

UNICAMP

André Alexandre de Thomaz

Plataforma Fotônica Integrada e suas Aplicações em Estudos de Quantum Dots e Processos Biológicos

Campinas
2013



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE FÍSICA “GLEB WATAGHIN”**

André Alexandre de Thomaz

**Plataforma Fotônica Integrada e suas
Aplicações em Estudos de Quantum
Dots e Processos Biológicos**

Orientador: Prof. Dr. Carlos Lenz Cesar

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação do Instituto de Física “Gleb Wataghin”
da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Ciências

Este exemplar corresponde a redação final da tese de doutorado
defendida pelo aluno André Alexandre de Thomaz e orientada
pelo Prof. Dr. Carlos Lenz Cesar

Prof. Dr. Carlos Lenz Cesar

Campinas
2013

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
VALKÍRIA SUCCI VICENTE – CRB8/5398 - BIBLIOTECA DO IFGW
UNICAMP**

T368p	<p>Thomaz, André Alexandre de, 1980- Plataforma fotônica integrada e suas aplicações em estudos de <i>quantum dots</i> e processos biológicos / André Alexandre de Thomaz. -- Campinas, SP : [s.n.], 2013.</p> <p>Orientador: Carlos Lenz Cesar. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Física “Gleb Wataghin”.</p> <p>1. Biofotônica. 2. Microscopia confocal. 3. Microscopia confocal multifóton. 4. Microscopia de geração de segundo harmônico. 5. Microscopia de geração de terceiro harmônico. 6. Pinças óticas. 7. Microscópio multimodal. I. Cesar, Carlos Lenz, 1955- II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Física “Gleb Wataghin”. III. Título.</p>
-------	---

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Integrated photonic platform and applications on quantum dots and biological processes studies

Palavras-chave em inglês:

Biophotonic

Confocal microscopy

Multiphoton confocal microscopy

Second harmonic generation microscopy

Third harmonic generation microscopy

Optical tweezers

Multimodal microscopy

Área de Concentração: Física

Titulação: Doutor em Ciências

Banca Examinadora:

Carlos Lenz Cesar [Orientador]

Josué Mendes Filho

Ana Maria de Paula

José Antonio Roversi

Marco Aurélio Pinheiro Lima

Data da Defesa: 27-03-2013

Programa de Pós-Graduação em: Física



MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE DOUTORADO DE ANDRÉ ALEXANDRE DE THOMAZ – R.A. 001337 APRESENTADA E APROVADA AO INSTITUTO DE FÍSICA "GLEB WATAGHIN", DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, EM 27 / 03 / 2013.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. Carlos Lenz Cesar
Orientador do Candidato - DEQ/IFGW/UNICAMP

Prof. Dr. Josué Mendes Filho – DF/UFCE

Profa. Dra. Ana Maria de Paula – DF/UFMG

Prof. Dr. José Antonio Roversi – DEQ/IFGW/UNICAMP

Prof. Dr. Marco Aurélio Pinheiro Lima – DEQ/IFGW/UNICAMP

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que ajudarem durante esse ciclo da minha vida, esperando não cometer a injustiça de esquecer alguém. Se comiti tal injustiça foi por falta de memória e não por falta de gratidão.

Começarei agradecendo ao meu orientador, Prof. Carlos Lenz Cesar, por me dar a oportunidade e confiar no meu trabalho desde a iniciação científica em 2003. Uma década já se passou e continuo sempre aprendendo com ele, e continuarei aprendendo sempre. Agradeço também aos meus companheiros de laboratório Javier, Vitor, Mariana. Todos nós sabemos como é trabalhar num ambiente interdisciplinar e de inovação. Deixo um agradecimento especial a Diogo Burigo Almeida que foi meu parceiro nas medidas dos quantum dots em função da temperatura e também é ele o responsável pela síntese dos quantum dots coloidais de excelente qualidade, sem falar nas discussões sobre resultados com nosso orientador, medidas de pico de absorção, microscopia eletrônica, raios-x e por aí vai. Agradeço ao Prof. Hernandez F. Carvalho e Alexandre Bruni-Cardoso pelos experimentos com próstata de rato. Saindo da Unicamp, extendo meus agradecimentos à Profa. Adriana Fontes da UFPE que sempre foi minha segunda orientadora. Todos os macetes para alinhar uma pinça óptica aprendi com ela, assim como as espectroscopias não lineares. Por falar em pinça óptica, os meus agradecimentos às Profas. Denise Feder e Suzete Gomes da UFF e Cecília Vieira pela realização em conjunto dos experimentos de quimiotaxia. Obrigado ao Prof. Luiz Guimarães Ferreira da USP pelas cedidas e utilizadas nessa tese. Agradeço também o apoio financeiro da FAPESP.

Uma agradecimento especial à meus pais por tudo que me ensinaram, pelo apoio e pelo carinho. Quero finalizar com um agradecimento mais que especial para minha esposa Karina, pelo tempo juntos, pelo apoio, compreensão, carinho e acima de tudo pelo seu amor.

Resumo

A comunidade científica concorda que há grandes chances que a próxima revolução tecnológica virá do controle dos processos biológicos. Grandes mudanças são esperadas, desde como produzimos alimentos até como combatemos as doenças. O controle dos processos biológicos nos permitirá produzir carne sintética para alimentação, produzir biocombustíveis retirando CO₂ da atmosfera, produzir órgãos inteiros para transplante e combater de forma eficiente doenças como câncer, por exemplo. Está claro para o nosso grupo que para se obter esses resultados é necessário entender a biologia na sua unidade mais básica: a célula. A partir do entendimento e domínio das reações químicas que acontecem dentro da célula, e mais especificamente do controle do DNA, é que vamos conseguir atingir essas previsões e revolucionar a maneira como vivemos hoje. Com esse pensamento em mente, o objetivo dessa tese foi desenvolver uma plataforma fotônica integrada para estudos de processos celulares. Nós acreditamos que as ferramentas fotônicas são as ferramentas que preenchem todos os requisitos para os estudos de processos celulares, pois possibilitam o acompanhamento dos processos em tempo real sem causar dano as células. As técnicas presentes são: fluorescência excitada por 1 ou 2 ftons, geração de segundo ou terceiro harmônico, pinças ópticas, imagem por tempo de vida da fluorescência e “fluorescence correlation spectroscopy” (FCS). Nesta tese demonstramos como montar essa plataforma integrada e mostramos sua versatilidade com resultados em várias áreas da biologia e também para o estudo de quantum dots.

Abstract

The scientific community believes there is a great chance that the next technological revolution is coming from the control of biological processes. Great changes are expected, from the way we produce food up to the way we fight diseases. The control of biological processes will allow us to produce synthetic meat as food, to produce biofuels extracting CO₂ directly from the atmosphere, to produce whole synthetic organs for transplant and to fight diseases, like cancer, in more efficient ways. It is clear to our group that in order to obtain these results it is necessary to understand biology from its most basic unity: the cell. Only from understanding and controlling chemical reactions inside a cell, and more specifically from the DNA controlling, it will be possible to achieve these predictions and cause a revolution in the way we live nowadays. Bearing these thoughts in mind, the objective of this thesis was to develop an integrated photonic platform for study of cellular processes. We believe that photonic tools are the only tools that fulfill all the requirements for studies of cellular processes because they are capable to follow processes in real time without any damage to the cells. The techniques integrated are: 1 or 2 photon excited fluorescence, second or third harmonic generation, optical tweezers, fluorescence lifetime imaging and fluorescence correlation spectroscopy. In this thesis we demonstrated how to assemble this integrated platform and we showed its versatility with results from different areas of biology and quantum dots.

Índice

Capítulo 1	Introdução.....	1
Capítulo 2	Sistema Experimental.....	17
2.1	Montagem da plataforma integrada passo a passo	17
2.2	Microscópios Utilizados.....	22
2.2.1	Microscópio Olympus IX-81 FV300	23
2.2.2	Microscópio Zeiss LSM 780 espectral invertido.....	26
2.2.3	Microscópio Zeiss reto LSM 780 espectral	29
2.3	Telescópio.....	30
2.4	Fotomultiplicadoras	33
2.5	Laser Mai Tai	35
2.6	Monocromador + Camera CCD.....	39
2.7	Criostato.....	41
Capítulo 3	Aplicações das Pinças Ópticas.....	42
3.1	Introdução	42
3.2	Princípio de Funcionamento da Pinça Óptica	45
3.3	Força Óptica no modelo da óptica geométrica.....	47
3.4	Calibração da Força Óptica.....	50
3.5	Montagem experimental das pinças ópticas na plataforma multimodal ...	52
3.6	Estudo de Taxias em microorganismos	57
3.7	Planejamento do experimento de Quimiotaxia.....	62
3.8	Resultados de Quimiotaxia	63
Capítulo 4	FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging)	67

4.1	Introdução	67
4.2	Tempo de Vida da Fluorescência.....	68
4.3	Domínio do Tempo x Domínio da Frequência.....	69
4.4	Time-Correlated Single Photon Counting (TCSPC)	72
4.5	PMT Espectral.....	77
4.6	Fontes de laser para TCSPC	78
4.7	Imagens de FLIM	79
Capítulo 5 Quantum Dots		86
5.1	Introdução	86
5.2	Cálculo dos Níveis de Energia	94
5.2.1	Modelo parabólico de partícula em uma caixa:	94
5.2.2	Modelo $\vec{k} \cdot \vec{p}$ de confinamento quântico.....	99
5.2.3	Modelo $\vec{k} \cdot \vec{p}$ para confinamento quântico no formalismo da função envelope	111
5.3	Problemas.....	120
5.4	Método Heurístico	127
5.5	Amostras de QDs.....	135
5.5.1	QDs de CdTe coloidais.....	136
5.5.2	QDs de CdTe em matriz vítrea	137
5.6	Quantum Dots Coloidais x Matriz de Vidro.....	138
5.7	Sistema Experimental	143
5.8	Picos de Emissão.....	145
5.9	Tempo de Vida da Fluorescência.....	149

Capítulo 6	FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy)	156
6.1	Introdução	156
6.2	Função de Autocorrelação	160
6.2.1	Cálculo da Função de Autocorrelação	163
6.3	Raio Hidrodinâmico e Calibração do Raio Lateral	172
6.4	FCS para Medir Propriedades Hidrodinâmicas de QDS	173
6.5	Sistema Experimental	175
6.6	Resultados de FCS em QD	179
6.7	Comparação das medidas dos raios dos QDS	187
Capítulo 7	Aplicações das Plataformas Integradas	191
7.1	Introdução	191
7.2	Aplicação de Pinças Ópticas e Microscopia Confocal	192
7.3	Aplicações de Fluorescência e SHG/THG	194
7.4	Aplicações de FLIM, SHG e THG	210
Capítulo 8	Conclusões e Perspectivas	214
Apêndice 1	Lista de Trabalhos Desenvolvidos Durante o Período da Tese	217

Capítulo 1

Introdução

Iniciei meu trabalho de pesquisas na área de biofotônica, orientado pelo Prof. Lenz, há uma década, em 2003 como estudante de Iniciação Científica, seguido de mestrado e agora, doutorado. Nesse aspecto tenho seguido uma trajetória linear desenvolvendo técnicas e protocolos para integrar as ferramentas fotônicas e aplicá-las a problemas biológicos e físicos. Ainda na iniciação, antes do microscópio confocal de varredura, trabalhei no desenvolvimento de um sistema de varredura da amostra para aquisição de imagens com geração de segundo harmônico [SHG = Second Harmonic Generation] e fluorescência excitada por dois fótons [TPEF = Two Photons Excited Fluorescence] em cristais inorgânicos. Redescobri na prática o que o resto do mundo já sabia, que imagens obtidas por varredura das amostras eram de baixa qualidade e extremamente demoradas, principalmente nos nossos experimentos onde foi necessário “enganar” dois pacotes de software para força-los a trabalhar em conjunto.

O primeiro microscópio confocal do grupo, da Olympus, chegou no início do meu mestrado e representou uma revolução. Embora não fosse um microscópio adaptado para microscopia multifóton, trabalhamos nas modificações necessárias para demonstrar as primeiras imagens de microscopia SHG por varredura laser do Brasil. Nesse período já trabalhava na integração de ferramentas fotônicas em

uma mesma plataforma acoplando nossa pinça óptica home-made no microscópio confocal e extraindo imagens de TPEF, SHG em conjunto com manipulações das pinças ópticas.

O período do doutorado representou uma expansão muito forte de todo o trabalho desenvolvido na iniciação e mestrado. Primeiro em relação as aplicações das técnicas já desenvolvidas no mestrado a problemas de interesse biológico, nas quais atuei como um “orientador” de médicos, biólogos e biomédicos para levar a cabo seus estudos. Em alguns casos, nos quais tanto os desafios instrumentais quanto da metodologia não estabelecida foi necessário assumir controle total do problema. Considerando a tradição do grupo em que estava inserido, com trabalhos em biofotônica e na física do confinamento de quantum dots semicondutores, também assumi o desafio de utilização das técnicas de biofotônica para estudo dos quantum dots coloidais. O grupo iniciou os trabalhos em quantum dots pensando em suas aplicações como chaveadores ópticos para comunicações ópticas. Nesse aspecto quantum dots embebidos em matrizes vítreas era ideal para integração dos dispositivos em sistemas de fibras ópticas. Entretanto, a área de quantum dots coloidais havia evoluído fortemente na década de 1990 para aplicações como marcadores fluorescentes em células e tecidos biológicos. Nesse aspecto ficou claro, portanto, que a física do confinamento dos quantum dots era importante tanto na área de dispositivos optoeletrônicos quanto na área de biofotônica.

Sem jamais perder o sentido de que minha missão era o desenvolvimento de uma plataforma cada vez mais integrada para responder aos grandes desafios da área de ciências da vida, continuei o trabalho de integração da plataforma fotônica. A integração da plataforma com FLIM [Fluorescence Lifetime Imaging] foi realizada ainda no microscópio Olympus quando obtive a primeira imagem de FLIM do Brasil. Toda a microscopia multifóton até 2007 era feita com laser de Ti:safira Tsunami da Spectra Physics cuja operação era demorada e complicada e exigia realinhamentos constantes. Mudar o comprimento de onda era uma operação que podia demorar até uma hora para o laser re-estabilizar. De certa forma era frustrante conseguir a colaboração de um médico ou biólogo que

permanecia horas no laboratório observando nossa luta para obrigar o equipamento a operar à contento. A chegada do laser MaiTai totalmente integrado e controlado por computador abriu os horizontes para as aplicações, pois podíamos agora mudar comprimento de onda em questão de minutos/segundos e concentrar nas aplicações. A integração da técnica de geração de terceiro harmônico [THG = Third Harmonic Generation] ficou a cargo do Vitor Pelegati, um estudante de mestrado recém chegado ao grupo, com quem trabalhamos em estreita colaboração. Esse trabalho rendeu a tese de mestrado do Vitor e aquisição de primeira imagem de THG do Brasil.

Cada vez que obtínhamos sucesso na integração de uma técnica nova seguia-se uma ação “social” de convencimento de médicos e biólogos para utilização da mesma. Isso motivado tanto pela curiosidade de ver a ferramenta respondendo a problemas reais das ciências da vida quanto pelo fato de que uma técnica só se estabelece verdadeiramente quando é utilizada para resolver problemas reais na sua área de atuação. Nessa fase praticamente caçávamos médicos e biólogos interessados na utilização do nosso sistema. Mas como eles não conheciam direito o potencial das técnicas, precisávamos convencê-los de que poderiam extrair informações importantes com nosso equipamento. Mas para isso era necessário pensar junto com eles para descobrir que problemas específicos poderíamos responder. Nesse aspecto essa tese de doutorado mostra o sucesso tanto no desenvolvimento da plataforma quanto do trabalho “social” para o desenvolvimento das aplicações da mesma ao longo do tempo. Aparentemente é necessário entre um a dois anos após o desenvolvimento da metodologia para que os primeiros trabalhos de aplicações apareçam.

O período 2008-2009 marcou uma revolução no desenvolvimento dos trabalhos do grupo quando o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia denominado INFABIC [Instituto Nacional de Fotônica Aplicada à Biologia Celular], submetido pelos institutos de biologia e física da UNICAMP, envolvendo também a medicina e engenharia de alimentos, foi aprovado pelo CNPq. Um projeto multiusuário da FAPESP completou o parque de equipamentos e técnicas ultra modernas nessa área. Com isso recebemos dois microscópios Zeiss, um invertido

e outro reto [upright], com um array de APDs [Avalanche Photo Diode] ultra sensível para detecção simultânea de 34 canais de comprimentos de ondas. Também vieram equipados com 5 detectores NDD [Non Descanned Detectors], alguns de APDs. O acoplamento dos lasers de pulsos ultracurtos ficou muito mais fácil assim como a técnica de FCS [Fluorescence Correlation Spectroscopy]. Novos sistemas de FLIM utilizando detectores ultra sensíveis foram instalados e abriram as possibilidades de aplicações do FLIM até para estudos in vivo. A extração de um feixe confocal para análise em monocromador externo ou detector de FLIM também foi extremamente facilitada e abriu muito as nossas possibilidades de estudos dos Quantum Dots e outros sistemas. No microscópio reto conseguimos acoplar um sistema de criostato que nos permitiu integrar duas técnicas até então consideradas incompatíveis: microscopia e criogenia. O tamanho dos criostatos, pela necessidade de vácuo, impedia a focalização do feixe na distância de trabalho das objetivas padronizadas utilizadas em microscopia. Com esse sistema foi possível fazer microscopia e espectroscopia em baixas temperaturas.

Grande parte desse trabalho será descrito ao longo dessa tese. Paralelamente com todo esse desenvolvimento fomos tomando consciência de que estávamos participando do nascimento de uma nova revolução científico tecnológica na história da humanidade. Essa consciência me deixou orgulhoso de poder colaborar em uma área com potencial para modificar completamente a forma como vivemos nossa vida no século XXI. Claro que essas ondas se devem ao trabalho coletivo de pesquisadores, inovadores, investidores em todo o mundo, e não a qualquer trabalho de um pesquisador individual como o nosso. Quando iniciamos a iniciação científica só se falava na revolução da informação, considerada o paradigma da revolução tecnológica moderna. Entretanto, creio que posso me orgulhar de estar contribuindo muito fortemente na introdução da revolução biofotônica no contexto brasileiro. Obtivemos as primeiras imagens de SHG, de FLIM, THG e CARS [Coherent Antistokes Raman Scattering] do Brasil. Integramos pinças ópticas com microscopia multifóton, FLIM e outras técnicas pela primeira vez, e nosso sistema se tornou a referência para outros grupos no país.

Também nos sentimos recompensados pelo fato de que espalhamos, através de apresentações em congressos e publicação de capítulos de livros^{1,2}, informações sobre as utilidades desses novos métodos junto a comunidade de médicos e biólogos. O workshop oferecido pelo INFABIC com aulas expositivas e experimentos hands on tem sido um fator muito importante na divulgação desses métodos junto a essas comunidades.

Acreditamos que a descrição da estrutura das revoluções científicas tecnológicas será valiosa para os físicos e estudantes de mestrado e doutorado que devem tomar decisões sobre em que área do conhecimento devem atuar. Por isso concluímos que deveríamos incluir uma descrição das mesmas na introdução dessa tese, que se tornará de domínio público no site da biblioteca do Instituto de Física da UNICAMP em pouco tempo.

Estrutura das Revoluções Científico-Tecnológicas:

O conhecimento científico na sociedade moderna é produzido constantemente em várias partes do planeta e em várias áreas de conhecimento simultaneamente. Dessa forma, era de se esperar que revoluções em várias áreas científicas ocorressem concomitantemente. Entretanto, a análise das revoluções tecnológicas que mudaram drasticamente o estilo de vida da humanidade mostra que essas revoluções ocorrem em ondas e apenas uma área por vez [1, 2]. A Figura 1 mostra um esquema das etapas dessa onda de revolução. Vale ressaltar a diferença entre revolução tecnológica e invenções. A noção de invenção descreve os aspectos tecnológicos e científicos de qualquer inovação enquanto a noção de revolução é econômica e social[2]. Esse é um dos motivos porque as revoluções tecnológicas ocorrem em ondas.

¹ C.L. Cesar, A.A. de Thomaz, A. Fontes, and H.F. De Carvalho, "Fluorescência", *Microscopia Óptica: Fundamentos e Aplicações às Ciências Biomédicas*, pp. 39-62, ISBN 978-85-98460-08-6, organizado por Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálisis, publicado por Wanderley de Souza, Rio de Janeiro (2010).

² C.L. Cesar, A.A. de Thomaz, A. Fontes, and W. de Souza, "Microscopias de Óptica Não Linear e Raman", *Microscopia Óptica: Fundamentos e Aplicações às Ciências Biomédicas*, pp. 163-178, ISBN 978-85-98460-08-6, organizado por Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálisis, publicado por Wanderley de Souza, Rio de Janeiro (2010).

As revoluções estão acopladas com o mercado financeiro e a sociedade tem que estar preparadas para recebe-las. Inovações “antes do tempo” ficam esperando sua vez por recursos porque o mercado financeiro dirigiu os recursos da sociedade para a tecnologia “da vez”. Podemos entender melhor esses conceitos analisando a Figura 1. A onda da revolução começa com o desenvolvimento de uma tecnologia de ruptura, cada vez mais advinda da ciência desenvolvida nas universidades. As invenções são feitas. A nova tecnologia é descoberta e seu potencial de aplicação detectado. Nessa etapa ocorre o que é chamado de fase de interrupção. Interrupção é a separação do mercado financeiro da tecnologia antiga. Logo após o período de interrupção vem a fase de frenesi.

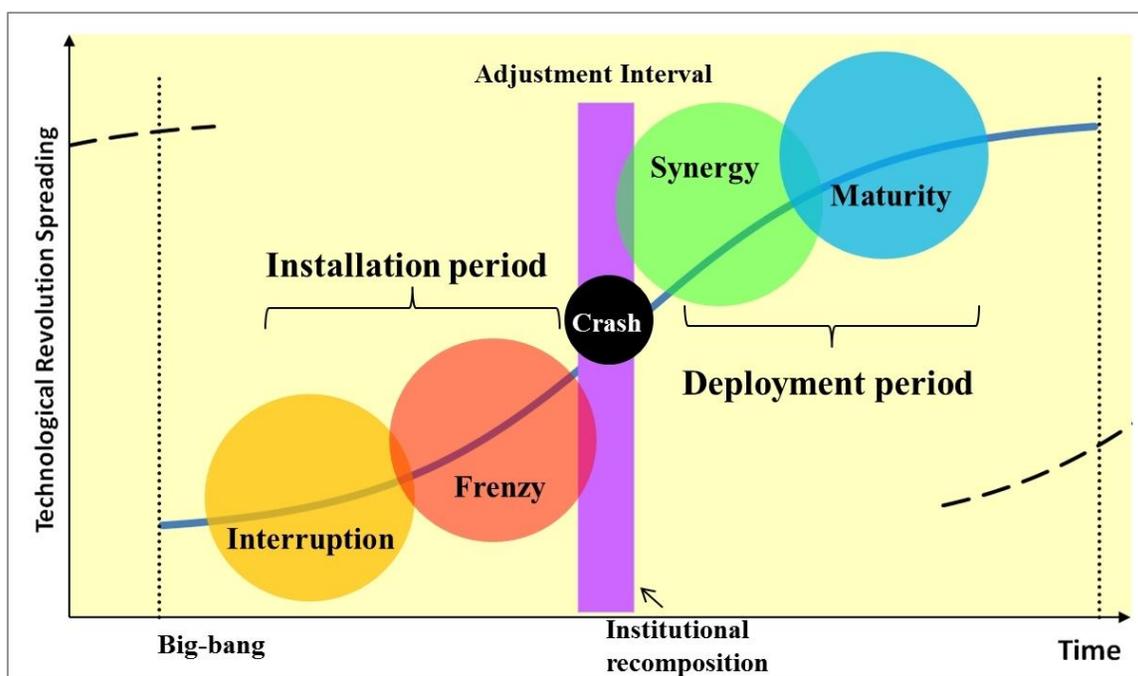


Figura 1 Etapas da revolução tecnológica

Essa fase tem como característica uma alta procura do mercado financeiro para investimentos. Várias companhias são fundadas com o objetivo de lucrar com essa nova tecnologia. Uma seleção natural ocorre ao final desse período. Apenas as companhias que são viáveis continuam existindo. As outras acabam fechando ou partindo para outras áreas. As fases de interrupção e frenesi são conhecidas como período de instalação. Nesse período o alto interesse do mercado financeiro vem do fato de que a oferta da nova tecnologia é muito baixa e a demanda se torna alta elevando o preço dos produtos/serviços. Essa é também uma fase de

altos lucros, totalmente orientada para performance, pois o mercado quer cada vez mais daquela tecnologia sem se preocupar muito com os preços. As empresas competem na base da performance, oferecendo produtos inovadores.

Após o período de instalação vem um intervalo de crise. Essa crise financeira acontece no centro do sistema econômico, e são conhecidas como estouro das bolhas. Existe um super investimento na fase do frenesi que acaba decepcionando os investidores. Um exemplo, foi a chamada bolha das empresas pontocom e de comunicações que levou ao que ficou conhecido como fibras escuras [dark fibers]. Os investidores chegaram a avaliar que o mercado de comunicações por fibras ópticas dobrava a cada três meses, até perceberem que apenas 5% da capacidades das fibras estavam sendo utilizadas. Nessa fase a sociedade procura se adaptar para receber a nova tecnologia e as instituições financeiras e governamentais tentam se reestruturar. Eventualmente, essa crise tipicamente de fundo tecnológico vaza para o mercado imobiliário, como aconteceu no Japão na década de 1990 e nos EUA na crise atual que explodiu em 2008.

Após esse intervalo de adaptação vem a fase de sinergia onde o mercado e a sociedade estão em sintonia com as novas tecnologias para então entrar na fase de maturidade. Essas duas fases são conhecidas como período de difusão/entrega da tecnologia. Esse período determina o fim da onda de revolução e começa a demarcar o início da próxima. Nesse período a tecnologia é difundida amplamente e não há mais tanto interesse do mercado financeiro em investir nessa tecnologia pois a oferta é muito grande fazendo com que a taxa de lucro não seja tão alta. É nesse período que os investidores começam a procurar novas opções para investimento.

O Brasil tem acompanhado essas revoluções sempre atrasado, entrando na fase da maturidade onde os lucros são menores e outros países periféricos também estão competindo. Trata-se da pior época para seguir de perto uma onda tecnológica, onde a disputa é por preços baixos e os países competem com mão de obra barata. Se fosse possível ter uma avaliação preditiva confiável sobre as direções das próximas ondas o país poderia se preparar melhor para a próxima. O

fato de que essas ondas aparecem em ciclos de 60 anos torna essa avaliação mais fácil, entretanto, e se o país fizer a aposta na tecnologia errada precisará esperar uns 40 anos para recomeçar.

Ao todo foram catalogadas cinco ondas de revoluções tecnológicas da era moderna:

1. Revolução Industrial – Inglaterra – 1771
2. Vapor e ferrovias – Inglaterra – 1829
3. Aço e eletricidade – Inglaterra+EUA+Alemanha – 1875
4. Petróleo, carros e produção de massa – EUA – 1908
5. Informação e comunicação – EUA – 1971
6. Próxima revolução??? ~ 2030

O ciclo de cada revolução tem em média 60 anos. A sociedade atual, definitivamente, está no período de difusão da revolução da tecnologia de informação e comunicação. Hoje em dia é difícil imaginar como seria a vida sem computadores, celulares e internet. Desde a produção industrial, passando por agricultura, até a vida pessoal de cada um. As grandes companhias de telecomunicação e informática estão firmemente estabelecidas, já criaram muitas barreiras à entrada, deixando pouco espaço para novas empresas. A taxa de inovações, antes dependente de uma competição feroz para ganhar mercado, agora depende do interesse das empresas oligopolizadas que podem atrasar a introdução de novos produtos para ter tempo de amortizar investimentos passados. Nessa fase o financiamento das empresas já estabelecidas provém de seus próprios lucros e as empresas novas quase não têm espaço no mercado financeiro dado o risco de quebra na competição com as gigantes do setor.

Considerando então que a revolução da informação atingiu a fase da maturidade e que os recursos financeiros mundiais estão liberados para a próxima onda a grande pergunta, nesse contexto, é qual será a próxima revolução tecnológica?

Prospecção para a VI Revolução Científico-Tecnológica

Nossa perspectiva pessoal é que o controle dos processos biológicos, ou biologia sintética, será a base da VI revolução Científico-Tecnológica. Essa também é a perspectiva de muitos analistas e investidores internacionais, passando por Bill Gates, Warren Buffet e George Soros, além de instituições de governos de países avançados. Alguns estudos apontam que essa próxima revolução é esperada para começar em 2015[2] e também aponta que a mesma deve vir do controle dos processos biológicos no seu nível mais básico[2]. Biologia sintética pode mudar completamente a maneira como o homem manufatura produtos e serviços, desde biocombustíveis sustentáveis extraído CO₂ da atmosfera por fotossíntese até biodispositivos especialmente desenvolvidos para trabalhar no nível molecular. Grandes mudanças nas indústrias farmacêuticas são esperadas, especialmente com o advento da bio-nano-tecnologia. Uma procura na internet revela um número considerável de companhias sendo fundadas nessas áreas.

1. Genencor - Palo Alto, California (agora em Rochester, New York) (1982)
2. Codexis - Redwood City, California (2002)
3. Amyris - Emeryville, California (2003) – Amyris Brazil – Campinas
4. Solazyme - South San Francisco (2003)
5. Synthetic Genomics - La Jolla, California (2005) fundada por Craig Venter & prêmio Nobel Hamilton O. Smith
6. LS9 - South San Francisco, California (2005)
7. Gevo - Englewood, Colorado (2005)
8. Mascoma - Lebanon, New Hampshire, (2005)
9. Algenol - Bonita Springs, Florida (2006)
10. Joule Unlimited - Cambridge, Massachusetts (2007)
11. Sapphire Energy San Diego, California (2007) – investidor: Bill Gates
12. Qteros - Marlborough, Massachusetts – investidor: Soros,

Podemos ver que em alguns casos investidores importantes estão sendo atraídos para essa área como Bill Gates e George Soros. Uma técnica bastante promissora é a tecnologia de impressão 3D de órgãos. O pesquisador Anthony Atala do Forest Wake Institute já fez apresentações demonstrando a impressão dos órgãos por impressoras adaptadas, como podemos ver na Figura 2.



Figura 2 Impressão de um rim humano[3]

Em lugar de utilizar jatos de tinta a impressora utiliza jatos de células. Após serem depositadas num arcabouço as células sozinhas começam a criar conexões e formar o órgão. O vídeo completo do processo está http://www.ted.com/talks/anthony_atala_printing_a_human_kidney.html. Outro avanço dessa nova revolução tecnológica é na área de produção de alimentos. A Figura 3 mostra o tamanho da área de pasto pela energia da produção de carne. Com o domínio da biologia não faz sentido esperar a criação de um animal completo para retirar sua carne. É muito menos custoso produzir apenas o que se deseja consumir. Winston Churchill em 1932 já previa esse futuro, suas palavras diziam

“We shall escape the absurdity of growing a whole chicken in order to eat the breast or wing, by growing these parts separately under a suitable medium. Synthetic food will, of course, also be used in the future”³

³ http://rolandanderson.se/Winston_Churchill/Fifty_Years_Hence.php

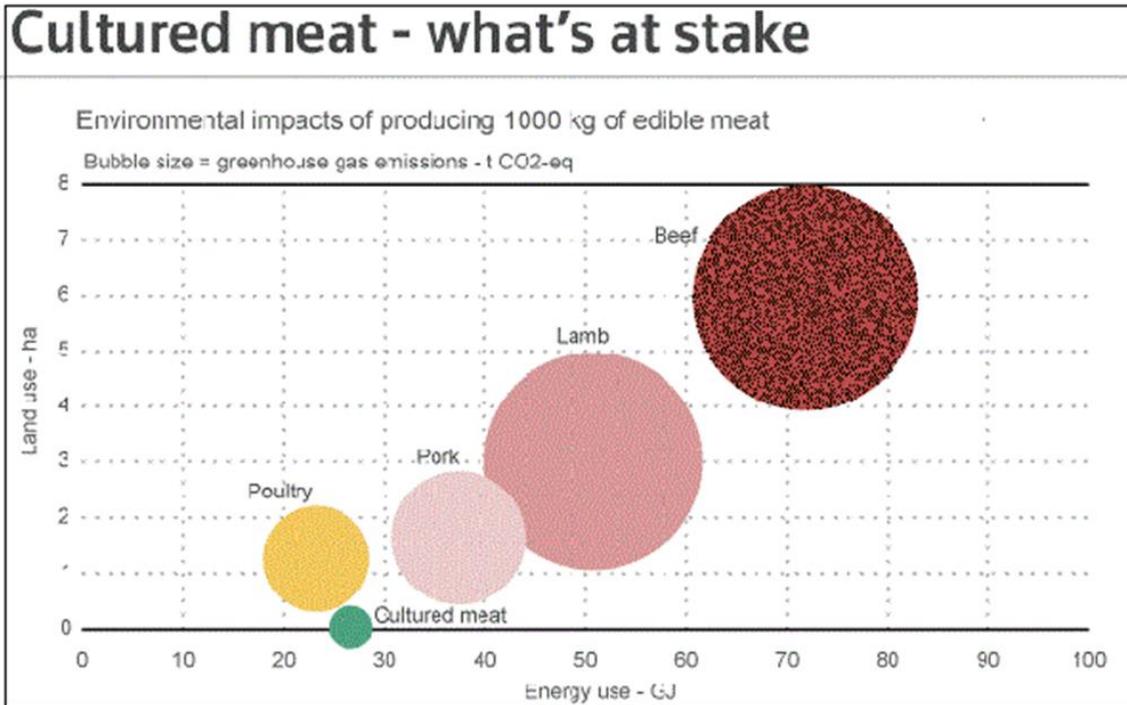


Figura 3 Gráfico de tamanho de pasto por energia para produção de carne[4]

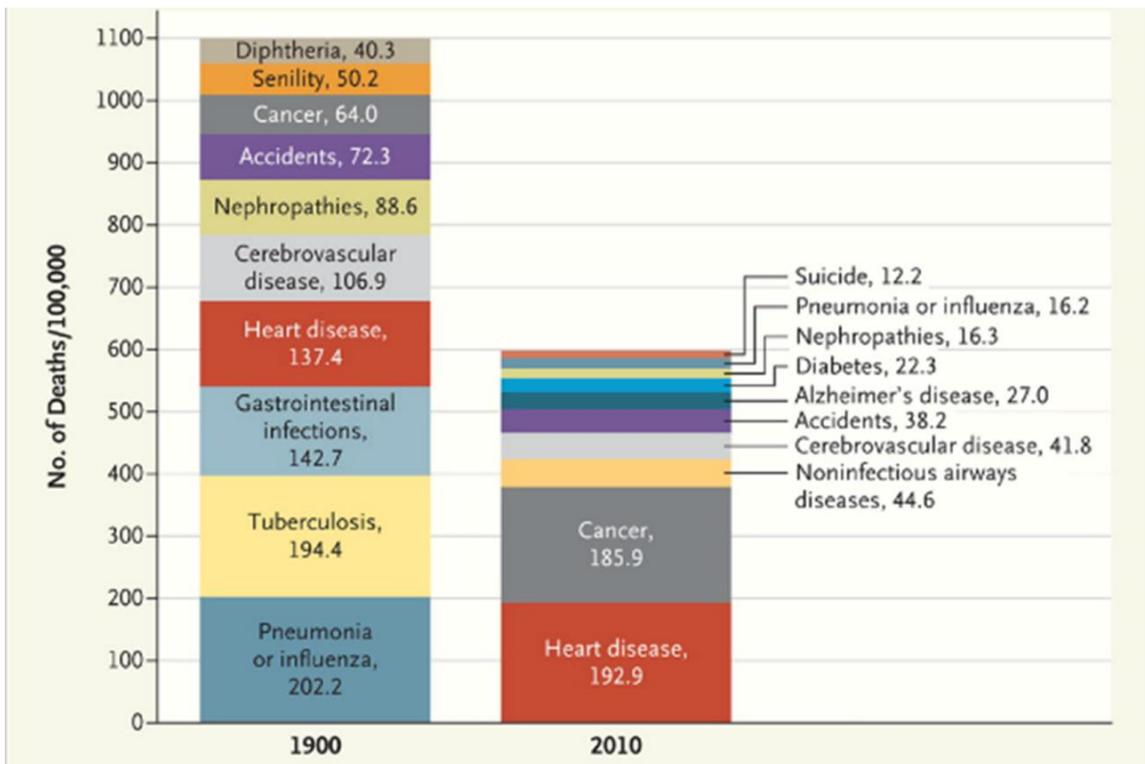


Figura 4 Causas de morte em 1900 e 2010[5]

Outro ponto importante é a própria expectativa de vida do ser humano. A Figura 4 mostra as causas de morte por 100.000 pessoas em 1900 e 2010 para os EUA. Em 1900 claramente as maiores causas de morte são por agentes externos,

principalmente bactérias. Após a humanidade aprender a lidar com esses agentes externos, em 2010, as mortes causadas pelos mesmos são insignificantes perto das doenças cardíacas e câncer. Isso quer dizer que as causas de morte não são mais externas, e sim internas. O mau funcionamento do corpo humano é o maior causador de mortes naturais na atualidade. É claro que o melhor entendimento de como o corpo humano funciona é necessário para mudar esse cenário.

Está claro para nosso grupo que a próxima revolução tecnológica será o controle dos processos biológicos no nível molecular/celular. As reações químicas são intermediadas por um maquinário celular que as tornam muito mais eficientes, mesmo operando em temperatura ambiente. Na escala biológica pode-se pensar em uma célula como uma planta produtora contendo máquinas que operam na escala nanométrica. Dentro da célula, catalizadores, enzimas, superfícies específicas, transporte ativo, etc, atuam para tornar possíveis reações com baixíssima probabilidade de ocorrência espontânea. A evolução garantiu a melhor compatibilidade e padronização dos blocos bioquímicos para permitir a produção das substâncias necessárias à manutenção da vida. Partindo de organismos simples a evolução foi aumentando a complexidade dos mesmos, de forma que os seres vivos que sobreviveram até hoje possuem inteligência acumulada em milhões de anos. Além disso, os seres vivos construíram órgãos específicos para a realização de diferentes tarefas.

Biofotônica na Revolução da Biologia Sintética

A localização espacial, irrelevante para a indústria química convencional, é crucial para os processos biológicos. As perguntas que precisam ser respondidas em relação aos processos biológicos são: o que aconteceu, onde aconteceu e quando aconteceu? Para descobrir o que aconteceu é necessário o uso de ferramentas capazes de distinguir diferentes moléculas. Espectroscopias ópticas, ou de ressonância magnética, são capazes de responder questões sobre que moléculas estão envolvidas em determinados processos. Para saber quando é preciso usar ferramentas de observação que respondem não destrutivamente em

tempo real. Já para descobrir onde é necessário o uso de microscopias e outras técnicas de visualização. O entendimento completo dos fenômenos biológicos requer a observação desde eventos intracelulares, na escala de nm. Em termos das ferramentas utilizadas no estudo dos processos biológicos, portanto, essas condições tendem a eliminar caracterizações destrutivas como, por exemplo, espectrometria de massa ou padrão de difração de raios-x de proteínas cristalizadas. Essas técnicas podem, e devem ser utilizadas, mas não serão capazes de acompanhar os processos em tempo real, nem de fornecer informações espaciais sobre os processos celulares.

Ondas são os únicos fenômenos físicos capazes de propagação à longa distância e que permitem trazer as informações do mundo micro ao macro. A microscopia óptica sofreu uma revolução nas duas últimas décadas incorporando todas as ferramentas de óptica não linear, possibilitadas pelo surgimento de lasers de pulsos ultracurtos comerciais. A óptica apresenta vantagens únicas em termos de resolução espacial, temporal e sensibilidade comparada com as outras técnicas. Entre essas vantagens pode-se apontar:

1. Alta sensibilidade da óptica aliada a baixa interação com matéria em observação que torna a óptica uma técnica não destrutiva. Observação de fluorescência de uma única molécula já tem décadas de idade. O importante para a sensibilidade da óptica é o número de fótons detectados, que aumenta com o tempo de observação. Em torno de 1000 fótons são emitidos em 1 μ s por uma única molécula em um processo de fluorescência típico, com tempo de vida da ordem de 1 ns. Isso permitiria a aquisição de uma imagem de 1 megapixel em 1 segundo. Como cada pixel tende a ter muito mais do que uma única molécula esse tempo de aquisição pode ser bem mais rápido, chegando a velocidade de vídeo [30 quadros por segundo] e até mais do que 100 quadros/segundo. Técnicas não ópticas com sensibilidade de detecção de uma única molécula são extremamente raras. Sinais de fluorescência estão entre os mais intensos, permitindo a aquisição de imagens e informações rapidamente. Entretanto, do ponto de vista espectral a técnica de fluorescência é pobre, pois as bandas de emissão são muito largas para permitir a discriminação entre duas moléculas. A

forma criativa utilizada pelos pesquisadores de ciências da vida tem sido a de marcar com especificidade bioquímica determinadas proteínas e acompanhar sua evolução ao longo do tempo com fluorescência. As proteínas fluorescentes intrínsecas, GFP, RFP, YFP etc, podem ser produzidas pelos próprios seres vivos após incorporação do comando de produção no código genético dos mesmos. Assim, a interferência nos processos biológicos se dá através das substâncias marcadoras e não da observação óptica em si. Além da própria emissão de fótons fluorescentes, o tempo em que esses são emitidos contém informações importantes sobre o ambiente químico em torno da molécula fluorescente. Microscopias baseadas no tempo de vida de fluorescência [FLIM] estão disponíveis comercialmente. Microscopia de Fluorescência, é portanto, uma técnica muito poderosa e deve ser a base de qualquer sistema de observação em tempo real de processos celulares.

2. Ressonâncias com os níveis eletrônicos e vibracionais das moléculas conferem seletividade bioquímica às técnicas ópticas. Para acompanhar reações bioquímicas no espaço e no tempo as espectroscopias, principalmente Raman e suas derivadas, podem ser utilizados como técnicas analíticas. A técnica Raman, mesmo muito menos intensa do que a fluorescência, transporta informações diretas sobre as vibrações moleculares, que dependem das ligações químicas, e tem capacidade de identificar diferentes moléculas. A especificidade bioquímica do Raman é muito superior, portanto, do que a da fluorescência.

3. Fótons também transportam momento e a transferência de momento dos fótons pode ser utilizada para manipulações e medidas de propriedades biomecânicas, utilizando a técnica chamada de Pinças Ópticas. Muitos eventos celulares dependem de propriedades biomecânicas, como adesão a superfícies, invasão, movimentação celular, etc. A magnitude das forças envolvidas na escala intracelular está entre dezenas de femtoNewtons a centenas de picoNewtons, e suas medidas necessitam de ferramentas com alta sensibilidade. As pinças ópticas geram forças mensuráveis [acima do ruído do movimento Browniano] entre 10 fN até 700 pN, o que a torna a ferramenta ideal para medidas biomecânicas no nível celular. Além disso, as Pinças Ópticas atuam remotamente, sem

necessidade de contato. Lasers no ultravioleta ou de alta intensidade também podem ser utilizados para microdissecção com precisão. Dessa forma, Pinças Ópticas podem ser usadas para iniciar e parar um processo, ou modificar o curso de ação do mesmo, ao mesmo tempo em que a microdissecção pode coletar nanoamostras durante o curso do processo para análise posterior por outras técnicas analíticas. Juntas, as duas técnicas permitiriam separar, por exemplo, determinadas regiões onde se suspeita que ocorreu um fenômeno importante, para posterior análise proteômica, ou amplificação por PCR, ou análise por espectrometria de massa, ou espectroscopia RMN, ou para cristalização de proteínas, etc.

4. O fato de que feixes de luz não colidem permite a integração de todas as técnicas ópticas para aquisição de informações em paralelo, ou seja, simultaneamente, em um único instrumento. A dificuldade para a integração óptica eram filtros dicróicos para juntar e separar feixes de diferentes comprimentos de onda. O desenvolvimento das microscopias de óptica não linear, entretanto, estimulou o desenvolvimento desses filtros e o crescimento de empresas que especializadas na produção de dicróicos. Hoje existe uma ampla oferta desses filtros no mercado.

Em resumo as técnicas ópticas modernas fornecem informações quantitativas, quimicamente seletivas, não destrutivas, em tempo real, de eventos localizados no espaço com resolução que pode chegar a 10 nm[6-9], bem próxima do tamanho das proteínas de importância biológica. Mais, as técnicas de microscopia óptica podem ser integradas em um único equipamento permitindo coleta simultânea do máximo de informações no curso do processo celular em observação. Sistema integrado de microscopia óptica e eletrônica de varredura cobriria a escala até 1 nm.

Objetivo e descrição dessa Tese:

Considerando o contexto descrito acima, da revolução da biologia sintética até o papel das microscopias fotônicas para análise de processos celulares, o

objetivo dessa tese foi desenvolver e aplicar uma plataforma fotônica integrada para estudos de processos celulares. Para isso, integraremos em um único microscópio confocal as técnicas de fluorescência (excitada por 1 ou 2 fótons), geração de segundo (SHG) e terceiro (THG) harmônicos, imagem por tempo de vida da fluorescência (FLIM) e fluorescence correlation spectroscopy (FCS). Começaremos descrevendo no Capítulo 2 como realizar essa integração independente do microscópio utilizado e as particularidades de cada microscópio disponível no grupo. No Capítulo 3 apresentaremos aplicações das pinças ópticas na medida de quimiotaxia na interação de parasita-vetor hospedeiro, uma área que precisei assumir diretamente pelas dificuldades técnicas e metodológicas. Depois passaremos para a teoria do FLIM no Capítulo 4. Já no Capítulo 5 trataremos da teoria de quantum dots (QDs) e também das aplicações dessa plataforma para estudo desses nanocristais. Em particular trabalhamos na revisão de resultados anteriores sobre os modelos de confinamento quântico e o papel do stress induzido pela matriz vítrea no confinamento. No Capítulo 6 a descrição teórica da técnica de FCS está presente bem como sua aplicação para a medida do raio hidrodinâmico de QDs. O Capítulo 7 é devotado para a apresentação de aplicações em biologia dessa plataforma fotônica integrada através da descrição dos artigos publicados durante o período da tese. Finalmente, no Capítulo 8 estão as conclusões dessa tese as perspectivas de trabalhos futuros. Nessa tese optamos por usar o ponto ao invés da vírgula como separador decimal devido à utilização de programas com a notação da linguagem inglesa para manter a concordância entre os dados apresentados e digitados durante da tese.

Capítulo 2

Sistema Experimental

Neste capítulo descreveremos os sistemas experimentais utilizados nessa tese. Iniciaremos com a descrição passo a passo das integrações das técnicas fotônicas e depois descreveremos os detalhes particulares de cada microscópio disponível em nosso laboratório.

2.1 Montagem da plataforma integrada passo a passo

Independente da particularidade de cada microscópio, a integração das técnicas confocais em uma única plataforma sempre segue o mesmo princípio. Um feixe de luz não colide com outro feixe de luz, portanto desde que existam portas e filtros disponíveis no microscópio podemos acoplar quantos feixes de laser desejarmos e extrair quantos sinais quisermos também. Começaremos com um microscópio confocal espectral convencional mostrado no esquema da Figura 5. Um feixe de

laser passa por um espelho dicróico, que é transparente para o laser mas reflete os outros comprimentos de onda, e depois é escaneado no plano x-y por dois espelhos montados em galvanômetros controlados pelo computador. A objetiva focaliza o feixe na amostra e coleta o sinal de fluorescência excitado. O sinal percorre o mesmo caminho que o laser, só que no sentido inverso, passando pelos dois espelhos de escaneamento. Isso deixa o feixe do sinal “descanned”, ou seja, parado. O espelho dicróico reflete o sinal e uma lente o focaliza em um pinhole. Uma grade de difração separa o sinal nas componentes de comprimento de onda que chegam a um array de detectores, que podem ser fotomultiplicadoras [PMTs] ou Avalanche Photodiodes [APDs], onde os feixes luminosos são transformados em sinais eletrônicos. O computador armazena as informações da posição do pixel xy com os sinais em cada comprimento de onda e as utiliza para reconstruir uma imagem para cada comprimento de onda. O pinhole está conjugado com o plano focal da objetiva, então apenas o que estiver no foco da objetiva não terá o sinal bloqueado pelo pinhole. Imagens em 3 dimensões [3D] são obtidas repetindo plano a plano após movimentar a objetiva por uma distância definida.

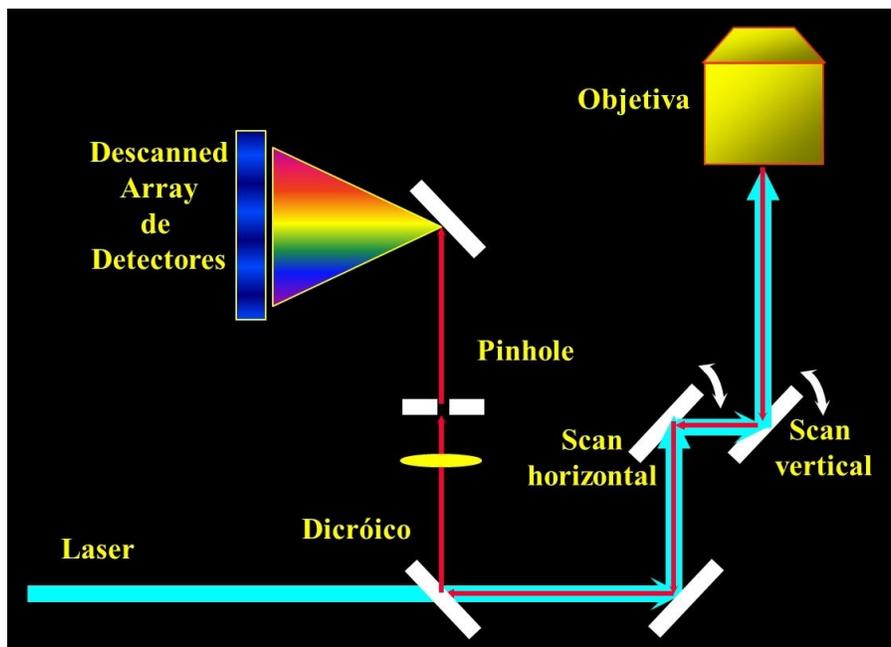


Figura 5 Esquema de um microscópio confocal espectral

A resolução espectral do array de detectores é em torno de 10 nm. Essa resolução é satisfatória para aquisição de imagens mas não é suficiente para resolver a separação de picos Raman, por exemplo. A maioria dos microscópios possuem a possibilidade de extrair o sinal por uma porta externa. No caso do nosso esquema isso é feito removendo a grade de difração para deixar o sinal passar diretamente para a entrada de um monocromador, como mostra a imagem da Figura 6. Dessa maneira o sistema é capaz de adquirir espectros com resolução da ordem de 0.01nm, com todas as vantagens do sistema confocal. Por exemplo, podemos adquirir uma imagem de fluorescência da amostra e em seguida selecionar um ponto nessa imagem e adquirir o espectro. Como o sinal coletado passa pelo pinhole ele é confocal, sendo detectado apenas no plano do ponto de interesse.

