E ainda, estudos mais recentes mostram que o triptofano está associado à fluorescência de *Malassezia* [7, 8, 9]. Tecidos infetados por tinha (do gênero *Trichophyton*) apresentam fluorescência esverdeada; na presença de *Pitiríase versicolor* (também vulgarmente conhecida como "micose de praia" ou "pano branco") pode-se visualizar uma emissão róseo-dourada. A *Porfíria*, com a lâmpada de Wood, evidencia-se de cor alaranjada. Contudo nem todos os fungos fluorescem. Na tabela 5.1, a fluorescência de alguns fungos é identificada [4, 10].

Tabela 5.1 – Fluorescência de fungos [5,6].

Fungo	Fluorescência
<i>Malassezia furfur</i>	Amarelo
<i>Microsporum canis</i>	Azul esverdeado
<i>Microsporum gypseum</i>	Amarelo escuro
<i>Microsporum audouinii</i>	Amarelo
<i>Microsporum ferrugineum</i>	Verde
<i>Microsporum distortum</i>	Verde
<i>Trichophyton schoenleinii</i>	Azul claro

Métodos que auxiliam um diagnóstico rápido de infecções são de grande importância, visto que um mesmo medicamento não age, eficientemente, sobre todos os fungos [11]. Com tudo, estas caracterizações de acordo com a cor são muito subjetivas e diagnósticos clínicos por fluorescência dependem da experiência do dermatologista. Em regiões geográficas de difícil acesso, nem todos os hospitais oferecem serviços de dermatologia ou possuem pessoal qualificado para este tipo de exame.

Neste capítulo é analisado a autofluorescência de diferentes tipos de fungos, utilizando fontes de luz ultravioleta. Aqui é mostrado que a emissão fluorescente de fungos excitados por LEDs é semelhante a fluorescência obtida com o uso de lâmpadas de Wood. Além disso, é mostrado que uma análise espectroscópica refinada da autofluorescência de fungos pode auxiliar no diagnóstico de diferentes infecções fúngicas.

Por último, com esses resultados, propõe-se um protótipo para caracterização óptica de fungos, que auxiliará dermatologistas ou médicos gerais na identificação de fungos e assim definir seu tratamento clínico.

5.1. CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA DE FUNGOS.

5.1.1. Fontes de excitação.

Para aplicações médicas, luz na região do UV no espectro eletromagnético pode ser obtida através de lâmpadas de mercúrio ou por dispositivos óptico-eletrônicos como o Diodo Emissor de Luz (LED). Além de serem eficientes fontes geradoras de luz, os LEDs são dispositivos compactos e de baixo consumo, características bastante atraentes para inserção em pequenos equipamentos. Luz UV também pode ser obtida através de fontes LASER infravermelho pulsados, explorando a geração de terceiro harmônico [12].

Três diferentes fontes ópticas foram utilizadas para explorar a fluorescência dos fungos no experimento: 5 LEDs UV da Roithner Laser (UVLED365-10) agrupados num diâmetro de aproximadamente 3cm; Lâmpada fluorescente UV (Lâmpada de Wood) de 4W da Toshiba (BLUE FL4BLB); terceiro harmônico do LASER pulsado (nano segundos) Nd:YAG (Continuum /Surelte). O espectro de emissão das diferentes fontes de excitação ultravioleta utilizadas é apresentado na Figura 5.1.

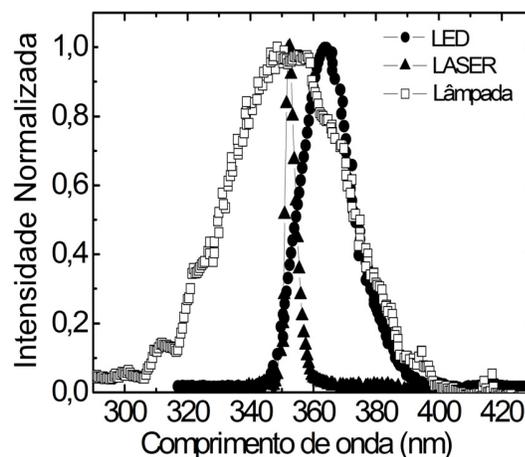


Figura 5.1. Espectro das fontes de excitação. (Lâmpada, LED e LASER).

A largura de banda, $\Delta\lambda$ e o pico de emissão λ_{\max} da lâmpada, do LED e do LASER são mostrados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 – Largura de banda ($\Delta\lambda$) e Pico de emissão (λ_{\max}) das fontes usadas.

Fonte	$\Delta\lambda$	$\Delta\lambda_{\max}$
Lâmpada (TOSHIBA)	18 nm	375 nm
LED UV	19 nm	363 nm
LASER	3 nm	352 nm

5.1.2. Sistema de detecção.

Na Figura 5.2, é mostrada a montagem experimental utilizada nas duas experiências. A intensidade da luz UV na amostra foi de $5\text{mW}/\text{cm}^2$ para todas as fontes usadas. A fluorescência gerada é coletada na direção perpendicular por uma lente de 5cm de distância focal e analisada por um espectrômetro (SPEX – Doublemate) cuja resolução é de 5\AA e uma fotomultiplicadora (1P28 da RCA Eletronic Device). O osciloscópio permite o acompanhamento visual da intensidade da fluorescência, além converter o sinal de corrente (gerado pela fotomultiplicadora) em voltagem para ser processado pelo Lock-In. O Lock-In integra e amplifica o sinal de voltagem, para ser processado no computador.

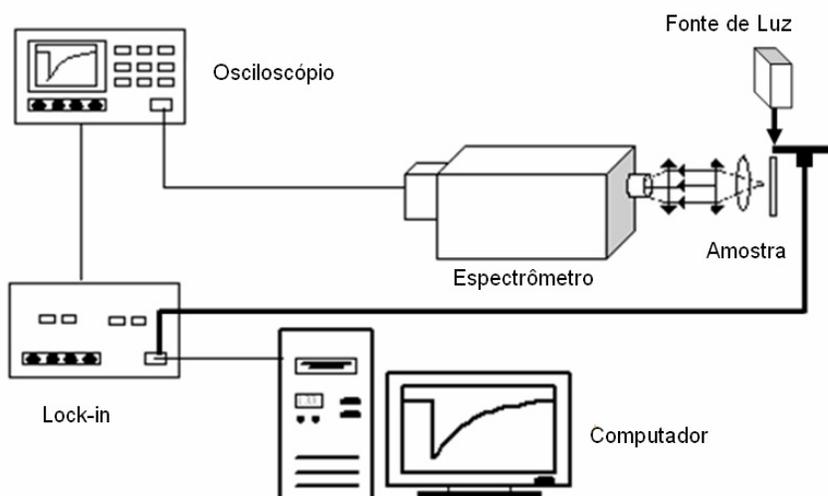


Figura 5.2. Montagem experimental para a medida de fluorescência utilizando três diferentes fontes de luz. Lâmpada UV, LED e LASER Nd:YAG (355nm).

5.1.3. Fungos.

Foram estudadas as espécies de fungos: *Microsporium gypseum*, *Microsporium canis*, *Trichophyton schoenleinii*, *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum* e *Fusarium solemi*. Esses tipos de fungos foram escolhidos por atingir a população do Nordeste do Brasil. Os fungos estudados foram isolados de pacientes atendidos no Laboratório de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco. O meio de cultura utilizado foi o *Sabouraud Dextrose Agar (DAS)*, contendo clorafenicol (0,05mg/L). Depois de isolados e identificados por inspeção visual, os fungos foram mantidos em tubos de ensaio sem antibióticos, com *DAS* e conservados a temperatura de 25°C.

5.1.4. Medida da fluorescência.

Cada conjunto de medidas continha sete amostras, sendo seis fungos e um meio de cultura. A cada sete dias o espectro de fluorescência de cada fungo foi adquirido. Na primeira aquisição dos dados, feita sete dias após a inoculação dos fungos, a maioria dos fungos apresentam uma intensidade de fluorescência capaz de ser detectada. A última aquisição dos espectros de cada conjunto de medidas foi realizada aos 21 dias depois da inoculação, tempo que permite uma melhor detecção e caracterização dos fungos por fluorescência. Em todos os experimentos, todas as amostras foram analisadas com as três fontes ópticas de excitação (LED, lâmpada e LASER). Todas as amostras analisadas fluoresceram.

A Figura 5.3 mostra os espectros de fluorescência dos fungos excitados com a lâmpada de Wood, 21 dias após inoculação. Para uma melhor visualização das características de fluorescência, os espectros estão apresentados em dois grupos de figuras ((a) e (b)). Os espectros obtidos para os fungos *Fusarium solemi*, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton schoenleinii* encontram-se no grupo “(a)” das figuras, enquanto que no grupo “(b)” é apresentado o comportamento espectral da fluorescência para os fungos *Microsporium gypseum*, *Microsporium canis* e *Epidermophyton floccosum*.