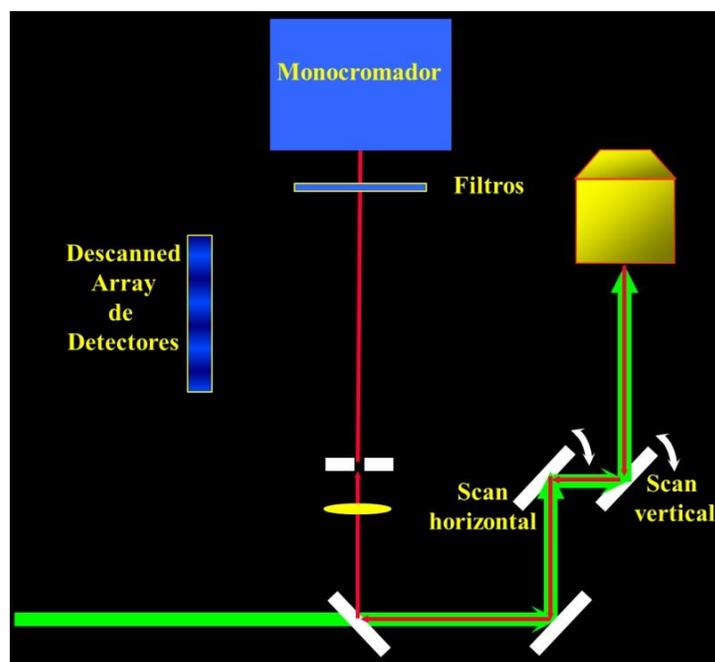


Figura 6 Adicionando um monocromador ao microscópio confocal

Levantando mecanicamente a objetiva criamos espaço para a colocação de mais um espelho após os espelhos de varredura e antes da objetiva. Desse modo tornamos possível a adaptação da pinça óptica ao sistema, como podemos observar no esquema da Figura 7. O espelho da pinça óptica tem que ser transparente para todos os comprimentos de onda exceto para o comprimento de onda do laser da pinça, 1064 nm. Com a pinça óptica o sistema ganha a

habilidade de fazer manipulações e medidas biomecânicas. O espelho da pinça óptica tem de ser colocado depois dos espelhos de varredura porque queremos fazer a imagem de partículas presas na pinça. Se o laser da pinça fosse acoplado antes dos espelhos de varredura ele seria escaneado e as partículas se movimentariam junto com o laser da pinça. Por esse mesmo caminho é possível acoplar um laser de corte, já que ele terá as mesmas restrições que o laser da pinça em relação aos espelhos de varredura.

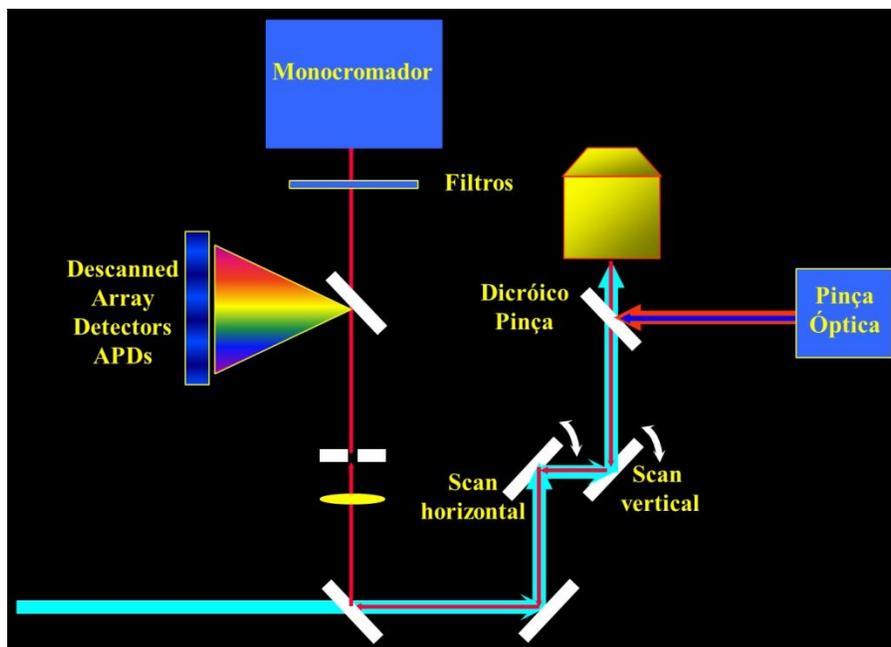


Figura 7 Adaptação da pinça óptica

Utilizando as portas de lasers externos do scanner de varredura podemos integrar um laser pulsado de femtosegundos ao sistema. Assim podemos realizar aquisição de imagens multifóton. É possível adquirir imagens de fluorescência excitada por absorção de dois fótons [TPEF = Two Photon Excited Fluorescence], segundo ou terceiro harmônico [SHG/THG = Second/Third Harmonic Generation]. Como o sinal da microscopia multifóton é excitado apenas no foco do laser ele já é intrinsecamente confocal não precisando do pinhole para eliminar as imagens fora de foco. Detectores “non-descanned” (NDD) são posicionados para coletar o sinal transmitido e o sinal refletido, já que para sinais coerentes a relação sinal transmitido/refletido contém informação relevante. O único cuidado com a detecção NDD é que, porque o feixe se move durante a varredura, o detector deve

ter uma área grande o suficiente para que o feixe coletado não saia da mesma durante a varredura. Filtros em frente aos detectores selecionam os comprimentos de onda desejados, como mostrado na Figura 8. Como o microscópio possui mais de uma porta externa de entrada é possível acoplar outros lasers além do laser de femtosegundos. Lasers de picosegundos oferecem a possibilidade de aquisição de imagens de picos Raman ou por CARS (Coherent Antistokes Raman Scattering).

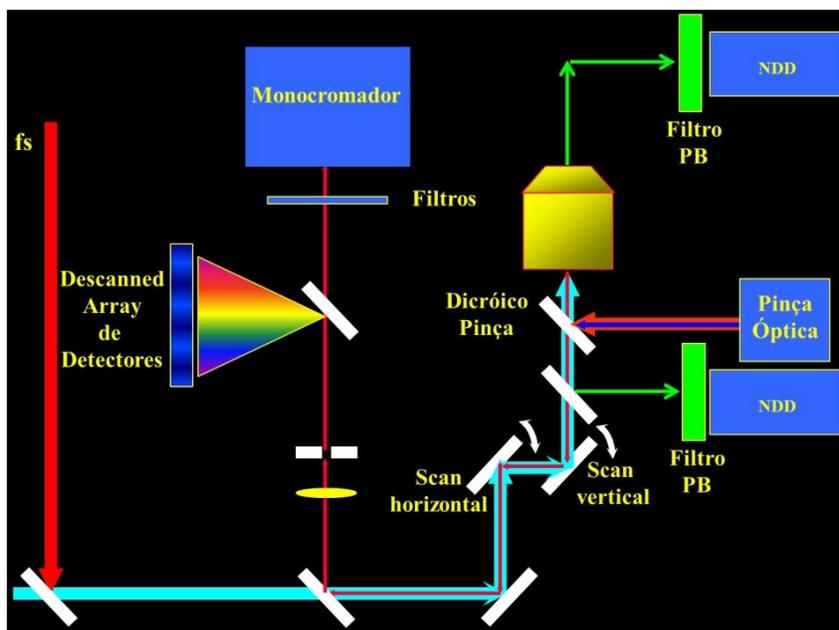


Figura 8 Laser e detectores para microscopias multifóton

Com a presença do laser pulsado utilizamos sua taxa de repetição para adquirir imagens por tempo de vida da fluorescência (FLIM). Assim como na microscopia multifóton, o sinal somente é gerado no foco do laser eliminando a necessidade de pinhole. Podemos utilizar as mesmas saídas dos detectores NDD para acoplar os detectores de FLIM. Um criostato pode ser colocado após a objetiva para realização de medidas em função da temperatura. Essas modificações são mostradas nas Figura 9 e Figura 10 a seguir.

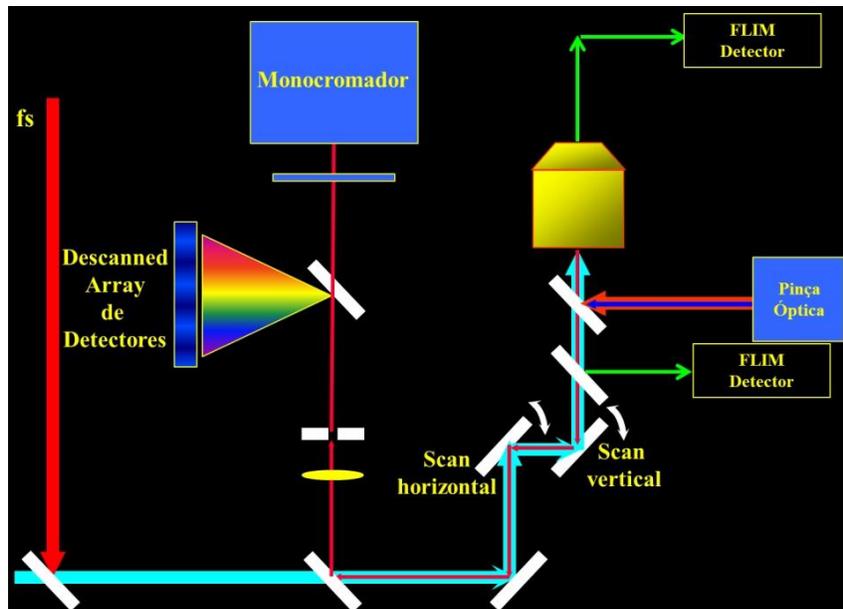


Figura 9 Adição dos detectores de FLIM.

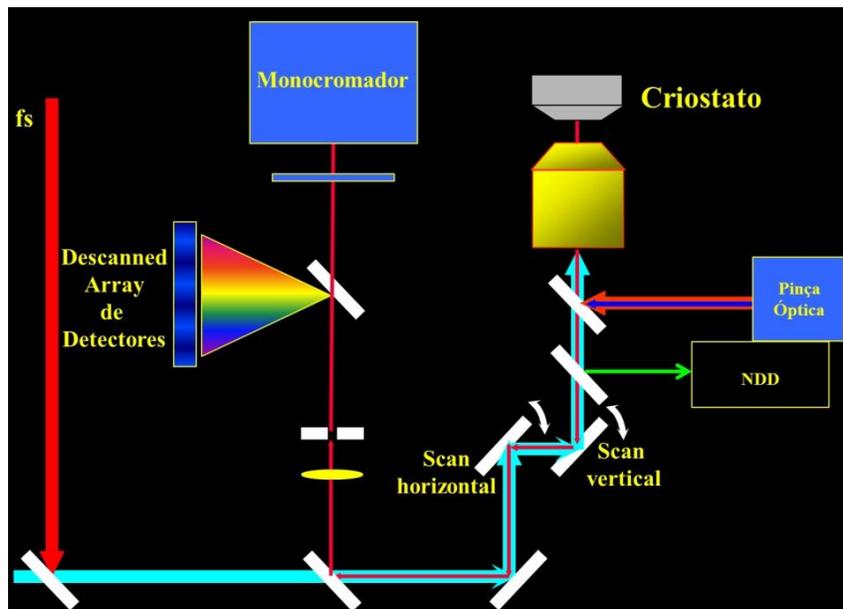


Figura 10 Criostato para medidas em função da temperatura

2.2 Microscópios Utilizados

O grupo de Biofotônica do Instituto de Física da Unicamp juntamente com o INFABIC, Instituto Nacional de Fotônica Aplicada a Biologia celular, possuem atualmente três microscópios disponíveis. Um microscópio confocal Olympus IX-

81 FV300, um microscópio Zeiss LSM 780 espectral reto e um Zeiss LSM 780 espectral invertido. A seguir descreveremos as características de cada sistema.

2.2.1 Microscópio Olympus IX-81 FV300

Esse sistema é composto pelo microscópio invertido IX-81 e pelo scanner de varredura FV300. Está equipado com objetivas Olympus PLANAPO de 10X, 40X e 60X. O FV300 possui uma porta para o acoplamento de lasers no visível e outra para o acoplamento de lasers no infravermelho. Um espelho dicróico (DM1) é responsável pelo acoplamento dos feixes visível-infravermelho direcionando-os para os espelhos galvanômetros de varredura. O DM1 é transparente para o infravermelho mas reflete o visível. Um espelho dicróico (DM2) é responsável por refletir os lasers de excitação e transmitir o sinal visível. Dentro do FV300 uma lente focaliza o sinal através do pinhole nas fotomultiplicadoras após passarem por filtros. Os filtros podem ser escolhidos de modo a separarem fluorescências de diferentes comprimentos de onda ou a fluorescência do SHG. Duas PMTs estão disponíveis para o sinal descanned. O sinal de THG é gerado na região de 300 nm pelo laser Mai Tai. Ele não pode ser detectado no sinal refletido pois os espelhos e lentes presentes nesse caminho absorverão o sinal. O THG é detectado no sinal transmitido. A Figura 11 mostra o esquema do sistema.

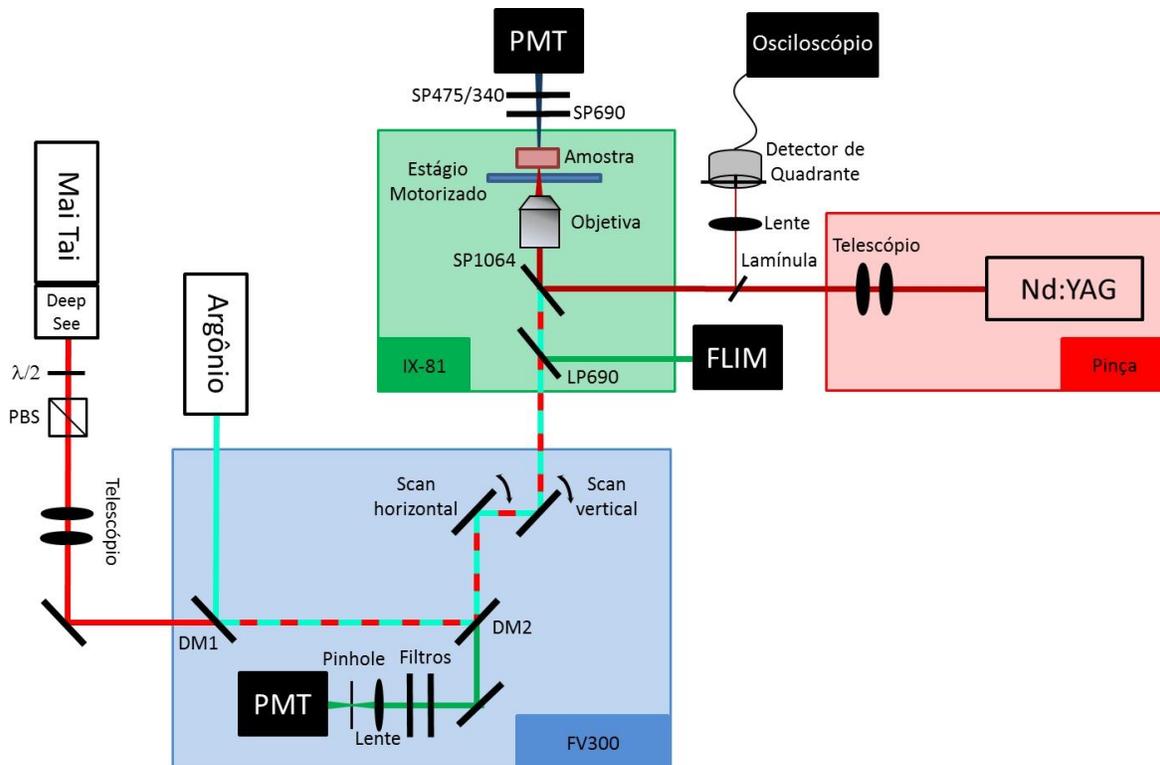


Figura 11 Esquema do microscópio confocal Olympus IX-81 FV300

O sistema oferece 2 PMTs NDD. Uma PMT de transmissão e outra PMT NDD que pode ser posicionada tanto na transmissão do sinal quanto na reflexão. Após a amostra um filtro passa baixa (SP690) é utilizado para rejeitar o sinal do laser de Mai Tai e filtros baixa baixa (SP475 ou SP340) são colocados para filtrar o sinal de SHG ou THG. O sinal de THG requer um cuidado especial para ser detectado. Na primeira montagem do sistema nós utilizamos o próprio condensador e um espelho do microscópio para coletar o sinal. O condensador absorve muito na região de 300 nm, região do sinal do THG. A alternativa foi retirar o condensador e aproximar o quanto fosse possível a PMT NDD da amostra para coletar o sinal, sem o uso de lentes ou espelhos. A PMT necessitava ficar muito próxima da amostra para que o sinal não divergisse muito e ficasse maior que a área de coleta da fotomultiplicadora. Uma peça metálica foi confeccionada para se encaixar no suporte do condensador e acomodar a PMT e os filtros necessários para coletar o sinal. A mesma peça é utilizada para a coleta do sinal de segundo harmônico. A Figura 12 mostra essa peça metálica com a fotomultiplicadora



Um filtro passa alta (LP690) foi colocado antes da objetiva para transmitir o laser de Ti:Safira e refletir a fluorescência no visível para o detector de FLIM. Uma peça especial fornece mais uma saída logo antes da objetiva. Nessa posição colocamos um filtro passa baixa (SP1064) nm para refletir o laser da pinça e transmitir o visível e o infravermelho do Mai Tai. No caminho de retorno da pinça uma lamínula foi colocada para refletir o espalhamento do laser para um detector de quadrante para realização das medidas de força óptica.

Em resumo, esse sistema é capaz de adquirir imagens confocais de fluorescência excitada por um ou dois fótons, segundo ou terceiro harmônico, FLIM, manipulação pela pinça óptica e medidas de força óptica. As técnicas podem ser usadas em conjunto ou separadamente.

As modificações realizadas foram publicadas no periódico (exceto pinça óptica)

V. B. Pelegati, J. F. Adur, A. A. de Thomaz, D. B. Almeida, M. O. Baratti, L.A.L.A. Andrade, F. Bottcher-Luiz and C. L. Cesar, ***“Harmonic Optical Microscopy and Fluorescent Lifetime Imaging platform for multimodal imaging”***, Microsc. Res. Tech. **75** (10), 1383-94 (2012), DOI: 10.1002/jemt.22078

2.2.2 Microscópio Zeiss LSM 780 espectral invertido

O sistema é composto pelo Microscópio Zeiss Axio Observer.Z1 e pelo scanner de varredura 780. Possui objetivas EC Plan-Neofluar 10x/0.30 Dry, EC Plan-Neofluar 20x/0.50 Dry, EC Plan-Neofluar 40x/1.30 Oil DIC, Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC. Quatro detectores NDD para o sinal refletido, dois NDD para o sinal transmitido. O detector espectral é GaAsP com 32 canais com resolução máxima de 2.9 nm descanned. Estão disponíveis também duas PMTs descanned. Os lasers disponíveis são Argônio (458, 488, 514nm), HeNe (543, 593, 633nm) e o Ti:Safira Mai Tai da Spectra-Physics. As imagens da Figura 13 mostram o microscópio e a pinça acoplada.



Figura 13 Esquerda: Microscópio Confocal Zeiss LSM 780. Direita: Pinça Óptica acoplada

A pinça óptica acoplada ao sistema é da empresa suíça MM&I [Molecular Machines & Industries]. Possui dois caminhos independentes de laser que podem gerar até oito pontos de captura cada. Os pontos de captura podem ser manipulados independentemente em todas as direções. Um laser de corte em 350 nm também está presente.

O esquema dos caminhos ópticos é mostrado na Figura 14

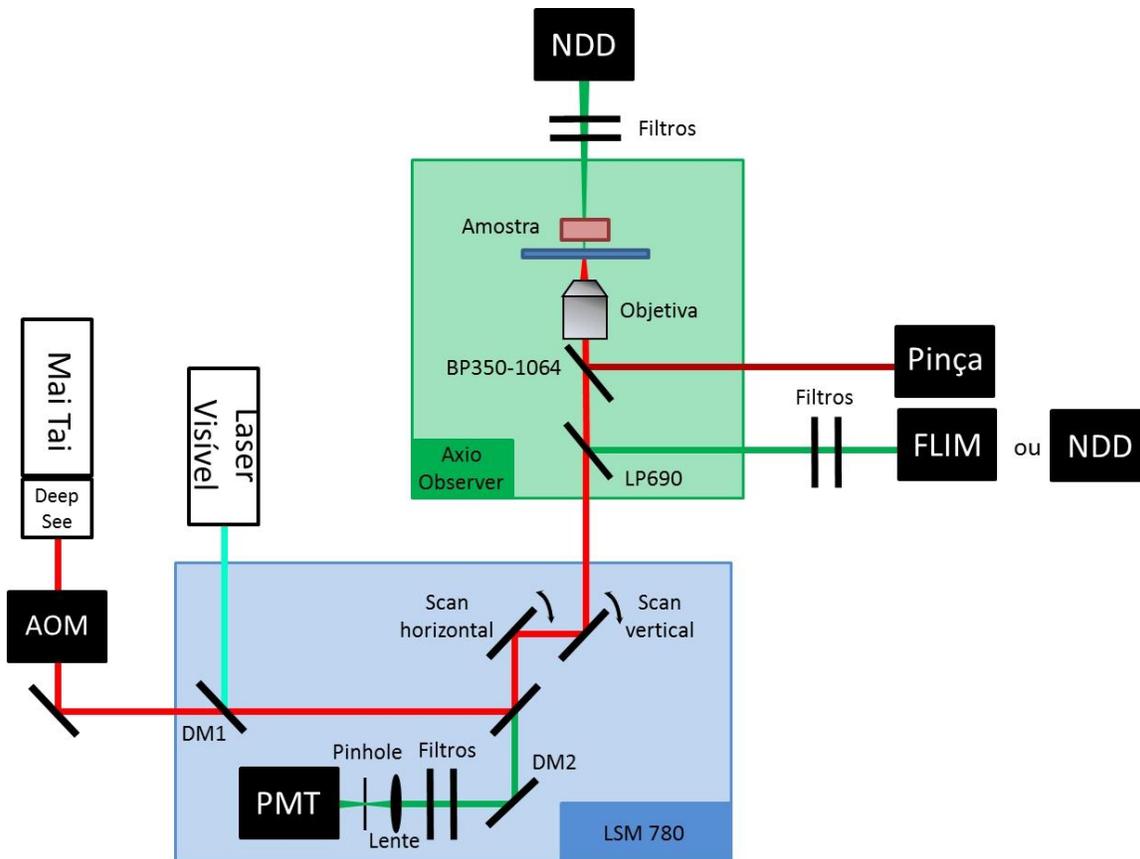


Figura 14 Esquema do microscópio confocal Zeiss LSM-780

Um filtro passa alta (LP690) reflete o sinal visível para o detector de FLIM ou PMT NDD (4 no total) e é transparente para laser Mai Tai. O laser da pinça e o laser de corte são refletidos por um filtro passa banda (BP350-1064). A banda de transmissão é o visível e a reflexão é abaixo de 350 nm e acima de 1064 nm. Na transmissão do sinal temos duas PMTs NDD com espaço para filtros para selecionar o sinal. O sinal de SHG pode ser detectado nos detectores descanned ou NDD. Ou ainda nos NDDs transmitidos e refletidos. A Figura 15 mostra um esquema do scanner 780 com uma descrição detalhada dos seus componentes

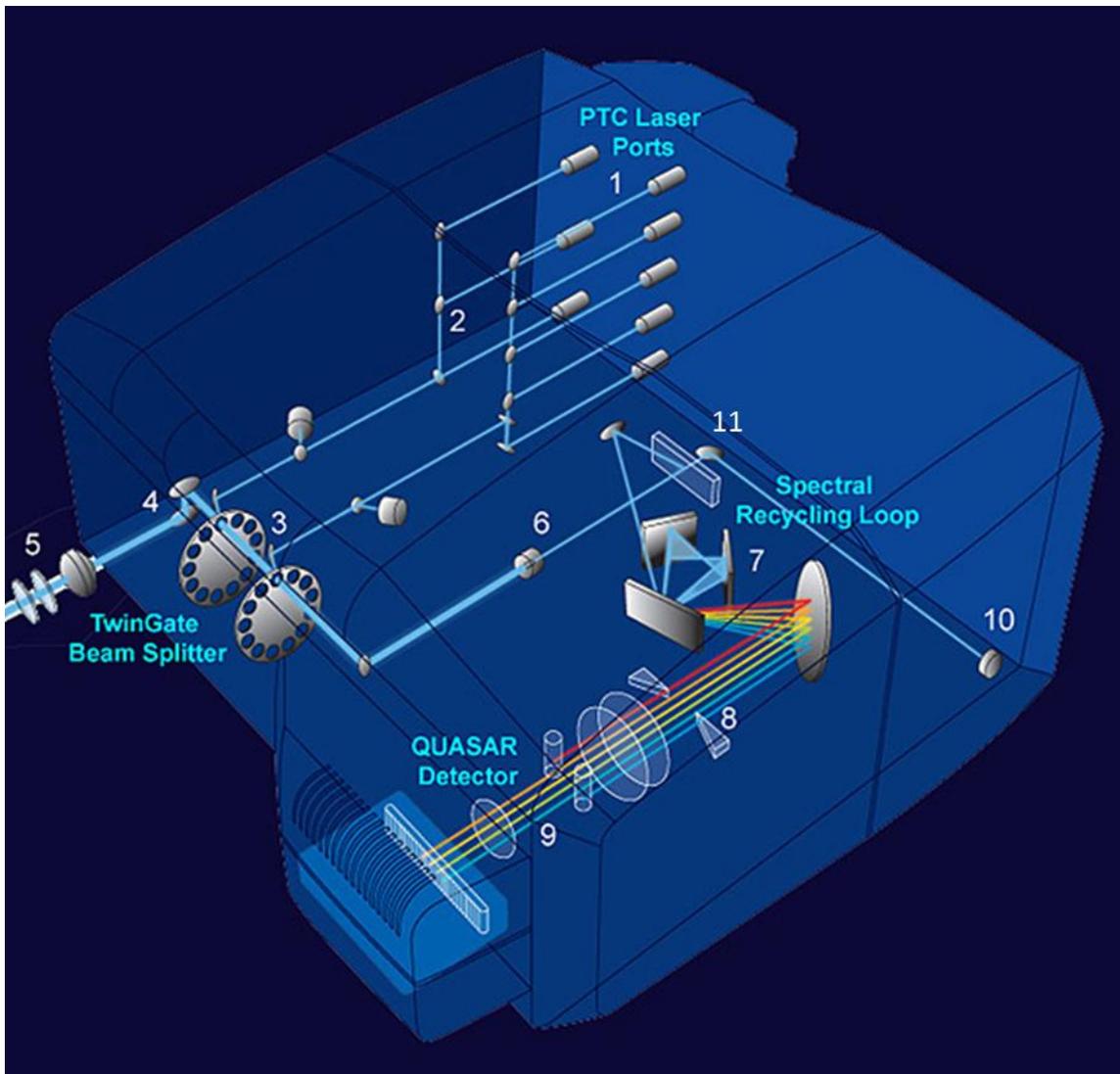


Figura 15 Esquema do LSM 780[10]

A região 1 é por onde os lasers visíveis são acoplados no scanner e a região 2 os lasers de infravermelho e outros, como diodo 405 nm por exemplo. A região 3 mostra o conjunto de espelhos dicróicos que acoplam os dois tipos diferentes de lasers. A ordem em que os lasers são acoplados é importante nesse caso. O dicróico que reflete os lasers visíveis vem antes do dicróico que reflete o infravermelho. Dessa forma o acoplamento de todos os lasers ocorre no dicróico do infravermelho, cuja característica é refletir o infravermelho e ser transparente para o visível. Se ocorresse o contrário, o dicróico do infravermelho vindo antes do visível, o acoplamento final se daria no dicróico do visível que refletiria parte do infravermelho incidente. Esse fato, dependendo das condições do experimento e da eficiência da geração do sinal excitado pelo infravermelho, pode inviabilizar a

excitação por esse laser. O espelhos com número 4 são os espelhos de varredura. Após retornar pelos espelhos de varredura e pelos dicróicos o sinal é focalizado no pinhole, na região número 6. O número 10 indica a posição do espelho ou filtros que escolhemos para direcionar o sinal para os detectores descanned internos ou para a saída externa do scanner. Os números 7, 8 e 9 são a grade de difração e os detectores internos do scanner, o array de APDs e duas PMTs.

2.2.3 Microscópio Zeiss reto LSM 780 espectral

A configuração desse microscópio é bem semelhante ao LSM 780 invertido. As objetivas disponíveis são Plan-Apochromat 10x/0.30 Dry (WD: 2mm), Plan-Apochromat 20x/1.0 Water DIC (WD:1.8mm), Plan-Apochromat 40x/1.0 Water DIC (WD:2.5mm) e C-Apochromat 63x/1.2 Water Korr (WD:0.28mm). A Figura 16 mostra uma foto do microscópio e a adaptação feita para a aquisição de imagens por FLIM.



Figura 16 Esquerda: Microscópio Confocal Zeiss LSM 780. Direita: adaptação para detecção descanned.

Os lasers visíveis são os mesmos exceto pelo laser de diodo 405 nm pulsado. Os pulsos tem 60 ps e as taxas de repetições são 80, 50 e 20 MHz. No caso desse sistema, como a excitação da fluorescência para aquisição de imagens de FLIM é feita por absorção de um fóton, o sinal tem que passar pelo pinhole para se tornar confocal. O laser Mai Tai também foi acoplado ao sistema. A peça feita para adaptar o detector de FLIM também pode ser usada para refletir

o sinal para o monocromador. O esquema do sistema é apresentado na Figura 17. Representamos no esquema apenas as diferenças significativas em relação ao microscópio invertido.

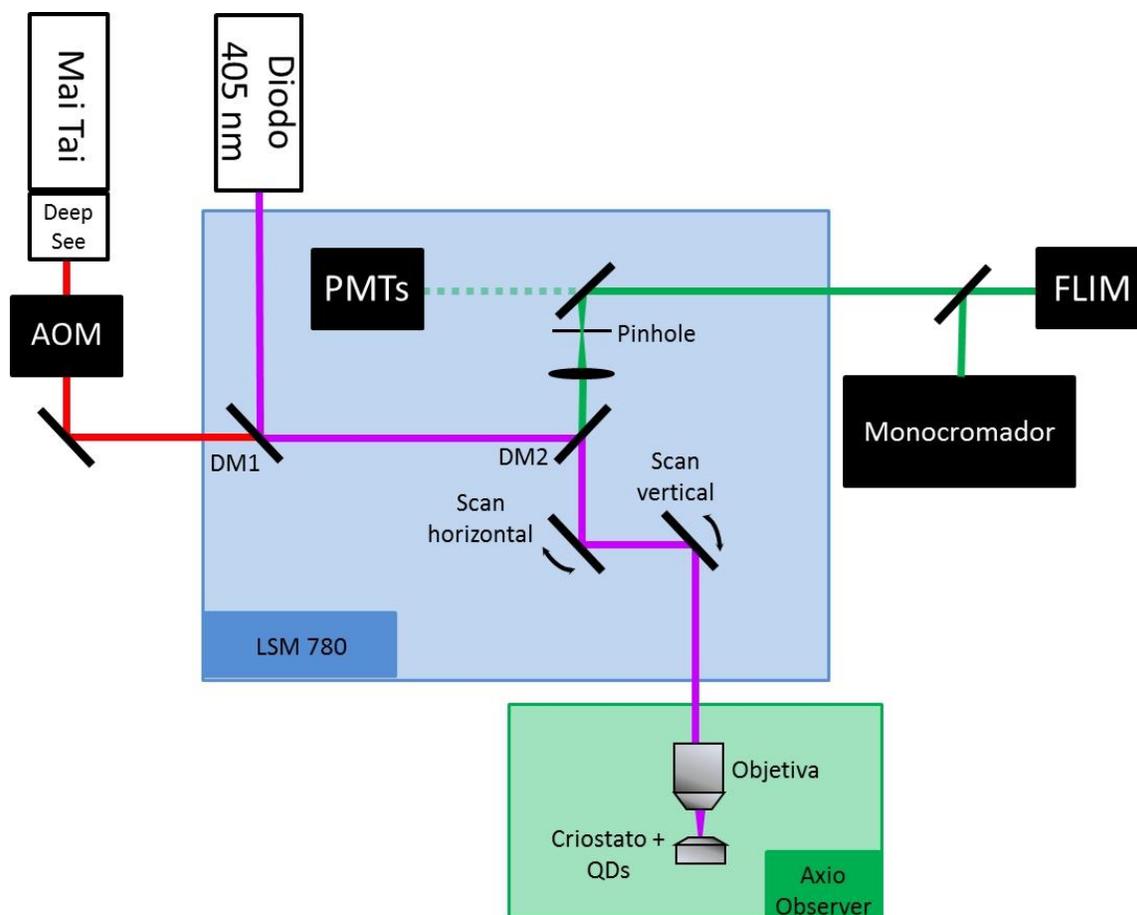


Figura 17 Esquema do microscópio confocal Zeiss LSM-780 direto

Um mesmo dicroico é utilizado para acoplar o laser de 405 nm e o infravermelho. No esquema da Figura 17 podemos observar a presença de um criostato que foi acoplado no lugar da platina do microscópio. Essa adaptação nos permitiu fazer medidas em função da temperatura na região entre 10 K e 300 K.

2.3 Telescópio ou Colimador

As várias técnicas biofotônicas integradas nos sistemas dessa tese utilizam diferentes lasers com diferentes comprimentos de onda para excitação. A

fluorescência excitada por um fóton utiliza lasers no visível, a fluorescência excitada por dois fótons, o SHG, o THG e o FLIM utilizam o laser pulsado no infravermelho. Esses feixes com diferentes comprimentos de onda são focalizados pelas objetivas em planos focais diferentes. Em termos das imagens geradas isso acarretaria em imagens capturadas em vários planos diferentes ou partículas pinçadas em planos diferentes das imagens, se considerarmos a integração pinças ópticas e microscopia confocal. Para contornar esse fenômeno utilizamos uma montagem de duas lentes uma no foco da outra chamada de telescópio. A Figura 18 mostra seu princípio de funcionamento

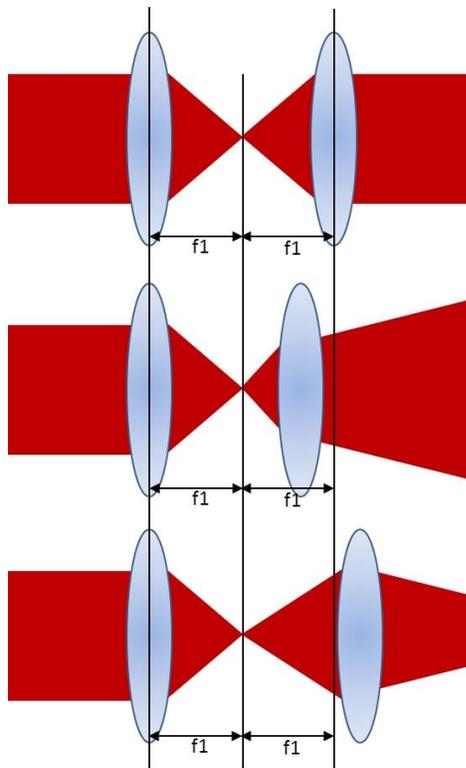


Figura 18 Telescópio com suas possíveis posições de lentes

Primeiro vamos analisar o caso em que as lentes possuem a mesma distância focal f_1 . Se o feixe paralelo atinge a primeira lente ele será focalizado na distância f_1 . Como a segunda lente também tem distância focal f_1 o feixe sairá paralelo quando passar pela mesma. Nenhuma mudança ocorreu. Na situação em que a segunda lente está mais próxima da primeira lente o feixe se torna um pouco divergente. O inverso ocorre quando a segunda lente está mais distante da primeira lente, tornando o feixe um pouco convergente. Essas mudanças serão

transmitidas para o plano focal da objetiva do microscópio. Com isso ganhamos controle da profundidade em z com que o feixe é focado. Um telescópio tem que ser montado para cada laser que possua um comprimento de onda diferente. Um dos lasers é usado como referência e todos os outros tem seus focos ajustados para essa referência.

O caso em que as duas lentes possuem distâncias focais diferentes é importante no caso do preenchimento do orifício da objetiva. Para aproveitar toda sua abertura numérica é necessário preencher totalmente o orifício na parte de trás da objetiva. Geralmente os feixes de laser são menores do que esse orifício. Um telescópio com lentes de diferentes distâncias focais possibilita controlar o tamanho do feixe, como exemplificado na Figura 19

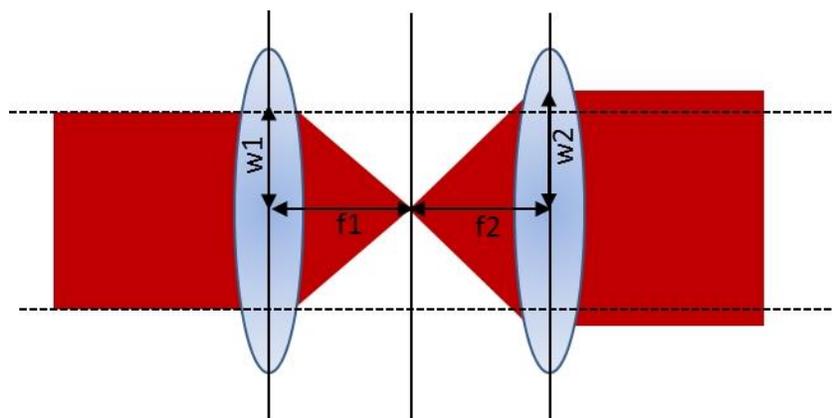


Figura 19 Telescópio com lentes de diferentes tamanhos focais

Um feixe com raio w_1 é focalizado pela primeira lente de distância focal f_1 . Ao deixar a lente com distância focal f_2 o feixe tem raio w_2 . Isso pode ser verificado analisando a semelhança de triângulos da Figura 19

$$\frac{w_1}{f_1} = \frac{w_2}{f_2} \Rightarrow w_2 = \frac{f_2 \times w_1}{f_1} \quad (2.1)$$

No fundo o tamanho do raio de saída é proporcional ao raio de entrada, sendo $w_2 > w_1$ se $f_2 > f_1$ e $w_2 < w_1$ se $f_2 < f_1$.

Em nossas plataformas integradas todos os lasers possuem um telescópio para adequarmos seus planos focais e obter o preenchimento do orifício da objetiva. No caso do sistema da Olympus IX81 FV300 o laser de Argônio é usado

como referência e o laser Mai Tai utiliza o telescópio para ajuste de seu foco. Os sistemas da Zeiss possuem telescópios automáticos localizados dentro do scanner para cada linha de laser, visível e infravermelho.

2.4 Fotomultiplicadoras

PMTs são dispositivos para detecção de luz que transformam fótons detectados em um sinal elétrico. PMTs possuem uma câmara em vácuo onde estão localizados um cátodo, dinodos e um anodo. A Figura 20 mostra um esquema desses dispositivos.

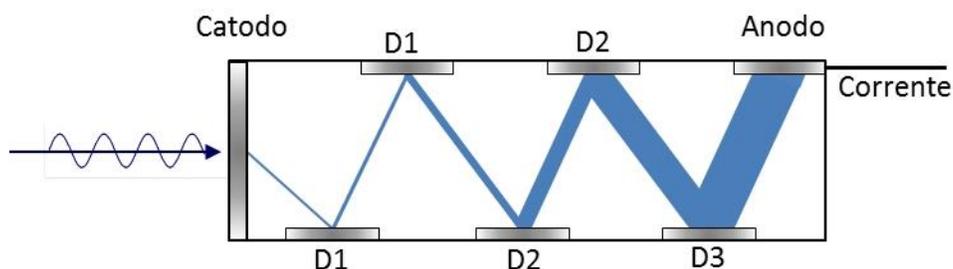


Figura 20 Esquema de uma PMT

Os fótons atingem a placa do cátodo arrancando elétrons, chamados de fotoelétrons. Esses elétrons são acelerados por uma diferença de potencial atingindo o primeiro dinodo (D1) onde arrancam mais elétrons. Novamente são acelerados para o segundo dinodo (D2) onde arrancam mais elétrons e assim sucessivamente até os elétrons atingirem o anodo. O processo em cascata amplifica o sinal inicial gerado por poucos fótons e a intensidade do sinal detectado será proporcional à intensidade da corrente gerada.

Os detectores conhecidos como avalanche photodiodes (APDs) são detectores de semicondutores com mais sensibilidade do que as PMTs convencionais. Os APDs utilizam o efeito fotoelétrico para transformar fótons detectados em corrente. Podemos ver um esquema na Figura 21. Fótons incidentes na camada de SiO_2 criam pares de elétron-buracos que passam pelas camadas n e p primeiramente e depois atingem a região de multiplicação (depletion region). Os pares elétrons-buracos colidem com os átomos do cristal e

a ionização resultante cria mais pares de elétrons-buracos. Esses pares resultantes da ionização por sua vez vão colidir com outros átomos gerando novos pares de elétrons-buracos e assim sucessivamente num efeito de avalanche e uma corrente é gerada proporcional ao número de fótons incidentes.

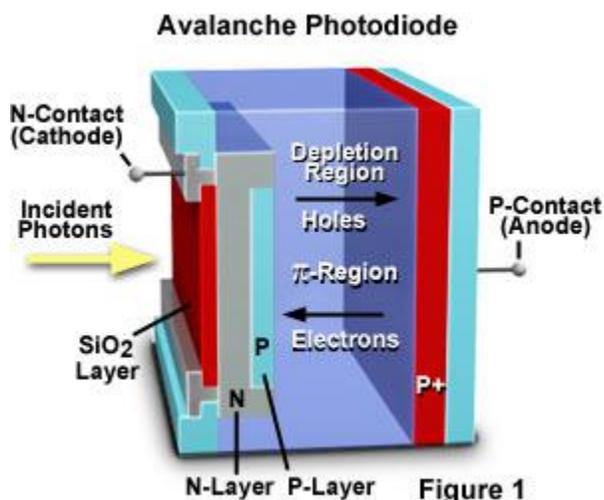


Figura 21 Esquema de um APD[11]

As fotomultiplicadoras mais sensíveis atualmente são as conhecidas como PMTs híbridas. Nas PMTs híbridas os fotoelétrons emitidos por um fotocátodo são acelerados por um campo elétrico intenso diretamente num APD, como mostra o esquema da Figura 28

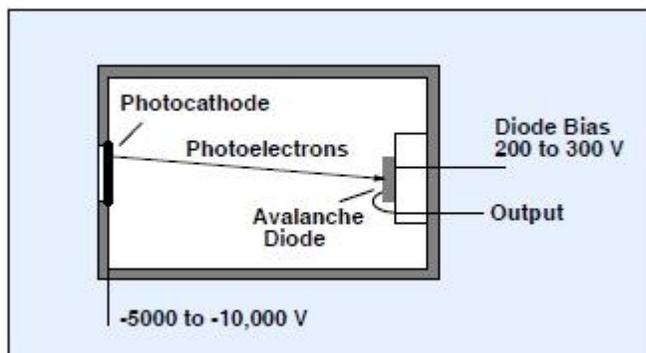


Figura 22 Princípio de funcionamento da PMT híbrida[12]

Os fotoelétrons acelerados atingem o APD e geram uma quantidade grande de pares de elétrons-buracos. Esses pares são amplificados pelo ganho linear do APD. Em PMTs convencionais os fotoelétrons são emitidos em todas as direções, tornando a eficiência do processo baixa. Os melhores cátodos têm uma eficiência quântica de 0.4 entre 400 e 500 nm [13]. Em um fotodiodo os pares de elétrons-

buracos gerados são separados por um campo elétrico e uma corrente é gerada. Como o processo de amplificação ocorre em uma só etapa ele é muito mais eficiente do que o processo nas PMTs convencionais. Eficiência quântica de 0.8 pode ser atingida nesse processo. A alta aceleração imposta aos elétrons entre o fotocatodo e o APD diminui o tempo de trânsito dos elétrons. Com uma voltagem de aceleração de 8 kV o tempo de trânsito dos elétrons é de apenas 50 ps[14, 15].

As função de resposta do instrumento (IRF) e a eficiência quântica para uma PMT híbrida HPM-100-40 (Becker&Hickl) é mostrada na Figura 23 a seguir.

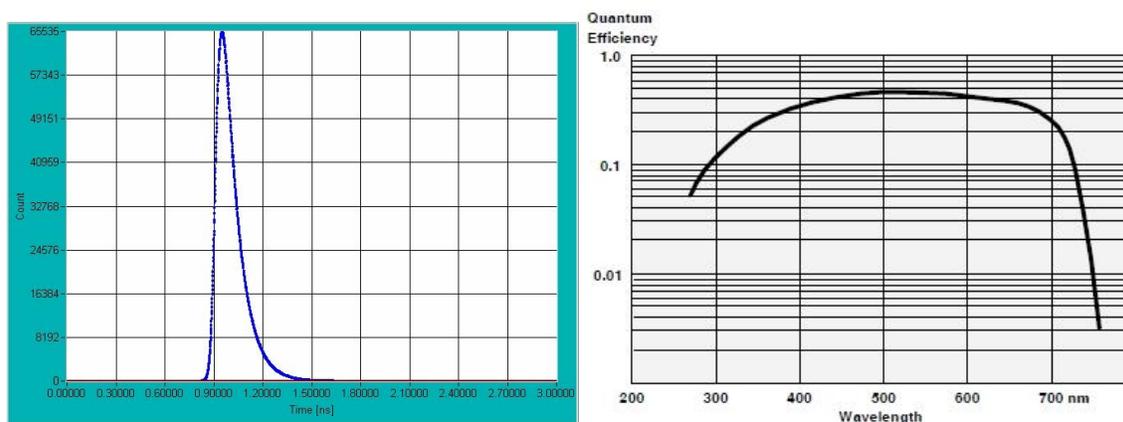


Figura 23 Esquerda: Resposta para pulsos de 40 ps de um laser de diodo. Escala da divisão 300 ps/div[12]. Direita: Eficiência Quântica[12].

Essas são as PMTs utilizadas pelo sistema de FLIM. Imagens por tempo de vida da fluorescência exigem uma fotomultiplicadora sensível a poucos fótons mas com tempo de resposta rápido para não perder resolução temporal. As PMTs híbridas possuem essas duas características.

2.5 Laser Mai Tai

O laser pulsado de femtosegundos utilizados em nossos sistemas é o laser Mai Tai HP da Spectra Physics. Sua emissão pode ser sintonizada entre 690 e 1040 nm com pulsos de aproximadamente 100 femtosegundos e taxa de repetição de 80 MHz. Sua curva de potência está na Figura 24

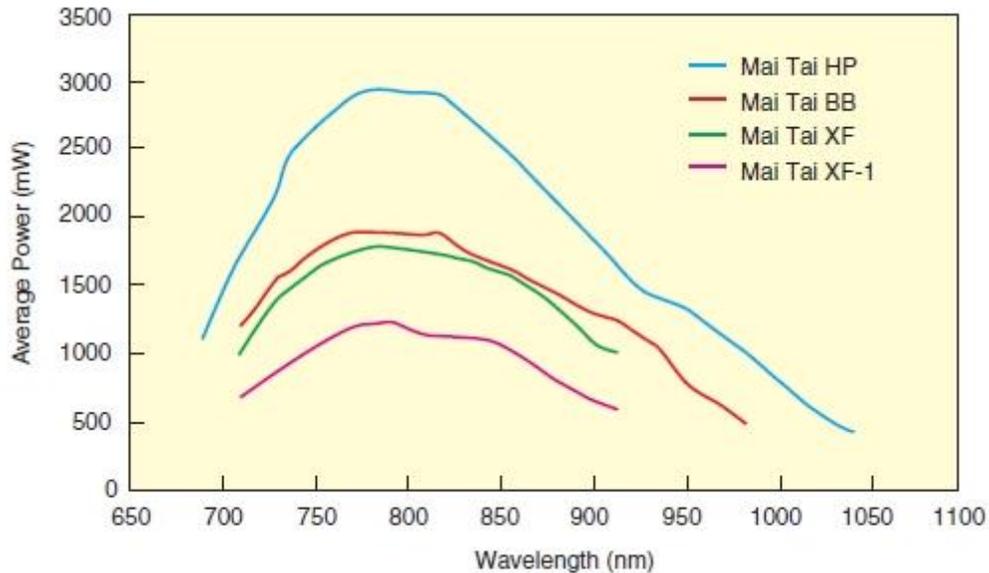


Figura 24 Curva de potências para os modelos de laser Mai Tai[16]

O Mai Tai é um sistema fechado “One Box” automatizado que inclui o laser de bombeio Millennia, um DPSSL [Diode Pumped Solid State Laser], um laser de Ti:Safira e um módulo de correção da dispersão da velocidade de grupo [GVD] chamado Deep See. Uma descrição mais detalhada desse sistema pode ser encontrada na tese de mestrado de Vitor Pelegati[17].

Nas primeiras versões do laser de Ti:Safira sua operação era toda manual. Toda mudança de comprimento de onda necessitava de pequenos ajustes para recuperar o modo pulsado. Para operar em toda faixa de emissão do cristal de Ti:Safira mais de um conjunto de espelhos era necessário. Isso poderia significar algumas horas de trabalho para mudança de uma faixa do espectro de emissão a outra. Para saber o comprimento de onda em que o laser estava emitindo um outro aparelho tinha que ser utilizado, como um monocromador por exemplo. Apesar de ser um laser com bastante opções, o tempo necessário para mudar algum componente da sua configuração poderia ser muito grande. O sistema Mai Tai surgiu para substituir esses lasers antigos e se tornar um laser “user friendly”. Todo os parâmetros do laser são controlados por computador. Desde a escolha do comprimento de onda até ajustes dos espelhos dentro da cavidade. O laser consegue varrer todo o seu espectro de emissão em modo pulsado em apenas alguns minutos, sem necessidade de qualquer ajuste por parte do usuário. O laser

pode ser controlado diretamente pelo programa de operação do microscópio. Esse fato torna a comunicação entre o laser e o microscópio possível sem a necessidade de comunicação entre seus programas proprietários.

Em resumo, o laser Mai Tai foi um grande avanço para a integração das técnicas multifotônicas nos microscópios confocais. A integração já era possível com o laser de Ti:Safira convencional, porém o tempo podia ser uma desvantagem considerável, ainda mais quando estamos interessados em seguir processos celulares.

Controle de potência do laser Mai Tai para Microscópio Olympus IX-81 FV300

A potência não é um parâmetro que pode ser modificado no sistema do Mai Tai. Para controlar a potência que incide na amostra nós utilizamos uma montagem com uma placa de meia onda ($\lambda/2$) e um polarizing beam splitter (PBS). A placa de meia onda é montada em um estágio giratório e sua função é selecionar a direção da polarização do feixe que passa por ela. O PBS transmite a polarização vertical e reflete a polarização horizontal. O feixe do Mai Tai, que tem polarização horizontal, tem sua orientação girada ao passar pela placa de meia onda dependendo do ângulo do estágio de rotação. Ao passar pelo PBS qualquer orientação diferente da horizontal terá parte do feixe refletido diminuindo assim a energia transmitida na polarização horizontal. Para controlar a potência, então, basta girar o estágio de rotação da placa de meia onda.

Controle de potência do laser Mai Tai para Microscópios Zeiss LSM 780

Os sistemas da Zeiss controlam a potência do Mai Tai através de um modulador acusto-óptico (AOM). O AOM é um dispositivo que pode controlar a potência, a frequência ou a posição espacial do feixe de laser a partir de um sinal elétrico. O componente principal de um AOM é um cristal transparente que é acoplado a um transdutor piezoelétrico. O sinal elétrico aplicado no transdutor cria ondas acústicas no cristal que criam uma modulação no seu índice de refração a qual atua como uma grade de difração. Qualquer feixe de luz que passar por esse cristal será submetido a essa modulação do índice de refração tendo seu caminho

alterado. A intensidade da luz difratada depende da intensidade da onda acústica. O tipo de regime da operação do AOM é definido pelo parâmetro Q dado por

$$Q = \frac{2\pi\lambda_0 L}{n\Lambda^2} \quad (2.2)$$

Onde λ_0 é o comprimento de onda da luz incidente, L é a distância que a luz viaja dentro do cristal, n o índice de refração do cristal e Λ o comprimento de onda acústico. Para $Q \ll 1$ temos o regime Raman-Nath, onde o feixe que incide no cristal na direção normal a superfície e várias ordens de difração estão presentes com as intensidades dada pela função de Bessel. A Figura 25 mostra esse caso.

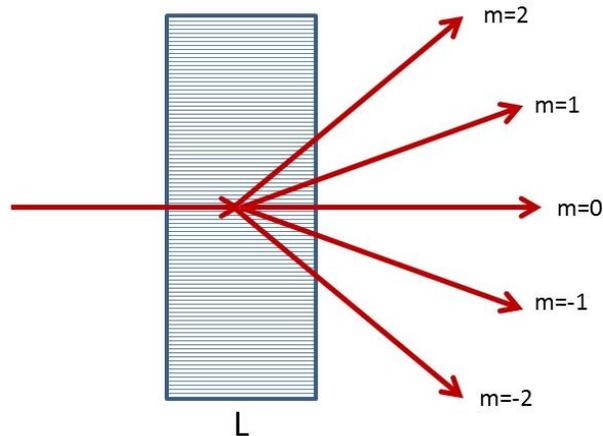


Figura 25 AOM caso $Q \ll 1$

Para $Q \gg 1$ o AOM atua no regime de Bragg. Para um ângulo de incidência do feixe θ_B , apenas uma ordem de difração deixa o cristal, as outras tem intensidade nula por interferência destrutiva, como mostra a Figura 26. A maioria dos AOMs atuam no regime de Bragg, incluindo os AOMs dos nossos sistemas.

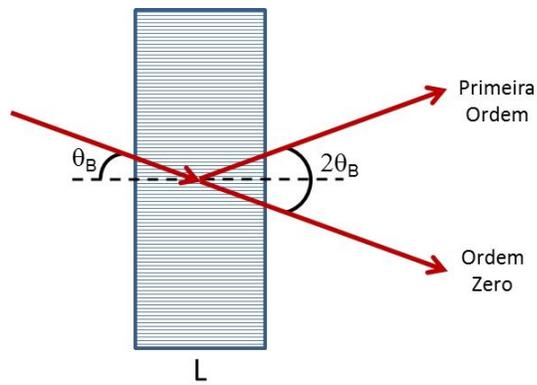


Figura 26 AOM caso $Q \gg 1$

2.6 Monocromador + Camera CCD

O monocromador utilizado em nosso sistema é um Acton Series SP2300i de 0.300 metro de distância focal e a câmera CCD é o modelo Pixis 100BR refrigerado a ar, ambos da empresa Princeton Instruments. Temos seis grades de difração com blazing para 350 nm e 750 nm com 300, 600 e 1200 linhas/mm. O sistema é controlado por computador pelo software proprietário Winspec. A Figura 27 mostra o esquema do conjunto.

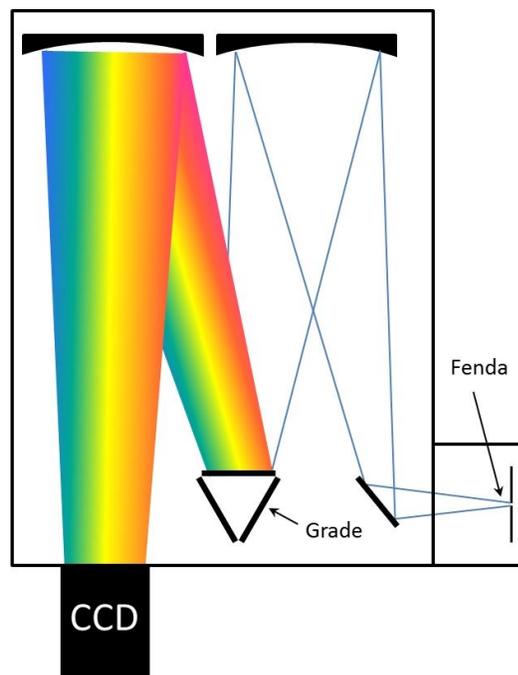


Figura 27 Esquema monocromador e CCD

O sinal que entra pela fenda é refletido para a grade de difração por um espelho côncavo. Ao deixar a grade o sinal é refletido por um segundo espelho côncavo e focalizado na entrada da CCD. Para obter a máxima resolução espectral é necessário que a grade esteja totalmente preenchida. Isso é obtido quando o f-number do monocromador é casado com óptica de focalização na fenda. A relação do f-number com a abertura numérica da lente que focaliza o feixe na fenda é

$$f \# = \frac{1}{2NA} \quad (2.3)$$

E a abertura numérica definida como

$$NA = n \sin \theta \approx n \tan \theta = n \frac{r}{f} \quad (2.4)$$

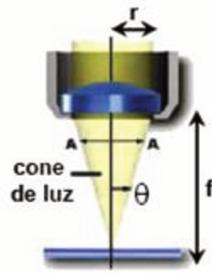


Figura 28 Definição de abertura numérica

O feixe de laser tem um diâmetro de aproximadamente 0.5 cm e o f-number do monocromador é $f/4$. Com esses parâmetros o foco da lente é dado por

$$f = f \# D \Rightarrow f \approx 2 \text{ cm} \quad (2.5)$$

Escolhemos uma lente de distância focal 2.5 cm e focalizamos o sinal na entrada da fenda do monocromador para obter a máxima resolução espectral.

2.7 Criostato

O criostato acoplado em nosso sistema é da empresa Cryovac modelo Konti Mikro de ciclo aberto. A transferência de Hélio é feita por um tudo em U semiflexível. A faixa de temperatura é de 4 a 300 K com estabilidade menor que 0.1 K. A amostra fica em vácuo com distância de 1 mm até a janela de quartzo. A Figura 29 mostra fotos do criostato. Detalhes da adaptação do criostato no microscópio confocal estarão presentes na tese de doutorado de outro aluno do grupo Diogo Burigo Almeida que será defendida em 2013.



Figura 29 Fotos do criostato acoplado ao microscópio confocal[18]

Em conclusão nesse capítulo descrevemos todos os equipamentos e acessórios básicos utilizados nessa tese.

Capítulo 3

Aplicações das Pinças Ópticas

3.1 Introdução

O objetivo principal desta tese é a integração e aplicações das várias ferramentas fotônicas, entre as quais a de um sistema de pinças ópticas. Entretanto, nosso grupo possui um grande número de teses antecedentes sobre o tema pinça óptica. Uma descrição teórica-experimental dessa técnica com bastante profundidade pode ser encontrada nas teses listadas a seguir que podem ser acessadas através do site <http://portal.ifi.unicamp.br/>. No portal do Instituto de Física clicar em biblioteca e logo a seguir clicar em teses e dissertações UNICAMP.

Teses de doutorado do grupo em pinças ópticas:

1. Wendel Lopes Moreira, ***“Expansão de campos eletromagnéticos arbitrários em termos de funções de onda vetoriais”***, (2010)
2. Antônio Álvaro Ranha Neves, ***“Forças Ópticas em Pinças Ópticas: Estudo teórico e Experimental”***, (2006)

3. Adriana Fontes, "**Sistema de Micromanipulação e Microanálise com Pinças Ópticas**", (2004)
4. Marcelo Mendes Brandão, "**Análise e caracterização da deformidade de eritrócitos em membranopatias**", (2003) Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

Teses de mestrado do grupo em pinças ópticas:

1. Heloíse Pöckel Fernandes; "**Estudo das propriedades elétricas das hemácias utilizando pinça óptica**", (2009) Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP
2. André Alexandre de Thomaz, "**Ferramenta Biofotônica Integrada para Manipulações e Microscopias Confocais**", (2007)
3. Lílina de Ysasa Pozzo; "**Desenvolvimento de Metodologia de Medida Vetorial de Forças em Tempo Real de Microorganismos Utilizando Pinças Ópticas para Estudos de Quimiotaxia e Osmotaxia de Parasitas**"; (2006)
4. Gustavo Pires Marques; "Análise do Potencial de Calibração da Força Óptica através de Dispositivos de Microscopia de Força Atômica"; (2005)
5. Adriana Fontes; "**Uso de Lasers para Manipulação e Medidas de Células Vivas**", (1999)

As teses do doutorado do Wendel Moreira, Antônio Neves e Adriana Fontes apresentam a teoria das pinças ópticas com máximo de rigor matemático, assim como algumas aplicações. Já a tese de doutorado do Marcelo Brandão e de mestrado da Heloíse Fernandes, defendidas pela FCM-UNICAMP, utilizam as pinças para estudo de reologia e propriedades elétricas de hemácias. A tese da Lílina Pozzo é precursora no uso da pinça para caracterização de quimiotaxia de parasitas. A tese de mestrado da Adriana Fontes foi a primeira do grupo nessa área.

Em termos de integração em uma plataforma multimodal a tese de doutorado da Adriana Fontes integrou pinças ópticas com espectroscopias, Raman e

fluorescência multifóton e geração de segundo harmônico sem capacidade de aquisição de imagens por varredura laser. A primeira integração com sistema de aquisição de imagens confocais com varredura laser foi desenvolvida na minha tese de mestrado na qual integrei pinças ópticas, com geração de segundo harmônico e fluorescência excitada por dois fótons. Entretanto o sistema de pinças dessa tese não permitia a medida do vetor das forças ópticas em tempo real utilizado nesse capítulo.

Considerando todos os estudos preliminares do grupo na área de pinças ópticas não faz sentido, nessa tese, uma descrição rigorosa da teoria de forças ópticas. Incluiremos, entretanto, uma explicação mais intuitiva baseada na óptica geométrica, que mostra como a luz é capaz de capturar e movimentar partículas, para não obrigar o leitor a reler as teses passadas do grupo.

Nessa tese de doutorado apresentamos uma plataforma biofotônica multimodal com uma integração muito mais ampla que inclui: fluorescência excitada por um e ou dois fótons, Fluorescence Lifetime Imaging [FLIM], geração de segundo e terceiro harmônicos [SHG/THG]. O aperfeiçoamento do novo sistema de pinças ópticas no microscópio confocal nos permitiu utilizá-lo para estudo mais profundo de quimiotaxia de *Trypanosoma cruzi* [*T. cruzi*] e *Trypanosoma rangeli* [*T. rangeli*] na presença de atratores reais como parede do intestino e glandulas salivares do inseto hospedeiro, *Rhodinus prolixus* [*R. prolixus*]. A partir das medidas dos vetores de força foi possível identificar a atração desses parasitas na direção do intestino, caso do *T. cruzi*, e na direção da glândula salivar, caso do *T. rangeli*. Esses órgãos são onde esses microorganismos completam seus ciclos de vida e se tornam capazes de infectar o hospedeiro mamífero. Vale a pena notar que para acompanhar os movimentos de um parasita vivo devido à quimiotaxia é necessário desenvolver um sistema de medida automática das forças ópticas que forneça as componentes da força em tempo real.

3.2 Princípio de Funcionamento da Pinça Óptica

O conceito de raios de luz da óptica geométrica pode ser aplicado quando o comprimento de onda da luz é muito menor do que as dimensões dos objetos em questão. Considere um feixe de luz incidindo numa partícula como mostra a Figura 30.

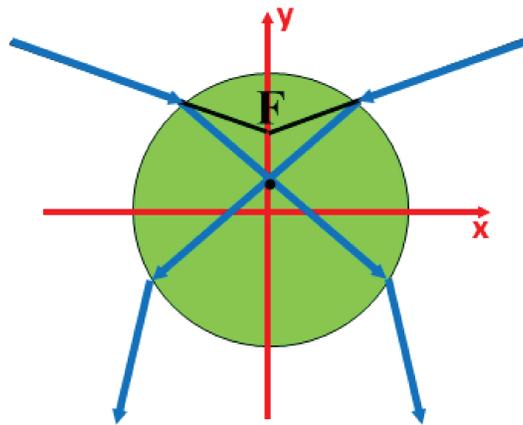


Figura 30 Esquema de um feixe de luz sendo focalizado numa partícula

Como o índice de refração da partícula é maior e diferente do índice de refração do meio os raios de luz mudam de direção quando encontram a partícula. Ao saírem do objeto os raios de luz mudam sua direção novamente. Einstein provou com o efeito fotoelétrico a dualidade onda-partícula da luz. O fóton, partícula que compõe o feixe de luz, possui momento linear definido por $|\vec{p}| = E/c$, onde E é a sua energia e c a velocidade da luz. Como a direção do raio de entrada é diferente da direção do raio de saída houve uma mudança no momento linear p . Ao mudar de direção o raio de luz transfere momento para a o objeto e surge a força \mathbf{f}_1 na direção noroeste no objeto como mostra a Figura 31 (a). Uma imagem especular do sistema em torno do eixo y mostra um segundo raio incidindo de cima para baixo e da esquerda para direita que gera a força \mathbf{f}_2 na direção nordeste da Figura 31 (b). As componentes horizontais dessas forças se cancelam, mas as componentes verticais, que tendem a trazer o centro da esfera para o foco do laser, se somam, como mostra a Figura 31 (b).

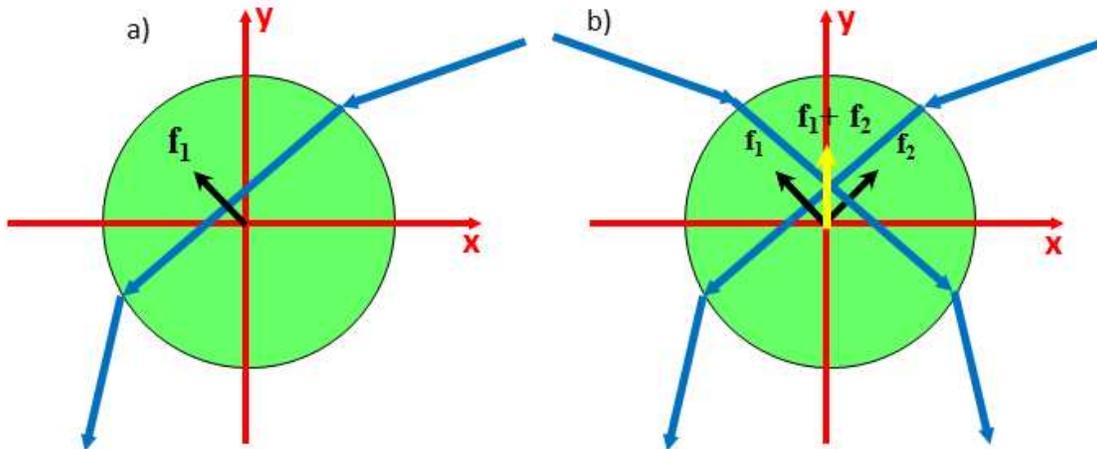


Figura 31 a) Trajetória do raio de luz externo. b) Surgimento da força pela transferência de momento dos raios refratados.

Toda vez que a partícula sair do ponto de equilíbrio (centro da partícula coincidindo com o foco do laser) surgirá uma força que tentará trazer o centro da partícula para o foco do laser. Essa força atua nas três dimensões tornando a pinça uma armadilha tridimensional. Nos primeiros trabalhos de levitação de partículas, A. Ashkin utilizou seis feixes contrapropagantes para aprisionar as partículas[19-22]. Só após os experimentos iniciais ele percebeu que apenas um feixe altamente focalizado era suficiente para capturar as partículas nas três dimensões[23, 24].

Uma situação mais realista incluiria infinitos raios de luz formando um cone com a abertura numérica do feixe incidente sem modificar a conclusão geral de que a força óptica é restauradora, desde que o índice de refração da partícula seja maior do que o do meio externo, tendendo sempre a trazer o centro da partícula para o foco do laser.

A tese de doutorado da Adriana Fontes mostrou que o modelo de óptica geométrica incluindo as reflexões integradas usando a condição seno de Abbe é uma excelente aproximação quantitativa para as forças geradas pelas pinças ópticas, podendo ser aplicada em situações em que as microesferas sejam suficientemente grandes e fora das ressonâncias de Mie. As reflexões levam aos seguintes efeitos: (1) o centro da esfera fica abaixo do foco do laser para dar conta das forças ópticas da reflexão; (2) se a diferença de índice de refração for muito

grande, como uma microesfera de látex ou sílica imersa em ar, a reflexão se torna tão alta que impossibilita a captura da partícula. Na literatura as duas forças, devido à refração e à reflexão, ficaram conhecidas como forças de gradiente, atrativa, e de espalhamento, repulsiva. Já as ressonâncias de Mie só ocorrem em condições especiais nas quais o feixe incide bem próximo da borda da microesfera excitando os whispering gallery modes. Nas aplicações desse capítulo trabalhamos com microesfera de poliestireno de $9 \mu\text{m}$ imersas em água que se deslocavam pouco da posição de equilíbrio, uma situação típica em que a óptica geométrica, usada nesse capítulo, é válida.

3.3 Força Óptica no modelo da óptica geométrica

A utilização da óptica geométrica para o cálculo da força óptica na tese de doutorado da Adriana Fontes foi baseada no esquema de reflexões múltiplas mostrado na Figura 32. Sempre que um raio de luz toca na superfície aparece uma refração e uma reflexão.

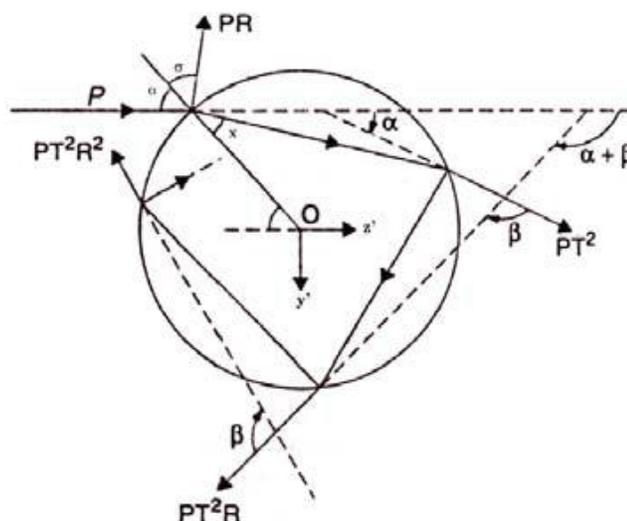


Figura 32 Reflexões e refrações de um raio de luz incidente (P) numa esfera. O centro de Coordenadas está no ponto O e o eixo z' está na direção do raio incidente.

A força, que o raio exerce na esfera, nas direções paralela e perpendicular a direção do raio incidente, é dada por [23, 25, 26]

$$F_{z'} = \frac{n_1 P}{c} \left[1 - R \cos(\pi + 2\sigma) + \sum_{n=0}^{\infty} T^2 R^n \cos(\alpha + n\beta) \right]$$

$$F_{y'} = \frac{n_1 P}{c} \left[-R \sin(\pi + 2\sigma) + \sum_{n=0}^{\infty} T^2 R^n \sin(\alpha + n\beta) \right] \quad (3.1)$$

O truque para transformar essa série de termos infinitos em uma progressão geométrica foi realizar uma transformação para o plano complexo na forma, $F_c = F_{z'} + i F_{y'}$, pois $R[\cos(\pi + 2\sigma) + i \sin(\pi + 2\sigma)] = R e^{i(\pi + 2\sigma)}$ e $T^2 \sum_{n=0}^{\infty} R^n [\cos(\alpha + n\beta) + i \sin(\alpha + n\beta)] = T^2 e^{i\alpha} \sum_{n=0}^{\infty} R^n e^{in\beta}$ cujo resultado é dado por:

$$F_c = \frac{n_1 P}{c} \left[1 + R \exp(2\sigma i) - T^2 \exp(i\alpha) \left[\frac{1}{1 - R \exp(i\beta)} \right] \right] \quad (3.2)$$

Onde $\alpha = (2\sigma - x)$, $\beta = (\pi - 2x)$ e $x = n \sin \sigma$. O ângulo incidente é definido por σ , $n = n_1/n_2$ o índice de refração relativo entre o meio (n_1) e a esfera (n_2), c é a velocidade da luz e P a potência do laser incidente. As variáveis $R = (\tan(\sigma - x)/\tan(\sigma + x))^2$ e $T = 1 - R$ são a refletância e a transmitância, respectivamente, para um raio linearmente polarizado. Como o ângulo de incidência varia para cada raio de luz, é necessário mudar o centro de coordenadas para uma posição fixa, que será o foco do feixe de luz, como mostrado na Figura 33

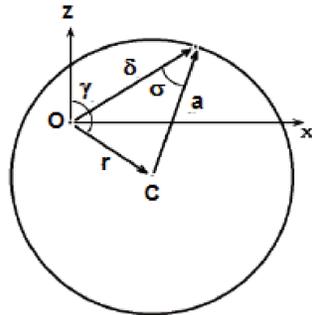


Figura 33 Mudança de coordenadas da origem e definição dos ângulos e vetores utilizados.

Escrevendo o ângulo de incidência σ em função do ângulo γ e dos vetores $\vec{\delta}$ e \vec{r} , a expressão final dependerá apenas do vetor de deslocamento \vec{r} (que

conecta o foco do feixe com o centro da esfera), da abertura numérica do feixe, do raio da esfera, da potência do feixe (considerada igual para todos os raios) e do índice de refração relativo, todas grandezas que podem ser medidas ou são conhecidas. Usando a lei do cosseno temos $\sigma = \arccos\left(1 + d^2 - (r/a)^2 / 2d\right)$, onde $d = \|\vec{\delta}\|$ e o vetor deslocamento $\vec{r} = (r \sin \gamma, 0, r \cos \gamma)$. O vetor de força para o feixe cônico é obtido pela integração de $F = \int \vec{F} dA / \int dA$, onde o elemento de área é dado por $dA = \sin \theta \cos \theta d\theta d\varphi$ pela condição do seno de Abbe, o ângulo θ varia de $0 \leq \theta \leq \theta_{\max}$ (θ_{\max} o ângulo da abertura numérica) e ângulo azimutal varia de $0 \leq \theta \leq 2\pi$. Essa expressão pode ser integrada numericamente no software Mathematica (Wolfram Research) obtendo-se o gráfico da força versus posição radial da figura 83 (Figura 34) da tese da Adriana Fontes[27] mostrada abaixo.

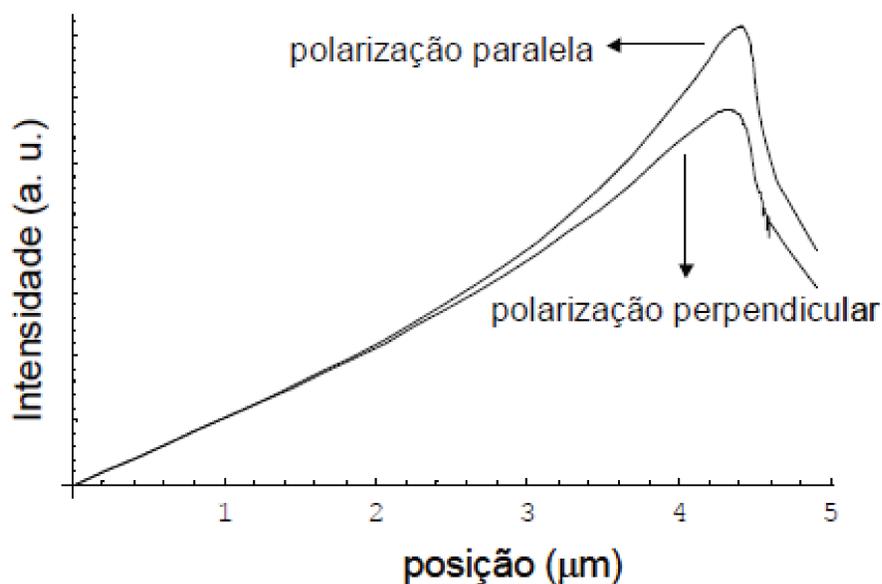


Figura 34 Força versus posição para polarização paralela e perpendicular[27]

Note que mesmo o modelo de óptica geométrica apresenta uma curva de força diferente as diferentes polarizações. Isso porque a reflexão de cada polarização é diferente. Entretanto a diferença só se torna significativa nas bordas da partícula. Já na tese do Antônio Neves[28], o cálculo muito mais preciso e sofisticado, considerando inclusive os caso de ressonância de Mie, para a mesma

microesfera apresenta o gráfico da Figura 35 abaixo. Dessa figura percebemos que para deslocamentos pequenos em relação ao centro da esfera nem a polarização do feixe incidente nem as ressonâncias são importantes. Por isso podemos afirmar que o cálculo da força óptica utilizando modelo de óptica geométrica é uma excelente aproximação para deslocamentos pequenos comparados com as dimensões da partícula.

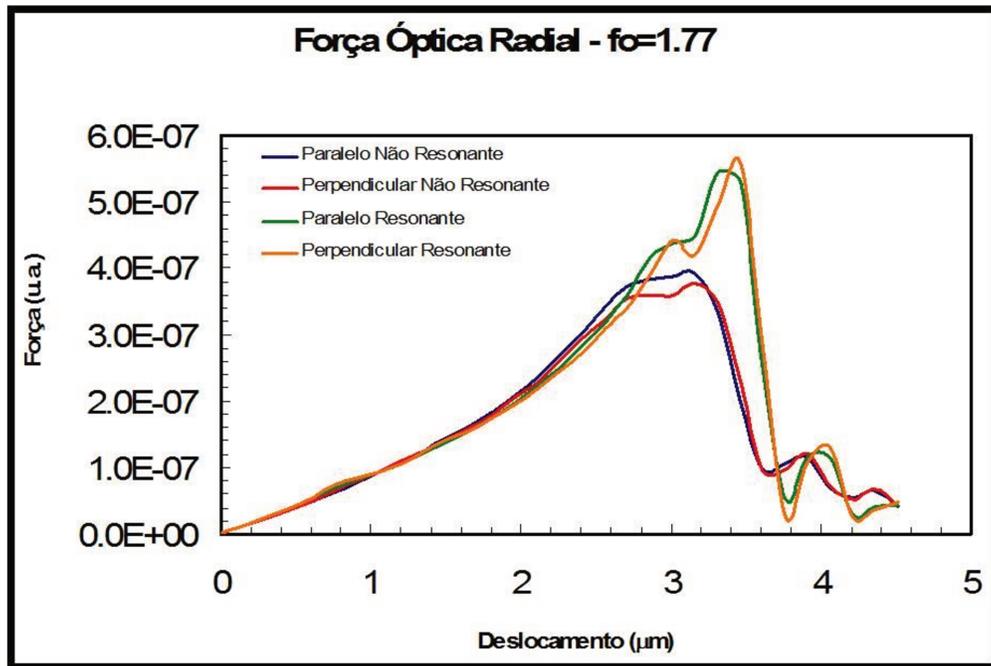


Figura 35 Força óptica na direção radial considerando as ressonâncias de Mie[28]

3.4 Calibração da Força Óptica

Para mostrar a validade do modelo da óptica geométrica a Adriana Fontes calibrou a força óptica contra um modelo de força hidrodinâmica em uma câmara de Neubauer de 100 μm de profundidade. No cálculo da força de arraste ela considerou inclusive a presença das paredes [29], utilizando a expressão:

$$F = \frac{6\pi\eta a u}{1 - A\left(\frac{a}{l}\right) + B\left(\frac{a}{l}\right)^3 + \dots} \quad (3.3)$$

Nessa expressão a velocidade da esfera é dada por u , seu raio por a , a viscosidade do fluido por η e l é a distância do centro da esfera até o fundo da câmara. As constantes A e B são integrais numéricas que dependem de l e b , sendo b a distância do centro da esfera até a lamínula.

Para realizar a calibração ela arrastou a microesfera em diferentes velocidades constantes u , definidas através de um estágio de translação, em diferentes profundidades na câmara l e com diversas soluções de glicose em que a viscosidade η e o índice de refração n variaram. Para cada uma das situações ela mediu o deslocamento da microesfera com uma câmera de vídeo e calculou a força óptica através da integração no mathematica e a força hidrodinâmica através da expressão (3.3). Para cada uma das situações ela construiu o gráfico com a força óptica versus a força hidrodinâmica mostrado na Figura 36. A reta ajustada aos pontos mostrou um coeficiente angular de 1.07 e o R^2 maior que 0.9. Isso mostra a validade do modelo de óptica geométrica para pequenos deslocamentos de partículas grandes.

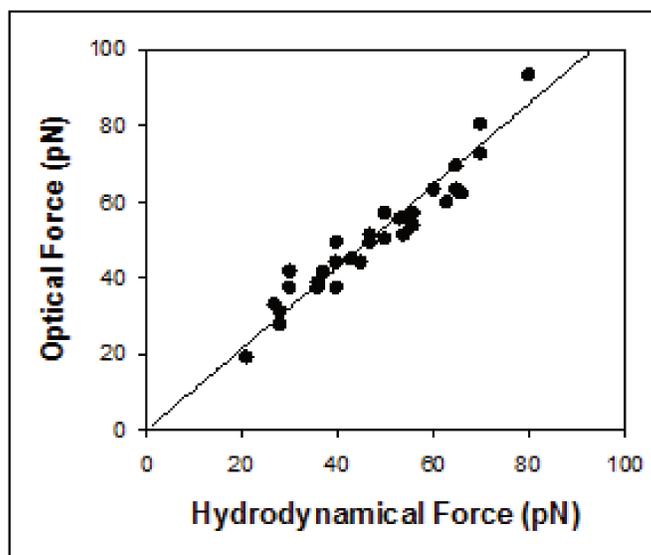


Figura 36 Gráfico da força óptica versus a força hidrodinâmica[27].

3.5 Montagem experimental das pinças ópticas na plataforma multimodal

O esquema do sistema completo é mostrado na Figura 37. As medidas foram feitas no Microscópio Olympus IX-81 FV300 usando a objetiva PLANAPO de 40X com 1.2 de abertura numérica.

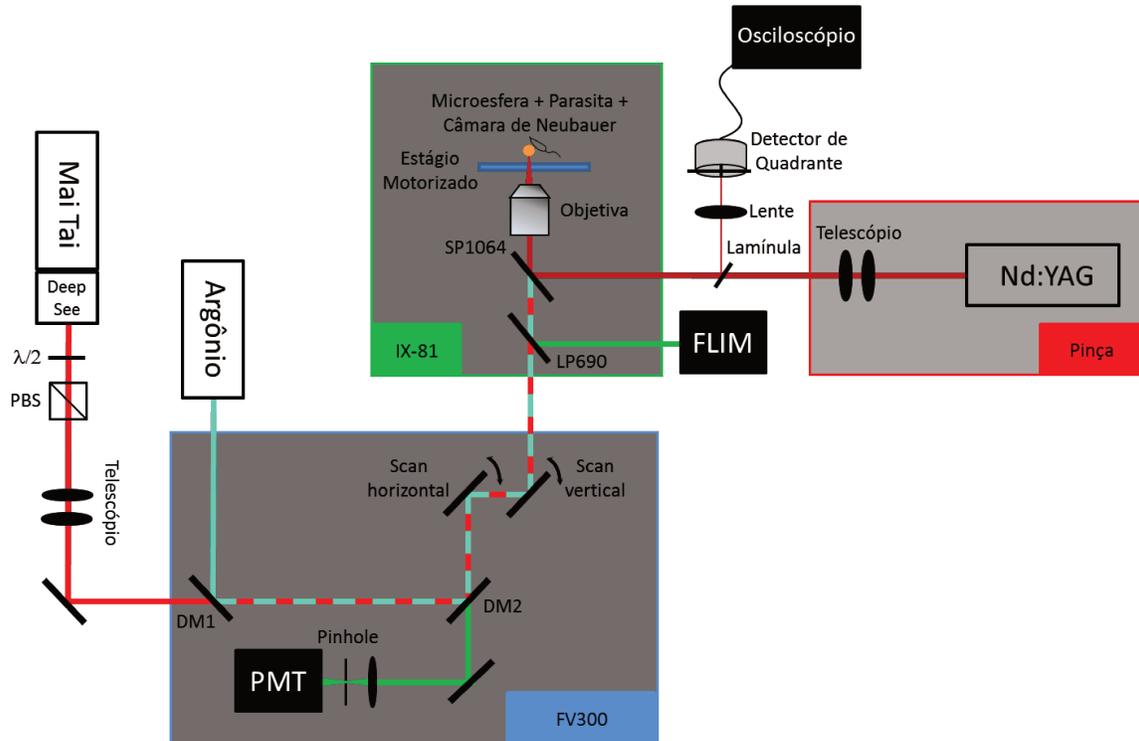


Figura 37 Montagem experimental para a medida de força

Embora os lasers de Argônio e Mai Tai (Ti:Safira) e o sistema de FLIM não tenham sido utilizados nesse experimento específico, de medida dos vetores de força, eles estão presentes no esquema para mostrar a integração da pinça no microscópio confocal e deixar evidente a possibilidade de aquisição de imagens confocais e por FLIM em partículas pinçadas. O laser da pinça é um laser de Nd:YAG com emissão em 1064 nm. O elemento óptico fundamental para a integração da pinça óptica com o sistema confocal é o dicróico SP1064 [short pass] que transmite feixes com comprimento de onda abaixo de 1064 nm e reflete o 1064 nm do feixe do Nd:YAG. Dessa forma todos os lasers do sistema confocal serão transmitidos pelo dicróico para incidir na amostra, da mesma forma que a

fluorescência gerada na amostra e coletada pela objetiva será transmitida para o sistema de aquisição de imagens confocal. A única restrição é evitar a utilização do sistema de Ti:safira de fs na região acima de 950 nm. Uma característica importante desse dicróico é que deve ter resposta plana até próximo de 300 nm, pois sinais de SHG e THG tendem a cair nessa região.

Um espelho dielétrico para 1064 nm atua como filtro passa baixa, refletindo o laser da pinça e sendo transparente para os comprimentos de onda inferiores a 1064 nm. Utilizamos uma lamínula de microscópio para refletir 8% do feixe retro-espalhado na direção do detector de quadrante(QP506SD2 - Pacific Sensor Incorporated). Uma lente de 5 cm de distância focal controla o tamanho do feixe no detector e o sinal eletrônico é enviado para um osciloscópio (Tektronix, model TDS 1012).

Medida automática em tempo real do vetor força utilizando detector de quadrante.

Como afirmamos na introdução desse capítulo apenas com um sistema de medida automática em tempo real das forças ópticas poderíamos acompanhar os movimentos dos parasitas devido à quimiotaxia. Como a medida direta da força do parasita é, na prática, impossível, precisamos usar uma microesfera como um transdutor de força. A esfera deve ser grande o suficiente comparada com o tamanho do parasita para ser possível observá-la frente a qualquer movimento do parasita. Por isso utilizamos microesferas de poliestireno de 9 μm como transdutor. Com esferas desse tamanho conseguimos evitar que o parasita fosse capturado diretamente pela pinça ou que o parasita se posicionasse na região do foco do laser causando um espalhamento não devido ao deslocamento da esfera. Como se trata de um sistema estático em equilíbrio a força do parasita será igual e oposta à força óptica na microesfera. Uma vez observado o deslocamento em x e y da posição da microesfera utilizamos a integração no mathematica descrita acima para calcular as forças nas direções x e y.

Para a medida automática da força utilizamos um detector de quadrante[30]. Conforme a esfera é deslocada pelo parasita ocorre o espalhamento da luz do laser, como exemplificado na Figura 38. A quantidade de luz em cada quadrante varia com a posição da microesfera. Adicionando dois quadrantes verticais superiores e inferiores e realizando a subtração dos mesmos obtemos um sinal proporcional ao deslocamento na direção vertical. Já adicionando os quadrantes da direita e da esquerda e subtraindo os dois obtemos um sinal proporcional ao deslocamento na direção horizontal. Como essas operações eletrônicas são realizadas em tempo real obtemos o deslocamento da microesfera nas duas direções, vertical e horizontal, simultaneamente.

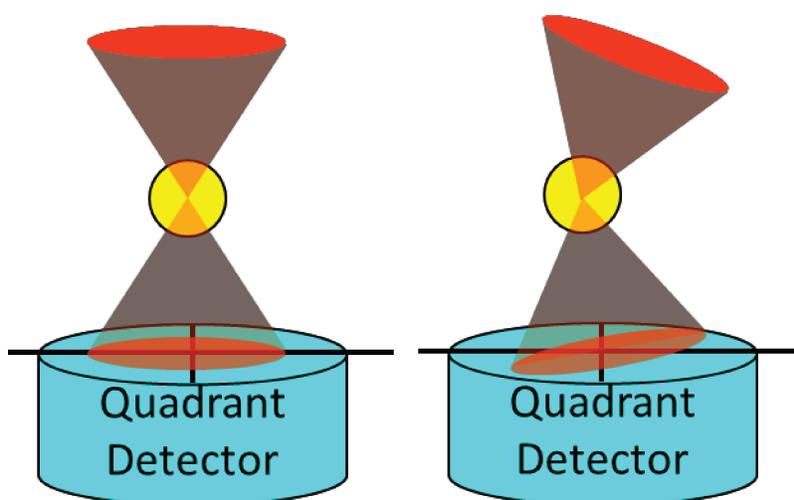


Figura 38 Espalhamento do feixe da pinça pelo deslocamento da microesfera

Em relação à montagem inicial do detector de quadrante em um microscópio upright convencional, modificações importantes foram necessárias para adaptação do mesmo em um microscópio confocal. No microscópio convencional o foco das imagens é obtido movendo a plataforma que suporta a amostra, já no caso dos microscópios confocais o foco é obtido através do movimento da objetiva e não da amostra. Como o laser da pinça incide pela mesma objetiva, logo percebemos que não era possível acompanhar o movimento da microesfera através do feixe de 1064 nm transmitido, que era deformado sempre que movíamos a pinça para capturar um parasita em diferentes planos. A solução foi usar o feixe refletido pela microesfera em lugar do transmitido. A posição do detector de quadrante em relação à lente de 5 cm mostrada no esquema da montagem experimental foi

ajustada para que a imagem da microesfera não seja tão pequena ao ponto do feixe no detector não se distribuir entre os 4 quadrantes, nem tão grande ao ponto de se tornar maior do que a dimensão do detector, garantindo uma boa sensibilidade da voltagem em relação ao deslocamento da microesfera.

Calibração do deslocamento:

Colocamos uma microesfera presa na superfície de uma lamínula de vidro posicionada sobre o estágio de translação motorizado do microscópio ajustando-a visualmente no centro da campo da imagem. Movemos o detector de quadrante em x e y até que os sinais de deslocamento vertical e horizontal fossem nulos, ou seja, a mesma potência de luz em todos os quadrantes. Daí movemos a microesfera nas direções x e y através do estágio de translação. O sinal vertical permaneceu nulo no movimento horizontal e sinal permaneceu nulo no movimento horizontal mostrando a qualidade do nosso alinhamento. Assim medimos as voltagens em função do deslocamento da microesfera em ambas as direções. A Figura 39 mostra a calibração obtida. Ajustando as curvas obtidas com uma reta encontramos o fator de proporção que transforma sinais de voltagem diretamente em deslocamento para as duas direções.

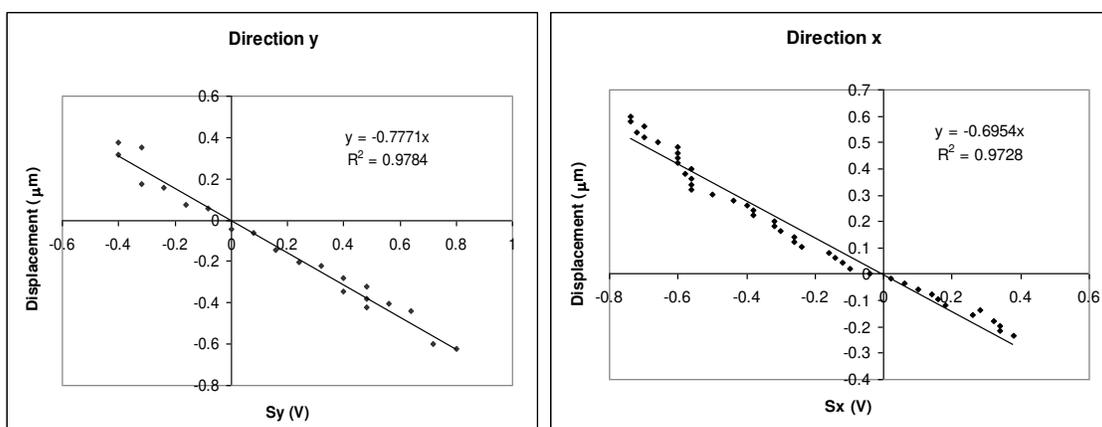


Figura 39 Calibração do detector de quadrante deslocamento x voltagem

Com essas curvas de calibração colocamos os parasitas e as microesferas em uma solução de PBS. Capturamos uma microesfera e saímos em busca de um parasita vivo no qual encostamos a microesfera pinçada até houvesse uma

adesão parasita/microesfera. Nesse momento podemos começar a observar os sinais de voltagem no osciloscópio para medida da força dos parasitas.

Para estudo de quimiotaxia em tempo real de parasitas flagelados, medimos os vetores força, intensidade e direção do movimento de células vivas sobre gradientes de concentração de substância quimioatraentes, benéficas ao parasita, ou quimiorepelentes, malélicas para o parasita. O universo de um microorganismo é o universo pré Galileiano, sem inércia, no qual corpos em movimento significam a presença de uma força, por conta do papel da viscosidade. Considerando as dimensões dos microorganismo esse é um universo mecânico com baixos números de Reynolds. Purcell [30, 31] mostrou que uma partícula de 10 μm que se movia com 30 $\mu\text{m/s}$ pára completamente após percorrer a distância de 0.6 μm após o desligamento da força que a mantia em movimento. Nesse universo as forças envolvidas também são muito pequenas. Nosso grupo tem medido forças de impulsão máximas de parasitas no intervalo entre 1 a 10 pN, e nós medimos forças da ordem entre 0 e 3 pN. A ferramenta ideal para medida de forças no intervalo de 50 fN até 200 pN, é a pinças óptica, existindo poucas alternativas em termos de sensibilidade.

Uma pergunta importante nesse ponto é se o tempo de resposta do nosso sistema de detecção, incluindo detector e osciloscópio, de 0,5 μs , é bem menor do que os tempos típicos de deslocamento do sistema parasita-microesfera. No limite de baixos números de Reynolds, ignorando a inércia e considerando lei de Stokes, a força pode ser calculada pelo termo da viscosidade, $F = 6\pi\eta a \frac{dx}{dt}$ de onde

extraímos o intervalo de tempo $\Delta t = \frac{(6\pi\eta a)\Delta x}{F}$ para uma impulsão típica. Na pinça

observamos deslocamentos da ordem de (Δx) 0.3 μm para a esfera de raio (a) de 4,5 μm . Assim, na força máxima, 3 pN, o intervalo de tempo do impulso será da ordem de 0,01 s, ou seja, 10 ms, 20 mil vezes maior do que o tempo de detecção de de 0,5 μs . Dessa forma podemos afirmar que nosso sistema é capaz de medir os vetores de força em **tempo real**.

3.6 Estudo de Taxias em microorganismos

O processo em que células e microorganismos direcionam seus movimentos de acordo com certos gradientes em seu ambiente é denominado taxia. Os microorganismos reagem a mudança de temperatura, pressão osmótica, luz e outros gradientes de parâmetros envolvidos na sua sobrevivência. Quando esses sistemas biológicos respondem a gradientes de substâncias, o processo é chamado de quimiotaxia. Quimiotaxia é a maneira como microorganismos encontram nutrientes, glicose por exemplo, ou a maneira como eles evitam moléculas tóxicas[32]. Espermatozóides são orientados em direção ao óvulo através da quimiotaxia[33]. Este mecanismo é mediado por esteróides e parece depender da produção de espécies reativas de oxigênio [33, 34]. Mesmo para organismos multicelulares, a quimiotaxia impulsiona fases subsequentes do desenvolvimento como a migração de neurônios e linfócitos[35]. Já foi reportado que a migração quimiotática diminui durante a metástase em câncer[36].

Existem muitos estudos na literatura sobre quimiotaxia, e outros tipos de taxias, como osmotaxia. A quimiotaxia foi estudada extensivamente sob dois pontos de vista: (1) uma visão de caixa preta onde a resposta é observada como função de um estímulo e (2) sob um ponto de vista bioquímico onde as reações bioquímicas disparadas pelos receptores são observadas[37-39]. A maioria dos trabalhos de quimiotaxia é em leucócitos, que tem uma taxia lenta baseada em movimento de “crawling”, ao contrário do movimento feito por bactérias e protozoários[40-42]. Há mais estudos de quimiotaxia de bactérias do que de protozoários [43-45]. O método mais utilizado, o ensaio de capilaridade, criado por Pfeffer[46] e mais tarde aperfeiçoado por Adler[47], é utilizado para análise quantitativa. De maneira geral o método conta o número de células encontradas na região de maior concentração do gradiente no capilar. Outro método, introduzido por Barros[45] para estudar a quimiotaxia de leishmania é baseado na medida do tempo médio de movimento em linha reta. Movimento em linha reta aqui é definido como a ausência de mudanças abruptas de direção. Nesse capítulo mostramos como as pinças ópticas podem ser utilizadas para estudar a

quimiotaxia do parasita causador da doença de Chagas, o *trypanosoma cruzi*, em um estágio fundamental no ciclo de vida do parasita, dentro do inseto que transmite a doença, chamado de VETOR da doença.

A doença de Chagas foi descoberta por Carlos Chagas, ver Figura 40, em 1909. Essa doença de Chagas está presente em mais de 15 países nas Américas, como mostra o mapa da Figura 40, com 8-11 milhões de infectados e uma incidência anual de 200,000 casos[48].



Figura 40 Esquerda: Carlos Chagas[49]. Direita: mapa da distribuição da doença de Chagas[50]

O ciclo de vida do parasita envolve dois hospedeiros, o inseto VETOR, e um mamífero, que pode ser o homem assim como centenas de outros mamíferos silvestres e domésticos. O vetor principal é o barbeiro, denominado pelo nome científico *Rhodinus prolixus*, cuja foto aparece na Figura 41. O parasita se apresenta em três formas: amastigota, epimastigota e trypomastigota, apresentadas na Figura 41.

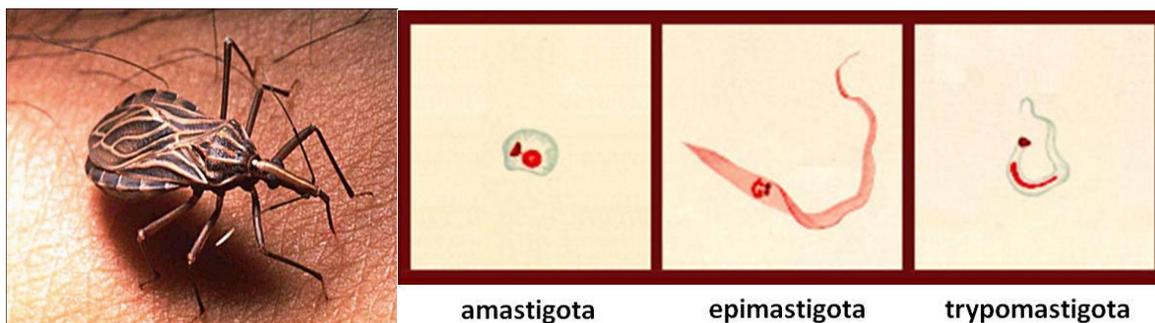


Figura 41 Esquerda: *Rhodinus prolixus* também conhecido como barbeiro[51]. Direita: três formas ao longo do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*[52]

Quando se encontra no interior das células do mamífero o parasita assume a forma amastigota, na qual não possui flagelo, logo pouco se movimenta, mas é nessa forma que ele pode se reproduzir. O *T. Cruzi* pode se alojar no interior de células fagocíticas, como macrófagos, por exemplo, e mononucleares, com tropismo pelas células musculares, especialmente as cardíacas. Antibióticos não conseguem atuar sobre esses parasitas quando se encontram no interior das células e a doença, até hoje, não tem cura. Seu efeito sobre o coração pode ser devastador, levando a uma hipertrofia do miocárdio.