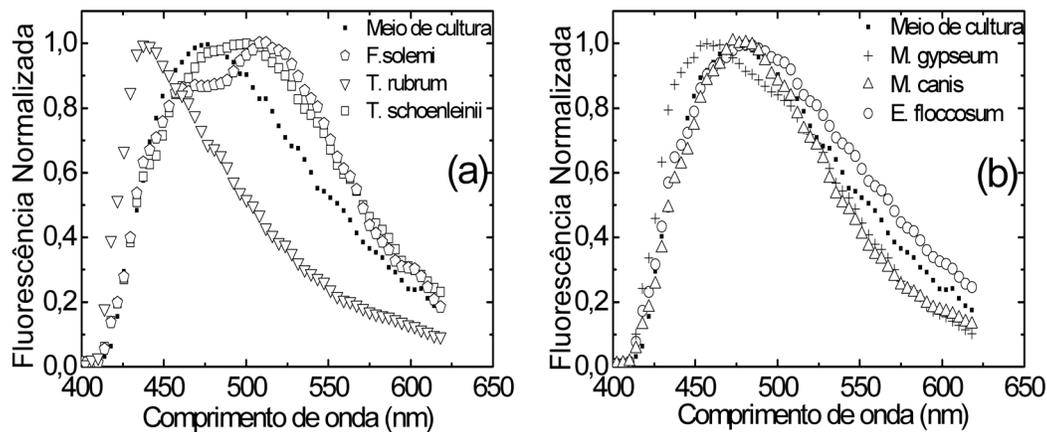


Figura 5.3. Espectros dos fungos excitados com Lâmpada de Wood (21 dias após a inoculação).

Nas Figuras 5.4 e 5.5, são apresentados os espectros de fluorescência dos fungos excitados com LED e com LASER, respectivamente, 21 dias após a inoculação. Os gráficos da fluorescência pela excitação do LED e da lâmpada são similares. Os gráficos das Figuras 5.5 foram normalizados para o comprimento de onda igual a 460nm. É fácil perceber três picos distintos no espectro de emissão dos fungos excitados com LASER. Estes picos estão localizados em 417nm, 460nm e 505nm.

A análise espectroscópica da fluorescência dos fungos mostra que a emissão obtida através da excitação com LED é bastante similar à obtida com a lâmpada de Wood. Com os resultados verifica-se também que os diferentes fungos estudados apresentam espectros de fluorescência bastante semelhantes. As pequenas diferenças espectrais entre as fluorescências dos diversos fungos são difíceis de serem percebidas através de uma inspeção visual.

Na Tabela 5.3, o comprimento de onda que representa o pico (λ_{max}) e a largura de banda ($\Delta\lambda$) das fluorescências foram medidos e listados, mostrando que as diferentes características de cada fungo não mudam utilizando as fontes de luz distintas (LED e Lâmpada). Os resultados de duas análises, obtidas com um intervalo de um mês entre elas, mostram que o λ_{max} e $\Delta\lambda$ podem ser usados na identificação de fungos.

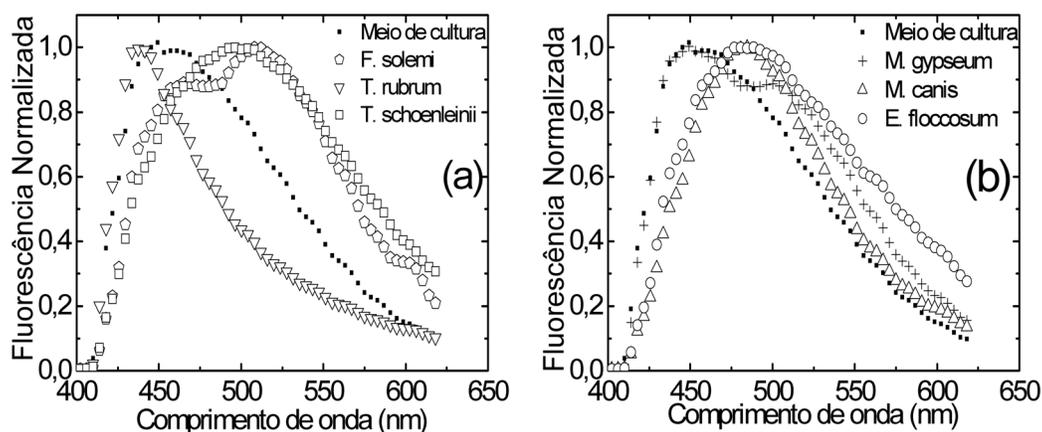


Figura 5.4. Espectros dos fungos excitados com LED UV (21 dias após a inoculação).