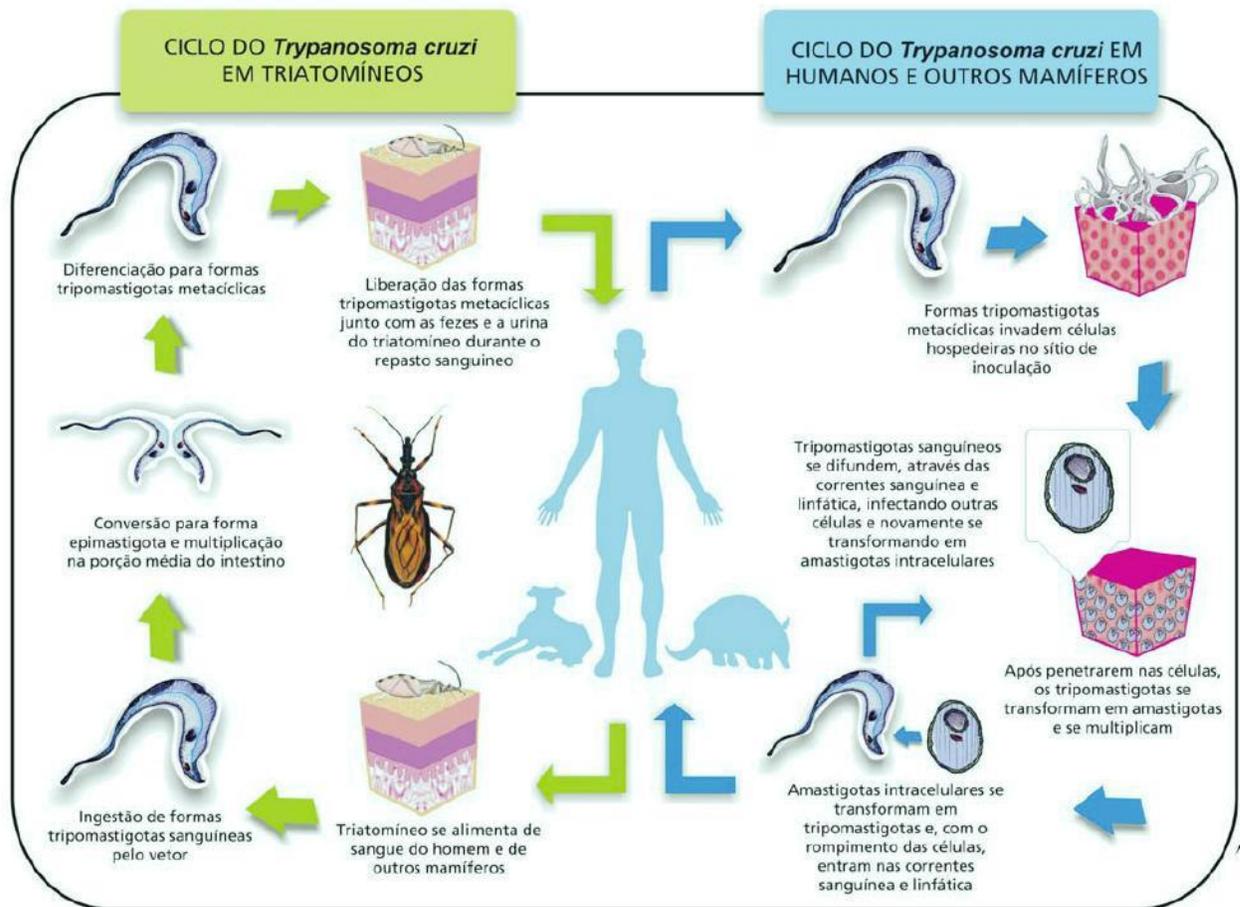
Ao sair das células para a corrente sanguínea passa para a forma tripomastigota, na qual desenvolve o flagelo que lhe permite movimentar-se. Quando um inseto suga o sangue de um ser humano ele ingere o trypanosoma na forma tripomastigota sanguínea. No intestino médio do inseto ele muda para a forma epimastigota na qual pode se movimentar e se reproduzir mas não é capaz de contaminar o ser humano. Ele adere às paredes do intestino, onde muda para a forma tripomastigota metaciclíca, na qual está pronto para contaminar o ser humano.

O ciclo se fecha quando o inseto volta a picar outro mamífero para sugar seu sangue. Ao mesmo tempo em que suga o sangue o inseto defeca depositando o trypanosoma na forma tripomastigota metaciclíca que é levado à corrente sanguínea quando o mamífero se coça. A Figura 42 mostra essa sequência de eventos.



Figura 42 Sequência de eventos na picada do inseto para a transmissão da doença de Chagas

A Figura 43 mostra o ciclo de vida de parasita tanto no mamífero quanto no vetor.



Ciclo de transmissão do *Trypanosoma cruzi* (simplificado). Infográfico: Venício Ribeiro, ICICT/Fiocruz.

Figura 43 Ciclo de vida do *trypanosoma cruzi*[53].

As estratégias utilizadas para combater a doença de Chagas se concentram ou na eliminação do vetor, ou nos ciclos de vida dentro do inseto ou do ser humano. Como a reprodução do parasita envolve dois animais, um inseto e um mamífero, sem a presença de mamíferos infectados a doença não seria transmitida. Infelizmente, dado o grande número de mamíferos capazes de hospedar o parasito, é impossível erradicar a doença isolando os humanos contaminados.

Uma estratégia possível seria a cura da doença no interior do ser humano infectado. Infelizmente isso só é possível nos estágios iniciais da doença quando o parasita ainda se encontra na corrente sanguínea e pode ser atacada pelo sistema imune e por antibióticos. Mesmo assim trata-se de uma luta complicada porque o parasita se refugia no interior dos macrófagos do qual sai com uma capa de

proteínas diferentes que atuam como uma camuflagem imunológica. No interior das células pouco pode ser feito do ponto de vista terapêutico.

Logo, o combate principal tem que ser realizado no ciclo de vida do lado do inseto. O combate direto ao inseto tem monopolizado a maior parte das ações de saúde pública na tentativa de erradicação da doença. Trata-se de uma estratégia que obteve grande sucesso no caso de febre amarela, por exemplo, hoje praticamente extinta das zonas urbanas. Entretanto, no caso da doença de Chagas, mesmo após um século, o barbeiro e a doença continuam presentes. Não foi possível levar os barbeiros à extinção, possivelmente devido a sua maior independência em relação ao ser humano.

Nesse contexto, percebe-se a importância também de entender as interações parasito-hospedeiro, no interior do vetor, são importantes para um melhor entendimento do ciclo de vida do parasita [54]. A quimiotaxia do parasita, nesse contexto, é um dos processos fundamentais dessa interação. Um dos passos fundamentais no ciclo de vida do *T. cruzi* no hospedeiro invertebrado ocorre no intestino do vetor triatomínio [barbeiro]. Formas epimastigotas do parasita se ligam a membrana perimicrovilar (PMM), uma barreira física e fisiológica localizada nas células do intestino, e sofrem intensa multiplicação. Esse processo envolve o reconhecimento de glicomoléculas e algumas proteínas hidrofóbicas localizadas na superfície das formas epimastigotas do *T. cruzi*. Moléculas quimiotáticas como proteínas/carboidratos na PMM, contribuem para a adesão e o desenvolvimento de tripanosomas no intestino do hospedeiro invertebrado [55].

Nosso estudo de quimiotaxia ganhou um padrão de comparação através de outro tripanosomatídeo chamado *T. Rangeli*. O *T. rangeli*, possui uma distribuição similar ao *T. cruzi* possuindo o mesmo vetor, mas não é patogênico para humanos. Similaridades antigênicas entre o *T. cruzi* e o *T. rangeli* geraram reatividade sorológica cruzada em infecções em humanos levando a diagnósticos errôneos de doença de Chagas [56]. O *T. rangeli* (transmitido pela saliva do hospedeiro vertebrado) precisa se ligar as glândulas salivares do inseto vetor e invadi-la para completar seu ciclo de vida [57].

3.7 Planejamento do experimento de Quimiotaxia

A Figura 44 mostra um diagrama do trato digestivo do vetor, *Rhodnius prolixus*, mostrando a glandula salivar, e os intestinos médio e posterior. Pelo descrito acima percebe-se que o *T. cruzi* deve se mostrar quimioatraído pelas paredes dos intestino médio, fundamental no seu ciclo de vida. Já o *T. rangeli* de mostrar quimioatração apenas para a glandula salivar.



Figura 44 diagrama do trato digestivo e da glândula salivar do barbeiro [*Rhodnius prolixus*]

Nossas colaboradoras da UFF/FIOCRUZ-RJ trouxeram tanto os insetos não contaminados vivos, quanto os parasitas na forma epimastigota em cultura. Elas são capazes de dissecar o inseto sobre uma lupa e extrair pedaços de cada uma dessas partes em questão de minutos. Assim o experimento consistiu em colocar partes extraídas dos insetos, os parasitas e as microesferas em solução de PBS em um câmara de Neubauer. Daí o experimento prossegue prendendo uma microesfera, para com ela capturar um parasita e realizar a medida das forças nas proximidades dos diferentes fragmentos comparando contra um padrão de distribuição de forças bem distante dos fragmentos.

3.8 Resultados de Quimiotaxia

Para as medidas envolvendo o *T. cruzi* câmaras de Neubauer foram preparadas contendo:

- I. parasitas sozinhos
- II. parasitas juntamente com cortes de intestino médio (midgut) de *R. prolixus* (local onde ocorre a metaciclo genese)
- III. parasitas e cortes de intestino posterior (hindgut) de *R. prolixus*
- IV. cortes de glândula salivar sem a membrana perimicrovilar

Os parasitas após aderirem as esferas capturadas pela pinça eram movidos para as proximidades dos cortes presentes em cada caso.

Para o caso em que o parasita estava sozinho foi observado um comportamento aleatório dos vetores de força. A intensidade máxima medida foi de 0.8 pN. O mesmo comportamento aleatório nos vetores de força foi observado quando o parasita foi movimentado para perto dos cortes de intestino posterior e glândula salivar. Isso indica que não há atração nenhuma dos parasitas por essas regiões. Os gráficos dos vetores de força para essa situações são mostrados na Figura 45

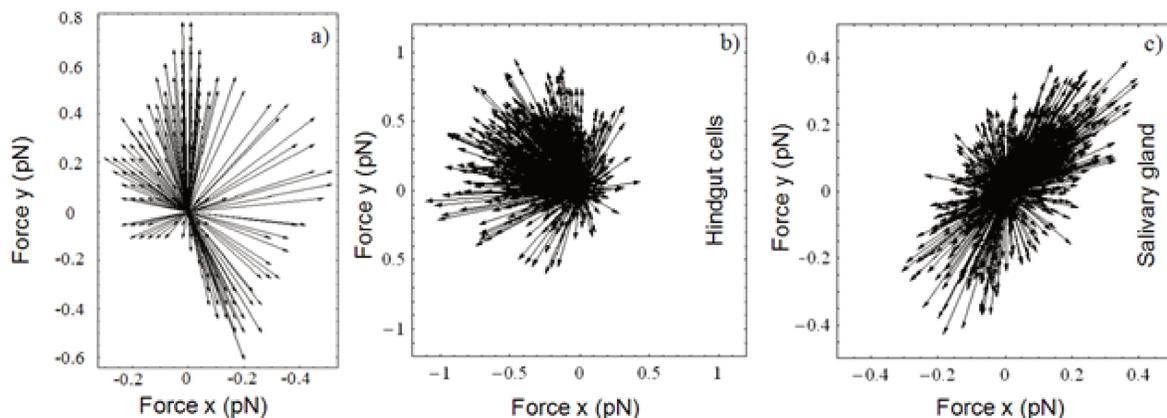


Figura 45 a) Gráfico bidimensional dos vetores de força para o *T. cruzi* sem a presença de nenhum atrator químico. Gráfico bidimensional dos vetores de força para o *T. cruzi* na presença da células do intestino posterior b) e glândula salivar c).

Por outro lado, quando o parasita é trazido para perto das células do intestino médio uma mudança de comportamento é detectada. A Figura 46 a) mostra o parasita projetando seu flagelo em direção ao intestino do barbeiro. Na Figura 46 b) podemos ver que os vetores de força do parasita na presença do intestino do inseto.

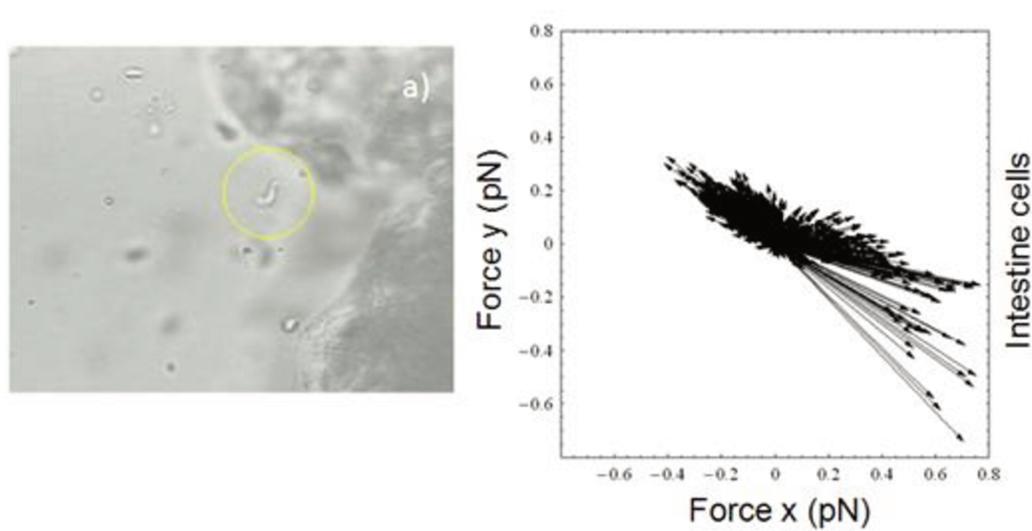


Figura 46 a) Imagem mostrando o *T. cruzi* (dentro do círculo) projetando seu flagelo em direção a células do intestino. O gradiente é gerado por todas as células. b) Gráfico bidimensional dos vetores de força referente a situação da imagem a)

Analisando os gráficos dos vetores de força nas diferentes situações nota-se várias mudanças de comportamento. Além do número de vetores estar mais concentrado na direção do intestino médio há mudanças também nas intensidades das forças. Na situação da Figura 45 a) a maior intensidade da força é 0.8 pN na direção y positiva, enquanto na Figura 46 b) é da ordem de 1 pN na direção das células. Porém no primeiro caso há vetores de força com quase a mesma intensidade em outras direções (~0.6 pN y negativo) enquanto na presença das células do intestino as intensidades nas outras direções não passa de 0.4 pN. Esses resultados demonstram a quimiotaxia do *T. cruzi* pelas células do intestino médio do barbeiro. O parasita tenta de maneira muito mais perceptível se movimentar na direção das paredes do intestino do que nas situações em que está sozinho ou não é atraído pelas células próximas a ele.

Para o *T. rangeli* os resultados são apresentados na Figura 47. O parasita foi trazido para as proximidades da glândula salivar e as forças exercidas por ele foram medidas. Assim como no caso do *T. cruzi*, a direcionalidade está presente nessas medidas. Concluimos que o *T. rangeli* é atraído pela células da glândula salivar do inseto hospedeiro. Forças com intensidade de 2.5 pN foram medidas na direção das células da glândula salivar.

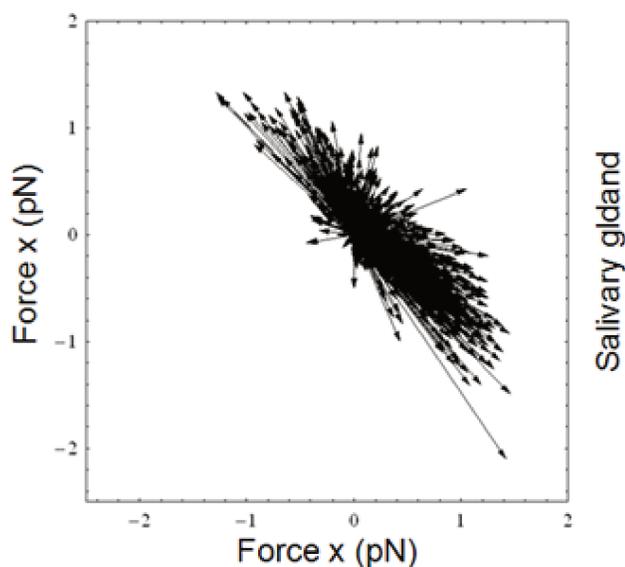


Figura 47 Gráfico bidimensional dos vetores de força do *T. rangeli* na presença da glândula salivar. O gradiente é gerado por todas as células

Em conclusão esse estudo mostrou, tanto através da intensidade quanto da direcionalidade das forças, a presença de quimiotaxia atrativa do *T. cruzi* por fragmentos do intestino médio e indiferença pela glândula salivar e intestino posterior. Já o *T. rangeli* foi indiferente aos fragmentos dos intestinos e mostrou quimioatração pelos fragmentos da glândula salivar. Esses resultados foram publicados no Journal of Optics e apresentado nos seguintes congressos

A. A. de Thomaz, A. Fontes, C. V. Stahl, L. Y. Pozzo, D. C. Ayres, D. B. Almeida, P. M. A. Farias, B. S. Santos, J. Santos-Mallet, S. A. O. Gomes, S. Giorgio, D. Feder and C. L. Cesar, “**Optical tweezers for studying taxis in parasites**”, J. Opt. **13** 044015 (2011)

A. A. de Thomaz, C. V. Stahl, A. Fontes, L. Y. Pozzo, S. Giorgio, S. A. O. Gomes, D. Feder and C. L. Cesar, **“Studying chemotaxis of parasites using Optical Tweezers”**, 17 International Microscopy Congress [IMC17], 19-24 September/2010, Rio de Janeiro, Brazil.

A. A. de Thomaz, C. V. Stahl, D. B. Almeida, A. Fontes, J. R. Santos-Mallet, C. L. Cesar, D. Feder and S. A. O. Gomes, **“Studying chemotaxis in real time using optical tweezers: Applications for interactions study in *Rhodnius prolixus-Trypanosoma cruzi/Trypanosoma rangeli*”**, Photonics West, 23 - 28 January 2010, San Francisco, California, USA – oral

A. A. de Thomaz, D. B. Almeida, A. Fontes, C. V. Stahl, J. R. Santos-Mallet, S. A. O. Gomes, D. Feder and C. L. Cesar, **“Evidence of chemotaxis by quantitative measurement of the force vectors of *Trypanosoma cruzi* in the vicinity of the *Rhodnius prolixus* midgut wall cells”**, Optics and Photonics da The International Society for Optical Engineering – SPIE, San Diego, California, EUA, em agosto de 2009. Oral. Proc. SPIE, Vol. 7400, 740009 (2009); doi:10.1117/12.826314

A. A. de Thomaz, A. Fontes, D. B. Almeida, C. V. Stahl, J. R. Santos-Mallet, S. A. O. Gomes, D. Feder and C. L. Cesar, **“*Trypanosoma cruzi* Quantitative Chemotaxis Characterization by Optical Tweezers”**, Microscopy and Microanalysis Meeting 2009, Richmond, Virginia, USA, Poster.

A. A. de Thomaz, L. Y. Pozzo, A. Fontes, D. B. Almeida, C. V. Stahl, J. R. Santos-Mallet, S. A. O. Gomes, D. Feder, D. C. Ayres, S. Giorgio and C. L. Cesar, **“Optical Tweezers Force Measurements to Study Parasites Chemotaxis”**, European Conference on Biomedical Optics, Munique 14 a 18 de julho 2009. Poster. Proc. SPIE, Vol. 7367, 73671A (2009); doi:10.1117/12.831480

Capítulo 4

Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM)

4.1 Introdução

A fluorescência de moléculas não é caracterizada somente pelo seu espectro de emissão, mas é caracterizada também pelo seu tempo de vida. Qualquer transferência de energia entre a molécula excitada e o meio em que está inserida muda o tempo de vida da fluorescência. Os elétrons excitados interagem com o meio externo principalmente através de íons, mas também através de dipolos, e essa interação pode mudar o tempo de vida. Isso significa que o tempo de vida de fluorescência é um bom sensor do ambiente químico em torno da molécula fluorescente. A imagem no FLIM é feita atribuindo diferentes cores para cada tempo de vida enquanto o brilho do pixel é proporcional à intensidade da fluorescência. Já que o tempo de vida de fluorescência não depende da concentração da molécula fluorescente, imagens por tempo de vida contêm uma informação direta de qualquer evento envolvendo transferência de energia[58, 59]. Exemplos típicos são o mapeamento de parâmetros celulares tais como pH, concentração de íons e ligação molecular[58, 59]. Cada molécula fluorescente tem

seu próprio tempo de vida. Detectando as diferenças entre os tempos de vida, é possível distinguir até mesmo entre corantes com a mesma emissão de fluorescência bem como identificar autofluorescência das células. Imagens com alta relação sinal-ruído podem ser obtidas utilizando um marcador com um tempo de vida muito longo em comparação com os corantes fluorescentes normalmente utilizados. Quantum Dots, por exemplo, apresentam tempo de vida muito superior ao de moléculas fluorescentes orgânicas e esse fato permite discriminar a emissão dos QDs em relação a emissão dos marcadores orgânicos usando uma medida do tipo time-gated. Da mesma forma terras raras da família dos Lantânídeos, podem ser diferenciadas de outros marcadores fluorescentes pelo tempo de vida extremamente longos, chegando a ms, desses materiais.

4.2 Tempo de Vida da Fluorescência

Antes de emitir um fóton e voltar o estado fundamental, o elétron permanece um determinado tempo no estado excitado. O tempo em que o elétron permanece no estado excitado chamamos de tempo de vida da fluorescência. Se o fluorófluoro é excitado por um pulso muito curto de luz, uma população $n_0(t)$ estará o estado excitado. A população do estado excitado decai com uma taxa $\Gamma + k_{nr}$

$$\frac{dn(t)}{dt} = -(\Gamma + k_{nr})n(t) \quad (4.1)$$

Onde $n(t)$ é o número de elétrons no estado excitado, Γ a taxa de emissão e k_{nr} a taxa de emissão não radioativa. Resolvendo a equação diferencial (4.1)

$$n(t) = n_0 e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (4.2)$$

O tempo de vida da fluorescência τ é definido como o inverso da taxa total de decaimento $(\Gamma + k_{nr})^{-1}$. O sinal medido é a intensidade da fluorescência que

será proporcional ao número de elétrons decaindo para o estado fundamental. A intensidade da fluorescência seguirá o mesmo padrão de decaimento

$$I(t) = I_0 e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (4.3)$$

O tempo de vida da fluorescência é o tempo médio em que os elétrons permanecem no estado excitado. Podemos calcular esse tempo calculando o tempo médio sobre a intensidade da fluorescência, $\langle t \rangle$

$$\langle t \rangle = \frac{\int_0^{\infty} t I(t) dt}{\int_0^{\infty} I(t) dt} = \frac{\int_0^{\infty} t I_0 e^{-\frac{t}{\tau}} dt}{\int_0^{\infty} I_0 e^{-\frac{t}{\tau}} dt} = \frac{\int_0^{\infty} t e^{-\frac{t}{\tau}} dt}{\int_0^{\infty} e^{-\frac{t}{\tau}} dt} \quad (4.4)$$

A integral no denominador é feita diretamente, enquanto a integral numerador fazemos por partes

$$\int_0^{\infty} e^{-\frac{t}{\tau}} dt = \tau \quad (4.5)$$

$$\int_0^{\infty} t e^{-\frac{t}{\tau}} dt = -\int_0^{\infty} -\tau e^{-\frac{t}{\tau}} dt + \left[t e^{-t/\tau} \right]_0^{\infty} = \tau^2 \quad (4.6)$$

O termo entre colchetes em (4.6) é zero nos limites e a integral restante é a mesma que foi feita anteriormente. Portanto o tempo $\langle t \rangle$ fica

$$\langle t \rangle = \frac{\tau^2}{\tau} = \tau \quad (4.7)$$

4.3 Domínio do Tempo x Domínio da Frequência

O tempo de vida da fluorescência pode ser detectado com técnicas denominadas de técnicas no domínio do tempo (DT), onde o tempo do decaimento

é medido diretamente, ou no domínio da frequência (DF) onde se mede o tempo de vida pela diferença de fase entre o sinal de excitação e o sinal de emissão. Os dois domínios estão conectados pela Transformada de Fourier, tornando-os equivalentes em termos de informações. Porém, isto não implica numa equivalência em termos dos aspectos experimentais.

No DT a amostra é excitada com um pulso muito curto de luz, geralmente ordens de grandeza menor que o tempo de vida da fluorescência, e a fluorescência emitida é medida em função do tempo. O tempo de vida é extraído quando a intensidade do sinal atinge o valor de $1/e$ do valor da intensidade no tempo inicial. No DF a amostra é excitada por uma luz modulada senoidal com frequência f , $\omega = 2\pi f$ [60]

$$E(t) = A + B \sin(\omega t) \quad (4.8)$$

Onde $A \geq B$ e a modulação da excitação é dada por B/A . A população do estado excitado é dada por

$$N(t) = a + b \sin(\omega t - \phi) \quad (4.9)$$

O sinal fluorescente será proporcional à população do estado excitado. Supondo o decaimento da fluorescência como (4.3) a equação diferencial dependente do tempo descrevendo a população do estado excitado é

$$\frac{dI(t)}{dt} = -\frac{1}{\tau} I(t) + E(t) \quad (4.10)$$

Substituindo (4.9) na equação diferencial (4.10)

$$b\omega \cos(\omega t - \phi) = -\frac{1}{\tau} [a + b \sin(\omega t - \phi)] + A + B \sin(\omega t) \quad (4.11)$$

Expandindo o $\sin(\omega t - \phi)$ e o $\cos(\omega t - \phi)$ e igualando os termos temos as seguintes equações

$$\omega \cos \phi = \frac{1}{\tau} \sin \phi \quad (4.12)$$

$$\omega \sin \phi + \frac{1}{\tau} \cos \phi = \frac{B}{b} \quad (4.13)$$

$$A - \frac{1}{\tau} a = 0 \quad (4.14)$$

Da equação (4.12) tiramos a relação

$$\tan \phi = \omega \tau \quad (4.15)$$

Elevando ao quadrado as equações (4.12) e (4.13) e adicionando as duas obtemos

$$\omega^2 + \frac{1}{\tau^2} = \frac{B^2}{b^2} \quad (4.16)$$

Utilizando a equação (4.14) obtemos a relação entre o tempo de vida e o fator de demodulação m

$$m = \frac{b/a}{B/A} = \frac{1}{\sqrt{\omega^2 \tau^2 + 1}} \quad (4.17)$$

A maneira mais eficiente de medir um sinal no domínio do tempo é medir a intensidade em um número grande de canais temporais[61]. Para um número grande de canais e uma resolução temporal alta para cada canal, o decaimento temporal pode ser deduzido a partir dos dados com uma relação sinal ruído perto da ideal. “Time-Correlated Single Photon Counting”, “Multichannel Scaler” e “Real-Time Digitising Technique” estão entre as técnicas que utilizam esse modo de aquisição. O método equivalente no domínio da frequência seria excitar a amostras com pulsos de luz e adquirir o espectro completo da amplitude e fase para diferentes frequências simultaneamente. Porém tal técnica não existe no domínio da frequência.

Com alguma informação sobre a amostra é possível modelar o comportamento do sinal emitido e reduzir o número de canais temporais utilizados na medida. Os fótons são detectados em várias janelas temporais sequenciais por

diferentes detectores em paralelo. A eficiência dependerá do modelo, do número de canais e da resolução temporal de cada canal. A técnica no DT que utiliza esse método é “Multigate Photon Counting”. No DF o método equivalente utiliza uma luz modulada para excitar a amostra. A amplitude e a fase do sinal são medidas em um pequeno número de frequências. Diferentes frequências de modulação são obtidas mudando a frequência de excitação ou utilizando harmônicos de uma fonte pulsada. Apenas para excitação com pulsos curtos e alta taxa de repetição um fator de demodulação perto do ideal é atingido.

O sinal também pode ser adquirido sequencialmente. No DT uma janela temporal varre o sinal e grava o tempo de chegada dos fótons. Nesse caso, como a maioria dos fótons não são detectados, pois estão fora da janela de varredura, a eficiência é baixa. Varredura do sinal é utilizada nos “Box car integrators”, “Gated Photon Counters” e “Gated Image Intensifiers”. No DF a frequência da excitação é varrida e a amplitude e fase do sinal são adquiridos em função da frequência.

O equipamento adquirido pelo nosso grupo utiliza a técnica “Time-Correlated Single Photon Counting” [TSCPC], que será apresentada com mais detalhes.

4.4 Time-Correlated Single Photon Counting (TCSPC)

Atualmente TCSPC é a técnica para medida do tempo de vida da fluorescência mais utilizada[58]. Ela se baseia no fato de que para sinais com alta taxa de repetição a intensidade da luz é tão baixa que a probabilidade de detectar mais de um fóton em um período do sinal é muito baixa. A Figura 48 ilustra essa condição

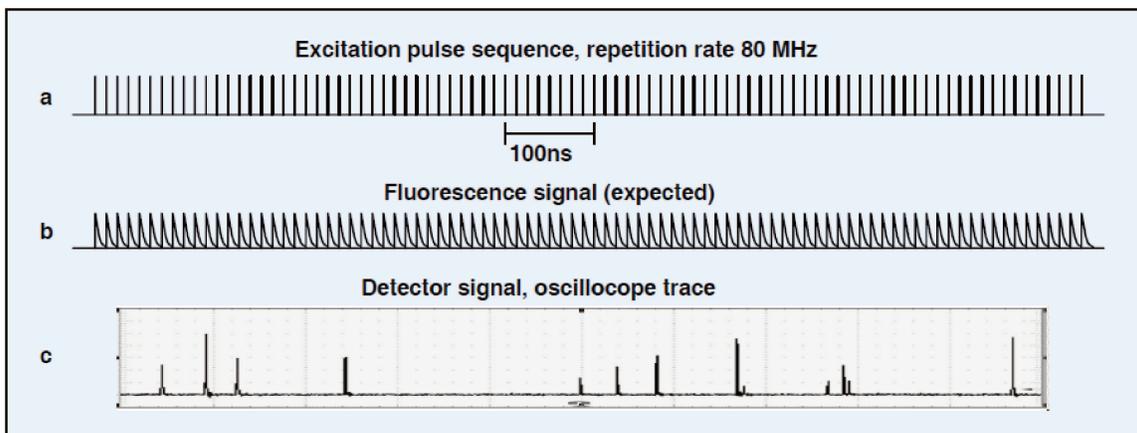


Figura 48 a. Sequência de pulsos laser operando em 80 Mhz, b. Fluorescência esperada emitida para cada pulso de excitação, c. Sinal detectado como sequência de pulsos curtos[12].

Como podemos ver da Figura 48, apesar da alta taxa de repetição do laser de excitação, os fótons detectados geram uma sequência de pulsos muito curtos no detector e não uma sequência contínua como esperado pela forma da onda da fluorescência. Esses pulsos são na verdade fótons únicos do sinal da fluorescência. Sendo assim, esses pulsos de fótons únicos devem ser considerados como uma distribuição de probabilidade de fótons e não mais como uma forma de onda da fluorescência. A Figura 48 mostra a baixa probabilidade de detecção de mais de um fóton em um período de laser. De fato, a taxa de detecção é de 1 fóton para cada 100 pulsos de laser[58]. O princípio de funcionamento da TCSPC é mostrado na Figura 49

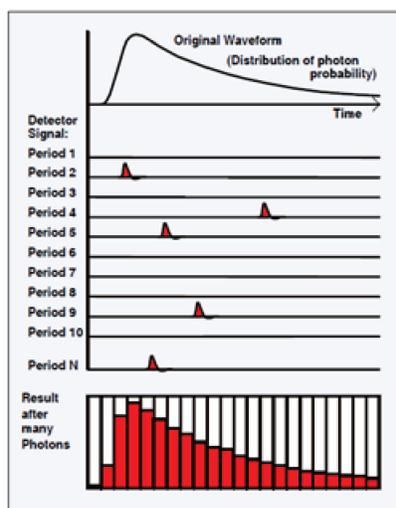


Figura 49 Princípio de funcionamento da TCSPC[12].

Quando um fóton atinge o detector o tempo de chegada em relação ao pulso do período correspondente é medido. Após vários ciclos um número grande de fótons atingiu o detector e cada tempo de chegada é gravado pelo computador. Com esse grande número de fótons é possível construir um histograma com o número de fótons para cada tempo de chegada. Dessa maneira a curva de decaimento da fluorescência pode ser reconstruída a partir desse histograma.

Nas técnicas de contagem de fótons o sinal detectado são sequências randômicas de pulsos correspondendo a detecção de fótons individuais. A intensidade da luz é representada pela densidade dos pulsos e não pela sua amplitude. Os pulsos de um único fóton tem duração menor que 2 ns. A Figura 50 mostra esses pulsos para uma fotomultiplicadora [PMT] modelo R5900 para uma taxa de 10^7 fótons por segundo. A imagem da esquerda mostra os pulsos em uma escala de tempo de 1 ns por divisão e a imagem da direita para uma escala temporal de 100 ns por divisão.

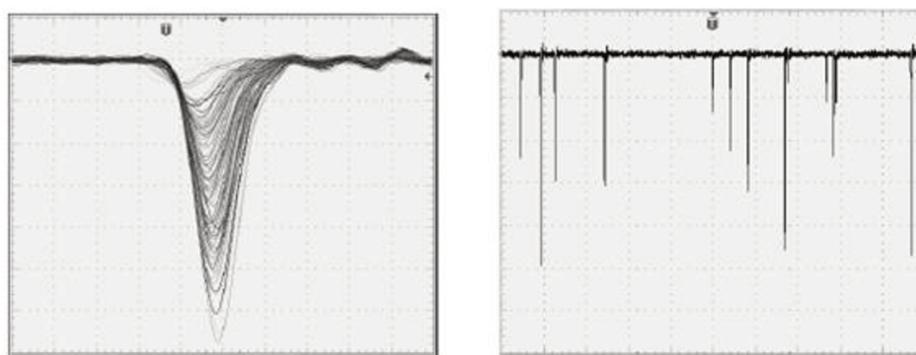


Figura 50 Pulsos de 1 único fóton detectado pela PMT R5900, escala de 1 ns por divisão (esquerda) e 100 ns por divisão (direita)[12].

Técnicas analógicas estão limitadas pela largura de banda do detector. A largura do tempo resposta do instrumento não pode ser menor que a largura do pulso de detecção de um único fóton. Nas técnicas de contagem de fóton esse fato não é o fator limitante na resolução. A resolução nessas técnicas está limitada pela capacidade do detector de diferenciar pulsos de fótons únicos, ou seja, está limitada pela largura do “transit-time spread” do detector. Geralmente, a largura do “transit-time spread” é uma ordem de magnitude menor que a largura do pulso de detecção de um único fóton. Isso significa que para um mesmo detector técnicas

de contagem de fótons oferecem uma resolução temporal e uma largura de banda do sinal maiores do que técnicas analógicas.

Contagem de fótons oferecem outras vantagens sobre técnicas de detecção analógicas. A imagem da Figura 50 mostra que pulsos de um único fóton tem uma considerável variação na amplitude. Como os processos de amplificação na PMT são randômicos, para cada medida, uma amplitude do sinal é obtida. Essa variação contribuirá para o ruído da medida. Esse fenômeno é conhecido como ruído de ganho. Medidas por contagem de fótons estão livres do ruído de ganho já que não utilizam a amplitude do sinal como parâmetro. Ruído eletrônico também não contribui desde que sua amplitude seja menor que a amplitude dos pulsos de fótons. O esquema de um sistema de TCSPC é representado na Figura 51 a seguir

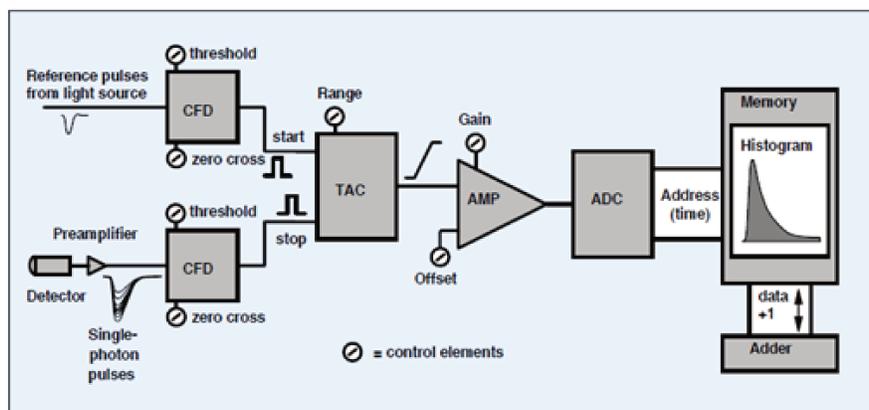


Figura 51 Representação do sistema de TCSPC[12]

O sistema é composto por três blocos distintos. O bloco de detecção que obtém o sinal de uma fotomultiplicadora e a referência do laser (CFD). O bloco que converte o tempo para amplitude (TAC). E o bloco que escreve os dados na memória do computador (ADC). O detector mede os pulsos de fótons individuais. Os pulsos são detectados por um discriminador rápido. Devido a grande variação na amplitude desses pulsos é necessário criar um mecanismo para eliminar essa diferença. Um “Constant Fraction Discriminator” (CFD) é utilizado para esse fim. O CFD é ativado por uma fração constante da amplitude do sinal evitando assim, variação no sinal devido à amplitude do pulso. Essa fração do pulso é conhecida como “zero cross point” e é obtida através da subtração do pulso consigo mesmo

mas atrasado no tempo, como mostrado na Figura 52. Como o zero cross point independe da amplitude do pulso a variação devida às diferenças entre as amplitudes dos pulsos é eliminada.

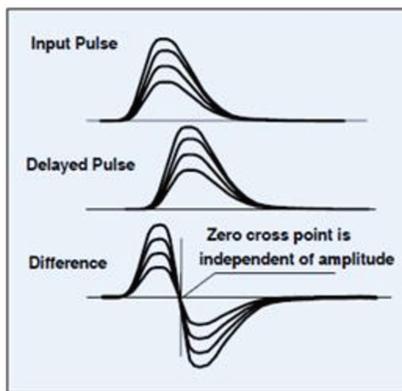


Figura 52 Funcionamento do CFD[12]

Outro CFD também é utilizado para eliminar o efeito da variação da amplitude na detecção do sinal de referência. O sinal é gerado pela própria eletrônica do laser, ou por uma parte do laser refletida para um detector de resposta rápida, e é sincronizado com a geração dos pulsos de luz. Os sinais de ambos os CFDs são enviados para um conversor de tempo em amplitude (TAC) em um esquema de começo e parada. O sinal do fóton serve como começo e o sinal da referência serve como parada. Se fosse o contrário, o TAC poderia ser acionado a partir de um pulso do sinal de referência e ficaria ativado até um fóton ser detectado. O pulso de chegada aciona um capacitor que fica carregando até a chegada do pulso de parada. Se a corrente no intervalo de começo e parada é constante, a voltagem no capacitor será proporcional ao tempo de seu carregamento.

O sinal do TAC é enviado a um conversor analógico-digital [ADC]. O sinal do ADC é o equivalente digital ao tempo de detecção do fóton. O ADC escreve na memória o tempo de chegada de cada fóton, construindo assim a distribuição temporal dos fótons.

Para a construção da imagem o sistema funciona basicamente como um microscópio de varredura a laser convencional. As placas do TCSPC esperam o sinal da unidade de varredura do laser e a partir desses sinais começa a aquisição

da imagem. Nesse caso, porém, ao invés de armazenar somente a intensidade de luz correspondente a cada pixel, o TCSPC armazena também os tempos de chegada de cada fóton. Com isso a reconstrução da imagem é feita atribuindo uma escala de intensidade proporcional à intensidade do sinal e uma escala de cores correspondente ao tempo de vida do sinal naquele pixel. A imagem final é reconstruída em duas etapas. A etapa de aquisição do sinal e a etapa de “fitting” do tempo de vida.

4.5 PMT Espectral

Nas PMTs convencionais, com a presença de um cátodo e um anodo, não há a possibilidade de diferenciar a posição em que o fotoelétron foi gerado, tampouco é possível diferenciar fótons de diferentes comprimentos de onda. Porém se a única placa do anodo for substituída por uma sequência de elementos de anodo individuais, é possível determinar a posição em que o fotoelétron foi gerado no catodo. Se a PMT estiver acoplada com um monocromador o conjunto ganha capacidade de fazer contagem de fótons para diferentes comprimentos de onda simultaneamente. Um detalhe que deve ser levado em conta para utilização desse tipo de PMT é que o sinal non-descanned NDD, varre uma área circular durante a varredura do feixe. Para um único detector, com área maior do que a área de varredura isso não é um problema, mas para o acoplamento em um monocromador com fenda vertical é um problema. A solução da Becker&Hickl foi a utilização de um cabo de fibras ópticas com uma extremidade na seção circular e a outra extremidade na geometria de uma fenda vertical, coincidindo com a fenda vertical da entrada do monocromador, conforme mostra a figura 32, onde se pode ver tanto o detector espectral já acoplado no mini monocromador quanto o cabo de fibras ópticas.



Figura 53 Esquerda: foto do detector multiespectral. Direita: foto da fibra de acoplamento mostrando a ponta retangular e a outra ponta circular.

O detector utilizado no nosso sistema de FLIM espectral é um PML-16 (Becker&Hickl) que possuem 16 canais com 20 nm de resolução cada. A resolução temporal instrumental é de 150 a 250 ps FWHM[12].

4.6 Fontes de laser para TCSPC

Uma fonte de laser para ser utilizada para contagem de fótons tem que ser pulsada. O sistema precisa de uma referência para poder medir o tempo do fóton em relação ao pulso do laser. A própria eletrônica do laser pode fornecer a taxa de repetição dos pulsos ou pode ser utilizada uma porção do laser refletida para um fotodetector de resposta rápida.

Lasers com pulsos de femtosegundos ou picosegundos de duração do pulso podem ser utilizados. Porém a taxa de repetição tem que ser escolhida com critério. A taxa de repetição do laser não poder ser mais rápida do que o tempo de vida da fluorescência. Se um próximo pulso de laser atingir a molécula antes de todos os elétrons excitados terem decaído, o tempo de vida medido não será o correto. Geralmente o dado fornecido pelo fabricante do laser é a taxa de repetição, uma frequência, e o tempo de vida das moléculas é dado em unidades de tempo. É fácil transformar a frequência do laser em um período de repetição tomando o inverso do valor da frequência. A Tabela 1 mostra taxas de repetições dos lasers disponíveis em nosso sistema e o período correspondente

Taxa de Repetição (MHz)	Período (ns)
20	50
50	20
80	12.5

Tabela 1 Taxas de repetição dos lasers e período correspondente.

4.7 Imagens de FLIM

O sistema de FLIM é composta por 3 partes distintas. O laser de excitação, o detector de contagem de fótons e a placa de computador responsável por controlar o detector e armazenar os dados medidos. Esse sistema é acoplado em um microscópio de varredura a laser. Para a construção da imagem as placas do TCSPC esperam o sinal da unidade de varredura do laser e a partir desses sinais começam a aquisição da imagem. Porém, nesse caso, ao invés de armazenar somente a intensidade de luz correspondente a cada pixel, o TCSPC armazena também os tempos de chegada de cada fóton. Com isso a reconstrução da imagem é feita atribuindo uma escala de intensidade proporcional à intensidade do sinal e uma escala de cores correspondente ao tempo de vida do sinal em cada pixel. A imagem final é reconstruída em duas etapas. A etapa de aquisição do sinal e a etapa de ajuste do tempo de vida. A imagem da Figura 54 mostra a tela do programa da etapa de aquisição utilizando um corte de tendão de camundongo como amostra.

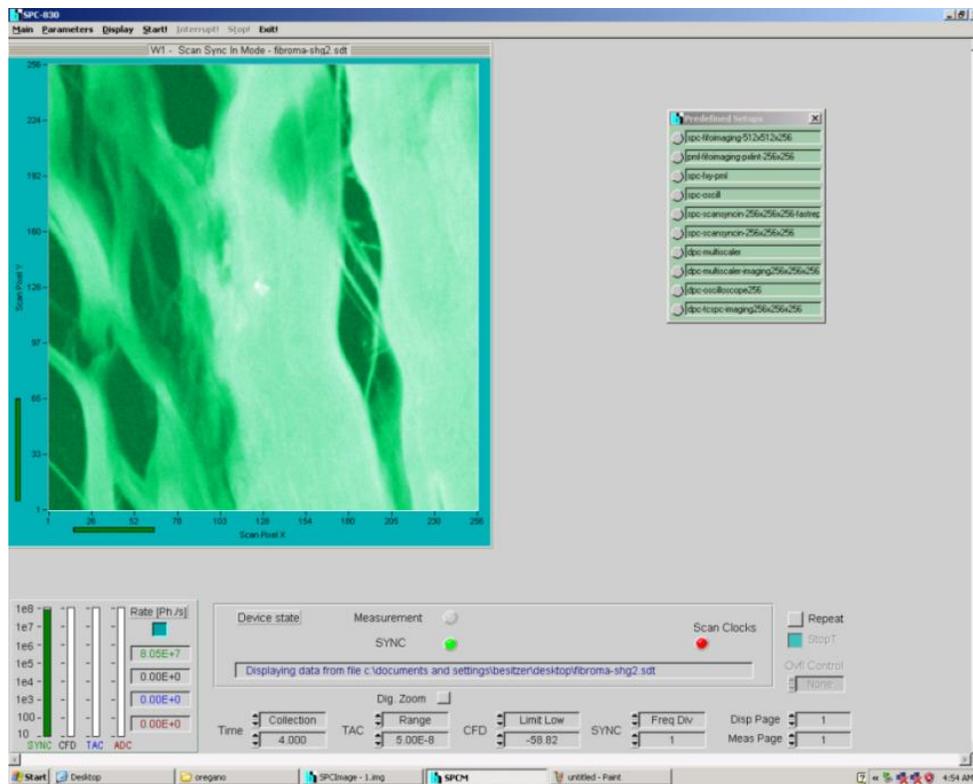


Figura 54 Programa para aquisição da imagem de FLIM

Podemos ver na imagem da Figura 54 as principais características do programa de aquisição de imagens. No canto superior esquerdo está o local onde será formada a imagem de intensidade da fluorescência. Logo abaixo, onde pode-se ver SYNC, CFD, TAC e ADC são as contagens referentes a esses parâmetros. SYNC se refere ao sinal de sincronização que nesse caso é a própria taxa de repetição do laser. Após a aquisição da imagem é necessário enviá-la para o programa que calcula o tempo de vida e aplica a escala de cores, o SPCImage. A tela desse programa é mostrada na Figura 55.