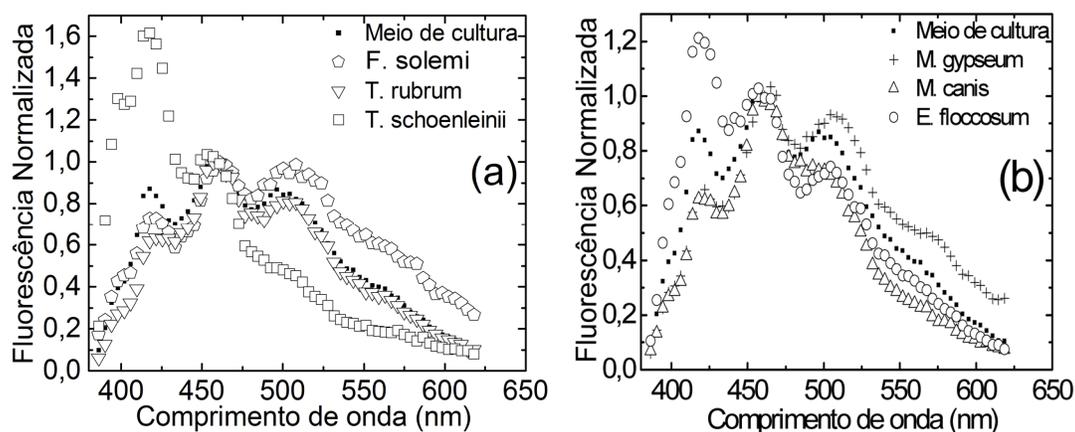


Figura 5.5. Espectros dos fungos excitados com LASER UV (21 dias após a inoculação).

Tabela 5.3 – Características espectrais da fluorescência dos fungos, 21 dias após a inoculação. Os valores do λ_{max} e do $\Delta\lambda$ são mostrados em nanômetros. O erro dos valores do λ_{max} é ± 5 nm. O erro dos valores do $\Delta\lambda$ é ± 7 nm. Amostras: 1) *Trichophyton rubrum*, 2) *Fusarium solemi*, 3) *Trichophyton schoenleinii*, 4) *Microsporium gypseum*, 5) *Microsporium canis*, 6) *Epidermophyton floccosum*, 7) Meio de cultura.

Fungos	1º experimento				2º experimento			
	LED		LAMP		LED		LAMP	
	λ_{max}	$\Delta\lambda$	λ_{max}	$\Delta\lambda$	λ_{max}	$\Delta\lambda$	λ_{max}	$\Delta\lambda$
1	437	72	438	73	440	68	449	75
2	495	150	495	140	479	164	483	150
3	511	141	510	138	511	141	512	143
4	482	143	480	138	-	-	-	-
5	482	108	478	107	485	149	480	116
6	450	135	456	121	446	119	456	126
7	449	108	474	120	455	126	474	123

Por outro lado podem-se explorar, as intensidades relativas dos picos de fluorescência em 510 e 430nm, obtidos na Figura 5.4, para a identificação de fungos. Na Tabela 5.4, os valores da intensidade relativa, definida como $(I_{\lambda_1}-I_{\lambda_2})/(I_{\lambda_1}+I_{\lambda_2})$, são mostrados. Onde I_{λ_1} e I_{λ_2} são as intensidades dos comprimentos de onda em 510nm e 430nm.

Tabela 5.4. Características espectrais da fluorescência dos fungos, 21 dias após a inoculação. (Excitação por LED UV). $I_{\lambda_1}= 510\text{nm}$ e $I_{\lambda_2}= 430\text{nm}$.

Fungos	$(I_{\lambda_1}-I_{\lambda_2})/(I_{\lambda_1}+I_{\lambda_2})$	
	1º experimento	2º experimento
<i>Trichophyton rubrum</i>	- 0,43	- 0,45
<i>Fusarium solemi</i>	0,26	0,25
<i>Trichophyton schoenleinii</i>	0,30	0,35
<i>Microsporium gypseum</i>	0,02	-
<i>Microsporium canis</i>	0,26	0,25
<i>Epidermophyton floccosum</i>	0,39	0,38
<i>Meio de Cultura</i>	- 0,03	- 0,03

A fluorescência induzida pelo LASER UV é bastante peculiar e apresenta três picos na estrutura dos espectros, resultantes de canais específicos de decaimento energético. As intensidades relativas dos picos (417, 460 e 505nm) podem também ser exploradas na identificação de fungos. Na Tabela 5.5, a intensidade relativa, definida como $(I_{\lambda_1}-I_{\lambda_2})/(I_{\lambda_1}+I_{\lambda_2})$, permite distinguir os fungos. Onde I_{λ_1} e I_{λ_2} são as intensidades dos comprimentos de onda 417nm e 505nm, obtidos na Figura 5.5.

Tabela 5.5. Características espectrais da fluorescência dos fungos, 21 dias após a inoculação. (Excitação LASER). Onde I_{λ_1} e I_{λ_2} são as intensidades dos comprimentos de onda 417nm e 505nm

Fungos	$(I_{\lambda_1}-I_{\lambda_2})/(I_{\lambda_1}+I_{\lambda_2})$	
	1º experimento	2º experimento
<i>Trichophyton rubrum</i>	0,55	0,54
<i>Fusarium solemi</i>	- 0,09	- 0,13
<i>Trichophyton schoenleinii</i>	- 0,13	- 0,13
<i>Microsporium gypseum</i>	0,25	-
<i>Microsporium canis</i>	- 0,10	- 0,08
<i>Epidermophyton floccosum</i>	0,28	0,26
Meio de Cultura	0,00	0,00