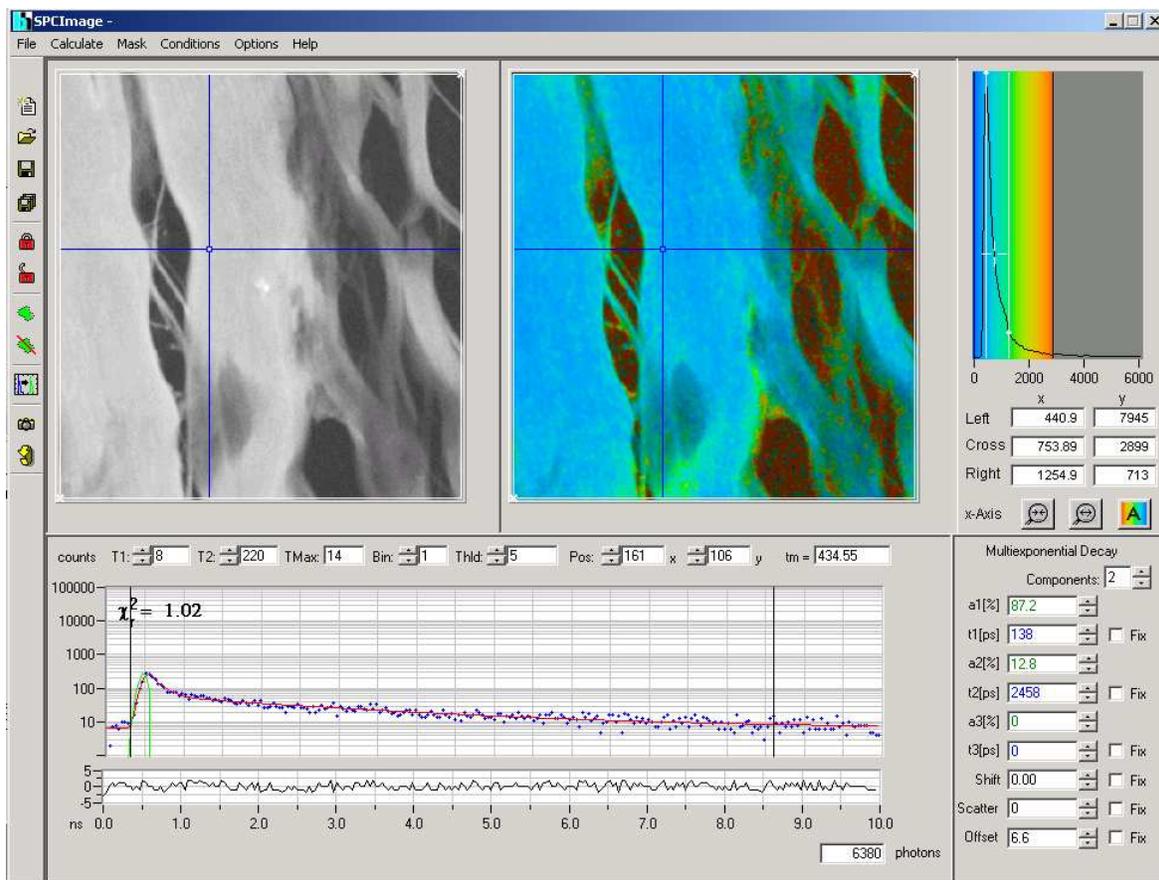


Figura 55 Tela do programa SPCImage

O SPCImage carrega a imagem de intensidade em escala de cinza. Na parte inferior podemos ver os parâmetros de ajuste para o decaimento da fluorescência para o pixel selecionado. Os pontos em azul são o histograma do tempo de vida a partir dos números de fótons detectados. A linha em vermelho é o “fitting” da curva a partir dos parâmetros vistos no canto inferior direito. Os parâmetros $a_1(\%)$ e $a_2(\%)$ representam a porcentagem das respectivas componentes temporais $t_1(\text{ps})$ e $t_2(\text{ps})$. Nesse caso temos 87.2% da componente t_1 com 138 ps e 12.8% da componente t_2 com 2458 ps. Pode-se ainda selecionar uma terceira componente para o tempo de vida se for o caso. Logo acima do quadro com os parâmetros do “fitting”, no canto superior direito, encontra-se o histograma dos tempos de vida em escala de cores. Nesse caso os tempos de vida mais curtos têm cores próximas do azul, enquanto os tempos de vida mais longos, cores próximas do vermelho. É possível manipular essa escala de cor para melhorar o contraste dentro da distribuição dos tempos de vida do histograma,

inclusive podendo inverter a sequência de cores, começando no vermelho e terminando no azul. Outra possibilidade é definir uma sequência de cores discreta, atribuindo azul aos tempos de vida de 100 a 500 ps e verde aos tempos de vida de 500 a 1000 ps por exemplo. Além das opções já citadas, o programa permite a visualização da imagem a partir de determinadas escala de cores, como por exemplo, a partir apenas do tempo t_1 ou da componente a_2 . A Figura 56 mostra os dois tipos diferentes de escala de cores obtidos mostrando apenas como o tempo t_1 e o t_2 variam, respectivamente.

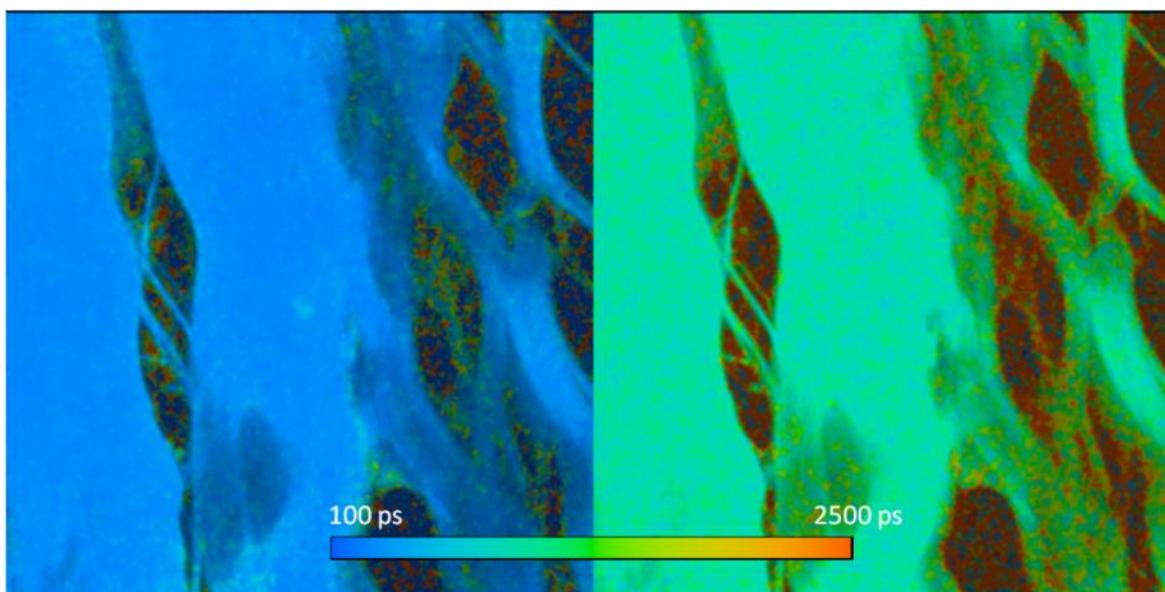


Figura 56 Imagens com dos diferentes tempos de vida t_1 (esquerda) e t_2 (direita)

Uma outra opção de imagem que o programa oferece é o “time gating”. Nessa opção podemos selecionar os fótons pelo seu tempo de vida e reconstruir a imagem apenas a partir desses fótons. Além de poder diferenciar regiões com tempo de vida de fluorescência bem diferentes, é possível diferenciar sinais que possuem tempo de vida bem diferentes. No caso do colágeno presente no tendão, o laser de Ti:Safira excita tanto a fluorescência por absorção de dois fótons quanto o SHG. O SHG, porém, é um processo coerente e instantâneo, enquanto a fluorescência possui um tempo de vida mais longo. Ao eliminarmos os fótons que possuem um tempo de chegada mais longo estamos eliminando os fótons da fluorescência. Podemos observar esse feito na Figura 57 abaixo.

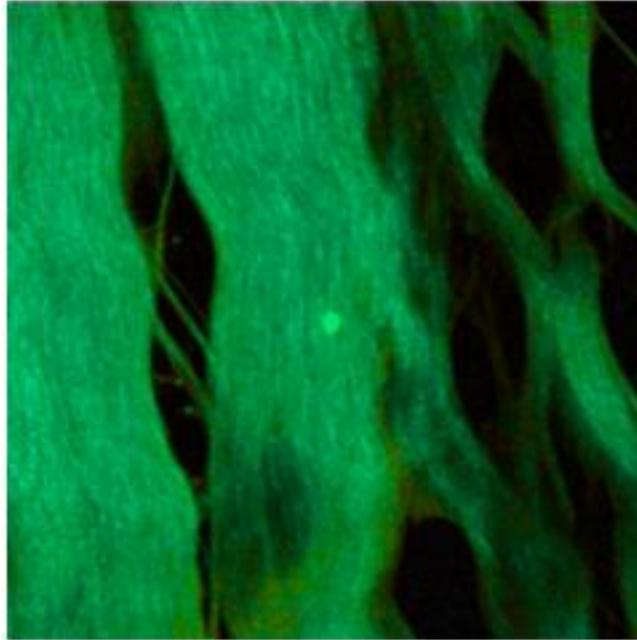


Figura 57 Imagem do colágeno por “time gating”

A diferença da imagem reconstruída levando em conta só os fótons de tempo de vida mais curto é clara ao se comparar a imagem do colágeno da Figura 57 com as figuras anteriores. Quando se elimina os fótons de fluorescência pelo “time gating” estamos vendo na reconstrução da imagem apenas os fótons referentes ao SHG e portanto podemos observar a textura fibrosa do tecido. Isso já foi observado em outras imagens adquiridas pelo grupo utilizando outros métodos. A Figura 58 mostra essa imagem.

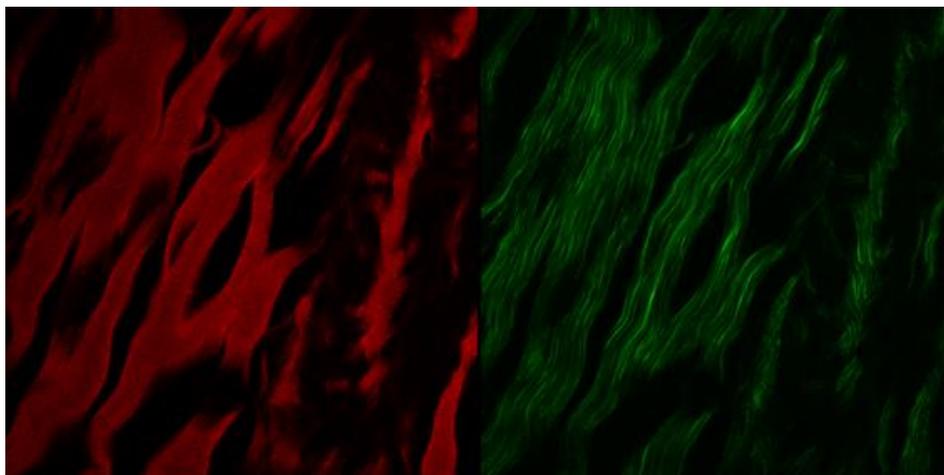


Figura 58 Imagem de fluorescência (esquerda) e SHG (direita)

O comportamento fibroso também está presente na imagem da Figura 58 por SHG, só que nesse caso, a imagem foi adquirida utilizando um filtro passa

banda para eliminar o sinal de fluorescência que chegava na fotomultiplicadora. Pela comparação entre as imagens da Figura 57 e da Figura 58 podemos concluir que a técnica de “time gating” elimina a utilização de um filtro para limpar o sinal do SHG, desde de que o sinal de fluorescência em questão tenha um tempo de vida mais longo do que o SHG. Esse fato pode ser aplicado a qualquer amostra que gera mais de um sinal, desde que esses sinais tenham tempos de vida que possam ser resolvidos pelo sistema. Podemos usar o time gating para discriminar todos os sinais gerados por óptica não linear, coerentes e instantâneos, tais como SHG, THG, CARS, etc. Um exemplo disso está na imagem de corte de parafina de aorta obtida por FLIM. Nessa imagem as cores em vermelho são os tempos de vida mais longos. É possível observar os diferentes tempos de vida das diferentes partes do tecido. Os tempos de vida mais longos são das fibras elásticas coradas com eosina-hematoxilina. As partes em azul, com os tempos de vida bem curtos, são devidas ao SHG do colágeno entre as fibras de elastina e da capa envoltória do tecido. Essa imagem foi a primeira imagem de FLIM do Brasil e do equipamento do grupo.

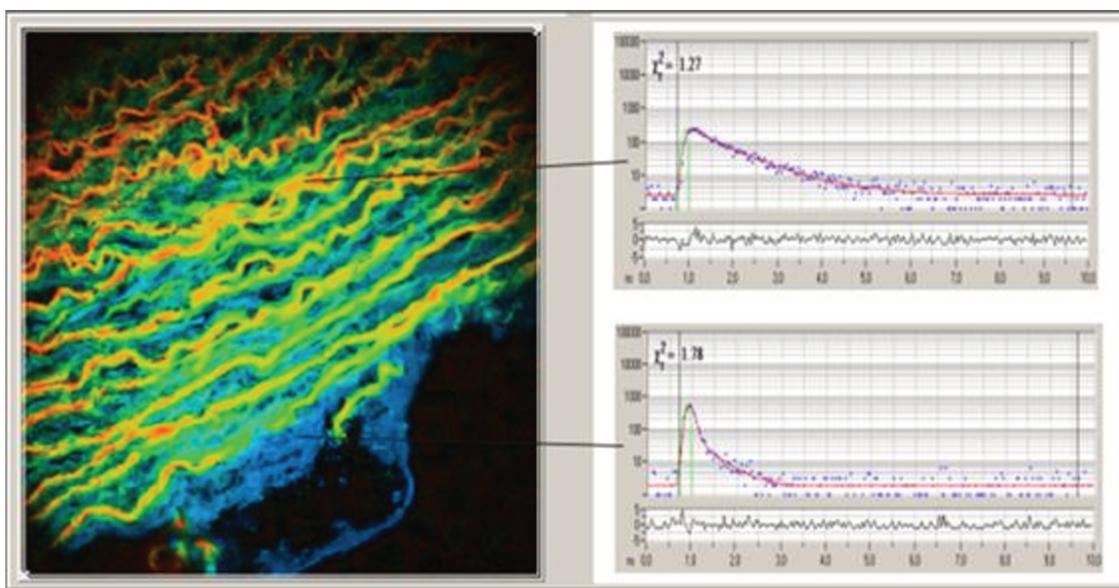


Figura 59 FLIM de um corte de parafina de aorta

Em resumo, o FLIM adiciona a capacidade de discriminação do ambiente químico à plataforma integrada. Essa característica é extremamente importante no estudo de processos biológicos. Dessa forma, integrado ao microscópio confocal

multifóton, a plataforma tem a capacidade de fazer imagens espectrais de fluorescência, SHG/THG e FLIM. Como veremos no Capítulo 7 de aplicações, o FLIM possibilita a análise de diferentes estágios metabólicos e também permite discriminação de tipos diferentes de câncer. Além do fato de que o tempo de vida do sinal pode ser útil quando os sinais detectados possuem comprimentos de onda semelhante. Como por exemplo, quando a amostra apresentar fluorescência próxima do comprimento de onda do SHG. Como o SHG é emitido instantaneamente é fácil discriminá-lo da fluorescência com o FLIM. O FLIM também é uma ótima ferramenta para estudo de fenômenos de superfície, como veremos no Capítulo 5. Utilizaremos o FLIM para medir o tempo de vida da fluorescência de quantum dots coloidais e quantum dots em matriz de vidro. Devido a forte interação entre o QD e a matriz de vidro, o tempo de vida da fluorescência cai drasticamente. Ao contrário do QD coloidal, isolado pela cap layer quase não há interação externa, apresentando tempos de vida mais longos.

Capítulo 5

Quantum Dots

5.1 Introdução

Quantum dots são nanocristais de semicondutores menores do que o raio de Bohr a_B do semicondutor “bulk” com diâmetros na escala de 1 a 10 nm. Nessa escala os elétrons e buracos sofrem um forte confinamento quântico, que modifica as propriedades ópticas desses materiais. Controlando seu tamanho é possível ajustar seus picos de absorção e emissão. De modo geral, quanto menor a partícula, mais para o azul a sua absorção se desloca. O primeiro artigo tratando sobre o assunto foi de Ekimov et al [62] em 1981, relatando sobre absorção de cristais microscópicos de CuCl em matriz de vidro. O primeiro paper sobre quantum dots coloidais data de 1982 de Brus et al[63] sobre recombinação de elétron-buraco em coloides de CdS. Apenas em 1988 Reed cunha o termo quantum dot[64].

Desde o seu surgimento quantum dots atraíram grande atenção da comunidade científica pelos seus fenômenos de confinamento em 3 dimensões

tanto de elétrons quanto de buracos. Desde então, diversos grupos internacionais demonstraram a possibilidade de modificar as propriedades ópticas de várias famílias de semicondutores II-VI e III-V através do confinamento quântico, evidenciado pelos espectros de absorção dos materiais. Diversas aplicações surgiram em computação, biologia, dispositivos fotovoltaicos, leds, displays, fotodetectores, entre outros. Para aplicações biofotônicas deseja-se controlar o comprimento de onda da emissão do ultravioleta até o limite de detecção das fotomultiplicadoras comerciais em torno de 1000 nm. Quanto menor a largura da banda de emissão mais estruturas celulares podem ser marcadas com diferentes cores. Esses QDs são funcionalizados de forma a se ligarem especificamente a determinadas proteínas. Desde então se demonstrou a existência de quantum dots com eficiências de fluorescência da mesma ordem e maiores do que a dos marcadores orgânicos comumente utilizados em microscopia de fluorescência. A partir de 1999-2000 os quantum dots coloidais (com eficiências de fluorescência comparáveis e as larguras de linha de emissão um pouco menores do que a dos marcadores convencionais) começaram a substituir os marcadores orgânicos comumente utilizados em microscopia de fluorescência e confocal, simples e multifóton. A ausência da fotodegradação permitiu que amostras preparadas fossem expostas à luz e que fossem realizados estudos dinâmicos nos sistemas biológicos, pois foi possível acompanhar a evolução da fluorescência no tempo por horas seguidas, o que era impossível anteriormente usando corantes orgânicos cuja fluorescência só perdura por alguns minutos. Outra grande vantagem dos QDs vem do fato de que um único laser pode excitar diferentes bandas de emissão nos quantum dots enquanto as moléculas orgânicas exigem mais de uma fonte de luz de excitação. Finalmente a citotoxicidade dos quantum dots é praticamente inexistente.

Entretanto, a eficiência de fluorescência dos primeiros quantum dots era muito baixa devido à presença de defeitos de superfície que capturavam os portadores fotoexcitados impedindo que o processo de fluorescência ocorresse. Só a partir de 1999 esse problema foi, internacionalmente, resolvido, passando a

superfície dos dots e exportando os defeitos para uma camada mais externa, como mostra a Figura 60.

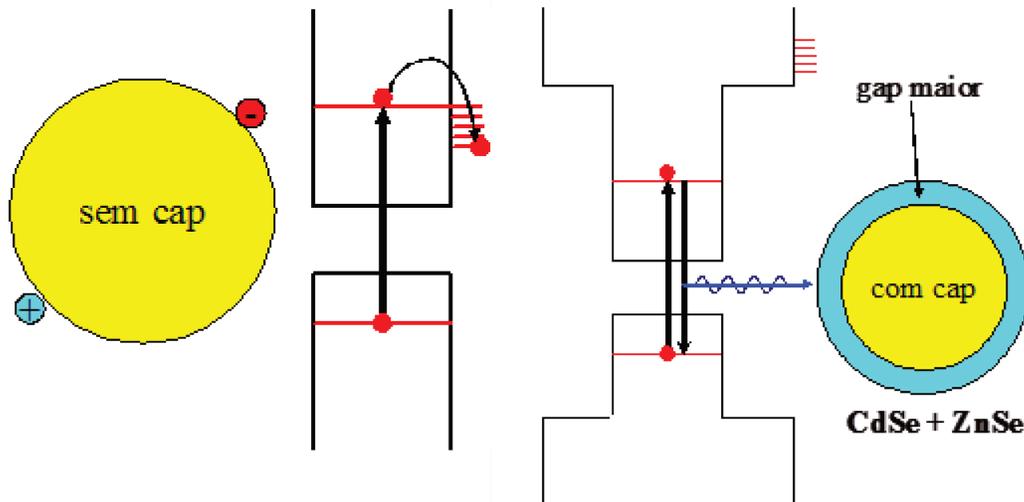


Figura 60 (esquerda) Processo de fluorescência em quantum dots não passivados. Elétron aprisionado na interface não gera fluorescência. (direita) Nos quantum dots passivados os elétrons não são capturados pelos defeitos de superfície exportados para superfície e externa com níveis de energia superiores aos dos estados confinados

Agora faremos um histórico sobre a trajetória do nosso grupo com Quantum Dots.

Histórico do grupo na área de Quantum Dots.

O Grupo de Fibras Ópticas do Instituto de Física Gleb Wataghin da UNICAMP iniciou-se em 1975 através de um convênio com o CPqD-Telebrás com a missão de desenvolver ciência e tecnologia de fibras ópticas no Brasil, uma área que se mostrava promissora no resto do mundo. Vale lembrar que a primeira fibra óptica com atenuação abaixo de 20 dB/km foi demonstrada por cientistas da Corning em 1970 e que as pesquisas para desenvolver sistemas de comunicações ópticas se iniciam em 1975 no mundo. Apenas em 1977 as empresas de comunicação iniciaram pesquisas de campo com sistemas de comunicações ópticas e o interesse em fibras ópticas monomodo foi despertado por conta da baixa atenuação dessas fibras. As datas dos principais eventos internacionais nessa área mostra o pioneirismo do trabalho desse grupo no Brasil. Esse foi um

exemplo de grande sucesso no desenvolvimento e transferência de tecnologia, que se inicia na UNICAMP, é transferido para o CPqD-Telebrás e finalmente, em 1983, para a empresa ABC-Xtal. Os grandes problemas tecnológicos enfrentados por esse grupo entre 1975 e 1985 foram o desenvolvimento de fibras monomodo e “dispersion shift fiber” (DSF), com zero de dispersão em 1.5 μm coincidindo com o mínimo da atenuação das fibras. Em 1986 o Grupo de Fibras Ópticas foi totalmente renovado por conta da transferência dos pesquisadores para CPqD e Indústria e o retorno aos EUA dos professores indianos. O novo grupo foi composto pelos jovens doutores, por ordem de entrada no grupo, Luiz Carlos Barbosa, Carlos Henrique de Brito Cruz, Hugo Luis Fragnito e Carlos Lenz Cesar, o orientador dessa tese. Em 1986 os grandes desafios na área de comunicações ópticas migraram dos elementos ópticos passivos, como as fibras, para elementos ópticos ativos, como os amplificadores ópticos, usando fibras dopadas com Érbio, e materiais para chaveamento ópticos ultra-rápidos. Sistemas de banda larga como o Wavelength Division Multiplexing [WDM] e Dense WDM [DWDM] são desenvolvimentos já da década de 1990. Os professores Brito, Fragnito e Lenz fizeram pós-doutorado no AT&T Bell Laboratories em Holmdel, NJ, e em 1990 o grupo voltou a se reunir na UNICAMP.

Dentro desse contexto houve uma decisão estratégica do grupo de apostar nos sistemas amplificados de banda larga e nos quantum dots como materiais promissores para chaveamento ópticos ultra-rápidos. A busca era por um material com alta não linearidade óptica mas com tempo de resposta ultra-rápido e os quantum dots representavam o melhor compromisso entre a magnitude da não linearidade e tempo de resposta curto, na faixa de pico-segundos. Por outro lado, os vidros dopados com quantum dots formavam um material compatível com fibras ópticas. O Prof. Barbosa, o braço de materiais do grupo, conseguiu produzir vidros dopados com quantum dots de CdTe em 1990, o segundo grupo no mundo após o grupo do Prof. Peyghambarian da Universidade de Arizona em Tucson, e o primeiro a produzir vidros dopados com quantum dots de PbTe no mundo, o que levava o pico de absorção para a região de 1,5 μm coincidindo com a janela de comprimento de onda das comunicações ópticas modernas. Muitos trabalhos

relativos aos quantum dots foram publicados pelo grupo assim como muitas teses de mestrado e doutorado foram defendidas desde 1990.

A tese do Carlos Oliveira[65] foi um marco no contexto da física do confinamento quântico em quantum dots de CdTe abandonando a aproximação de massa efetiva e utilizando o método $\vec{k} \cdot \vec{p}$ de Kane para cálculo dos níveis confinados nessas estruturas quânticas. Nessa tese se mostrou como era possível simplesmente incluir as não parabolicidades das bandas da relação de dispersão de Kane para extrair os níveis confinados da banda de condução, assim como mostrou a necessidade de misturar os buracos pesados e leves para o cálculo do confinamento na banda de valência. Já a tese do Gaston Tudury[66] foi o marco para o cálculo do confinamento quântico em quantum dots de PbTe, de band gap muito pequeno. Além disso o gap desse material ocorre no ponto X, fora do centro da zona de Brillouin em $\vec{k} = 0$. Também foi na tese do Gaston Tudury que percebeu-se que o comportamento dos níveis confinados com a temperatura estava longe do esperado teoricamente. Esse resultado foi atribuído ao papel do stress da matriz vítrea sobre os quantum dots, devido ao grande descasamento dos coeficientes de dilatação vidro/semicondutor.

Apesar do envolvimento do Prof. Lenz com biofotônica, especialmente na área de pinças ópticas, não foram as propriedades de emissão dos quantum dots coloidais utilizadas como marcadores fluorescentes, que incentivou o trabalho com os sistemas coloidais, mas sim a possibilidade de utilizá-los como uma amostra comparativa aos vidros dopados com quantum dots, devido a ausência de stress devido ao descasamento de coeficientes de dilatação térmica para explicar os resultados do Gaston Tudury. Apesar da tese do Gaston ter sido defendida em 2001 os resultados em função da temperatura foram obtidos em 1998, por isso, o desenvolvimento da síntese de quantum dots coloidais se inicia no grupo em 1999. Desde então o grupo já produziu quantum dots coloidais dos semicondutores: CdSe; PbSe; PbS; PbTe; HgSe e HgTe. Dificuldades técnicas, entretanto, não permitiram a comparação dos vidros dopados com quantum dots versus quantum dots coloidais até essa tese. Uma vez desenvolvida a capacidade de produção de quantum dots coloidais o grupo também decidiu aplicá-los como

marcadores fluorescentes na área de biofotônica, que envolve outros aspectos como eficiência da fluorescência e seus tempos de vida, eliminação de traps de superfície através de passivação e capeamento das mesmas, assim como bioconjugação dos quantum dots para marcação de proteínas específicas. A Figura 61 mostra os resultados da tese de mestrado do Diogo Almeida com quantum dots coloidais fluorescendo do azul ao vermelho, à medida que os quantum dots crescem de tamanho com o tempo de tratamento térmico.

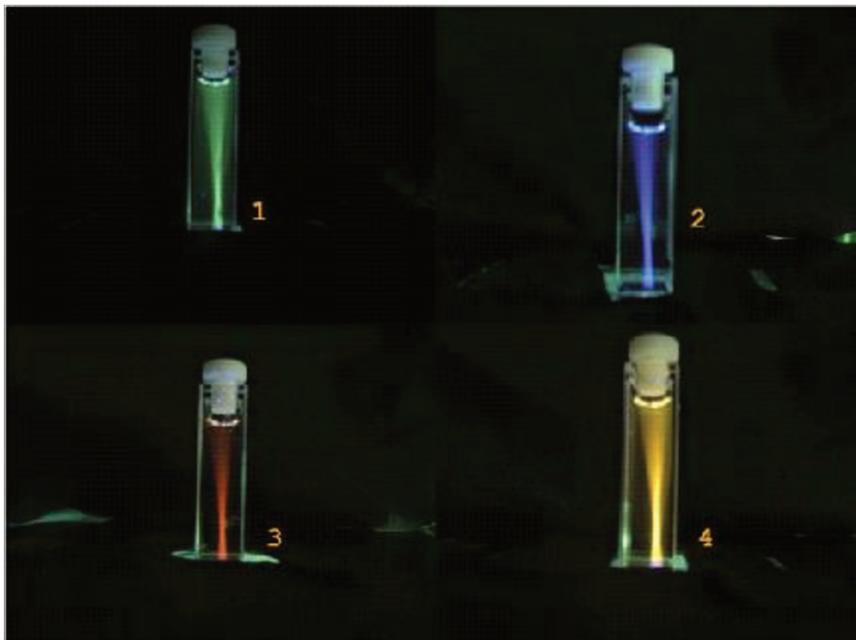


Figura 61 Solução de quantum dots coloidais de CdTe produzidos na UNICAMP fluorescendo do azul ao vermelho demonstrando controle do tamanho e boa passivação da superfície dos mesmos.

Em 2007 encontramos outra evidência forte do papel importante do stress pelo descasamento de coeficiente de dilatação térmica vidro/semicondutor nos quantum dots de CdTe quando observamos uma transição de fase não explicada por variação de temperatura mas sim por variação de stress[67]. Nessa tese conseguimos finalmente comparar os vidros dopados com quantum dots de CdTe com quantum dots coloidais de CdTe com mesmo pico de absorção e confirmamos tanto o resultado do Gaston quanto os da transição de fase de Moreira, estabelecendo de vez a importância do stress induzido pelo descasamento de coeficiente de dilatação térmica em quantum dots.

5.2 Teses do Grupo na Área de QDs

As tabelas abaixo mostram as teses de mestrado e doutorado defendidas desde 1990 dentro do grupo organizadas em vidros dopados com quantum dots de CdTe, heteroestruturas de PbTe e quantum dots coloidais. Essas teses estão disponíveis através do site <http://portal.ifi.unicamp.br/>. No portal do Instituto de Física clicar em biblioteca e logo a seguir clicar em teses e dissertações UNICAMP. Além das teses existem mais de 40 publicações do grupo relativas aos quantum dots em vidros e coloidais listadas no final do capítulo

Teses de doutorado em vidros dopados com Quantum Dots de CdTe

	Orientado	Ano	Título	Orientador
1	Janúncio Afonso de Medeiros Neto	1992	Desenvolvimento e caracterização de nanoestruturas do tipo $CdTe_xS_{1-x}$ em vidros borosilicatos	Luiz Carlos Barbosa
2	Miriam Regina Xavier de Barros	1991	Geração de pulsos ultracurtos e estudo de relaxações rápidas em vidros dopados com $CdTe_{1-x}S_x$	Carlos Henrique de Brito Cruz
3	José Manoel Martin Rios	1993	Estudo de relaxações ultra-rápidas em vidros dopados com CdTe	Hugo Luis Fragnito
4	Sérgio Tsuda	1994	Espectroscopia de femtossegundos em vidros dopados com CdS_xSe_{1-x} e pontos quânticos de CdTe	Carlos Henrique de Brito Cruz
5	Carlos Roberto Mendes de Oliveira	1995	Estudo de Confinamento Quântico em Semicondutores II-VI: Poços Quânticos e Pontos Quânticos	Carlos Lenz Cesar
6	Victor Ciro Solano Reynoso	1996	Estudo do controle do crescimento de nanoestruturas semicondutoras do tipo CdTe e CdTeS em matrizes vítreas borosilicatos	Luiz Carlos Barbosa
7	Ricardo Enrique Marotti Priero	1998	Dinâmica de femtossegundos em pontos quânticos de CdTe	Carlos Henrique de Brito Cruz
8	Marcela Leal Redigolo	2002	Caracterização óptica de pontos quânticos de CdTe em matriz vítrea	Carlos Henrique de Brito Cruz
9	Lázaro Aurélio Padilha Júnior	2006	Estudo de fenômenos ópticos ultra-rápidos lineares e não-lineares em pontos quânticos semicondutores	Carlos Henrique de Brito Cruz

Teses de Doutorado em heteroestruturas com Quantum Dots de PbTe

	Orientado	Ano	Título	Orientador
1	Raul Fernando Cuevas Rojas	1998	Fabricação e caracterização de vidros dopados com quantum dots de PbTe	Luiz Carlos Barbosa
2	Gastón Esteban Tudury	2001	Medidas de Propriedades Não Lineares Resolvidas no Tempo em Vidros Dopados com Pontos Quânticos Semicondutores	Carlos Lenz Cesar
3	Eugenio Rodriguez Gonzalez	2004	Fabricação de multicamadas de quantum dots de PbTe por laser ablation	Luiz Carlos Barbosa

Teses de mestrado em vidros dopados com Quantum Dots de CdTe

	Orientado	Ano	Título	Orientador
1	Alexandre Silva Duarte	1993	Desenvolvimento de um sistema de medição do índice de refração não linear	Hugo Luis Fragnito
3	Walter Americo Arellano Espinoza	1996	Absorcao optica e fotoluminescencia em pontos quanticos de CdTe em vidros dopados	Ana Maria de Paula
2	Marcela Leal Redigolo	1998	Fotoluminescência resolvida no tempo em pontos quânticos de CdTe	Carlos Henrique de Brito Cruz
3	Cristiane Oliveira de Faria	2000	Simulação do Crescimento de Pontos Quânticos Semicondutores em Vidros	Carlos Lenz Cesar
4	Vagner Luiz da Silva	2005	Medidas de lente termica em vidros borossilicato com pontos quanticos de CdTe	Antonio Manoel Mansanares
5	Max Erik Soffner	2005	Efeito anomalo nas medidas de lente termica em vidros com pontos quanticos de CdTe	Antonio Manoel Mansanares

Teses de mestrado em Quantum Dots coloidais

	Orientado	Ano	Título	Orientador
1	Antônio Álvaro Ranha Neves	2002	Nanocristais Coloidais de Semicondutores II - VI e IV-VI	Carlos Lenz Cesar
2	Wendel Lopes Moreira	2005	Síntese e Estabilização de Pontos Quânticos Coloidais de Semicondutores II-VI e IV-VI	Carlos Lenz Cesar
3	Gilberto Júnior Jacob	2005	Produção e Caracterização de Fibras Ópticas de Vidros Teluritos Dopadas com Quantum Dots Semicondutores de PbTe	Carlos Lenz Cesar
4	Diogo Burigo Almeida	2008	Pontos quânticos coloidais de semicondutores II-VI encapsulados com SiO ₂	Carlos Lenz Cesar

O objetivo desse capítulo é apresentar os nossos resultados relativos aos quantum dots tanto em vidros quanto coloidais com excessão dos resultados de FCS, que serão descritos nos capítulos devotados aos mesmos. O modelo de confinamento quântico será rediscutido e apresentaremos nossos resultados com um método heurístico para cálculo de confinamento quântico. Medidas de emissão e tempo de vida da fluorescência em função da temperatura em quantum dots coloidais de CdTe serão comparadas com novas medidas nos mesmos vidros dopados com quantum dots de CdTe do trabalho de Moreira et al [67] para confirmar a transição de fase e que a mesma é realmente induzida pelo stress devido ao descasamento de coeficiente de dilatação térmica vidro/semicondutor. Também mostramos o comportamento da emissão em função da temperatura nos dois casos e mostramos a validade da suposição da tese do Gaston Tudury sobre

os efeitos da matriz vítrea sobre o confinamento. Esses resultados mostram claramente que os modelos de confinamento só devem ser comparados aos resultados experimentais em quantum dots coloidais, livres dos efeitos de stress da matriz hospedeira dos quantum dots.

Para tanto iniciamos o capítulo revendo os modelos de confinamento quântico parabólicos da partícula presa em uma caixa esférica. Logo a seguir reproduzimos a metodologia $\vec{k} \cdot \vec{p}$ e discutimos a validade dos modelos para o tamanho das nanopartículas obtidas atualmente, comparando as bandas de energia do bulk extraídas do método $\vec{k} \cdot \vec{p}$ com as bandas calculadas, e observadas experimentalmente, com métodos mais sofisticados, como o LDA -1/2. A comparação mostra claramente os limites de validade da metodologia $\vec{k} \cdot \vec{p}$ e que nossos quantum dots são pequenos demais para a validade do modelo $\vec{k} \cdot \vec{p}$, que tende a superestimar o confinamento quântico. Nesse ponto apresentamos o método heurístico desenvolvido nessa tese para cálculo dos níveis confinados. A seguir apresentamos os resultados experimentais da emissão de quantum dots coloidais e em vidros em função da temperatura confirmando a transição de fase observada por Moreira et al (2007) e o papel do stress da tese do Gaston Tudury.

5.3 Cálculo dos Níveis de Energia

5.3.1 Modelo parabólico de partícula em uma caixa:

O primeiro modelo de confinamento quântico nos quantum dots foi o de uma partícula com massa igual à massa efetiva no fundo/topo das bandas de um semicondutor presa em uma caixa, com potencial do tipo:

$$V_{esf}(\vec{r}) = \begin{cases} 0 & |r| < a \\ \infty & |r| \geq a \end{cases} \quad (5.1)$$

onde a é o raio do quantum dot.

Esse modelo, válido apenas para energias de confinamento muito pequenas, pode ser justificado no contexto do teorema de Bloch para um semicondutor com simetria cúbica.

Para um cristal infinito, bulk, o Hamiltoniano do sistema pode ser escrito como:

$$\left[\frac{\hat{p}^2}{2m_0} + V_{per}(\vec{r}) \right] \Psi_n(\vec{r}) = E_n \Psi_n(\vec{r}) \quad (5.2)$$

onde E_n é a energia para a banda n , $\Psi_n(\vec{r})$ a função de onda dessa banda, $V_{per}(\vec{r})$ é o potencial com periodicidade da rede cristalina e $\hat{p} = -i\hbar\nabla$ é o operador momento e $\frac{\hat{p}^2}{2m_0}$ é o operador energia cinética. O teorema de Bloch garante que a função de onda pode ser expressa como o produto de uma onda plana por uma função periódica na forma $\psi_n(\vec{r}) = e^{i\vec{k}\cdot\vec{r}} u_{nk}(\vec{r})$, onde as funções periódicas $u_{nk}(\vec{r})$ são chamadas funções de Bloch. Aplicando o operador energia cinética nesse produto temos:

$$\frac{\hat{p}^2}{2m_0} \psi_n(\vec{r}) = e^{i\vec{k}\cdot\vec{r}} \left[\frac{\hat{p}^2}{2m_0} + \frac{\hbar^2 k^2}{2m_0} + \frac{\hbar}{m_0} (\vec{k} \cdot \hat{p}) \right] u_{nk}(\vec{r}) \quad (5.3)$$

De onde extraímos o Hamiltoniano para o cálculo das funções de Bloch:

$$\left[\frac{\hat{p}^2}{2m_0} + \frac{\hbar^2 k^2}{2m_0} + \frac{\hbar}{m_0} (\vec{k} \cdot \hat{p}) + V_{per}(\vec{r}) \right] u_{nk}(\vec{r}) = E_n(\vec{k}) u_{nk}(\vec{r}) \quad (5.4)$$

e da banda de energia $E_n(\vec{k})$. Para um \vec{k}_o fixo o operador auto-adjunto da equação (5.4) acima significa que as funções de Bloch $u_{n\vec{k}_o}(\vec{r})$ formam um conjunto completo que pode ser utilizado na expansão de qualquer função com a periodicidade da rede.

No caso do quantum dot devemos incluir o potencial esférico e substituir a onda plana $e^{i\vec{k}\cdot\vec{r}}$ por uma função envelope na forma $\psi_n(\vec{r}) = F_n(\vec{r}) u_{nk}(\vec{r})$. Note que

$F_n(\vec{r})$ é denominada de função envelope porque varia pouco comparativamente à função de Bloch $u_{nk}(\vec{r})$, a qual oscila pelo menos uma vez em uma célula unitária. As bandas de energia se tornam níveis de energia discretos ao impor a condição de contorno $F(a)=0$ na função envelope na superfície do QD. O Hamiltoniano desse problema agora pode ser expresso como:

$$\left[\frac{\hat{p}^2}{2m_0} + V_{per}(\vec{r}) + V_{esf}(\vec{r}) \right] F_n(\vec{r}) u_{nk}(\vec{r}) = E_n F_n(\vec{r}) u_{nk}(\vec{r}) \quad (5.5)$$

Aplicando, novamente o operador energia cinética no produto função envelope pela função de Bloch obtemos:

$$\frac{\hat{p}^2}{2m_0} [F_n(\vec{r}) u_{nk}(\vec{r})] = F_n(\vec{r}) \frac{\hat{p}^2}{2m_0} u_{nk}(\vec{r}) + u_{nk}(\vec{r}) \frac{\hat{p}^2}{2m_0} F_n(\vec{r}) + \frac{1}{m_0} [\hat{p} F_n(\vec{r})] \cdot [\hat{p} u_{nk}(\vec{r})] \quad (5.6)$$

Em lugar de aplicar o operador momento e energia cinética diretamente sobre a função envelope é melhor utilizar a sua transformada de Fourier dada por:

$F_n(\vec{r}) = \int F_n(\vec{k}) e^{i\vec{k}\cdot\vec{r}} d^3k$ na qual sabemos como os operadores momento $\hat{p} = -i\hbar\nabla$ e $\hat{p}^2 = -\hbar^2\nabla^2$ atuam:

$$\hat{p} F_n(\vec{r}) = \int F_n(\vec{k}) \hbar\vec{k} e^{i\vec{k}\cdot\vec{r}} d^3k \quad (5.7)$$

$$\hat{p}^2 F_n(\vec{r}) = \int F_n(\vec{k}) \hbar^2 k^2 e^{i\vec{k}\cdot\vec{r}} d^3k \quad (5.8)$$

Nesse caso então:

$$\frac{\hat{p}^2}{2m_0} [F_n(\vec{r}) u_{nk}(\vec{r})] = \int F_n(\vec{k}) e^{i\vec{k}\cdot\vec{r}} \left[\frac{\hat{p}^2}{2m_0} + \frac{\hbar^2 k^2}{2m_0} + \frac{\hbar}{m_0} (\vec{k} \cdot \hat{p}) \right] u_{nk}(\vec{r}) d^3k \quad (5.9)$$

Desprezando o produto do potencial de confinamento $V_{esf}(\vec{r})$ com a função de Bloch⁴, mas não com a função envelope, podemos re-escrever o Hamiltoniano na forma:

$$\left[\frac{\hat{p}^2}{2m_0} + V_{per}(\vec{r}) + V_{esf}(\vec{r}) \right] \left[F_n(\vec{r}) u_{n\vec{k}}(\vec{r}) \right] = \int F_n(\vec{k}) e^{i\vec{k}\cdot\vec{r}} \left[\frac{\hat{p}^2}{2m_0} + \frac{\hbar^2 k^2}{2m_0} + \frac{\hbar}{m_0} (\vec{k} \cdot \hat{p}) + V_{per}(\vec{r}) \right] u_{n\vec{k}}(\vec{r}) d^3k + V_{esf}(\vec{r}) \int F_n(\vec{k}) e^{i\vec{k}\cdot\vec{r}} u_{n\vec{k}}(\vec{r}) d^3k \quad (5.10)$$

Ou, usando o resultado da equação do Bloch

$$\left[\frac{\hat{p}^2}{2m_0} + V_{per}(\vec{r}) + V_{esf}(\vec{r}) \right] \left[F_n(\vec{r}) u_{n\vec{k}}(\vec{r}) \right] = \int F_n(\vec{k}) e^{i\vec{k}\cdot\vec{r}} E_{nbulk}(\vec{k}) u_{n\vec{k}}(\vec{r}) d^3k + V_{esf}(\vec{r}) \int F_n(\vec{k}) e^{i\vec{k}\cdot\vec{r}} u_{n\vec{k}}(\vec{r}) d^3k \quad (5.11)$$

Nesse ponto a idéia é tirar a dependência em \vec{k} da função de Bloch utilizando as funções no fundo/topo das bandas em $\vec{k} = 0$ fazendo $u_{n\vec{k}}(\vec{r}) \cong u_{n0}(\vec{r})$, que permite que as mesmas sejam extraídas da integral em k e canceladas em ambos os lados da equação (5.11), restando apenas a equação para a função envelope:

$$\int F_n(\vec{k}) e^{i\vec{k}\cdot\vec{r}} E_{nbulk}(\vec{k}) d^3k + V_{esf}(\vec{r}) \int F_n(\vec{k}) e^{i\vec{k}\cdot\vec{r}} d^3k = E_n \int F_n(\vec{k}) e^{i\vec{k}\cdot\vec{r}} d^3k \quad (5.12)$$

A aproximação parabólica da massa efetiva implica é expandir $E_{nbulk}(\vec{k})$ no topo/fundo das bandas até segunda ordem. Como se trata de uma expansão em torno de pontos extremos, mínimo ou máximo, então $\left. \frac{\partial}{\partial k} E_n(\vec{k}) \right|_{\vec{k}=0} = 0$ e

$$E_{nbulk}(\vec{k}) = E_g + \frac{k^2}{2} \left[\frac{\partial^2}{\partial k^2} E_{nbulk}(\vec{k}) \right]_{\vec{k}=0}, \text{ onde } E_g \text{ é a energia do gap do semiconductor.}$$

⁴ No interior do QD, onde a função de Bloch é não nula, o potencial esférico é nulo.

Entretanto, a massa efetiva é definida como $\left[\frac{\partial^2}{\partial k^2} E_{nbulk}(\vec{k}) \right]_{\vec{k}=0} = \frac{\hbar^2}{m_{ef}}$,

logo $E_{nbulk}(\vec{k}) = E_g + \frac{\hbar^2 k^2}{2m_{ef}}$, levando a equação (5.12) para a forma:

$$\int F_n(\vec{k}) \left(\frac{\hbar^2 k^2}{2m_{ef}} \right) e^{i\vec{k}\cdot\vec{r}} d^3k + V_{esf}(\vec{r}) \int F_n(\vec{k}) e^{i\vec{k}\cdot\vec{r}} d^3k = (E_n - E_g) \int F_n(\vec{k}) e^{i\vec{k}\cdot\vec{r}} d^3k \quad (5.13)$$

Agora usamos a identidade $\int F_n(\vec{k}) k^2 e^{i\vec{k}\cdot\vec{r}} d^3k = \nabla^2 \int F_n(\vec{k}) e^{i\vec{k}\cdot\vec{r}} d^3k$ e voltamos ao espaço direto \vec{r} para obter:

$$\left[\frac{\hbar^2 \nabla^2}{2m_{ef}} + V_{esf}(\vec{r}) \right] F_n(\vec{r}) = E_{conf} F_n(\vec{r}) \quad (5.14)$$

onde $E_{conf} = E_n - E_g$, ou $E_n = E_g + E_{conf}$.

Essa equação é a equação de uma partícula em uma caixa esférica cuja solução bem conhecida é dada por $F_n(\vec{r}) = j_n(kr) Y_n^m(\theta, \varphi)$ onde $j_n(kr)$ são as funções esféricas de Bessel, $Y_n^m(\theta, \varphi)$ são os harmônicos esféricos e a relação de dispersão é dada por $E_{conf} = \frac{\hbar^2 k^2}{2m_{ef}}$. A condição de contorno $F(a) = 0$ leva à

quantização dos k 's através da equação transcendental $j_n(ka) = 0$, cujas raízes são dadas por $k = \frac{\pi \chi_{nm}}{a}$, onde $\pi \chi_{nm}$ é a n ésima raiz da função esférica de Bessel,

i.e. $j_n(\pi \chi_{nm}) = 0$. Nesse caso as energias incluindo o confinamento são dadas por:

$$E_n = E_g + \chi_{nm}^2 \left(\frac{\hbar^2}{8m_{ef} a^2} \right).$$

A validade do modelo parabólico de uma partícula presa em uma caixa esférica logo foi contestada, porque a energia de confinamento era grande demais para a validade da utilização da massa efetiva constante no topo/fundo da banda. A validade do modelo aumenta quando $E_{conf} \ll E_g$. Vale a pena notar que para um grande número de pesquisadores os quantum dots representaram uma evolução

para confinamento em três dimensões de hetero estruturas semicondutoras. Nas décadas de 1970 e 1980 os quantum wells estavam em plena efervescência, originando vários prêmios Nobel. A evolução da área de pesquisa era apontada como a de quantum wells, confinamento em uma dimensão apenas, quantum wires, confinamento em 2 dimensões, e quantum dots, confinamento em 3 dimensões. Já se sabia que, mesmo para o confinamento mais fraco dos quantum wells a aproximação de bandas parabólicas não era válida, principalmente para semicondutores de gap pequeno[68]. Também já existia todo um formalismo baseado no método $\vec{k} \cdot \vec{p}$ na area de quantum wells que logo se estabeleceu para o estudo de quantum dots.

5.3.2 Modelo $\vec{k} \cdot \vec{p}$ de confinamento quântico

O objetivo do modelo $\vec{k} \cdot \vec{p}$ é extrair as bandas de energia $E_n(\vec{k})$ e as funções de Bloch $u_{nk}(\vec{r})$ do Hamiltoniano:

$$\left[\frac{\hat{p}^2}{2m_o} + \frac{\hbar^2 k^2}{2m_o} + \frac{\hbar}{m_o} (\vec{k} \cdot \hat{p}) + V_{per}(\vec{r}) \right] u_{nk}(\vec{r}) = E_n(\vec{k}) u_{nk}(\vec{r}) \quad (5.15)$$

Para tanto é necessário começar pela estrutura cristalina do material bulk e definir as aproximações do modelo e a região de validade do mesmo.

Propriedades do CdTe: O CdTe é um semicondutor pertencente ao grupo II-VI. Sua rede cristalina é do tipo “zincblend” que pode ser descrita como duas redes cúbicas de face centrada (fcc) com os íons do grupo II e grupo IV deslocadas ao longo do eixo [111] por $[a/4, a/4, a/4]$, onde a é o parâmetro de rede.

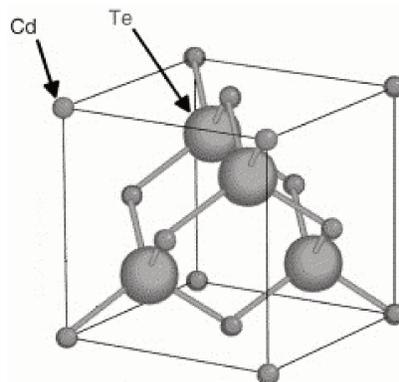


Figura 62 Estrutura cristalina tipo “zincblend” do CdTe

A estrutura de banda do CdTe é mostrada na Figura 63, calculada por Mauro Fernando Soares Ribeiro Júnior utilizando o método LDA -1/2[69].

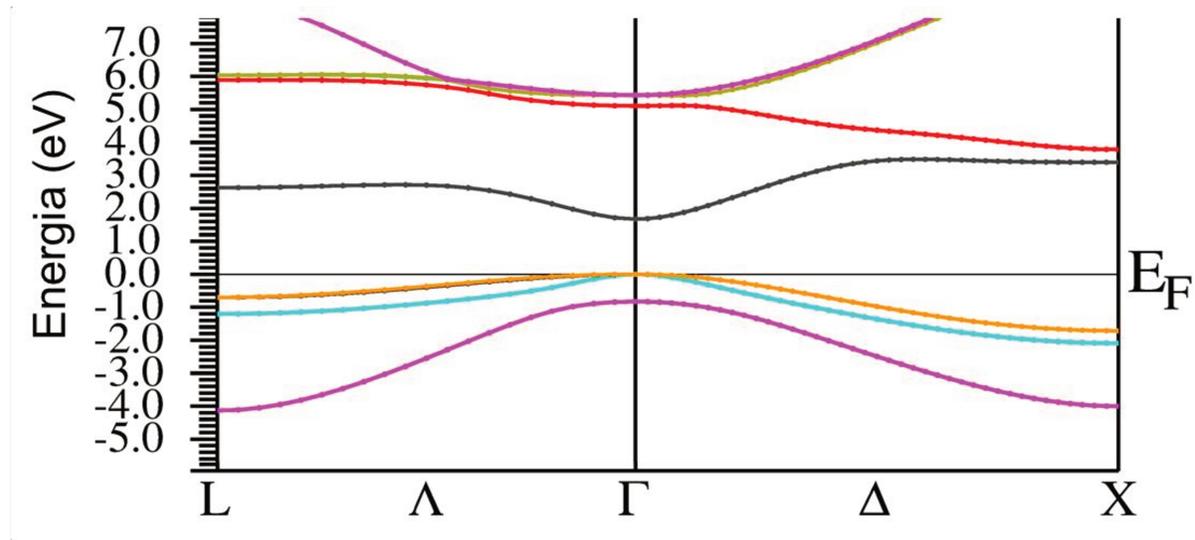


Figura 63 Estrutura de Banda do CdTe[69], E_F energia de Fermi

Átomos possuem níveis de energia eletrônicos muito bem definidos e discretos. Ao se aproximar os átomos uns dos outros em um cristal esses níveis começam a se quebrar em subníveis, como mostra a Figura 64. Quanto mais átomos são adicionados a essa configuração mais próximo os subníveis estarão entre si. Para cristais com número de átomos da ordem de 10^{23} átomos/mol esses subníveis estão tão próximos que formam bandas de energia, entre as quais existem regiões em que os elétrons não podem estar, conhecida como gaps de energia.