É importante observar que a fluorescência dos fungos é semelhante (mas não igual) ao espectro do meio de cultura. Observa-se também que as fluorescências de meios de cultura preparados em dias distintos apresentam pequenas diferenças. A fluorescência do meio foi tratada como background na emissão do fungo. A emissão do meio de cultura pode mascarar as características espectroscópicas de alguns fungos. Os fungos *Microsporium canis*, *Microsporium gypseum* e *Fusarium solemi* apresentaram uma baixa intensidade de fluorescência e a determinação de suas características pode ser afetada pela coleção da fluorescência do meio de cultura. Já, os fungos *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton schoenleinii* possuem uma maior intensidade de emissão, onde o *Trichophyton rubrum*, apresenta espectro de fluorescência que mais se diferencia dos outros fungos analisados.

O tempo de decaimento da fluorescência foi medido para todas as amostras excitadas com o LASER pulsado visando explorar o tempo de vida como um segundo parâmetro para a caracterização dos fungos. Contudo, os tempos de decaimento obtidos são menores do que 10 ns, tempo da resolução temporal do sistema de aquisição.

5.2. DISPOSITIVO ÓPTICO PARA DIAGNOSTICO DE FUNGOS.

De acordo com a caracterização da fluorescência dos microorganismos, pode-se projetar um dispositivo óptico para caracterização de fungos. O dispositivo proposto, acompanhado com a inspeção visual do dermatologista, poderá permitir a caracterização das diferentes espécies de fungos e assim auxiliar na determinação do tratamento.

Um dispositivo de baixo custo, como se observa na Figura 5.6, poderia conter os seguintes elementos:

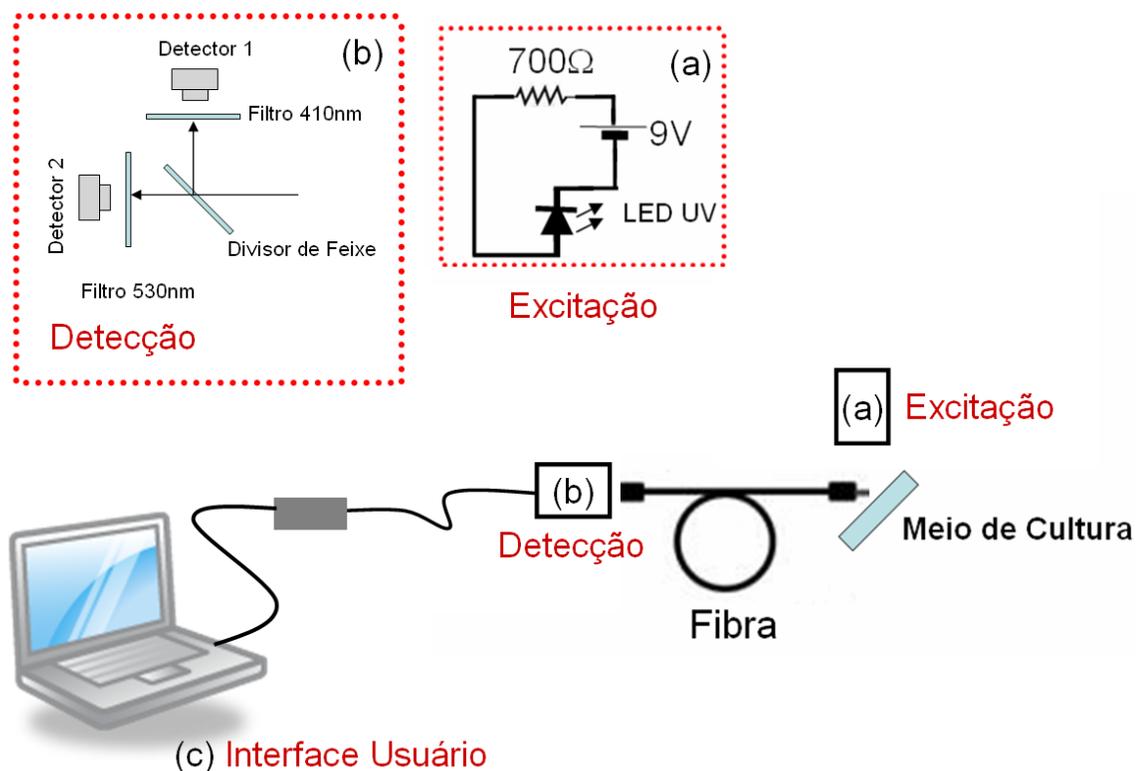


Figura 5.6. Dispositivo para caracterização de fungos. O sistema poderá ser conformado por uma fonte de excitação LED (a), um sistema de detecção que obterá os valores de intensidade de fluorescência em 410 e 530nm (b), e uma interface de processamento e comparação com base de dados e um Display fornecendo ao usuário a identificação do fungo presente (c).