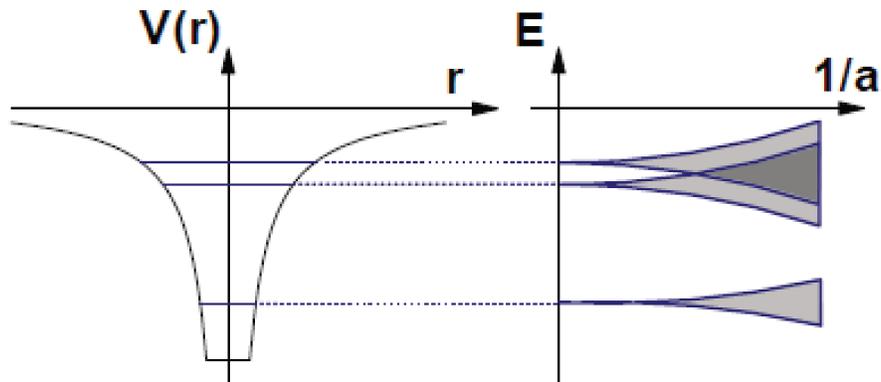


Figura 64 Níveis atômicos se desdobrando em bandas

O CdTe é formada por um íon de Cádmiu [Cd²⁺] e outro de Telúriu [Te²⁻]. A sua distribuição eletrônica está na Figura 65 dois elétrons e a do Te (5S+5P) possui seis elétrons. O Cd cede dois elétrons para o Te completar a camada P deixando sua camada S vazia. A última camada completa (valência) tem a forma de um orbital tipo P sendo triplamente degenerada. A primeira camada vazia (condução) tem a forma de um orbital tipo S. As funções de onda podem ser definidas para a condução $|s\rangle = \Phi(r)$ e para a valência como $|x\rangle = x\Phi(r)$, $|y\rangle = y\Phi(r)$, $|z\rangle = z\Phi(r)$.

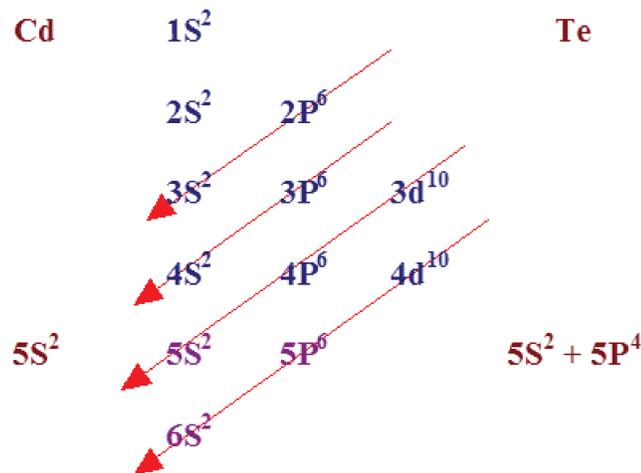


Figura 65 Distribuição eletrônica da molécula de CdTe

Para calcular as bandas de energia e os estados eletrônicos temos que resolver a equação de Schrödinger

$$\left[\frac{\hat{p}^2}{2m_o} + \frac{\hbar^2 k^2}{2m_o} + \frac{\hbar}{m_o} (\vec{k} \cdot \hat{p}) + V_{per}(\vec{r}) \right] u_{nk}(\vec{r}) = E_n(\vec{k}) u_{nk}(\vec{r}) \quad (5.16)$$

Interação spin-órbita: O elétron que se move no cristal com uma velocidade v “percebe” um campo magnético devido à transformação relativística do campo elétrico gerado pelos átomos da rede cristalina dada por [70-72]:

$$\vec{B} = \frac{-1}{c^2} \vec{v} \times \vec{E} = \frac{1}{mc^2} \nabla V_{per} \times \vec{p} \quad (5.17)$$

Esse campo interage com o spin do elétron gerando o Hamiltoniano spin-órbita da forma:

$$H_{SO} = \frac{\hbar}{4m^2c^2} [\nabla V_{per} \times \vec{p}] \cdot \vec{\sigma} \quad (5.18)$$

onde σ_x , σ_y e σ_z são os operadores de spin que atuam sobre as funções \uparrow e \downarrow da seguinte forma

$$\begin{array}{lll} \sigma_x \uparrow = \downarrow & \sigma_y \uparrow = -i\downarrow & \sigma_z \uparrow = \uparrow \\ \sigma_x \downarrow = \uparrow & \sigma_y \downarrow = i\uparrow & \sigma_z \downarrow = -\downarrow \end{array} \quad (5.19)$$

O Hamiltoniano completo, então, é dado por:

$$\left[\frac{\vec{p}^2}{2m_0} + \frac{\hbar}{m_0} (\vec{k} \cdot \vec{p}) + \frac{\hbar^2 k^2}{2m_0} + V_{per}(\vec{r}) + \frac{\hbar}{4m^2c^2} [\nabla V_{per} \times \vec{p}] \cdot \vec{\sigma} \right] u_{nk}(\vec{r}) = E_n(\vec{k}) u_{nk}(\vec{r}) \quad (5.20)$$

Esse é o Hamiltoniano com o termo $\vec{k} \cdot \vec{p}$ que deu origem ao nome do método. O vetor de onda \vec{k} é um parâmetro na equação. O fato de que essa equação é auto-adjunta significa que as autofunções em um determinado \vec{k} fixo formam um conjunto completo e podem servir de base para expansão de qualquer outra função. No caso do CdTe o topo da banda de valência, split off e o mínimo da banda de condução se encontram no ponto Γ em $k=0$, logo as funções $u_{n0}(\vec{r})$ são ideais para expansão do sistema. Para um dado $k=k_0$ conhecido, equação (5.16) será

$$\left[\frac{\vec{p}^2}{2m_0} + \frac{\hbar}{m_0} (\vec{k}_0 \cdot \vec{p}) + \frac{\hbar^2 k_0^2}{2m_0} + U(\vec{r}) \right] u_{nk_0}(\vec{r}) = E_n(\vec{k}_0) u_{nk_0}(\vec{r}) \quad (5.21)$$

$$H(\vec{k}_0) u_{nk_0}(\vec{r}) = E_n(\vec{k}_0) u_{nk_0}(\vec{r}) \quad (5.22)$$

Podemos reescrever a equação (5.21) em termo do $H(\vec{k}_0)$

$$\left[H(\vec{k}_0) + \frac{\hbar}{m_0} (\vec{k} - \vec{k}_0) \cdot \vec{p} + \frac{\hbar^2 (\vec{k} - \vec{k}_0)^2}{2m_0} \right] u_{nk}(\vec{r}) = E_n(\vec{k}) u_{nk}(\vec{r}) \quad (5.23)$$

Para escrevermos (5.23) na forma matricial multiplicamos pela esquerda pela expansão de $u_{nk}(\vec{r})$ em termos de $u_{nk_0}(\vec{r})$ do Hamiltoniano $H(\vec{k}_0)$

$$u_{nk}(\vec{r}) = \sum_{n'} c_{n'n} u_{nk_0}(\vec{r}) \quad (5.24)$$

E integramos sobre uma célula unitária

$$\sum_{n'} \left[\left(E(\vec{k}_0) + \frac{\hbar^2 (\vec{k} - \vec{k}_0)^2}{2m_0} \right) \delta_{nn'} + \frac{\hbar}{m_0} (\vec{k} - \vec{k}_0) \cdot \vec{p}_{nn'} \right] c_{nn'} = E_n(\vec{k}) c_{nn'} \quad (5.25)$$

$$\vec{p}_{nn'}(\vec{k}) = \int_{\text{célula unitária}} u_{nk_0}^*(\vec{r}) \vec{p} u_{n'k_0}(\vec{r}) d\vec{r} \quad (5.26)$$

As equações (5.24) à (5.26) definem a representação $\vec{k} \cdot \vec{p}$ [71-73]. A equação (5.25) é uma equação de autovalores para o ponto k na representação de k_0 . Para tratar o termo não diagonal como perturbação escolhe-se k perto de k_0 e utiliza-se a teoria de perturbação de Löwdin[74]. No método de Löwdin os estados são divididos em dois tipos A e B, como mostra a Figura 66. A contribuição dos estados denominados A, com energias próximas, é grande e obtida por diagonalização direta. Já a contribuição dos estados denominados B, também chamados de bandas remotas, é pequena e obtida por métodos de perturbação ordinária, modificando ou renormalizando os valores obtidos em ordem zero.

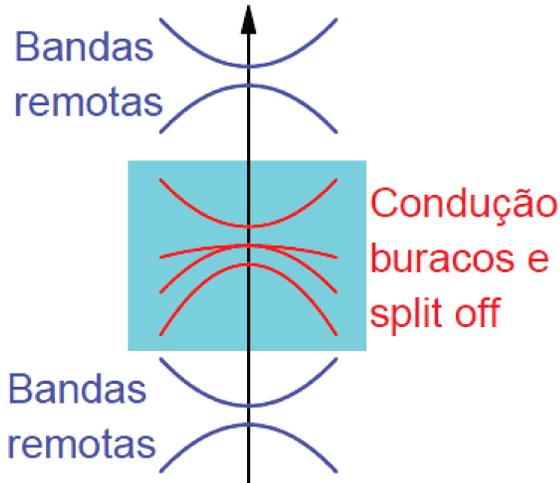


Figura 66 Bandas de interesse e bandas remotas no método de Löwdin.

Os elementos renormalizados são:

$$h'_{ij} = h_{ij} + \sum_{\beta} \frac{h_{i\beta} h_{\beta i}}{E_i - E_{\beta}} \quad (5.27)$$

Onde i e j pertencem a A, β pertence a B e h_{ij} são os elementos da matriz original. Os conjuntos A e B são escolhidos de tal forma que

$$|h_{ij}| \ll |E_i - E_j| \quad i \in A \text{ e } j \in B \quad (5.28)$$

A energia calculada com teoria de perturbação até segunda ordem nas vizinhanças de k_0 é dada por

$$E_n(\vec{k}) = E_n(\vec{k}_0) + \frac{\hbar}{m_0} (\vec{k} - \vec{k}_0) \cdot \vec{p}_{mn} + \frac{\hbar^2 (\vec{k} - \vec{k}_0)^2}{2m_0} + \frac{\hbar^2}{m_0^2} \sum_{n'} \frac{|(\vec{k} - \vec{k}_0) \cdot \vec{p}_{nn'}|}{E_n(\vec{k}_0) - E_{n'}(\vec{k}_0)} \quad (5.29)$$

No semiconductor que estamos interessados o gap está no ponto Γ onde $k_0 = 0$. Sem a interação spin-órbita as bandas de valência em $k_0 = 0$ seriam triplamente degeneradas, mas a interação spin-órbita levanta a degenerescência da banda chamada de "split off", levando a três bandas de valência chamadas de buracos pesados e leves, degenerados em $k_0 = 0$ e de split off.

A função de onda para a banda de condução $|s\rangle$ tem simetria orbital de momento angular $L=0$ enquanto as funções de onda da banda de valência

$|x\rangle|y\rangle$ e $|z\rangle$ tem simetria orbital de momento angular $L=1$. O Hamiltoniano (5.23) comuta com o operador momento angular orbital \vec{L} . O Hamiltoniano completo com a interação spin-órbita não comuta com \vec{L} mas comuta com o momento angular total $\vec{J} = \vec{L} + \vec{S}$, então a base adequada é tal que o momento angular total \vec{J} e sua projeção no eixo z J_z sejam diagonais. A base é formada pela combinação linear das funções $|s\uparrow\rangle, |s\downarrow\rangle, |x\uparrow\rangle, |x\downarrow\rangle, |y\uparrow\rangle, |y\downarrow\rangle, |z\uparrow\rangle$ e $|z\downarrow\rangle$ [72], os símbolos \uparrow e \downarrow significam spin para cima e spin para baixo, respectivamente. A base é utilizada da seguinte forma

$$|is\downarrow\rangle \left| \frac{(x-iy)\uparrow}{\sqrt{2}} \right\rangle |z\downarrow\rangle \left| \frac{(x+iy)\uparrow}{\sqrt{2}} \right\rangle |is\uparrow\rangle \left| \frac{-(x+iy)\downarrow}{\sqrt{2}} \right\rangle |z\uparrow\rangle \left| \frac{(x-iy)\downarrow}{\sqrt{2}} \right\rangle \quad (5.30)$$

A matriz com $k_0 = 0$ como referência, está representada a seguir

$$H = \begin{pmatrix} |is\downarrow\rangle & \left| \frac{(x-iy)\uparrow}{\sqrt{2}} \right\rangle & |z\downarrow\rangle & \left| \frac{(x+iy)\uparrow}{\sqrt{2}} \right\rangle & |is\uparrow\rangle & \left| \frac{-(x+iy)\downarrow}{\sqrt{2}} \right\rangle & |z\uparrow\rangle & \left| \frac{(x-iy)\downarrow}{\sqrt{2}} \right\rangle \\ E_c + \frac{\hbar^2 k^2}{2m_0} & 0 & Pk_z & 0 & 0 & -P \frac{k_x + ik_y}{\sqrt{2}} & 0 & P \frac{k_x - ik_y}{\sqrt{2}} \\ 0 & E_v + \frac{\hbar^2 k^2}{2m_0} - \frac{\Delta}{3} & \frac{\sqrt{2}}{3} \Delta & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ Pk_z & \frac{\sqrt{2}}{3} \Delta & E_v + \frac{\hbar^2 k^2}{2m_0} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & E_v + \frac{\hbar^2 k^2}{2m_0} + \frac{\Delta}{3} & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & E_c + \frac{\hbar^2 k^2}{2m_0} & 0 & Pk_z & 0 \\ -P \frac{k_x - ik_y}{\sqrt{2}} & 0 & 0 & 0 & 0 & E_v + \frac{\hbar^2 k^2}{2m_0} - \frac{\Delta}{3} & \frac{\sqrt{2}}{3} \Delta & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & Pk_z & \frac{\sqrt{2}}{3} \Delta & E_v + \frac{\hbar^2 k^2}{2m_0} & 0 \\ P \frac{k_x + ik_y}{\sqrt{2}} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & E_v + \frac{\hbar^2 k^2}{2m_0} + \frac{\Delta}{3} \end{pmatrix} \quad (5.31)$$

Onde E_c e E_v são os extremos da banda de condução e valência, respectivamente. O parâmetro P é proporcional ao elemento de matriz do momento entre a banda de valência e a banda de condução

$$P \equiv \frac{\hbar}{im_0} \langle s | p_x | x \rangle = \frac{\hbar}{im_0} \langle s | p_y | y \rangle = \frac{\hbar}{im_0} \langle s | p_z | z \rangle \quad (5.32)$$

Termos como

$$\begin{aligned} \langle s | p_i | j \rangle &= 0 \quad i \neq j \\ \langle s | p_i | s \rangle &= \langle i | p_j | l \rangle = 0 \quad i, j, l = x, y, z \end{aligned} \quad (5.33)$$

São nulos devido a simetria das funções $|s\rangle |x\rangle |y\rangle$ e $|z\rangle$. Os elementos de matriz referente ao termo de Split-off são

$$\langle i | (\nabla U \times \vec{p})_j | l \rangle = \varepsilon_{ijl} \text{ e } \langle s | (\nabla U \times \vec{p})_i | j \rangle = 0 \text{ para } i, j, l = x, y, z \quad (5.34)$$

Onde ε_{ijl} é o tensor de Levi-Civita $\varepsilon_{xyz} = \varepsilon_{zyx} = \varepsilon_{yxz} = 1$ e $\varepsilon_{yxz} = \varepsilon_{xzy} = \varepsilon_{zxy} = -1$ e nulo para quaisquer índices repetidos. A constante Δ é definida como a separação em energia devido ao termo de Split-off

$$\Delta = -\frac{3i\hbar}{4m_0^2 c^2} \langle x | (\nabla U \times \vec{p})_y | z \rangle \quad (5.35)$$

Podemos escolher o vetor de onda \vec{k} na direção \hat{z} , com isso k_x e $k_y = 0$ e matriz do Hamiltoniano toma a forma de dois blocos diagonais 4x4

$$H = \begin{pmatrix} H_{4 \times 4} & 0 \\ 0 & H_{4 \times 4} \end{pmatrix} \quad (5.36)$$

$$H_{4 \times 4} = \begin{pmatrix} E_c + \frac{\hbar^2 k^2}{2m_0} & 0 & Pk & 0 \\ 0 & E_v + \frac{\hbar^2 k^2}{2m_0} - \frac{\Delta}{3} & \frac{\sqrt{2}}{3} \Delta & 0 \\ Pk & \frac{\sqrt{2}}{3} \Delta & E_v + \frac{\hbar^2 k^2}{2m_0} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & E_v + \frac{\hbar^2 k^2}{2m_0} + \frac{\Delta}{3} \end{pmatrix} \quad (5.37)$$

Para calcular as energias no fundo da banda ($\vec{k} = 0$), devemos diagonalizar a matriz

$$H_0 = \begin{pmatrix} E_c & 0 & 0 & 0 \\ 0 & E_v - \frac{\Delta}{3} & \frac{\sqrt{2}}{3} \Delta & 0 \\ 0 & \frac{\sqrt{2}}{3} \Delta & E_v & 0 \\ 0 & 0 & 0 & E_v + \frac{\Delta}{3} \end{pmatrix} \quad (5.38)$$

Dois dos autovalores já estão na forma diagonal, os outros dois são calculados a partir da diagonalização da matriz 2x2 restante, chegando ao resultado:

$$E_{EL} = E_c \quad (5.39)$$

$$E_{LH} = E_v + \frac{\Delta}{3} \quad (5.40)$$

$$E_{SO} = E_v - \frac{2\Delta}{3} \quad (5.41)$$

$$E_{HH} = E_v + \frac{\Delta}{3} \quad (5.42)$$

onde EL denota as energias para o elétron, LH light-hole, SO Split-off e HH heavy-hole, respectivamente. Percebe-se então que a adição do termo de interação de

spin-órbita deslocou o máximo da banda de valência por $-\frac{2\Delta}{3}$ e o máximo da banda de Split-off por $\frac{\Delta}{3}$, deixando uma separação de Δ entre a banda do split off e as bandas de LH e HH. Convém redefinirmos a energia do gap como sendo a diferença entre o mínimo da banda de condução e o máximo da banda de valência. Redefiniremos também a energia do máximo da banda de valência como zero.

$$E_g = E_c - E_v' \quad (5.43)$$

$$E_v' = E_v + \frac{\Delta}{3} \quad (5.44)$$

$$H_{4 \times 4} = \begin{pmatrix} E_c + \frac{\hbar^2 k^2}{2m_0} & 0 & Pk & 0 \\ 0 & E_v' + \frac{\hbar^2 k^2}{2m_0} - \frac{2\Delta}{3} & \frac{\sqrt{2}}{3} \Delta & 0 \\ Pk & \frac{\sqrt{2}}{3} \Delta & E_v' + \frac{\hbar^2 k^2}{2m_0} - \frac{\Delta}{3} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & E_v' + \frac{\hbar^2 k^2}{2m_0} \end{pmatrix} \quad (5.45)$$

A diagonalização dessa nova matriz resulta na relação conhecida como Relação de Dispersão de Kane (levando em conta que um dos autovalores já está na forma diagonal)

$$[E' - E_c][E' - E_v'][E' - E_v' + \Delta] - k^2 P^2 \left[E' - E_v' + \frac{2\Delta}{3} \right] = 0 \quad E' = E - \frac{\hbar^2 k^2}{2m_0} \quad (5.46)$$

Somando e subtraindo E_v' em (5.46) temos

$$[E' - E_v' + E_v' - E_c][E' - E_v'][E' - E_v' + \Delta] - k^2 P^2 \left[E' - E_v' + \frac{2\Delta}{3} \right] = 0 \quad (5.47)$$

$$\left[E' - E'_v - (E_c - E'_v) \right] \left[E' - E'_v \right] \left[E' - E'_v + \Delta \right] - k^2 P^2 \left[E' - E'_v + \frac{2\Delta}{3} \right] = 0 \quad (5.48)$$

Desse modo conseguimos colocar a referência no topo da banda de valência, de modo que a energia será medida a partir desse ponto. Fazendo

$$E' - E'_v = E - \frac{\hbar^2 k^2}{2m_0} - E'_v = E'' \quad (5.49)$$

Logo (5.46) fica

$$\left[E'' - E_g \right] \left[E'' \right] \left[E'' + \Delta \right] - k^2 P^2 \left[E'' + \frac{2\Delta}{3} \right] = 0 \quad (5.50)$$

Para calcular a massa efetiva do elétron escolhemos $E - E_c = \frac{\hbar^2 k^2}{2m_{el}^*}$, assim

$$E'' = E - \frac{\hbar^2 k^2}{2m_0} - E'_v + E_c - E_c = E - E_c + E_g - \frac{\hbar^2 k^2}{2m_0} = \frac{\hbar^2 k^2}{2m_{el}^*} - \frac{\hbar^2 k^2}{2m_0} + E_g \quad (5.51)$$

Substituindo (5.51) em (5.50) e descartando os termos de ordem maiores que k^2 temos

$$\left[\frac{\hbar^2 k^2}{2m_{el}^*} - \frac{\hbar^2 k^2}{2m_0} \right] \left[E_g \right] \left[E_g + \Delta \right] - k^2 P^2 \left[E_g + \frac{2\Delta}{3} \right] = 0 \quad (5.52)$$

$$\left[\frac{m_0}{m_{el}^*} - 1 \right] \left[E_g \right] \left[E_g + \Delta \right] - \frac{2m_0}{\hbar^2} P^2 \left[E_g + \frac{2\Delta}{3} \right] = 0 \quad (5.53)$$

Definindo $E_p = \frac{2m_0 P^2}{\hbar^2}$, a massa efetiva do elétron fica

$$\frac{m_0}{m_{el}^*} = 1 + \frac{E_p \left(E_g + \frac{2\Delta}{3} \right)}{E_g \left(E_g + \Delta \right)} \quad (5.54)$$

O mesmo procedimento pode ser utilizado para calcular a massa efetiva do light-hole e do split-off. Para o light-hole fazemos $E - E'_v = -\frac{\hbar^2 k^2}{2m_{lh}^*}$

$$E'' = E - \frac{\hbar^2 k^2}{2m_0} - E'_v = -\frac{\hbar^2 k^2}{2m_{lh}^*} - \frac{\hbar^2 k^2}{2m_0} \quad (5.55)$$

$$\frac{m_0}{m_{lh}^*} = \frac{2E_p}{3E_g} - 1 \quad (5.56)$$

E para o Split-off $E - E'_v = -\frac{\hbar^2 k^2}{2m_{lh}^*} - \Delta$, logo

$$E'' = E - \frac{\hbar^2 k^2}{2m_0} - E'_v = -\frac{\hbar^2 k^2}{2m_{so}^*} - \frac{\hbar^2 k^2}{2m_0} - \Delta \quad (5.57)$$

$$\frac{m_0}{m_{so}^*} = \frac{E_p}{3(\Delta + E_g)} - 1 \quad (5.58)$$

Os termos nulos no Hamiltoniano significam que não estamos levando em consideração a interação com as bandas remotas. O heavy-hole está desacoplado dos outros buracos e ainda teria energia positiva igual à do elétron na banda de condução, em desacordo com outros resultados experimentais e teóricos. Isso quer dizer que com esse Hamiltoniano obtemos boas aproximações para as massas efetivas para o fundo das bandas de condução, light-hole e o Split-off mas nada podemos afirmar sobre a banda do heavy-hole. Luttinger[75] usando apenas argumentos de simetria mostrou, até ordem de k^2 , como seria a matriz incluindo a interação das bandas remotas. O bloco 4x4 da matriz já com os parâmetros de correção das bandas remotas é dado por:

$$H_{4 \times 4} = \begin{pmatrix} E_g & 0 & Pk & 0 \\ 0 & -(\gamma_1 - 2\gamma_2) \frac{\hbar^2 k^2}{2m_0} - \frac{2\Delta}{3} & \frac{\sqrt{2}\Delta}{3} & 0 \\ Pk & \frac{\sqrt{2}\Delta}{3} & -(\gamma_1 + 4\gamma_2) \frac{\hbar^2 k^2}{2m_0} - \frac{\Delta}{3} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -(\gamma_1 - 2\gamma_2) \frac{\hbar^2 k^2}{2m_0} \end{pmatrix} \quad (5.59)$$

onde γ_1 e γ_3 são chamados parâmetros de Luttinger.

5.3.3 Modelo $\vec{k} \cdot \vec{p}$ para confinamento quântico no formalismo da função envelope

Nesse ponto é conveniente quebrar o problema em dois sub-espacos, um o da função envelope denotada pelo vetor \vec{R} , que varre pontos entre as células unitárias e o outro da função de Bloch denotada pelo vetor \vec{r} que varre pontos dentro da célula unitária. Da mesma forma definiremos os operadores momento por $\vec{P}_{\vec{R}} = -i\hbar\nabla_{\vec{R}}$ e $\vec{P}_{\vec{r}} = -i\hbar\nabla_{\vec{r}}$. Assumindo que os QDs são esféricos com raio a , pois a forma esférica minimiza a energia de interface positiva em relação à energia negativa do volume, o potencial de confinamento $V(\vec{r})$ será esférico. Para calcular os níveis de energia do QD precisamos do Hamiltoniano completo, incluindo o potencial esférico, dado por[76]

$$H = \frac{(\vec{P}_{\vec{r}}^2 + \vec{P}_{\vec{R}}^2 + 2\vec{P}_{\vec{r}} \cdot \vec{P}_{\vec{R}})}{2m_0} + V_{spheric}(\vec{R}) + V_{periodic}(\vec{r}) + \frac{(\nabla V_{per} \times \vec{P}_{\vec{r}} \cdot \vec{S})}{m_0 c} \quad (5.60)$$

Note que $\vec{P}_{\vec{R}}$ foi desprezado no termo de interação spin-órbita. O Hamiltoniano (5.60) é semelhante ao Hamiltoniano do método $\vec{k} \cdot \vec{p}$ (5.20) em que o termo $\vec{P}_{\vec{r}} \cdot \vec{P}_{\vec{R}}$ substituiu o termo $\vec{k} \cdot \vec{p}$. O termo $\frac{\vec{P}_{\vec{r}}^2}{2m_0}$ representará a energia cinética no fundo da banda correspondendo ao primeiro termo de (5.20) e o termo $\frac{\vec{P}_{\vec{R}}^2}{2m_0}$ representará a energia cinética dos portadores correspondendo ao terceiro termo de (5.20) Devemos escolher agora um operador que comuta com o Hamiltoniano (5.60) para utilizar suas autofunções como base da diagonalização. Os termos referentes aos momentos comutam com $L_{\vec{r}} + L_{\vec{R}}$ e o termo referente a interação spin-órbita comuta com $J = L_{\vec{r}} + S$. Isso sugere que um bom número quântico é o operador que chamaremos de F , onde

$$\vec{F} = \vec{L}_{\vec{r}} + \vec{L}_{\vec{R}} + \vec{S} \rightarrow [\vec{F}, H] = 0 \quad (5.61)$$

Pelas regras de soma de momentos angulares os valores de \vec{F} podem ser

$$|L_{\vec{R}} - L_{\vec{r}} - S| \leq F \leq L_{\vec{R}} + L_{\vec{r}} + S \quad (5.62)$$

Para as funções envelope existem boas justificativas para usar a base $F_l^m(\vec{r}) = j_l(kr)Y_l^m(\theta, \varphi)$. Uma é que se trata de uma base completa. A segunda é que essa é a base das soluções da partícula em uma caixa esférica obtida na seção 5.3.1 desse capítulo. Finalmente vale notar que a onda plana pode ser expandida nessa base pois:

$$e^{i\vec{k}\cdot\vec{r}} = 4\pi \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-l}^l i^l j_l(kr) Y_l^{m*}(\theta_k, \varphi_k) Y_l^m(\theta_r, \varphi_r) \quad (5.63)$$

Como $F(\vec{R})$ é do espaço \vec{R} o momento angular associado a expansão será L_R . A condição de contorno de que função de onda tem que ser zero para $r = a$, o raio do QD, implica que a função envelope é nula nas bordas do QD. Se apenas considerarmos o potencial esférico, sem a interação spin-órbita, a função envelope teria a seguinte forma

$$F(\vec{R}) = j_{L_R}(kR)Y_{L_R}^m(\theta, \phi) \rightarrow j_{L_R}(ka) = 0 \rightarrow E_{conf} = \frac{\hbar^2(ka)_{raiz}^2}{2m^*} \quad (5.64)$$

Esse é o resultado da partícula com massa efetiva constante em uma caixa esférica. A condição de contorno (5.64) torna as energias de confinamento discretas e não mais contínuas como eram nas bandas de energia do bulk. Entretanto, se a massa efetiva agora depende da energia a condição de contorno

(5.64) muda para uma equação transcendental do tipo $E_{conf} = \frac{\hbar^2(ka)_{raiz}^2}{2m_{ef}(E_{conf})}$.

Além de comutar com o momento angular total $\vec{F} = \vec{L}_{\vec{r}} + \vec{L}_{\vec{R}} + \vec{S}$ o Hamiltoniano (5.60) tem paridade definida. Isso significa que os autoestados desse Hamiltoniano conservam tanto a paridade quanto o número quântico F . A paridade das funções totais será dada pela paridade da função envelope

multiplicada pela paridade das funções de Bloch. Para o elétron a função de onda tem simetria do orbital tipo S, portanto possui momento angular igual a zero, e é par. Para os buracos a função de onda tem simetria do orbital tipo P, possuindo momento angular igual a 1, e é ímpar. A paridade da função envelope é dada pela paridade do momento angular $L_{\bar{R}}$ e a paridade total será dada pela soma $L_{\bar{R}} + L_{\bar{r}}$. Utilizando a notação $|J, L_{\bar{R}}\rangle$ para construir os vetores de base temos que, para $F^+ = 1/2$, por exemplo, podemos ter $S = 1/2$, $L_{\bar{r}} = 0$ e $L_{\bar{R}} = 0$ para a banda de condução, $J = 1/2$ e $L_{\bar{R}} = 1$ para a banda de Split-off e $J = 3/2$ e $L_{\bar{R}} = 1$ para a banda de valência, resultando em $F_{1/2}^+ = \left| \frac{1}{2}, 0 \right\rangle_c + \left| \frac{3}{2}, 1 \right\rangle_v + \left| \frac{1}{2}, 1 \right\rangle_{so}$. Repetindo o procedimento para os outros valores de F construímos a tabela abaixo:

Paridade: $L_{\bar{R}} + L_{\bar{r}}$	$L_{\bar{R}} = 0$	$L_{\bar{R}} = 1$	$L_{\bar{R}} = 2$	$L_{\bar{R}} = 3$
$J = 1/2$ Banda de Condução $L_{\bar{r}} = 0$	$F^+ = 1/2$	$F^- = 1/2$ $F^- = 3/2$	$F^+ = 3/2$ $F^+ = 5/2$	$F^- = 5/2$ $F^- = 7/2$
$J = 1/2$ Banda de Split-off $L_{\bar{r}} = 0$	$F^- = 1/2$	$F^+ = 1/2$ $F^+ = 3/2$	$F^- = 3/2$ $F^- = 5/2$	$F^+ = 5/2$ $F^+ = 7/2$
$J = 3/2$ Banda de Valência $L_{\bar{r}} = 1$	$F^- = 3/2$	$F^+ = 1/2$ $F^+ = 3/2$ $F^+ = 5/2$	$F^- = 1/2$ $F^- = 3/2$ $F^- = 5/2$	$F^+ = 3/2$ $F^+ = 5/2$ $F^+ = 7/2$ $F^+ = 9/2$

Tabela 2 Possíveis valores para o momento angular total F . Regiões azuis correspondem a estados pares e regiões vermelhas estados ímpares

As funções para cada subespaço são

$$F_{1/2}^+ = \left| \frac{1}{2}, 0 \right\rangle_c + \left| \frac{3}{2}, 1 \right\rangle_v + \left| \frac{1}{2}, 1 \right\rangle_{so} \quad (5.65)$$

$$F_{\frac{1}{2}}^- = \left| \frac{1}{2}, 1 \right\rangle_c + \left| \frac{3}{2}, 2 \right\rangle_v + \left| \frac{1}{2}, 0 \right\rangle_{so} \quad (5.66)$$

$$F_{\frac{3}{2}}^+ = \left| \frac{1}{2}, 2 \right\rangle_c + \left| \frac{3}{2}, 1 \right\rangle_v + \left| \frac{3}{2}, 3 \right\rangle_v + \left| \frac{1}{2}, 1 \right\rangle_{so} \quad (5.67)$$

$$F_{\frac{3}{2}}^- = \left| \frac{1}{2}, 1 \right\rangle_c + \left| \frac{3}{2}, 0 \right\rangle_v + \left| \frac{3}{2}, 2 \right\rangle_v + \left| \frac{1}{2}, 2 \right\rangle_{so} \quad (5.68)$$

Podemos escrever a matriz nos subespaços $F = 1/2$ e $F = 3/2$ levando em conta a paridade. A matriz tem a forma de bloco[76], mostrada a seguir

$$\begin{pmatrix} H_{F_{\frac{1}{2}}}^{l=0} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & H_{F_{\frac{1}{2}}}^{l=1} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & H_{F_{\frac{3}{2}}}^{l=0} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & H_{F_{\frac{3}{2}}}^{l=1} \end{pmatrix} \quad (5.69)$$

Os dois subespaços estão desacoplados. Os dois primeiros blocos, de $F = 1/2$, são matrizes 3x3. Os blocos referentes a $F = 3/2$ são matrizes 4x4. A paridade é dada por l . As matrizes 3x3 tem a mesma forma, apresentada a seguir

$$H_{F_{\frac{1}{2}}}^{l=0,1} = \begin{pmatrix} \left| \frac{1}{2}, l \right\rangle_c & \left| \frac{3}{2}, l+1 \right\rangle_v & \left| \frac{1}{2}, |l-1| \right\rangle_{so} \\ E_c + \frac{\hbar^2 k^2}{2m_o} & -i\sqrt{\frac{2}{3}}Pk & -i\sqrt{\frac{1}{3}}Pk \\ +i\sqrt{\frac{2}{3}}Pk & E_v - (\gamma_1 - 2\gamma_2) \frac{\hbar^2 k^2}{2m_o} & 0 \\ +i\sqrt{\frac{1}{3}}Pk & 0 & E_v - \Delta - \gamma_1 \frac{\hbar^2 k^2}{2m_o} \end{pmatrix} \quad (5.70)$$

Os termos dependentes de \vec{k}^2 foram desprezados. E_c e E_v são os extremos da banda de condução e valência, respectivamente. Detalhes sobre a diagonalização dessa matriz podem ser encontrados na tese de doutorado de Carlos Oliveira[65]. A relação de dispersão para energia da banda de condução é dada por

$$E_{EL} = E_g + \frac{\hbar^2 k^2}{2m_0} \left[1 + \frac{E_p}{3} \left(\frac{2}{E_{EL}} + \frac{1}{E_{EL} + \Delta} \right) \right] \quad (5.71)$$

O autovetor da banda de condução com paridade par é $\left| \frac{1}{2}, 0 \right\rangle_c \leftrightarrow L_{\bar{R}} = 0$, a condição de contorno para função envelope é satisfeita quando $j_0(ka) = 0$. Para o estado ímpar $L_{\bar{R}} = 1$, a condição contorno é $j_1(ka) = 0$. A relação de dispersão para a energia do light-hole é dada por

$$E_{LH} = \frac{\hbar^2 k^2}{2m_0} \left[\frac{2E_p}{3(E_{LH} - E_g)} - (\gamma_1 + 2\gamma_2) \right] \quad (5.72)$$

O autovetor com paridade par é $\left| \frac{3}{2}, 1 \right\rangle_v \leftrightarrow L_{\bar{R}} = 1$, a condição contorno requer que $j_1(ka) = 0$. Para o estado ímpar $L_{\bar{R}} = 2$ resultando na condição de contorno $j_2(ka) = 0$.

Finalmente, a relação de dispersão para a energia do Split-off é dada por

$$E_{SO} = \frac{\hbar^2 k^2}{2m_0} \left[\frac{E_p}{3(E_{SO} - E_g)} - \gamma_1 \right] - \Delta \quad (5.73)$$

O autovetor com paridade par é $\left| \frac{1}{2}, 1 \right\rangle_{SO} \leftrightarrow L_{\bar{R}} = 1$, a condição contorno requer que $j_1(ka) = 0$. Para o estado ímpar $L_{\bar{R}} = 0$ resultando na condição de contorno $j_0(ka) = 0$.

Percebemos então que para as bandas de condução, light hole e split-off é necessário encontrar as raízes de $j_l(ka) = 0$ e substituir os valores de k nas devidas relações de dispersão, que definem massas efetivas dependentes da energia, ou as não parabolicidade das bandas, para encontrar os níveis de energia dos estados confinados.

A situação, entretanto, muda para os dois blocos restantes do subespaço $F = 3/2$ compostos pelas matrizes 4x4. Começaremos pela paridade ímpar $H_{F_{3/2}}^{l=1}$.

$$H_{F_{3/2}}^{l=1} = \begin{pmatrix} \left| \frac{1}{2}, 1 \right\rangle_c & \left| \frac{3}{2}, 0 \right\rangle_v & \left| \frac{3}{2}, 2 \right\rangle_v & \left| \frac{1}{2}, 2 \right\rangle_{so} \\ E_c + \frac{\hbar^2 k^2}{2m_o} & i\sqrt{\frac{1}{3}}Pk & -i\sqrt{\frac{1}{3}}Pk & -i\sqrt{\frac{1}{3}}Pk \\ i\sqrt{\frac{1}{3}}Pk & E_v - \gamma_1 \frac{\hbar^2 k^2}{2m_o} & 2\gamma_2 \frac{\hbar^2 k^2}{2m_o} & 2\gamma_2 \frac{\hbar^2 k^2}{2m_o} \\ -i\sqrt{\frac{1}{3}}Pk & 2\gamma_2 \frac{\hbar^2 k^2}{2m_o} & E_v - \gamma_1 \frac{\hbar^2 k^2}{2m_o} & -2\gamma_2 \frac{\hbar^2 k^2}{2m_o} \\ -i\sqrt{\frac{1}{3}}Pk & 2\gamma_2 \frac{\hbar^2 k^2}{2m_o} & -2\gamma_2 \frac{\hbar^2 k^2}{2m_o} & E_v - \Delta - \gamma_1 \frac{\hbar^2 k^2}{2m_o} \end{pmatrix} \quad (5.74)$$

Redefinindo dois vetores base como $|LH\rangle = \frac{1}{\sqrt{2}} \left(\left| \frac{3}{2}, 0 \right\rangle_v - \left| \frac{3}{2}, 2 \right\rangle_v \right)$ e

$|HH\rangle = \frac{1}{\sqrt{2}} \left(\left| \frac{3}{2}, 0 \right\rangle_v + \left| \frac{3}{2}, 2 \right\rangle_v \right)$, a matriz transformada assume a seguinte forma

$$H_{F_{3/2}}^{l=1} = \begin{pmatrix} \left| \frac{1}{2}, 1 \right\rangle_c & |LH\rangle & |HH\rangle & \left| \frac{1}{2}, 2 \right\rangle_{so} \\ E_c + \frac{\hbar^2 k^2}{2m_o} & i\sqrt{\frac{2}{3}}Pk & 0 & -i\sqrt{\frac{1}{3}}Pk \\ -i\sqrt{\frac{2}{3}}Pk & E_v - (\gamma_1 + 2\gamma_2) \frac{\hbar^2 k^2}{2m_o} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & E_v - (\gamma_1 - 2\gamma_2) \frac{\hbar^2 k^2}{2m_o} & 0 \\ i\sqrt{\frac{1}{3}}Pk & 0 & 0 & E_v - \Delta - \gamma_1 \frac{\hbar^2 k^2}{2m_o} \end{pmatrix} \quad (5.75)$$

Para os elétrons, light-hole e Split-off essa matriz é idêntica a matriz do subespaço $F = 1/2$, os autovalores são os mesmos porém neste caso as condições de contorno mudam. O autovalor referente ao heavy-hole já está na forma diagonal e vale

$$E_{HH} = -(\gamma_1 - 2\gamma_2) \frac{\hbar^2 k^2}{2m_o} \quad (5.76)$$

pois o topo da banda de valência é definido como energia zero. A condição de contorno para a banda de condução nesse caso é $j_1(ka) = 0$. A condição de contorno para o Split-off é $j_2(ka) = 0$. Percebemos entretanto que nesse caso o light-hole e o heavy-hole estão acoplados. Seus autovetores são combinações lineares de seus respectivos vetores. A condição de contorno nesse caso vai envolver as funções radiais $j_l(ka)$ para os dois tipos de buraco, logo

$$\phi = A\phi_{HH} + B\phi_{LH} \quad (5.77)$$

A condição de contorno impõe que na superfície do QD $\phi = 0$

$$\begin{cases} Aj_0(k_{HH}a) + Bj_0(k_{LH}a) = 0 \\ Aj_2(k_{HH}a) - Bj_2(k_{LH}a) = 0 \end{cases} \quad (5.78)$$

Para que o sistema (5.78) tenha solução diferente da trivial seu determinante tem que ser nulo, ou seja:

$$j_0(k_{HH}a)j_2(k_{LH}a) + j_0(k_{LH}a)j_2(k_{HH}a) = 0 \quad (5.79)$$

Já o subbloco $H_{F_{3/2}}^{l=0}$ par, tem sua matriz dada por

$$H_{F_{3/2}}^{l=0} = \begin{pmatrix} \left| \frac{1}{2}, 2 \right\rangle_c & \left| \frac{3}{2}, 1 \right\rangle_v & \left| \frac{3}{2}, 3 \right\rangle_v & \left| \frac{1}{2}, 1 \right\rangle_{so} \\ E_c + \frac{\hbar^2 k^2}{2m_o} & i\sqrt{\frac{1}{15}}Pk & -i\sqrt{\frac{1}{5}}Pk & -i\sqrt{\frac{1}{3}}Pk \\ -i\sqrt{\frac{1}{15}}Pk & E_v - \left(\gamma_1 - \frac{8}{\gamma_2} \right) \frac{\hbar^2 k^2}{2m_o} & \frac{6\gamma_2}{5} \frac{\hbar^2 k^2}{2m_o} & \frac{2\gamma_2}{\sqrt{5}} \frac{\hbar^2 k^2}{2m_o} \\ i\sqrt{\frac{3}{5}}Pk & \frac{6\gamma_2}{5} \frac{\hbar^2 k^2}{2m_o} & E_v - \left(\gamma_1 + \frac{8}{\gamma_2} \right) \frac{\hbar^2 k^2}{2m_o} & -\frac{6\gamma_2}{5} \frac{\hbar^2 k^2}{2m_o} \\ i\sqrt{\frac{1}{3}}Pk & \frac{2\gamma_2}{\sqrt{5}} \frac{\hbar^2 k^2}{2m_o} & -\frac{6\gamma_2}{5} \frac{\hbar^2 k^2}{2m_o} & E_v - \Delta - \gamma_1 \frac{\hbar^2 k^2}{2m_o} \end{pmatrix} \quad (5.80)$$

Redefinindo da mesma maneira dois novos vetores da base como

$$|LH\rangle = \frac{1}{\sqrt{10}} \left(\left| \frac{3}{2}, 1 \right\rangle_v - 3 \left| \frac{3}{2}, 3 \right\rangle_v \right) \text{ e } |HH\rangle = \frac{1}{\sqrt{10}} \left(3 \left| \frac{3}{2}, 1 \right\rangle_v + \left| \frac{3}{2}, 3 \right\rangle_v \right), \text{ a matriz fica}$$

$$H_{F=3/2}^{l=0} = \begin{pmatrix} \left| \frac{1}{2}, 2 \right\rangle_c & |LH\rangle & |HH\rangle & \left| \frac{1}{2}, 1 \right\rangle_{so} \\ E_c + \frac{\hbar^2 k^2}{2m_o} & i\sqrt{\frac{2}{3}}Pk & 0 & -i\sqrt{\frac{1}{3}}Pk \\ -i\sqrt{\frac{2}{3}}Pk & E_v - (\gamma_1 + 2\gamma_2) \frac{\hbar^2 k^2}{2m_o} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & E_v - (\gamma_1 - 2\gamma_2) \frac{\hbar^2 k^2}{2m_o} & 0 \\ i\sqrt{\frac{1}{3}}Pk & 0 & 0 & E_v - \Delta - \gamma_1 \frac{\hbar^2 k^2}{2m_o} \end{pmatrix} \quad (5.81)$$

A matriz do subespaço $F = 3/2$ é idêntica a do espaço ímpar, possuindo os mesmos autovalores porém os autovetores são diferentes. Como os autovetores são diferentes as condições de contorno para a função envelope também serão diferentes. Para o elétron $j_2(ka) = 0$, Split-off $j_1(ka) = 0$. O light-hole e o heavy-hole estão acoplados nesse caso novamente. Utilizando o mesmo raciocínio anterior a condição de contorno fica

$$\begin{cases} Cj_1(k_{HH}a) + Dj_1(k_{LH}a) = 0 \\ Cj_3(k_{HH}a) - Dj_3(k_{LH}a) = 0 \end{cases} \quad (5.82)$$

Aplicando a condição de determinante nulo, temos

$$9j_1(k_{HH}a)j_3(k_{LH}a) + j_1(k_{LH}a)j_3(k_{HH}a) = 0 \quad (5.83)$$

Finalmente temos as energias para cada banda do QD e as condições de contorno que causam o confinamento dos elétrons e buracos. A seguir listaremos as 4 relações de dispersão das bandas e um resumo das condições de contorno.

$$E_{EL} = E_g + \frac{\hbar^2 k^2}{2m_0} \left[1 + \frac{E_p}{3} \left(\frac{2}{E_{EL}} + \frac{1}{E_{EL} + \Delta} \right) \right] \quad (5.84)$$

$$E_{LH} = \frac{\hbar^2 k^2}{2m_0} \left[\frac{2E_p}{3(E_{LH} - E_g)} - (\gamma_1 + 2\gamma_2) \right] \quad (5.85)$$

$$E_{SO} = \frac{\hbar^2 k^2}{2m_0} \left[\frac{E_p}{3(E_{SO} - E_g)} - \gamma_1 \right] - \Delta \quad (5.86)$$

$$E_{HH} = -(\gamma_1 - 2\gamma_2) \frac{\hbar^2 k^2}{2m_0} \quad (5.87)$$

	$F^+ = 1/2$	$F^- = 1/2$	$F^+ = 3/2$	$F^- = 3/2$
EL	$j_0(k_{EL}a) = 0$	$j_1(k_{EL}a) = 0$	$j_2(k_{EL}a) = 0$	$j_1(k_{EL}a) = 0$
SO	$j_1(k_{SO}a) = 0$	$j_0(k_{SO}a) = 0$	$j_1(k_{SO}a) = 0$	$j_2(k_{SO}a) = 0$
LH	$j_1(k_{LH}a) = 0$	$j_2(k_{LH}a) = 0$	$9j_1(k_{HH}a)j_3(k_{LH}a) +$	$j_0(k_{HH}a)j_2(k_{LH}a) +$
HH			$j_1(k_{LH}a)j_3(k_{HH}a) = 0$	$j_0(k_{LH}a)j_2(k_{HH}a) = 0$

Tabela 3 Condições de contorno para os QDs.

Para calcular a energia de confinamento para os elétrons, Split-off e light-hole do subespaço $F = 1/2$ utilizamos o seguinte procedimento:

1. A partir das condições de contorno da Tabela 3 calcular o valor de k para cada raio a .
2. Utilizar o valor de k para calcular a energia nas equações (5.84) à (5.86)

O software Excel da Microsoft, ou qualquer outro software matemático, pode ser utilizado para fazer esses cálculos. Instruções de como utilizar o Excel para realizar esses cálculos pode ser encontradas na tese de mestrado de Antônio Neves[77].

No caso do light-hole e heavy-hole não podemos utilizar o mesmo procedimento pois precisamos resolver uma equação transcendental para achar os valores dos k_{HH} e k_{LH} . Nesta situação, porém, a energia é a mesma para os dois buracos. O procedimento é, então, modificado para a seguinte forma:

1. Escolhemos um valor de energia para os buracos e a partir das equações (5.85) e (5.87) calculamos o par k_{HH} e k_{LH} correspondente.

2. Aplicamos esse par k_{HH} e k_{LH} nas condições de contorno da Tabela 3 e verificamos se foram satisfeitas ou não.
3. No caso da condição estar satisfeita já temos a energia em função de k , caso contrário variamos o valor da energia até que a condição de contorno seja satisfeita.

Assim como no caso anterior, podemos utilizar o Excel para calcular as energias de confinamento. Os detalhes podem ser encontrados na tese de mestrado de Antônio Neves[77]

5.4 Problemas

A Figura 67 contém a dispersão de energia para o CdTe calculada pelos diferentes métodos para a primeira zona de Brillouin na direção $\Gamma \rightarrow X$.