a. Fonte de excitação: LED UV da Roithner LASER (UVLED365-10) [13].

b. Sistema de detecção: De acordo com a Tabela 5.4, do comportamento espectral da fluorescência dos fungos excitados com LED, é possível identificar os microorganismos analisando as diferentes partes do espectro de emissão na região do visível. Nesse caso em 510nm (I_{λ_1}) e em 430nm (I_{λ_2}). Assim, esse sistema deve possuir dois filtros espectrais. Um filtro capaz de selecionar a região dos 430nm, como se observa na Figura 1.9. (Filtro FB430-10) [14], enquanto que um segundo filtro permitirá a transmissão espectral da fluorescência em 510m (Filtro FB510-10) [14]. Esse sistema permitirá obter a relação da fluorescência $(I_{\lambda_1}-I_{\lambda_2})/(I_{\lambda_1}+I_{\lambda_2})$ nos comprimentos de onda em 510nm e 430nm.

O sistema de detecção deve ser composto de fibra óptica (0.22NA UV/VIS) [14] para coleção da fluorescência. Divisor de feixe 50/50 e filtros, capaz de selecionar a região dos 430nm e a região dos 510nm (na Figura 5.7 observa-se o espectro de absorção dos filtros escolhidos FB430-10 e FB450-10). A luz transmitida pelos filtros será detectada por dos detectores ópticos (GaP Fotodiodo, 2.5 MHz, 150-550nm, ver Figura 5.8) [14].

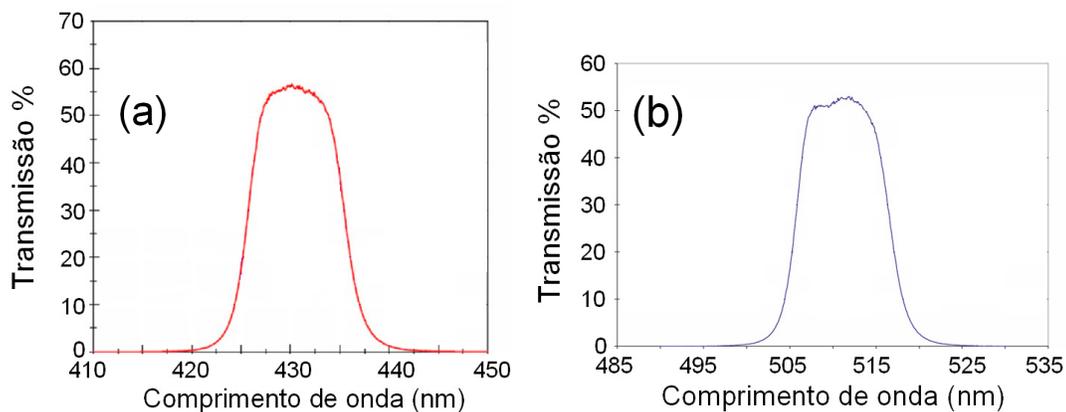


Figura 5.7. Curvas de transmissão do Filtro FB430-10 (a) e Filtro FB510-10 (b) da empresa Thorlabs [14].

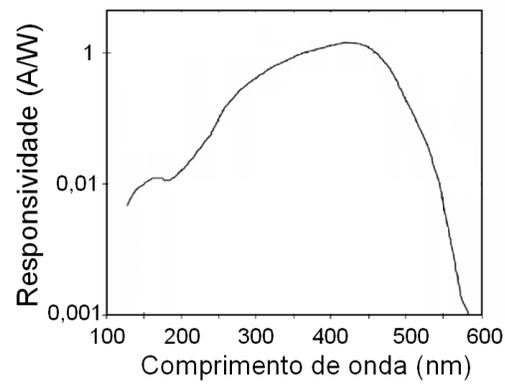


Figura 5.8. Curvas de Responsividade do detector FGAP71 “Thorlabs” [14].

c. Interface Usuário: Os sinais elétricos produzidos pelos fotodetectores poderão ser analisados por um microcontrolador. Os resultados obtidos deverão ser comparados com uma base de dados e apresentados ao usuário através de um “display”.

5.3 CONCLUSÕES.

Foi mostrado que diferentes fontes de luz UV podem ser usadas para induzir autofluorescência de fungos. Como as lâmpadas de Wood, pode-se também explorar LEDs UV na identificação de fungos em diagnósticos clínicos. (No futuro, LEDs estarão mais presentes em aplicações na área médica e biológica). LASERs também podem ser usados na identificação de fungos.

Foi mostrado que algumas das limitações de um diagnóstico por fluorescência (com lâmpada de Wood, por exemplo) podem ser superadas através de análises espectroscópicas refinadas.

Com a análise de fluorescência dos fungos foi possível projetar um dispositivo de custo relativamente baixo que poderá oferecer informações importantes para Dermatologistas. Contudo, é necessário criar uma base de dados mais abrangente para diferentes fungos.