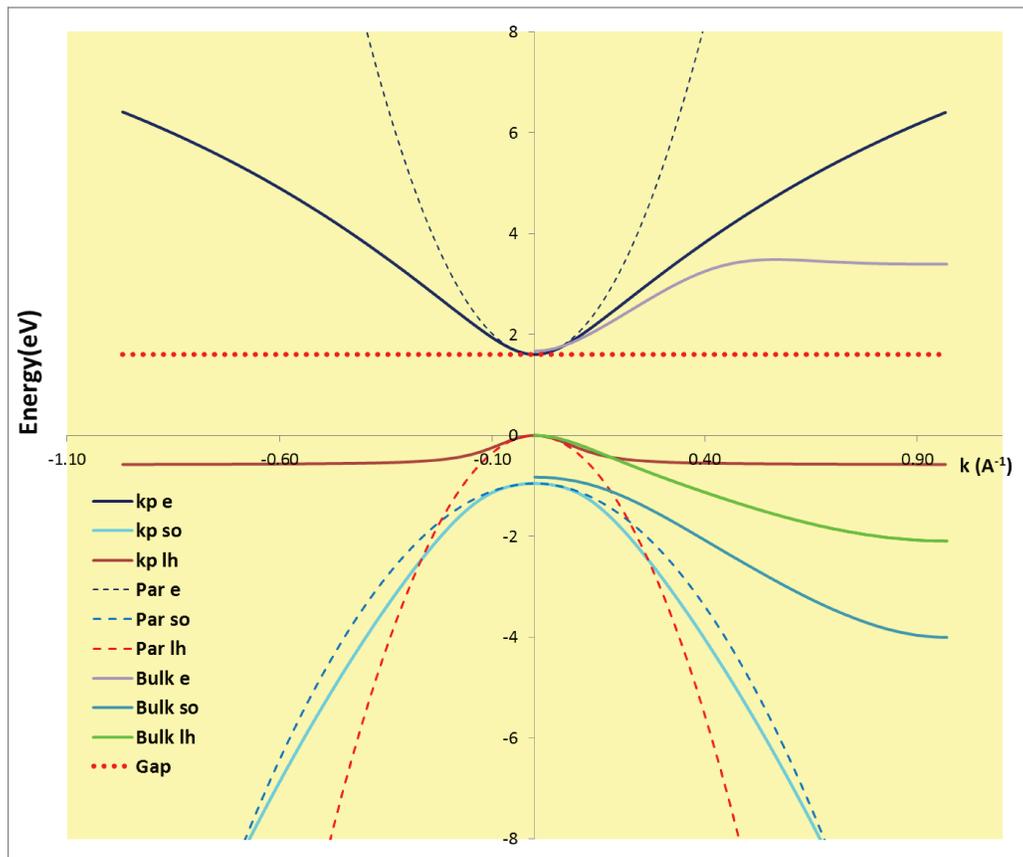


Figura 67 Dispersão da energia do CdTe calculada pelos diferentes métodos.

As legendas e, so e lh são referentes a banda de condução [elétron], Split-off e light-hole respectivamente. Curvas com a legenda kp foram calculadas pelo método $\vec{k} \cdot \vec{p}$ utilizando as equações (5.84) à (5.86), curvas com a legenda par foram calculadas utilizando o modelo parabólico e curvas com a legenda bulk são as curvas de energia da Figura 63. A legenda Gap indica no valor do gap do bulk do CdTe. As curvas do heavy-hole foram omitidas para não saturar o gráfico. Em torno de $k = 0$ as curvas obtidas pelo modelo $\vec{k} \cdot \vec{p}$ e pelo modelo parabólico estão bem próximas da curva do bulk. Porém quando o k começa a crescer as três curvas tomam valores bem distintos. A do modelo parabólico cresce rapidamente para o caso da energia do elétron, enquanto a curva do modelo $\vec{k} \cdot \vec{p}$ fica em valores intermediários mas diferentes ainda da curva do bulk. Para valores de k muito grandes a curva do bulk tem uma espécie de saturação enquanto as duas outras curvas continuam crescendo. O mesmo fenômeno acontece para os buracos. Em torno de zero as curvas coincidem. No caso do light-hole (lh) a curva calculada pelo modelo $\vec{k} \cdot \vec{p}$ tem um comportamento bem peculiar, ficando constante para valores de k diferentes de zero, bem diferente do comportamento da curva do bulk. A curva do modelo parabólico cresce rapidamente também tendo valores diferentes do bulk. Para o Split-off (so) os valores do modelo $\vec{k} \cdot \vec{p}$ acabam crescendo mais rapidamente do que os valores do modelo parabólico, sendo novamente bem diferentes dos valores para o bulk.

Essa análise mostra que a aproximação do modelo $\vec{k} \cdot \vec{p}$ não consegue recuperar a dispersão de energia do bulk se estendermos o QD até o infinito. Para o fundo das bandas ($k = 0$) os modelos fornecem valores satisfatórios. Porém à medida que k se afasta de zero os valores começam a divergir significativamente.

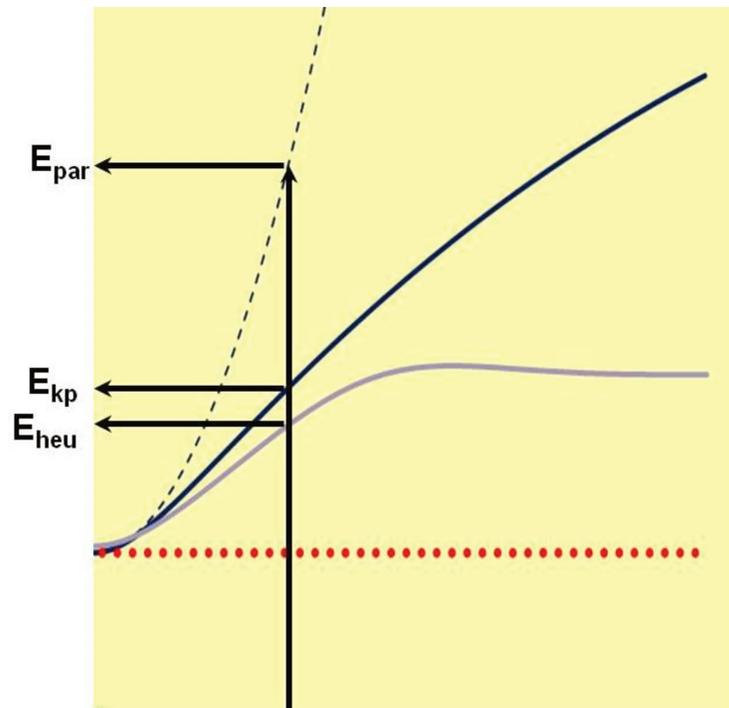


Figura 68 Cálculo da energia de confinamento utilizando diferentes modelos para a curva de dispersão da banda de condução.

Essa diferença nas curvas das bandas dos diferentes modelos tem implicações fortes na energia de confinamento. Vamos considerar, por exemplo, o caso do confinamento na banda de condução que satisfaz a condição de contorno

$$j_l(ka) = 0, \text{ com o raio do QD } a \text{ bem conhecido. Nesse caso } k = \frac{\pi\chi_{lm}}{a} \text{ está definido.}$$

Conforme se observa na Figura 68 a energia de confinamento no modelo parabólico é definida pela interseção de reta vertical em k com a curva de dispersão parabólica, a do modelo $\vec{k} \cdot \vec{p}$ com a dispersão $\vec{k} \cdot \vec{p}$ e do modelo heurístico desse capítulo através da interseção com a curva de dispersão real do bulk. Note que o modelo parabólico super-estima por larga margem o confinamento, o modelo $\vec{k} \cdot \vec{p}$ também super estima mas não tanto, comparado com o confinamento utilizando o método heurístico.

Entretanto, a situação mais comum é aquela em que se conhece a energia de confinamento através das medidas de absorção óptica da qual se pretende extrair o raio do quantum dot.

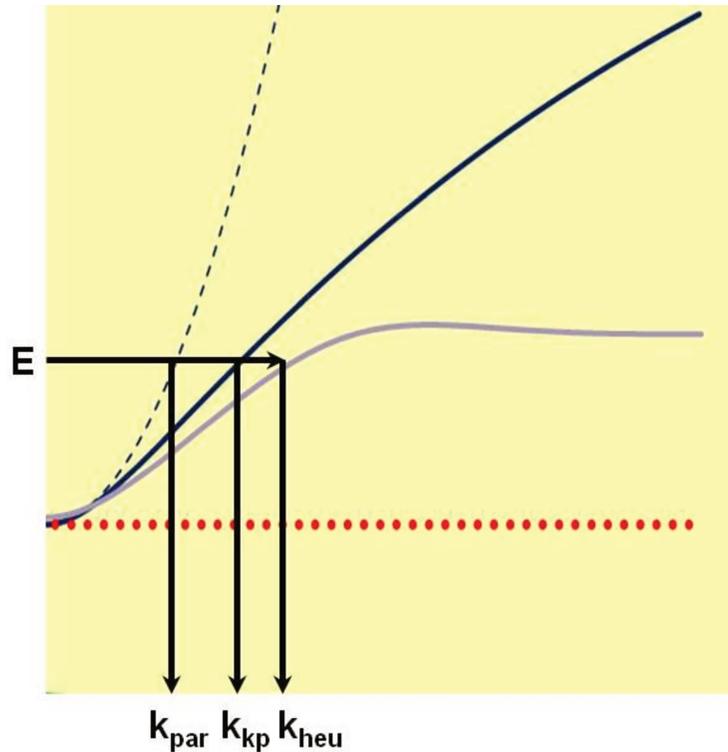


Figura 69 Cálculo do raio do QD através da energia de confinamento utilizando diferentes modelos para a curva de dispersão da banda de condução.

A Figura 69 agora mostra que $k_{par} < k_{\vec{k} \cdot \vec{p}} < k_{heu}$, o que significa que utilizando $a = \frac{\pi\chi_{lm}}{k}$ para calcular o raio do QD nos leva á desigualdade $a_{heu} < a_{\vec{k} \cdot \vec{p}} < a_{par}$, significando que tanto o modelo parabólico quanto o $\vec{k} \cdot \vec{p}$ superestimam os raios dos QDs. Para confinamentos muito pequenos até o modelo parabólico seria uma boa aproximação, enquanto o modelo $\vec{k} \cdot \vec{p}$ pode ser estendido para confinamentos maiores, mas nenhum dos dois pode ser estendido para confinamentos muito altos. Esse fato não supreende uma vez que mesmo no modelo $\vec{k} \cdot \vec{p}$ desprezamos termos de ordem superiores à k^2 . Por outro lado, a própria relação de dispersão de Kane aponta para o fato de que a massa efetiva se torna mais parabólica para valores de band gaps mais altos, ou seja, que a validade das aproximações se torna mais crítica para semicondutores com band gaps menores.

Um comportamento similar foi observado por Norris[78] em QDs de CdSe. O gráfico reproduzido na Figura 70 mostra os pontos experimentais em comparação com a energia da primeira transição em função do inverso do raio ao quadrado, para o modelo $\vec{k} \cdot \vec{p}$. Podemos ver na Figura 70 que enquanto a energia cresce indefinidamente para o modelo $\vec{k} \cdot \vec{p}$ os pontos experimentais se desviam da reta para raios muito pequenos (\vec{k} 's grandes) como acontece no bulk.

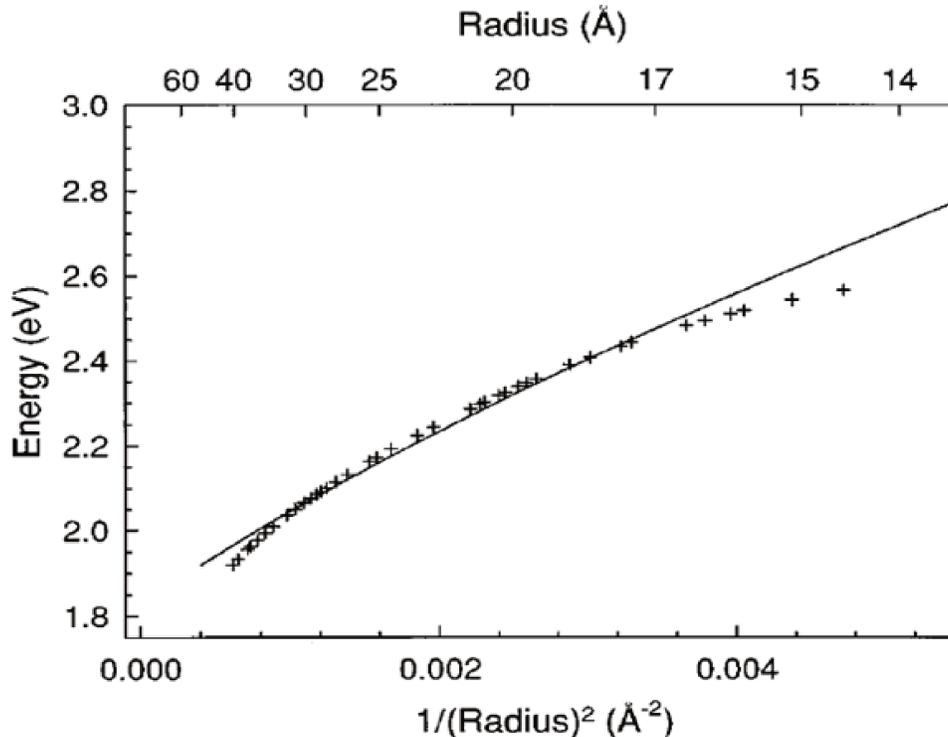


Figura 70 Energia da primeira transição em função do inverso do raio ao quadrado para quantum dots de CdSe. Linha contínua modelo $\vec{k} \cdot \vec{p}$, cruzes pontos experimentais[78]

O gap do CdTe é considerado pequeno em comparação a outros semicondutores como o CdSe, por exemplo. Com o gap pequeno a interação com as bandas remotas não podem ser descartadas. Efros[79, 80] modificou os cálculos para tentar incorporar esse comportamento contudo não teve sucesso, como apontado por Zunger[81]. Zunger observa que como o método $\vec{k} \cdot \vec{p}$ utiliza parâmetros do bulk, como por exemplo, E_p, γ_1, γ_2 , que não podem ser medidos diretamente, diferentes conjuntos de valores de parâmetros podem dar os mesmos resultados. A grande crítica ao modelo $\vec{k} \cdot \vec{p}$ tem sido a de que a liberdade na escolha dos parâmetros permitiria ajustar o modelo para explicar

quaisquer resultados experimentais. Efros tenta rebater a crítica[82], dizendo que o método $\vec{k} \cdot \vec{p}$ foi capaz de descrever a absorção, hole burning e o espectro de excitação de fotoluminescência em nanocristais de CdSe. Para descrever QDs com gap menores, Efros usa o exemplo do cálculo das energias em função do tamanho do QD para o elétron e para o heavy-hole, mostrado na Figura 71

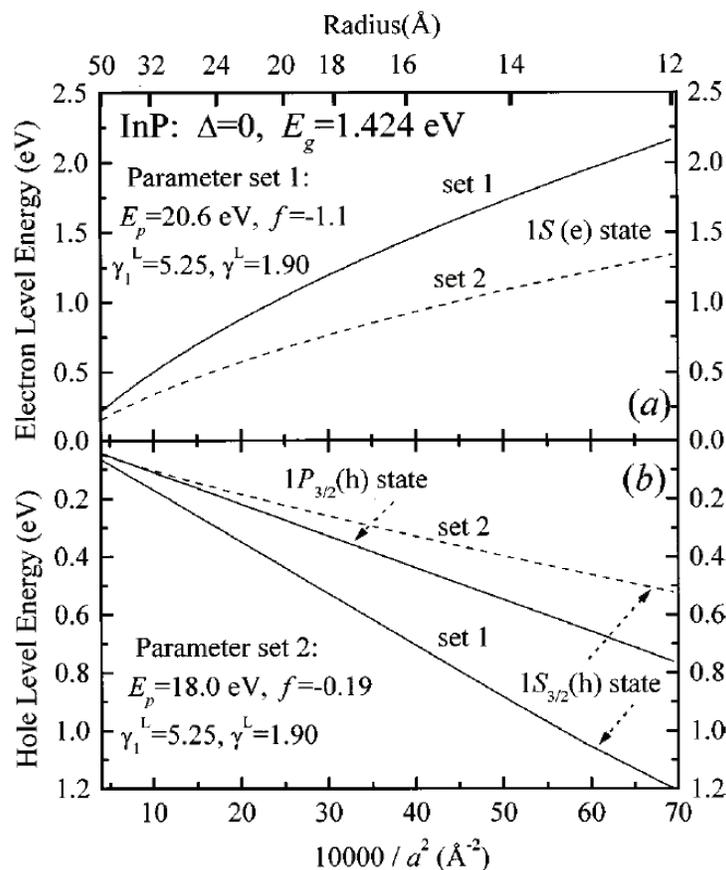


Figura 71 Cálculo dos níveis com dois grupos de parâmetros diferentes[82]

Ele utilizou dois grupos de parâmetros diferentes. O primeiro utilizando valores dos parâmetros do bulk medidos. No segundo grupo o valor de E_p foi variado em 10%, modificando completamente o resultado mudando a simetria do estado dos buracos para um orbital tipo S. Zunger novamente refuta[83] os argumentos a favor do método $\vec{k} \cdot \vec{p}$ expostos por Efros, dizendo que um bom ajuste dos dados experimentais nem sempre representa uma boa teoria. Continua dizendo que se apenas uma mudança tão pequena no valor do E_p , que é da ordem dos valores encontrados na literatura, causa uma mudança tão drástica na

ordem dos níveis isso deveria ser levado em conta na avaliação do método. Finaliza dizendo que o objetivo do seu método não é fornecer um novo valor de E_p para adicionar a longa lista de valores existentes, mas sim comparar dois métodos diferentes para o cálculo dos níveis de energia para o QD a partir de um dado comum que é a relação de dispersão do bulk.

Zunger aponta que a metodologia $\vec{k} \cdot \vec{p}$ super estima as energias de confinamento tanto para as bandas de valência quanto as bandas de condução e mostra que as principais razões para os erros dessa técnica são a base muito restrita das funções de Bloch no fundo da banda $u_{n0}(\vec{r})$ e a relação de dispersão do bulk incorreta.

Por outro lado Efos aponta que a técnica Direct Diagonalization Method [DDM] utilizada por Zunger tem apresentado dificuldades no cálculo dos parâmetros do bulk. Além disso a técnica utilizada por Zunger está relacionada com a metodologia DFT, Density Functional Theory, a qual tem apresentado dificuldades inclusive na obtenção do band gap do bulk. Não se pode esperar muito de metodologias incapazes de obter valores precisos para o band gap do bulk. Além disso, em lugar de resolver diretamente a equação

$$\left[\frac{\hat{p}^2}{2m_0} + V_{per}(\vec{r}) \right] \Psi_n(\vec{r}) = E_n \Psi_n(\vec{r}) \quad (5.88)$$

Esse grupo resolve um sistema “dobrado” nas proximidades de uma energia de referência

$$\left[\frac{\hat{p}^2}{2m_0} + V_{per}(\vec{r}) - E_{ref} \right]^2 \Psi_n(\vec{r}) = (E_n - E_{ref})^2 \Psi_n(\vec{r}) \quad (5.89)$$

Para os quais apresentam justificativas aparentemente sem uma aceitação universal. Traduzindo, em termos de aproximação por aproximação os dois métodos apresentam problemas similares. Entretanto, aparentemente se torna claro que a utilização de curvas de dispersão do bulk erradas geram confinamentos quânticos super estimados.

Tendo isso em mente, nós decidimos utilizar um método heurístico para calcular as bandas de energia do QD, usando a estrutura da metodologia $\vec{k} \cdot \vec{p}$ com a relação de dispersão do bulk calculada por métodos mais precisos. Como o problema está relacionado com a não recuperação da dispersão de energia do bulk e na escolha dos parâmetros $(E_p, \gamma_1, \gamma_2)$ nós utilizamos diretamente a dispersão de energia do bulk. Ao fazer isso garantimos que no limite do raio do QD indo para infinito retomamos a dispersão do bulk e também garantimos que estamos usando os valores corretos dos parâmetros do bulk. É bastante razoável que utilizemos as mesmas condições de contorno do método $\vec{k} \cdot \vec{p}$ anulando as funções envelope na superfície do QD e que a simetria esférica do problema nos permite usar os harmônicos esféricos e as funções esféricas de Bessel como base.

5.5 Método Heurístico

Para contornar os problemas encontrados no método $\vec{k} \cdot \vec{p}$ (a não recuperação da dispersão de energia do bulk e a escolha dos parâmetros E_p, γ_1, γ_2) nós utilizaremos diretamente a relação de dispersão do bulk. A relação de dispersão do bulk para o CdTe foi calculada na tese de doutorado de Mauro Ribeiro Júnior[69] orientada pelo Prof. Luiz Guimarães Ferreira no Instituto de Física da USP. O método denominado de DFT/LDA-1/2 [LDA-1/2 = Local Density Approximation na técnica de meia ocupação] desenvolvido pelo grupo do prof. Guimarães na USP se mostrou capaz de calcular band gaps de muitos semicondutores assim como os Valence Band Offsets de diversas heterojunções. Procuramos resultados experimentais das curvas de dispersão para o CdTe, difíceis de encontrar pois não se trata de um experimento simples, e percebemos que são bem explicados pelos resultados obtidos na tese do Mauro Ribeiro Jr. Dessa forma decidimos usar esse método como padrão para o cálculo das relações de dispersão do bulk. O gráfico da Figura 72 mostra a relação de

dispersão para CdTe para valores de k positivos na direção $\Gamma \rightarrow X$ calculados pelo Prof. Guimarães.

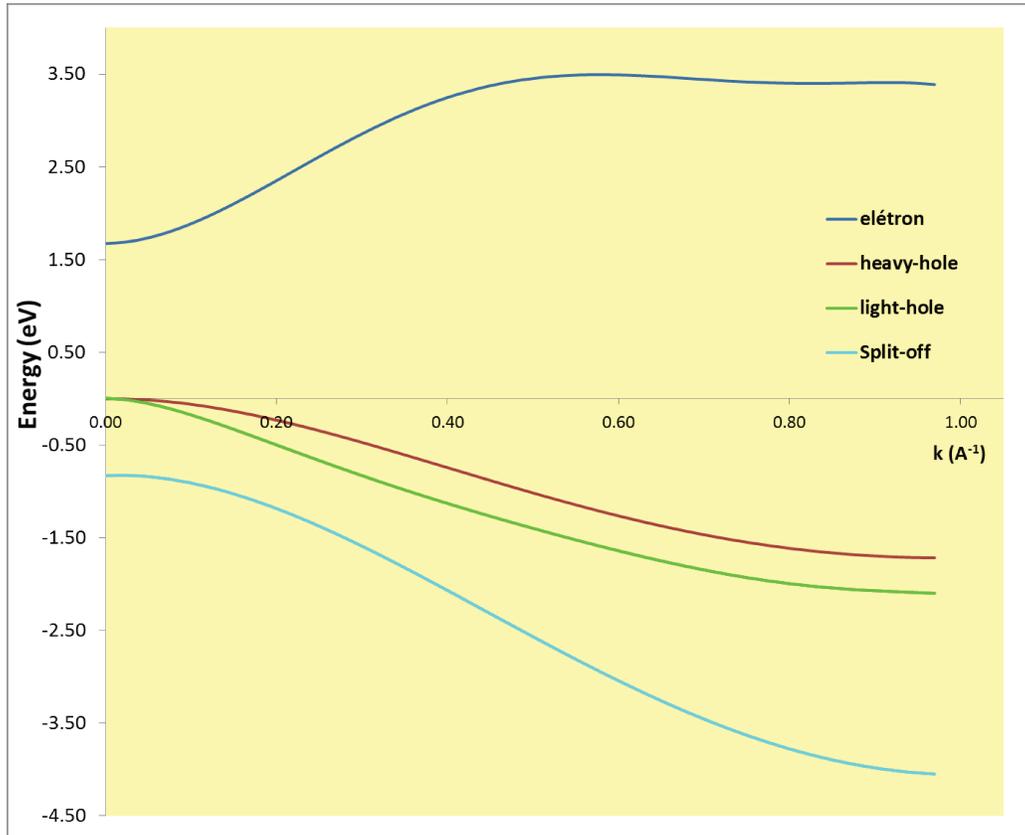


Figura 72 Relação de dispersão da energia para o CdTe bulk direção $\Gamma \rightarrow X$.

Para aplicar as condições de contorno da Tabela 3 precisamos do vetor de onda k que satisfaça a condição de que ka seja uma raiz da função esférica de Bessel para um determinado raio a do QD. O gráfico da Figura 72 nos fornece a energia em função do vetor de onda k , traçada a partir de pontos discretos. Para aplicar a condição de contorno e calcular a energia precisamos de uma relação contínua entre energia e vetor de onda $E(k)$. Para o elétrons, Split-off e o light-hole do subespaço $F = 1/2$ esse cálculo pode ser feito diretamente. Basta fazer um ajuste da curva da dispersão da energia e usar a função obtida para calcular a energia referente a qualquer vetor de onda.

O procedimento para o heavy-hole e light-hole do subespaço $F = 3/2$, entretanto, é mais complicado, pois a condição de contorno para esse subespaço é uma equação transcendental, que não nos permite determinar os vetores de onda para depois calcular a energia referente a esses vetores. Nessa situação adotaremos uma estratégia interativa. O procedimento precisa das curvas das funções inversas $k_{HH}(E)$ e $k_{LH}(E)$, em lugar de $E(k)$. Daí escolhe-se um valor para a energia E com o qual calculamos $k_{HH}(E)$ e $k_{LH}(E)$ e aplicamos nas condições de contorno da Tabela 3, que manteremos igual as condições de contorno do método $\vec{k} \cdot \vec{p}$. Se a condição de contorno for satisfeita encontramos a energia, se não repetimos o processo iterativamente até encontrar a energia de confinamento.

A seguir apresentamos detalhes do procedimento do cálculo heurístico. Para o caso da energia do elétron, Split-off e light-hole as condições de contorno são do tipo

$$j_l(ka) = 0 \rightarrow k_{ln} = \frac{\chi_{ln}}{a} \quad (5.90)$$

Onde o índice l é referente ao momento angular e χ_{ln} a n ésima raiz da função esférica de Bessel. Para esse tipo de condição de contorno serão feitos os seguintes passos:

1. Traçamos o gráfico da dispersão de energia no Microsoft Excel
2. Inserimos uma Linha de Tendência polinomial no gráfico, ajustando a potência do polinômio para se adequar a curva.
3. A partir do polinômio podemos calcular a energia referente ao k_{ln} , ou seja, $E(k_{ln})$.

Repetindo esse procedimento podemos calcular a energia dos elétrons e dos buracos para cada tamanho de Quantum Dot. A seguir mostramos os gráficos com os ajustes para dispersão da energia para elétrons, light-hole e Split-off.

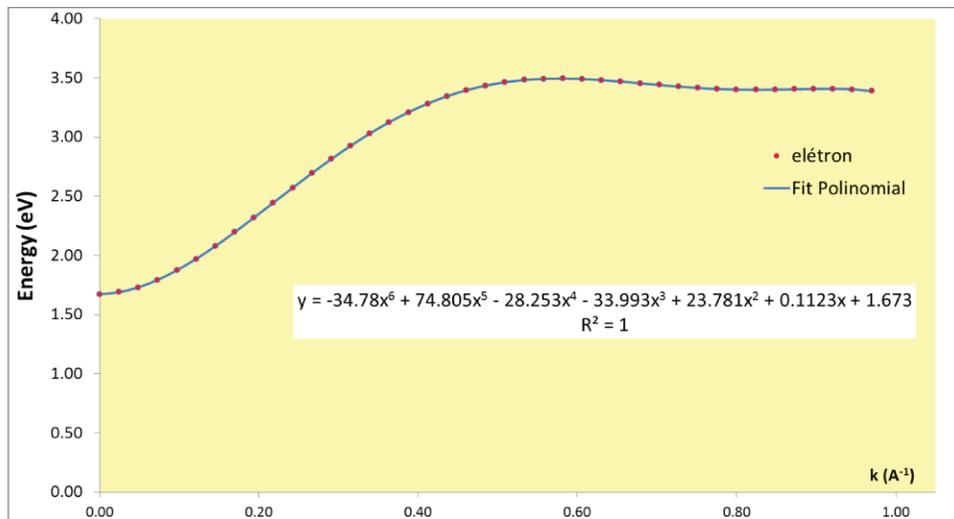


Figura 73 Ajuste para a relação de dispersão do elétron.

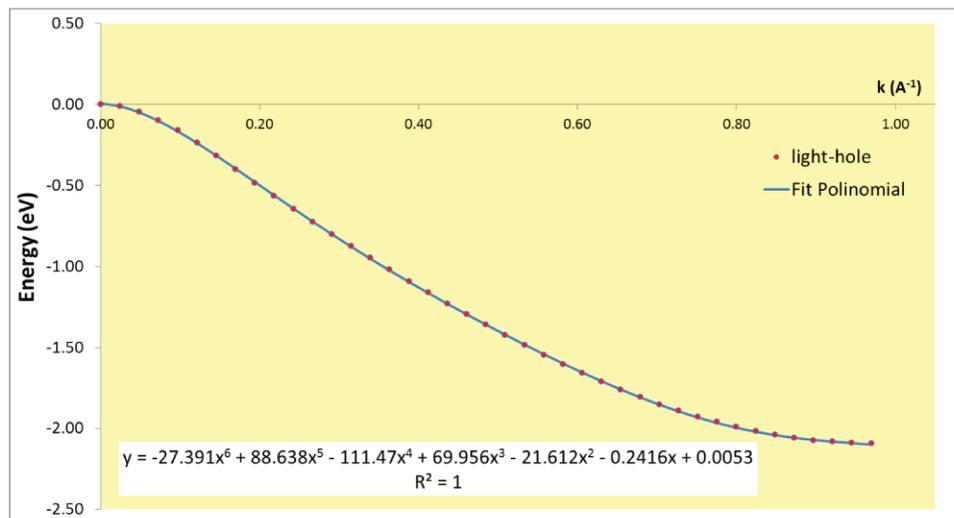


Figura 74 Ajuste para a relação de dispersão do light-hole.

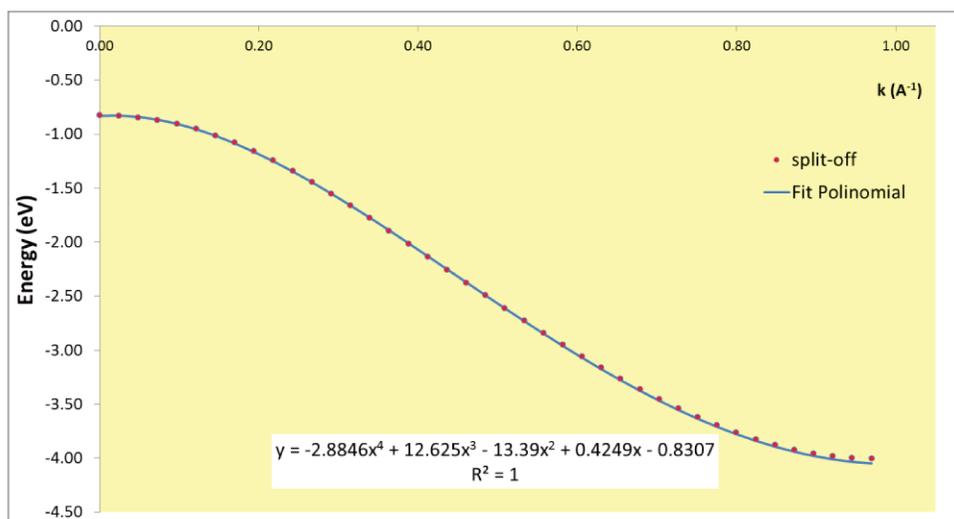


Figura 75 Ajuste para a relação de dispersão do Split-off.

Dos gráficos da Figura 73 a Figura 75 podemos tirar as relações da energia em função do vetor de onda para cada caso. As relações são apresentadas na tabela a seguir

Banda	Energia(k)
Elétron	$E_{EL} = -34.78k^6 + 74.805k^5 - 28.253k^4 - 33.993k^3 + 23.781k^2 + 0.1123k + 1.673$
Light-hole	$E_{LH} = -27.391k^6 + 88.638k^5 - 111.47k^4 + 69.956k^3 - 21.612k^2 - 0.2416k + 0.0053$
Split-off	$E_{SO} = -2.8446k^4 + 12.625k^3 - 13.39k^2 + 0.4249k - 0.8307$

Tabela 4 Energia em função do vetor de onda

Para o heavy-hole temos que modificar o procedimento. Por causa da sua condição de contorno não basta apenas calcular a energia para o vetor de onda, já que a energia é a mesma para os dois buracos. Precisamos da relação inversa, para calcular os dois vetores de onda em função da energia. O procedimento neste caso será o seguinte:

1. Traçar o gráfico no Excel da dispersão de energia para o heavy-hole e light-hole.
2. Inverter os eixos, isto é, trocar a o eixo da energia com o eixo do k .
3. Traçar o novo gráfico para os eixos invertidos.
4. Ajustar o polinômio para as duas curvas.
5. Escolher uma energia inicial
6. Calcular os vetores de onda para essa energia inicial
7. Verificar se a condição de contorno com os vetores de ondas calculados é satisfeita
8. Se não for satisfeita a condição de contorno variar a energia para que se aproxime da condição desejada.

O gráfico da Figura 76 mostra as curvas do LH e HH já invertidas

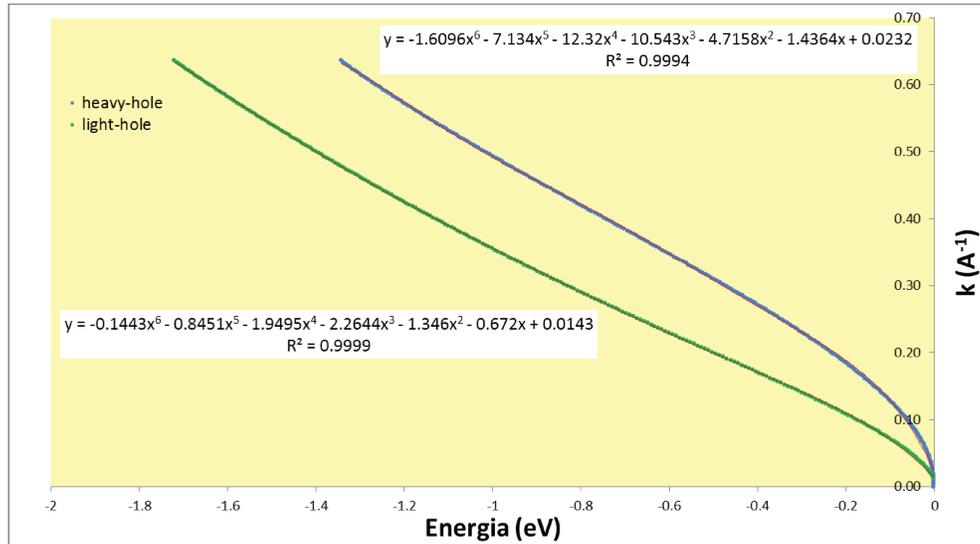


Figura 76 Vetor de onda em função da energia

As relações do vetor de onda em função da energia estão apresentadas na tabela a seguir

Banda	$k(E)$
Light-hole	$k_{LH} = -0.1443E^6 - 0.8451E^5 - 1.9495E^4 - 2.2644E^3 - 1.346E^2 - 0.672E + 0.0143$
Heavy-hole	$k_{HH} = -1.6096E^6 - 7.134E^5 - 12.32E^4 - 10.543E^3 - 4.7158E^2 - 1.4364E + 0.0232$

O processo de escolher a energia e verificar a condição de contorno é um processo que requer muitos passos, praticamente impossível de ser feito manualmente. Neste ponto utilizamos o mesmo procedimento empregado na tese de mestrado de Antônio Neves[77]. Nós criamos uma planilha no Excel em que para cada raio do QD era escolhido um valor de energia inicial, calculamos os vetores de onda correspondentes ao LH e HH e utilizamos a ferramenta Solver do Excel para procurar valor de energia que satisfaça a condição de contorno desejada. Deve-se apenas tomar cuidado para encontrar as raízes da ordem mais baixa para a mais alta.

Utilizando os procedimentos descritos até agora fomos capazes de calcular os níveis de energia para diferentes tamanhos de QD. O gráfico a seguir mostra esses níveis calculados. As letras i ou p nas legendas significam níveis ímpares ou

pares e os números representam os índices de cada nível (vindo das raízes da função esférica de Bessel).

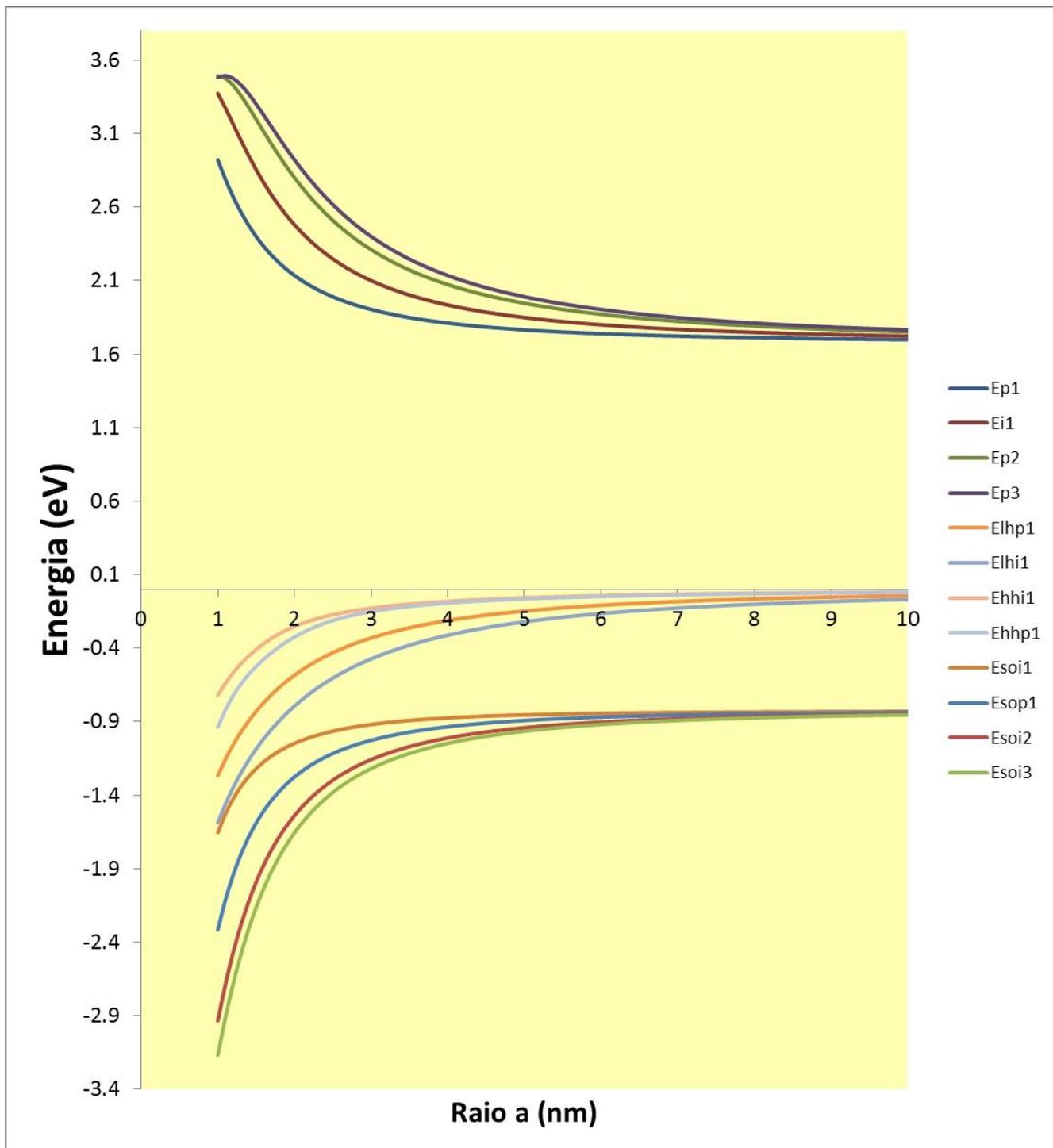


Figura 77 Níveis de energia para os diferentes portadores em função do raio para os QDs de CdTe calculados pelo método proposto na tese.

Podemos fazer uma comparação entre os níveis calculados pelo método $\vec{k} \cdot \vec{p}$ e pelo método proposto nessa tese. A Figura 78 e Figura 79 mostram os níveis calculados com os dois métodos.

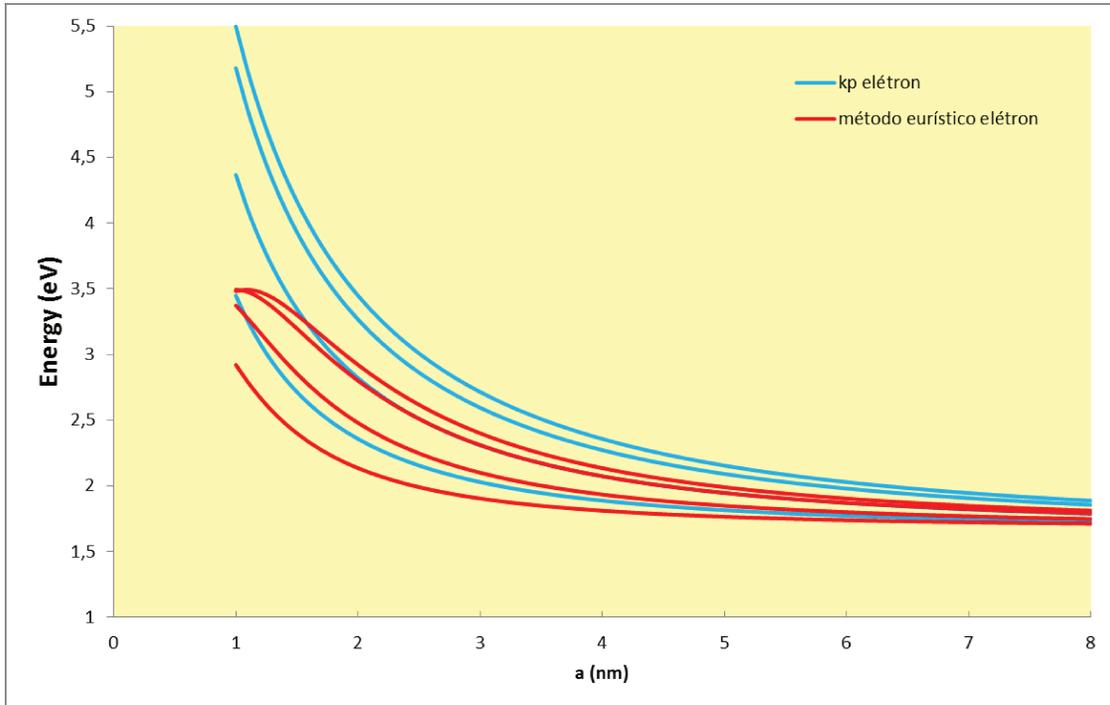


Figura 78 Comparação entre as energias dos níveis dos elétrons entre os métodos

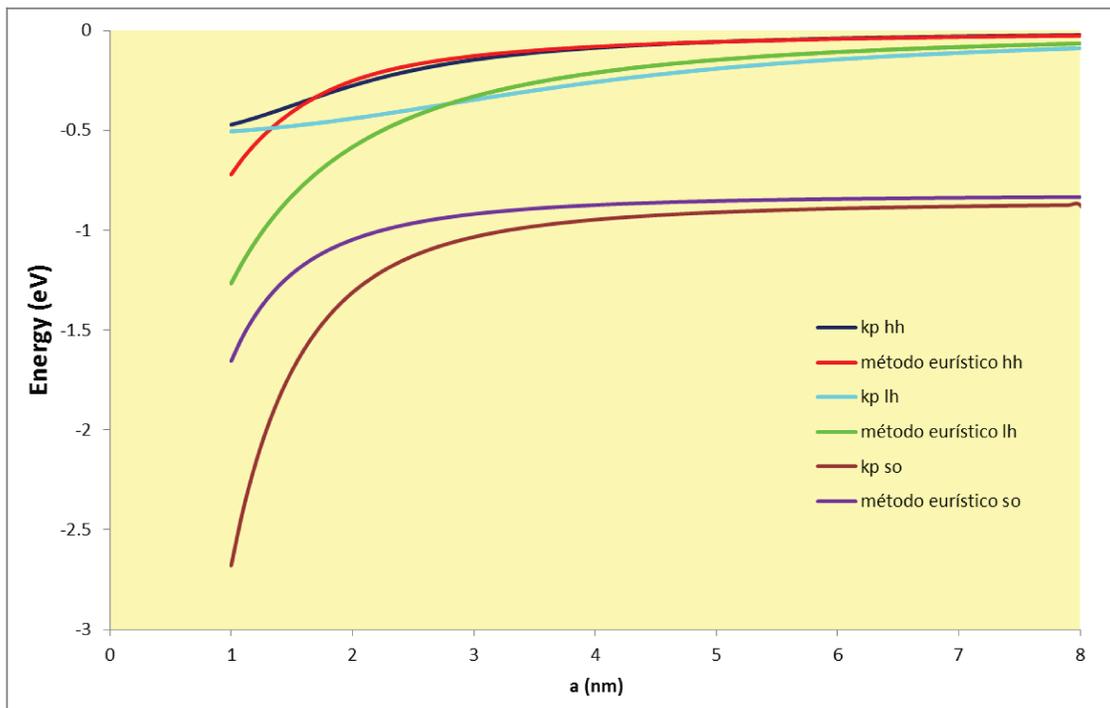


Figura 79 Comparação entre as energias dos níveis dos buracos entre os métodos

Analisando os gráficos da Figura 78 e da Figura 79 vemos a diferença entre os níveis de energia. De uma maneira geral o método $\vec{k} \cdot \vec{p}$ superestima os níveis de energia. Existe uma diferença de aproximadamente 0.5 eV entre as duas curvas na região de 1 nm e uma diferença de 0.2 na região de 2 nm. Essa diferença pode ser importante, pois muitas vezes utiliza-se a medida do pico de absorção para calcular o tamanho do QD. Ao se comparar com os níveis calculados pelo $\vec{k} \cdot \vec{p}$ pode-se obter quantum dots muito maiores do que realmente são. Um exemplo seria para um QD de 2 nm de raio a primeira transição (entre o $E_{\text{hh1}}-E_{\text{p1}}$) para o método $\vec{k} \cdot \vec{p}$ estaria em 470 nm enquanto para o novo método em 520 nm. Uma diferença de 50 nm. Invertendo a análise, para um pico de absorção de 490 nm o raio previsto pela teoria $\vec{k} \cdot \vec{p}$ seria de 2.2 nm e para o método heurístico de 1.8 nm, uma diferença de 0.4 nm. Considerando que o parâmetro de rede do CdTe é de 0.64 nm, temos quase um parâmetro de rede de diferença entre os dois métodos.

Utilizamos esse método heurístico para calcular os tamanhos dos QDs utilizados nas nossas medidas de FCS. Os resultados desse método foram consistentes com os resultados do FCS, pois forneceram raios um pouco menores do que os raios hidrodinâmicos observados com FCS, compatíveis com a capa de passivação dos QDs. Já os resultados obtidos com o método $\vec{k} \cdot \vec{p}$ forneceram tamanhos maiores do que os raios hidrodinâmicos obtidos com FCS, mostrando uma contradição entre os dois métodos.

5.6 Amostras de QDs

Nessa seção realizamos a comparação entre quantum dots coloidais e embebidos em uma matriz vítrea para avaliar o papel do stress devido ao descasamento dos coeficientes de dilatação térmica. Os QDs coloidais foram preparados via rota química. O segundo tipo de QD foi sintetizado em matriz de

vidro através de tratamento térmico. Na sequência apresentamos alguns detalhes das amostras utilizadas nas medidas.

5.6.1 QDs de CdTe coloidais

Os QDs coloidais utilizados nessa tese foram sintetizados pelo doutorando Diogo Almeida em nosso grupo seguindo o procedimento descrito por Gaponik[84]. As rotas utilizadas para a produção de QDs de CdE (X= S, Se, Te) começam com a redução do calcogeneto (E) para transformá-lo de E metálico para E^{-2} , utilizando Na_2E produzido in situ através da adição do calcogênio metálico e de boro-hidreto de sódio ($NaBH_4$). Já o segundo precursor, o Cd^{2+} , é preparado com o acetato de cádmio na forma de pó diluído em uma solução de 10^{-2} mol/L, e o surfactante ácido mercaptoacético(AMA), um composto orgânico que contém enxofre. AMA é facilmente adsorvida nas superfícies dos pontos quânticos, devido à afinidade dos átomos de enxofre pelo cádmio, ajudando na eliminação dos defeitos da superfície do QD. O tamanho dos QDs é controlado pelo tempo de refluxo após a injeção do precursor de cádmio. As duas amostras apresentadas aqui tiveram tempos 17h [Col2909] e 44h [Col2108], com os respectivos espectros de absorção apresentados na Figura 80.

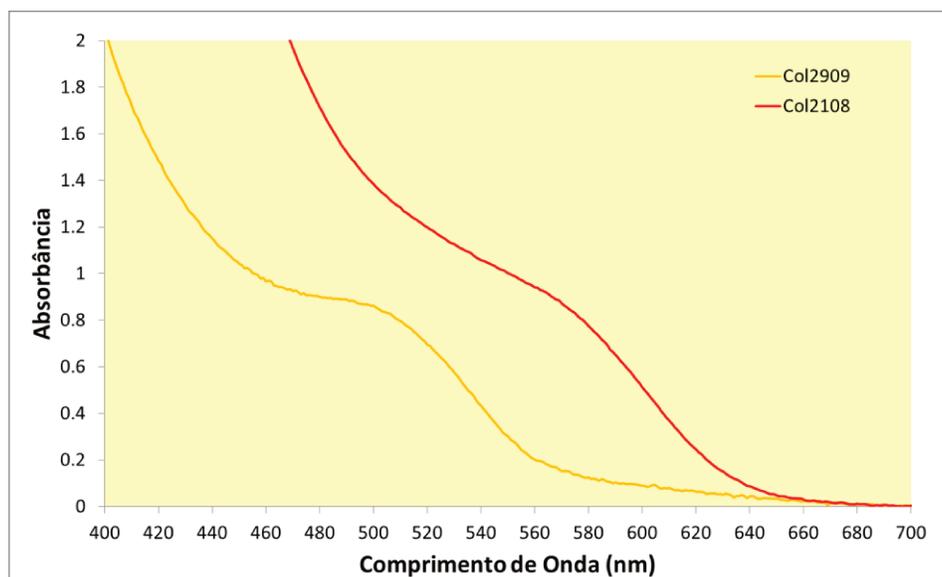


Figura 80 Espectros de Absorção do QDs coloidais utilizados na tese

Nossa convenção na denominação dos QDs coloidais é usar o prefixo Col seguido da data da produção dos mesmos. Maiores detalhes da metodologia estão descritos na tese de Mestrado de Diogo Burigo Almeida[85] e nas referências [86, 87].