5.4 REFERÊNCIAS.

- [1]. RIPPON, JW. *Medical Mycology: The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes*, 3rd ed. W B Saunders Co, 1988.
- [2]. DE HOOG G.S, GUARRO J., GENE M., FIGUERAS J. *Atlas of Clinical Fungi*, 2nd ed. American Society Microbiology, 2001.
- [3]. MARGAROT J and DEVEZE P. “Aspect de quelques dermatoses lumiere ultraparaviolette”. *Note preliminaire: Bulletin de la Société des sciences médicales et biologiques de Montpellier*. Vol 6, pp. 375-378. 1925.
- [4]. ASAWANONDA P., CHARLES T.R. “Wood's light in dermatology”. *International Journal of Dermatology*, Vol 38, pp. 801-807. 1999.
- [5]. WOLF F. T. “Chemical nature of the fluorescent pigment produced in *Microsporum*-infected hair”. *Nature*, Vol 4591, pp. 180-181. 1957.
- [6]. CHATTAWAY F.W., BARLOW J.E., “Fluorescent substances produced by Dermatophytes”. *Nature*, Vol 4604, pp. 281-282. 1958.
- [7]. MAYSER P., TOWS A., KRAMER H.-J e. WEIB R, “Further characterization of pigment-producing *Malassezia* strains”. *Mycoses*, Vol 47, pp. 34–39. 2004.
- [8]. MAYSER P, SCHAFFER U, KRAMER HJ, IRLINGER B, STEGLICH W., “Pityriacitrin– a ultraviolet-absorbing indole alkaloid from the yeast *Malassezia furfur*”. *Archives of Dermatological Research*, Vol 94, pp. 131– 134. 2002.
- [9]. MAYSER P, WILLE G, IMKAMPE A, THOMA W, ARNOLD N, MONSEES T. “Synthesis of fluorochromes and pigments in *Malassezia furfur* by use of tryptophan as single nitrogen source”. *Mycoses*, Vol 41, pp. 265–267. 1998.

- [10]. MUSTAKALLIO, K., KORHONEN, P., "Monochromatic ultraviolet photography in dermatology," *Journal of Investigative Dermatology*. Vol 47, pp. 351-356. 1966.
- [11]. GHINI R. "Resistência a Fungicidas". Disponível em: <http://www.frac-brasil.org.br/> .. Acesso em Novembro 2007.
- [12]. ROITHNER LASER TECHNIK. Disponível em: http://www.roithner-laser.com/LED_diverse.htm. Acesso em Novembro 2007.
- [13]. EDMUND OPTICS INC. Disponível em: <http://www.edmundoptics.com/onlinecatalog/DisplayProduct.cfm?productid=24561>. Acesso em Novembro 2007.
- [14]. THORLABS INC. Disponível em: http://www.thorlabs.com/Navigation.cfm/Guide_ID=21&visNavID=953. Acesso em Novembro 2007.

CAPÍTULO 6. CONCLUSÕES, RESULTADOS E PERSPECTIVAS.

6.1 Conclusões.

Os resultados desta tese podem ser apreciados a partir de dois pontos de vista:

Desenvolvimento de técnicas ópticas:

- A técnica *TMEZ* foi proposta e desenvolvida. É uma técnica sensível e flexível que caracteriza, simultaneamente, os efeitos não lineares térmicos e não térmicos das amostras. Esta técnica pode-se converter em uma técnica muito útil para grupos de pesquisa que não tem acesso a um LASER de relativa alta potência.
- A técnica de Microscopia multifotônica de campo aberto foi implementada.
- Um sistema de caracterização de fungos “*In-Vitro*” foi desenvolvido. Além disto, foi proposto um novo dispositivo para o diagnóstico de fungos “*In-Vivo*”.

Análise óptica de Biosistemas:

- Foi desenvolvido um estudo das propriedades ópticas lineares e não lineares de sistemas biológicos (fungos e aminoácidos).
- Foram analisadas as modificações das características ópticas de sistemas biológicos com a interação destes com nanopartículas metálicas. O entendimento dos aspectos básicos da interação nanopartículas-Biosistemas é essencial para o desenvolvimento de novas aplicações em nano-Biofotônica
- A emissão fluorescente de diferentes fungos foi verificada e caracterizada.

6.2 Resultados. Artigos completos publicados em periódicos:

RÁTIVA, DIEGO J; GOMES,A.S.L; WACHSMANN-HOGIU,S; FARKAS, D.L; ARAUJO, R.E. “Nonlinear excitation of Tryptophan emission enhanced by silver nanoparticles”. *Journal of Fluorescence*, 2008. (Aceito para publicação).

RÁTIVA, DIEGO J; ARAUJO, R.E. GOMES, A.S.L. “Nonlinear optical properties of nanometric and subnanometric silver particles in aqueous solution”. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2008. (Submetido).

RÁTIVA, DIEGO J; BARBALHO, J. P; FIGUEIREDO, J. M.; GOMES, A. S. L; SOUZA FILHO L.; MARSDEN,A; ARAUJO, R.E. “Perspectives on in vitro fungal diagnosis with UV light”. *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica*. Vol. 23, p.p 25-30, 2007.

RÁTIVA, DIEGO J ; ARAUJO, R. E. ; ARAUJO, C. B. ; GOMES, A. S. L. ; KASSAB, L. R. P. “Femtosecond nonlinear optical properties of lead-germanium oxide amorphous films”. *Applied Physics Letters*, Vol 90, p.p 231906-231910, 2007.

GOMES, A.S.L; E.L. FALCAO FILHO, ARAUJO, C. B., RÁTIVA, DIEGO J; ARAUJO, R. E.; K, SAKAGUCHI; F. P. MEZZAPESA; I.C. CARVALHO; P. G. KAZANSKY. “Third-order nonlinear optical properties of bismuth-borate glasses measured by conventional and thermally managed eclipse Z scan”. *Journal of Applied Physics*, Vol 101, p.p. 033115-033119, 2007.

GOMES, A. S. L.;E.L. FALCAO FILHO;ARAUJO,C.B; RÁTIVA, DIEGO J ; ARAUJO, R. E. “Thermally managed eclipse Z-scan”. *Optics Express*, Vol. 15, p. 1712-1717, 2007.

Trabalhos completos publicados em anais de congressos:

RÁTIVA, DIEGO J; GOMES,A.S.L; WACHSMANN-HOGIU,S; FARKAS, D.L; ARAUJO, R.E. “Silver Nanoparticles in Nonlinear Microscopy”. *International Microwave & Optoelectronics Conference*, Salvador, 2007.

ARAUJO, R. E.; RÁTIVA, DIEGO J; GOMES, A. S. L. “Plasmon-resonance enhancement of nonlinear properties of Amino acids”. *Photonic West 2007*, San Jose. 2007.

GOMES, A. S. L; E.L. FALCAO FILHO; ARAUJO,C.B; RÁTIVA, DIEGO J; ARAUJO, R.E. “Novel high sensitivity thermal managed eclipse Z-scan technique”. *Photonic West 2007*, San Jose. 2007.

RÁTIVA, DIEGO J; BARBALHO, J. P; ARAUJO, R. E; GOMES, A. S. L; MARTINS-FILHO, J. F; SOUZA FILHO, L.G; A. MARSDEN . “In Vitro Fungal identification with UV Light”. *Simpósio Brasileiro de microondas e optoeletrônica*, Momag 2006, Belo Horizonte, 2006.

BARBALHO, J. P; RÁTIVA, DIEGO J; MARTINS-FILHO, J. F; GOMES, A. S. L; A. MARSDEN; SOUZA FILHO L.G.; ARAUJO, R.E. “Diagnostico In Vitro de fungos por Espectroscopia de fluorescência induzida por radiação ultravioleta”. *XX Congresso brasileiro de engenharia biomédica*, 2006, São Pedro, 2006.

Resumos expandidos publicados em anais de congressos:

E.L. FALCAO FILHO; GOMES, A. S. L.; ARAUJO,C.B; RÁTIVA, DIEGO J ; ARAUJO, R. E. “Managing thermal effects in eclipse Z-scan”. *The European Conference on Lasers and Electro-Optics and the International Quantum Electronics Conference (CLEO)*. Munique, 2007.

GOMES, A. S. L; KYOTOKU, B.B; RÁTIVA, DIEGO J; ARAUJO, R.E. “Photonics based diagnostics tools for Life Sciences: from Optical Coherence Tomography to Plasmon Controlled Fluorescence”. *XXX Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada*, São Lourenço, Minas Gerais, 2007.

6.3. Perspectivas.

Foi identificado que o aumento da fluorescência da solução de Triptofano nas proximidades de partículas de prata advém da presença de um nível do plasmon intermediário (da prata) que auxilia a excitação por três fótons em 800nm. Assim, torna-se possível a exploração das partículas de prata como novas ferramentas em microscopia. Futuros trabalhos estarão centrados na utilização da autofluorescência de sistemas biológicos “*in-vitro*” para obtenção de imagens por médio da técnica *WFTP*, explorando e otimizando o aumento da eficiência quântica da autofluorescência pela presença das partículas de prata.

Um espectrômetro USB 4000 será adaptado á base do microscópio NIKON para obter simultaneamente o espectro de fluorescência na região do visível e as imagens multifotônicas das amostras.

A caracterização por fluorescência “*in-vivo*” e a criação de uma base de dados mais abrangente para diferentes fungos, serão futuros passos na otimização e aplicação do dispositivo projetado nessa tese para identificação de fungos.