As curvas de absorção foram ajustas com um background cúbico e uma gaussian e encontramos o pico de absorção d amostra Col2909 em 501 nm e o pico de absorção da amostra Col2108 em 551 nm. Utilizamos o pico de absorção da amostra Col2909 para calcular o tamanho do QD a partir de Dagpete[88] e comparar com o tamanho calculado pelos modelos da energia de transição propostos nesta tese. Já a amostra Col2108 foi sintetizada para ter um tamanho próximo ao tamanho da amostra do QD em matriz vítrea. Sabemos que seus tamanhos estão próximos pois suas curvas de absorção são similares.

5.6.2 QDs de CdTe em matriz vítrea

O crescimento de QDs em matrizes vítreas foi extensivamente descrito nas teses e trabalhos publicados pelo grupo[65, 66]. Utilizamos as mesmas amostras descritas por Moreira et al (2007). Aqui só vamos salientar os aspectos importantes para o entendimento do nosso trabalho.

Para produção dos QDs em matriz vítrea funde-se os precursores do vidro, SiO_2 , ZnO , B_2O_3 , Na_2O , adicionando 2% em peso da mistura de CdO e Te metálico, a $1400\text{ }^\circ\text{C}$ sobre agitação para garantir uma mistura homogênea. O material fundido é resfriado rapidamente para a temperatura ambiente, em um processo denominado “quenching”. Nessa etapa se obtém uma matriz vítrea com Cd e Te dispersos, sem a formação de QDs. Os QDs em si são formados por nucleação e crescimento após elevar a temperatura acima do soft point do vidro, em $540\text{ }^\circ\text{C}$, na qual é possível a difusão dos elementos Cd e Te e a nucleação acontece. O tamanho é controlado pelo tempo nessa temperatura de annealing, que foi de 300 minutos para nossa amostra. Percebe-se, portanto, que os QDs são formados nessa temperatura na qual os QDs e vidro estão em equilíbrio mecânico. O stress mecânico induzido por descasamento de coeficiente de

dilatação térmico, então, acontece para temperaturas abaixo da temperatura de annealing.

As propriedades macroscópicas termomecânicas dessas amostras como, densidade, expansão térmica, condutividade elétrica, entre outras, serão basicamente da matriz vítrea, uma vez que fração de QDs na matriz é bem pequena. Por outro lado, dado que o vidro é transparente as propriedades ópticas são definidas pelos QDs em si. A curva de absorção é mostrada na Figura 81, reproduzida da tese de Mestrado Max Soffner[89]. Chamaremos essa amostra de CdTe300.

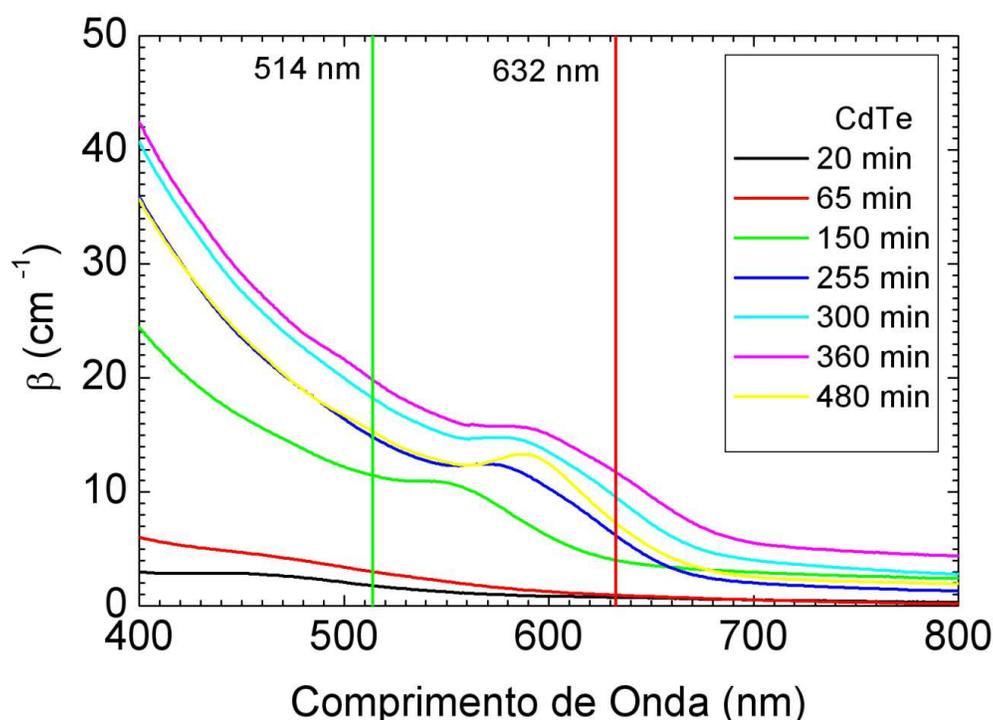


Figura 81 Curva de absorção para a amostra CdTe300[89]

5.7 Quantum Dots Coloidais x Matriz de Vidro

A primeira evidência do grupo de comportamentos anômalos em quantum dots em matriz vítrea foi observada na tese de doutorado de Gaston Tudury[66], para QDs de PbTe. Observou-se que o pico de absorção em função da temperatura tinha um comportamento muito diferente do comportamento do bulk, como se observa da Figura 82 extraída da tese do Gaston Tudury. As três

amostras medidas (com tamanhos dos QDs diferentes dependendo do tempo de tratamento térmico) tem uma variação do pico de absorção de $130 \mu\text{eV}/\text{K}$ à $30 \mu\text{eV}/\text{K}$, sendo praticamente linear. Esses valores estão bem abaixo do valor da variação do pico para o bulk. A variação para o bulk é da ordem de $400 \mu\text{eV}/\text{K}$. Essa variação continua pequena mesmo considerando o efeito do confinamento quântico.

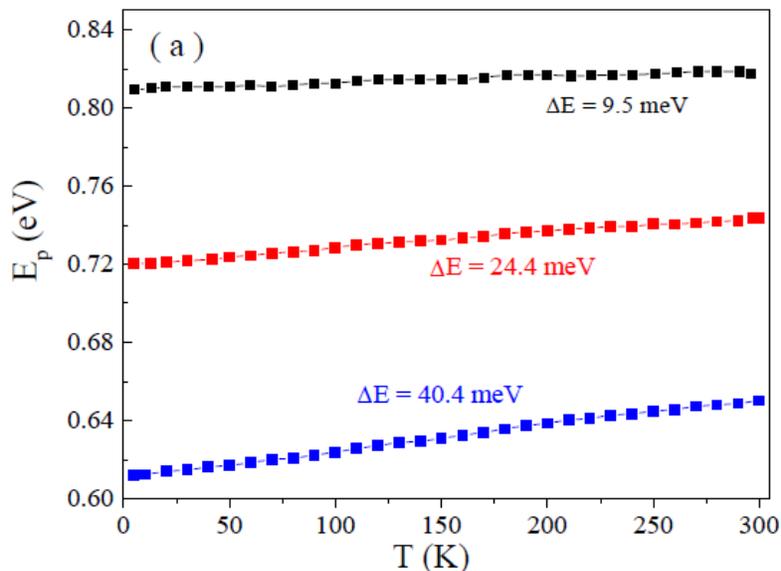


Figura 82 Variação do pico de absorção em função da temperatura para as amostras de 300min (azul), 150min (vermelho) e 105min (preto)[66]

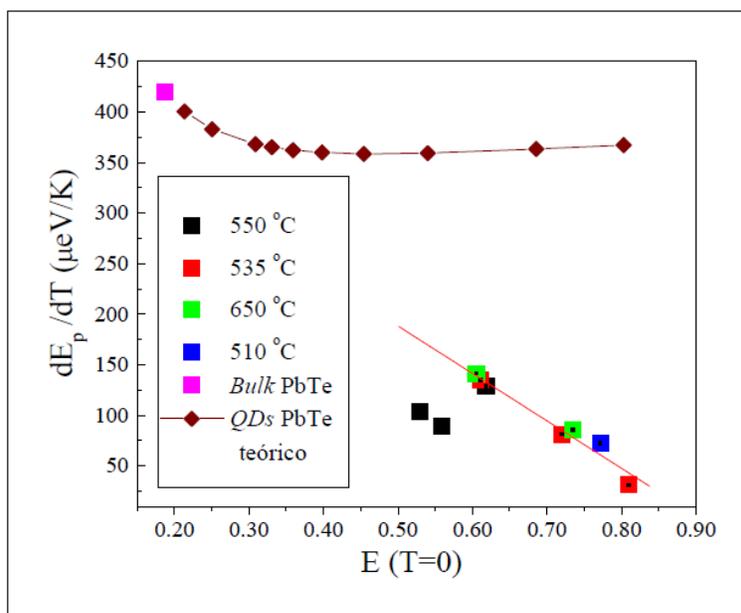


Figura 83 Variação do pico da absorção em função do confinamento quântico e cálculo da variação esperada[66]

A diferença entre o comportamento do bulk e dos QDs pode ser visualizada na Figura 83. A interpretação dada na época foi que um efeito de “stress-strain” ocorria nesses QDs por estarem envolvidos pela matriz de vidro. Por terem coeficientes de expansão térmica diferentes os QDs e o vidro respondem de forma diferente as mudanças de temperatura. O coeficiente de dilatação térmica dos QDs é muito maior que o do vidro, logo podemos supor que o vidro não sofre dilatação/contração térmica. O QD livre sofreria uma contração bem intensa com a diminuição da temperatura. Mas a matriz vítrea exercerá uma tração nos QDs tendendo a segurá-lo no mesmo tamanho. O equilíbrio termo-mecânico QD-vidro portanto dependerá das constantes elásticas e térmicas do QD e do vidro. De qualquer forma, a tendência do stress induzido por temperatura é manter o tamanho do QD constante.

O principal fator que define a variação do band gap dos semicondutores em função da temperatura é o parâmetro de rede dos cristais, que muda de acordo com o coeficiente de dilatação térmica. Entretanto, se a dilatação/contração é impedida o band gap não muda e observa-se uma variação com a temperatura bem menor do que o esperado para um QD livre de stress, como observou o Gaston Tudury. Ele estimou que uma pressão de 1,6 GPa explicaria a diferença entre os picos de absorção em 300K e 0 K do QD comparado com o bulk, e chegou a realizar medidas em função da pressão hidrostática, em colaboração com Sanclayton Moreira, no vidro para entender o comportamento do QD de PbTe em função da pressão. Infelizmente o vidro suportou apenas pressões de 0,2 GPa, muito abaixo da pressão estimada para a observação do efeito.

Outro trabalho que observou o efeito de stress induzido por variação de temperatura em vidros dopados com QD de CdTe foi de Sanclayton Moreira [67]. Moreira mediu a constante dielétrica [medidas de capacitância], espalhamento de luz e a difusividade térmica, de QDs de CdTe em matriz de vidro, entre as temperaturas de 20 a 300 K. A Figura 84 contém os dados obtidos para a medida da capacitância e a figura 73 os dados medidos para a difusividade térmica e o parâmetro θ da técnica de lente térmica.

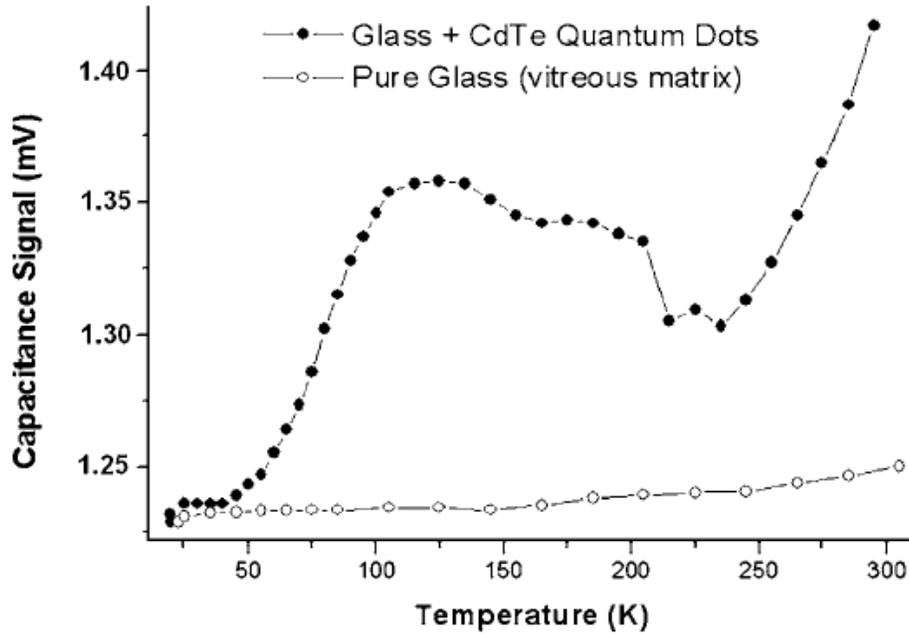


Figura 84 Capacitância vs temperatura: círculos pretos QD de CdTe e círculos brancos matriz de vidro pura[67]

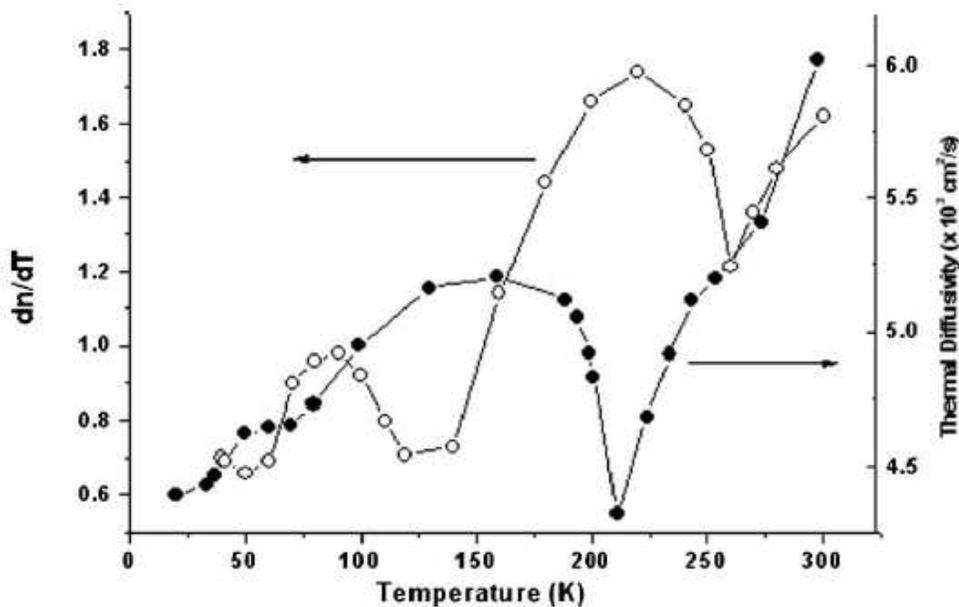


Figura 85 Difusividade térmica (direita) e parâmetro θ (esquerda) vs temperatura[67]

Claramente o comportamento da capacitância é diferente para a matriz pura e para a matriz dopada com os quantum dots. Porém, o fato que chamou a atenção é que a capacitâncias dos QDs possui duas regiões com anomalias diferentes, em torno de 100 K e 220 K. O mesmo comportamento anômalo é visto nas medidas de difusividade térmica e do parâmetro θ , novamente em torno de 100 K e 200 K. Os fenômenos foram observados sem o laser de excitação.

Apenas com o laser de prova os mesmos comportamentos anômalos foram observados. A Figura 86 apresenta os dados medidos para a transmissão do laser de prova.

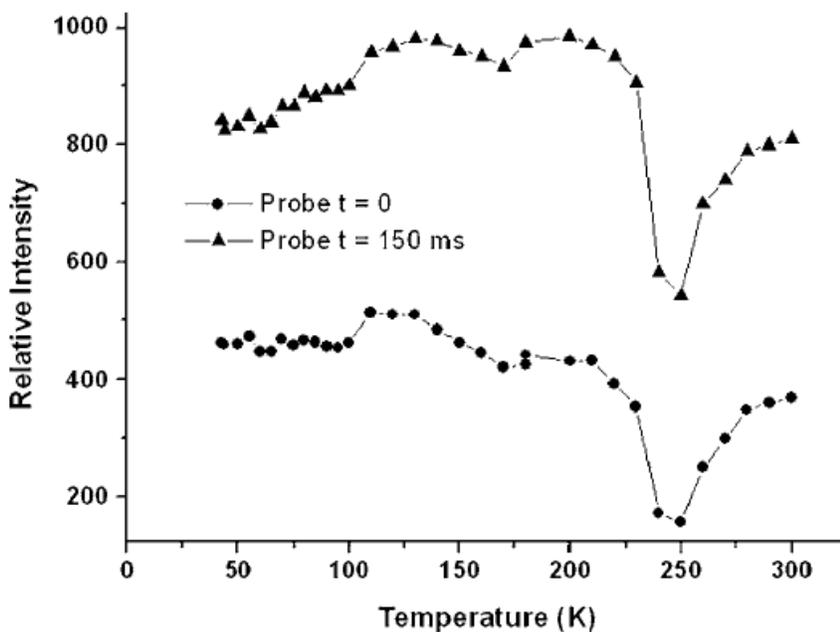


Figura 86 Intensidade do laser de prova vs temperatura[67]

Como nos casos anteriores, a região de 100 K e a região de 200 K apresentam comportamentos anômalos. Como as mudanças não ocorrem nas medidas da matriz de vidro pura, todos esse fenômenos refletem mudanças sofridas pelos QDs. Os autores concluíram que esse comportamento era devido a uma transição de fase dos quantum dots. O CdTe não possui nenhuma transição de fase com a temperatura na faixa utilizada mas apresenta transições de fase começando com a pressão de 35 kBar para o bulk. O trabalho, publicado na Applied Physics Letters, estimou um stress induzido por uma variação de temperatura de 800 K da ordem de 1,1 Gpa, muito superior as dezenas de kBar necessárias para as transições de fase com pressão. Discussões sobre o papel do stress em vidros dopados com QDs e apresentação de evidências sobre a presença do stress, são antigas, mas faltou sempre uma medida conclusiva, inequívoca, provando a presença e importância desse stress.

Nessa tese decidimos esclarecer essa questão realizando medidas nos dois tipos de amostras, vidros dopados com QDs de CdTe, caso em que o QD estaria

sujeito a pressão da matriz vítrea, e QDs coloidais de CdTe, livres de stress, no qual o QD poderia expandir (contrair) livremente. Para tanto medimos espectro de luminescência dos QDs e o tempo de vida da fluorescência em função da temperatura. As medidas da emissão da fluorescência refletem o que está acontecendo com o band gap, enquanto as medidas do tempo de vida da fluorescência indicam o nível de interação com o meio. As medidas foram feitas em QDs coloidais e envolvido por matriz de vidro que apresentam tamanhos idênticos. Para medidas nos QDs coloidais em função da temperatura deixamos secar uma gota com a solução de QDs sobre uma lamínula por 24 horas.

5.8 Sistema Experimental

O esquema do sistema completo é mostrado na Figura 37

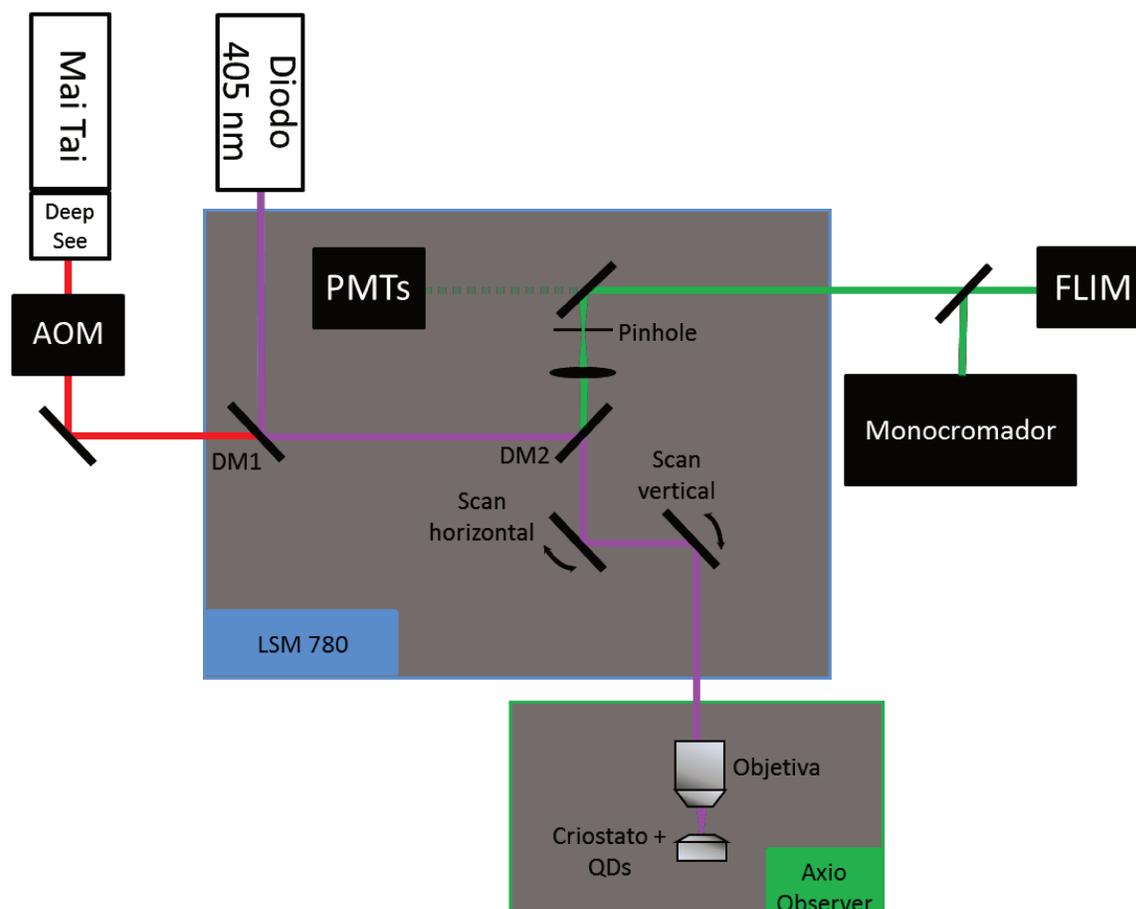


Figura 87 Esquema experimental para as medidas do pico de emissão e FLIM em função da temperatura

As medidas foram feitas no Microscópio Zeiss LSM 780 espectral direto. Como se trata de um sistema confocal descanned podemos posicionar o feixe do laser em qualquer ponto da amostra, ou mesmo efetuar uma varredura, sem perder o alinhamento com o monocromador e detetor do FLIM.

O laser de diodo em 405 nm (descrito na seção 4.6) foi utilizado em modo contínuo para excitar a fluorescência nas medidas dos picos de emissão e no modo pulsado nas medidas do tempo de vida da fluorescência. Nos dois casos varia-se o laser em uma área de $20 \times 20 \mu\text{m}$ para evitar photobleaching na região da medida. Um minicriostato controlou a temperatura da amostra até 10 K. A grande vantagem desse criostato foi a proximidade entre a superfície da amostra e a janela de vidro que mantém o vácuo sem qualquer condensação de umidade na parte externa. Essa pequena distância nos permitiu usar uma objetiva de longa distância de trabalho para focalizar o feixe do laser na amostra com quantum dots. O sinal de luminescência gerado foi coletado pela mesma objetiva passando novamente pelos espelhos de varredura. O dicróico DM2 separa o feixe da fluorescência do feixe do laser. Uma lente focaliza o sinal no pinhole e um espelho o direciona para a saída externa do scanner. O detector do FLIM é preso na peça metálica como mostra a Figura 88. Dentro da peça metálica um espelho pode ser colocado para refletir o sinal para o monocromador.



Figura 88 Detector de FLIM acoplado a saída externa do scanner

5.9 Picos de Emissão

Para estudar o comportamento do QD na matriz de vidro versus QDs coloidais nós medimos o espectro de emissão da fluorescência, apresentados na Figura 89 e na Figura 90.

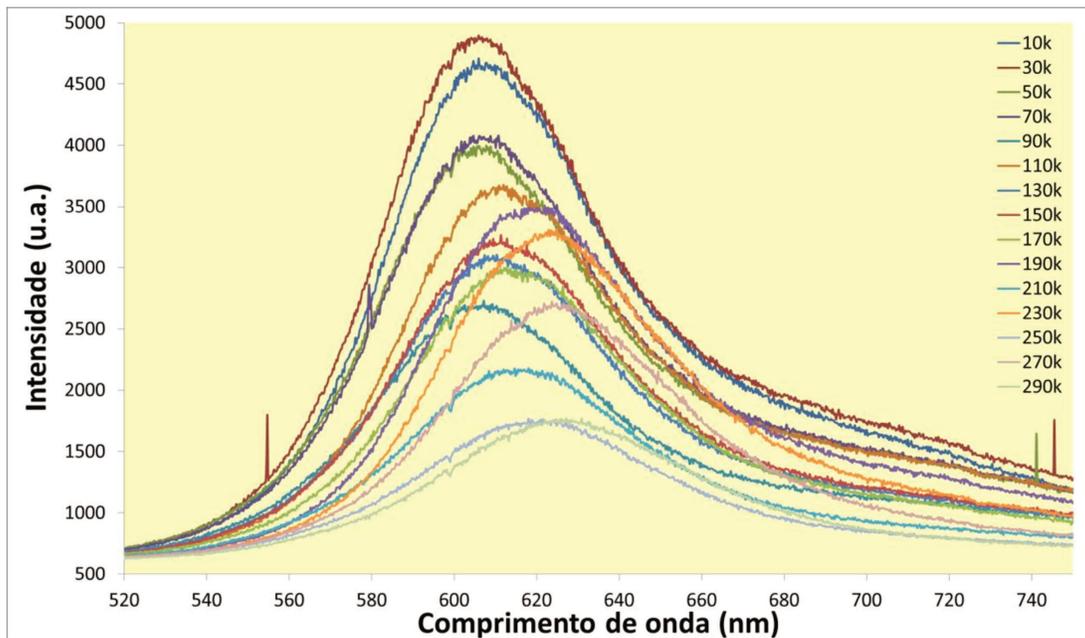


Figura 89 Espectros de fluorescência para diferentes temperaturas Col2108

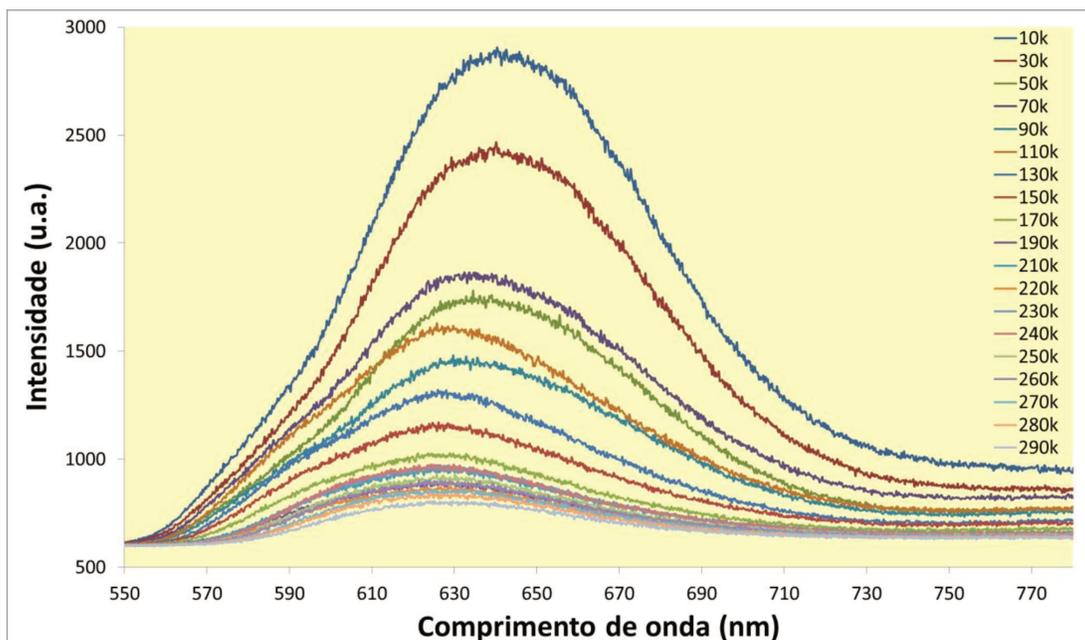


Figura 90 Espectros de fluorescência para diferentes temperaturas CdTe300

É possível ver algumas diferenças entre os espectros, mas fica difícil visualizar o que queremos mostrar nessa escala. A seguir, mostramos os mesmos espectros normalizados pelos máximos de emissão.

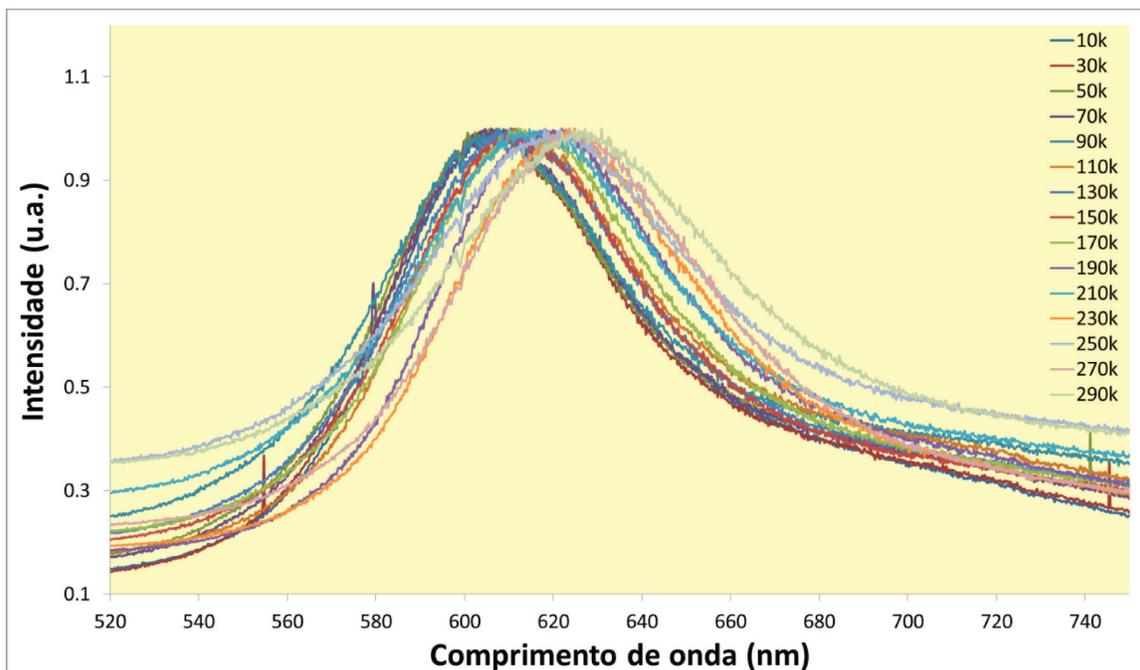


Figura 91 Espectros de fluorescência QD coloidal normalizados pelo máximo para diferentes temperaturas

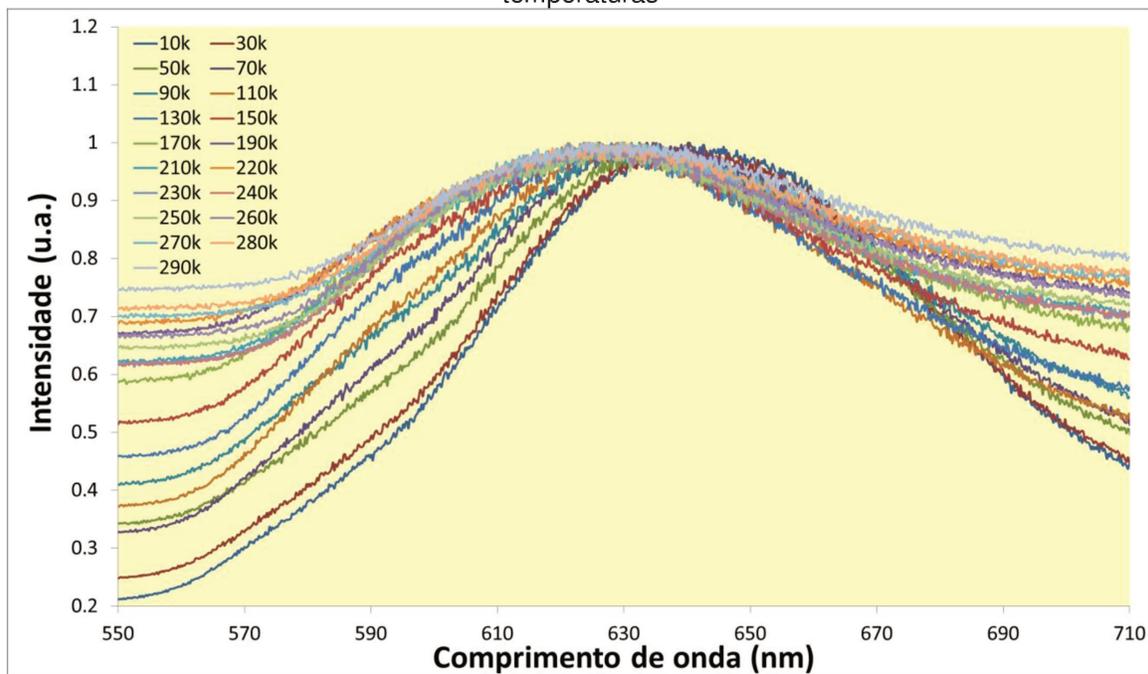


Figura 92 Espectros de fluorescência QD em vidro normalizados pelo máximo para diferentes temperaturas

Analisando os picos de emissão da Figura 91 e da Figura 92 é possível observar dois comportamentos bem diferentes. O pico de emissão do QD coloidal avança para comprimentos de onda maiores conforme a temperatura sobe. Como era de se esperar, pois a energia do gap diminui conforme a temperatura aumenta. O contrário ocorre no QD em vidro. Com o aumento da temperatura o pico de emissão se desloca para comprimentos de onda menores, indicando uma diminuição na energia do gap. Esse efeito é mais claramente observado quando fazemos um gráfico do pico de emissão pela temperatura para os dois tipos de QD, mostrado na Figura 93

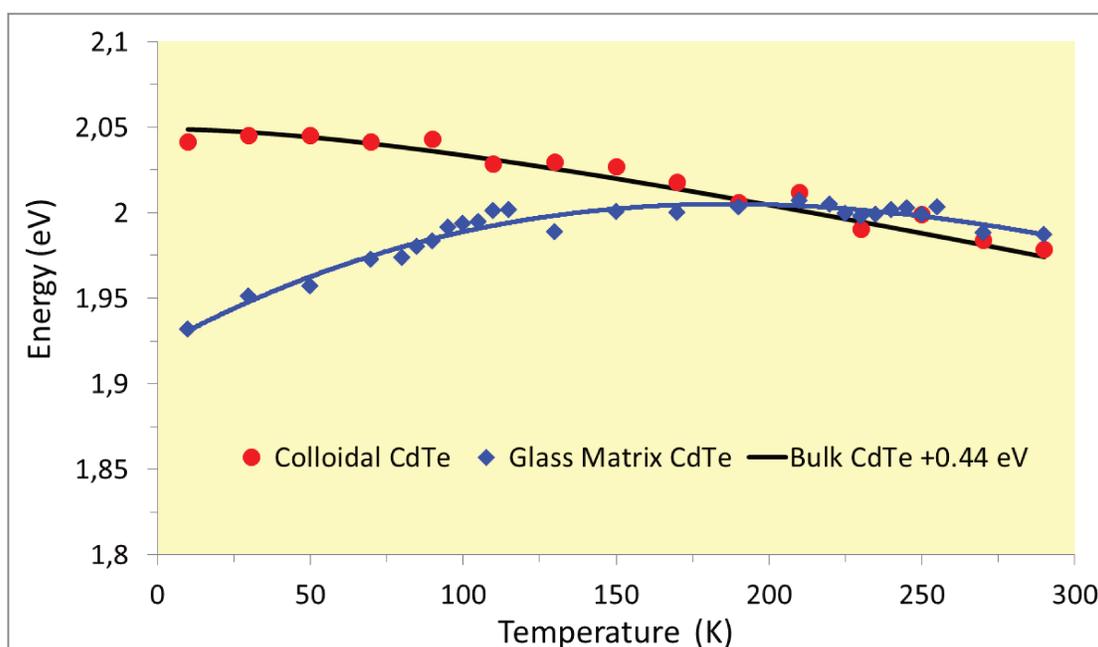


Figura 93 Picos de emissão em função da temperatura para os dois tipos de QD

As curvas da energia em função da temperatura nos dois QDs são claramente diferentes. Enquanto a energia do pico de emissão QD coloidal está diminuindo com a temperatura (um indicativo de que a energia do gap está diminuindo também) a energia do pico de emissão do QD em matriz de vidro aumenta. Isso significaria que o gap do material está aumentando conforme a temperatura aumenta. A expressão que calcula o valor da energia do gap do CdTe em função da temperatura é dada por Varshni [90]

$$E_g(T) = E_{g,0K} - \alpha \frac{T^2}{T + \beta} \quad (5.91)$$

Onde $E_{g,0K}$ é a energia do gap a 0K, α é um coeficiente de temperatura e β é aproximadamente a temperatura de Debye do semiconductor. Adicionamos na Figura 93 o gráfico do gap do bulk do CdTe[91], com os valores $\alpha = 0.4 meV / K$, $\beta = 160 K$ e $E_{g,0K} = 1.606 eV$, somado por uma constante para comparação com os gráficos dos QDs. Podemos ver na Figura 93 que o comportamento do gap do QD coloidal é o mesmo do gap do bulk acrescido de uma constante. A constante foi determinada como o valor médio da diferença entre os pontos do QD coloidal e os pontos do gap do bulk, com um desvio padrão de 0.005. Claramente, pela análise das curvas da Figura 93, o QD coloidal se comporta de maneira semelhante ao bulk enquanto o QD em vidro, por conta da interação com a matriz de vidro, não segue a mesma tendência. A pressão negativa que surge pela diferença entre os coeficientes de expansão térmica impede que o QD dilate (contraia) livremente. A Figura 94 mostra apenas os picos de emissão da amostra CdTe300.

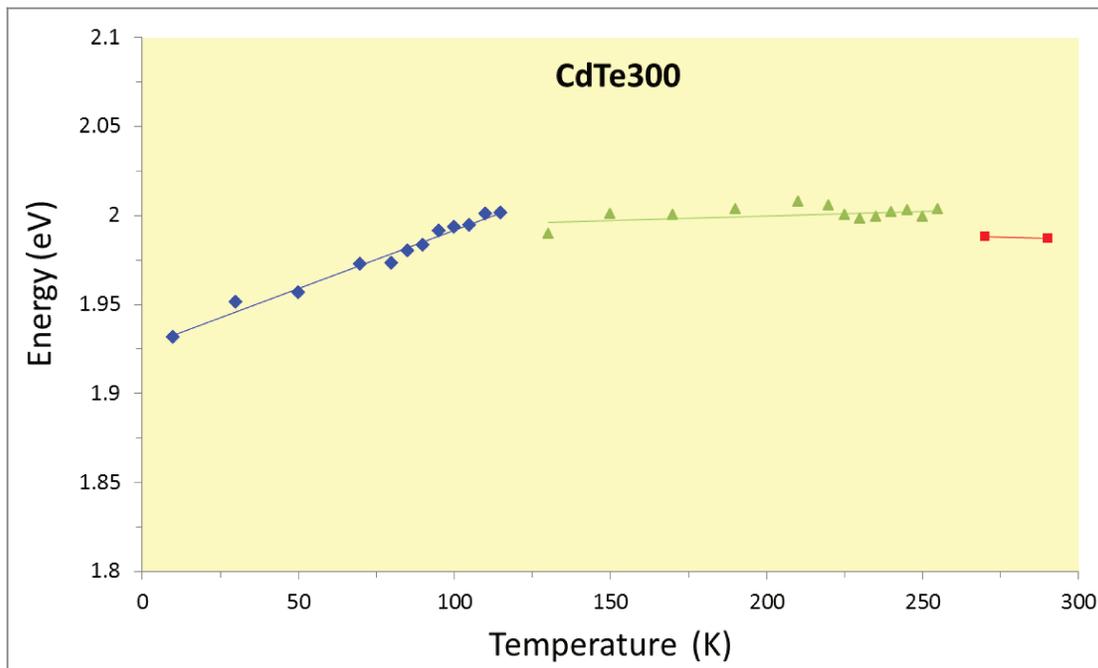


Figura 94 Picos de emissão da fluorescência para amostra CdTe300

É possível identificar três regiões distintas no gráfico, com três inclinações diferentes e duas descontinuidades nas inclinações. As temperaturas referentes a essas descontinuidades são as mesmas encontradas por Moreira[67] para as transições de fase. Esse fato fica mais claro ao sobrepor os dois gráficos na Figura 95. As temperaturas em que as descontinuidades ocorrem são as mesmas temperaturas observadas no trabalho anterior. Concluímos, portanto, que as transições de fase dos QDs também estão presentes nas posições dos picos de emissão da fluorescência.

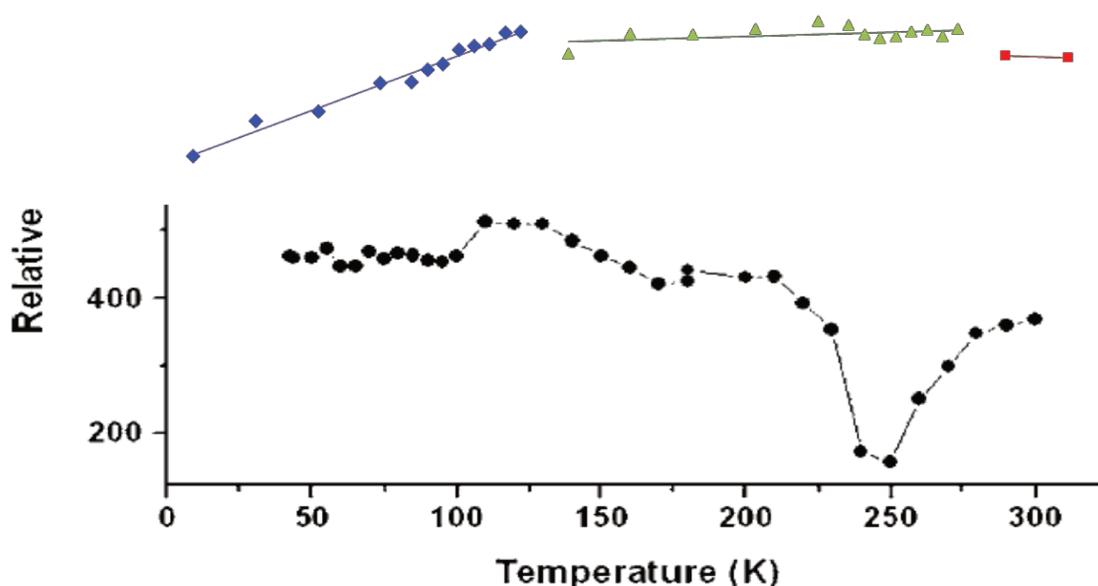


Figura 95 Sobreposição dos gráficos dos picos de emissão e intensidade do laser de prova

5.10 Tempo de Vida da Fluorescência

O tempo de vida fluorescência também é um indicador da interação do emissor com o meio. Quanto mais forte a interação com o meio, mais caminhos para decair estão disponíveis para o elétron tornando o tempo de vida da fluorescência menor. O tempo de vida foi ajustado com duas componentes para as duas amostras, que chamamos de t_1 , a componente rápida, e t_2 , a componente

lenta. Os valores das duas componentes são bem diferentes nas duas amostras. As Figura 96 e Figura 97, mostram os dados que obtivemos.

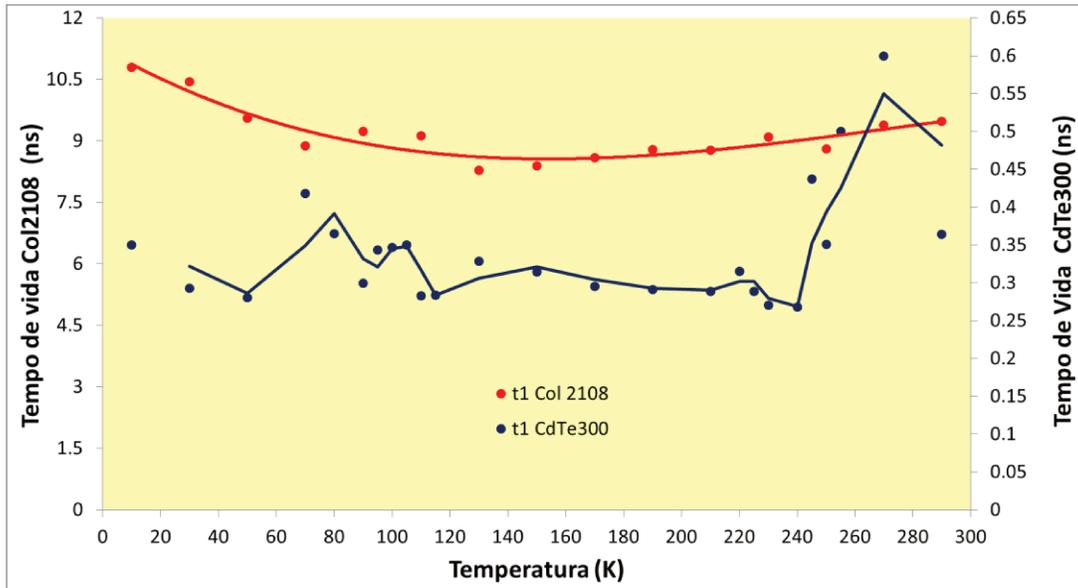


Figura 96 Tempos de vida da fluorescência em função da temperatura para QD coloidal emitindo no vermelho e QD em matriz de vidro, componente t1

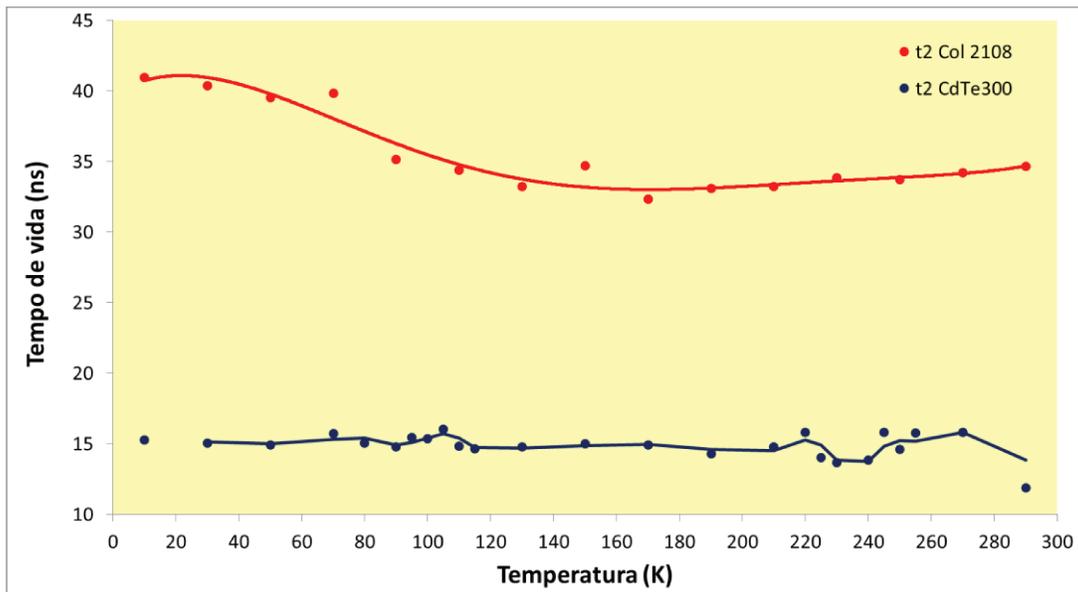


Figura 97 Tempos de vida da fluorescência em função da temperatura para QD coloidal emitindo no vermelho e QD em matriz de vidro, componente t2

Para a amostra Col2108 a componente t_1 tem valores aproximadamente entre 10 e 9 ns enquanto para a amostra CdTe300 a componente t_1 é muito menor, com valores aproximados entre 300 e 400 ps. Já os valores da componente t_2 nos QDs coloidais varia entre 35 e 40 ns e permanece

praticamente constante em torno de 15 ns para o QD em vidro. Essa diferença nos valores do tempo de vida t_1 entre as duas amostras indicam que os elétrons no caso do CdTe300 passam muito menos tempo no estado excitado do que os elétrons no caso do Col 2108. Tempos de vida na faixa de 300-400 ps, como no caso da componente t_1 do CdTe300, estão quase no limite de resposta do instrumento. São tempos de vida muito rápidos em comparação com tempos de vida de moléculas, na faixa de alguns nanosegundos, e tempos de vida de QDs coloidais na faixa de dezenas de nanosegundos.

Esse fato sugere que a matriz de vidro oferece rotas de decaimento para o elétron que não estão disponíveis no caso do quantum dot coloidal. O QD coloidal possui uma cap layer que o isola do meio. A rota disponível para o elétron decair é voltando ao estado fundamental emitindo um fóton. Por outro lado, a presença do vidro em volta do QD gera um acoplamento com os fônons muito forte. A diferença de energia entre o pico de absorção e o pico de emissão, conhecida como diferença Stokes, para quantum dots de CdTe em vidro é da ordem de 100 meV[92]. A energia do fônon óptico longitudinal foi medido em 21 meV[93]. Essa diferença é de aproximadamente 5 vezes indicando uma interação elétron-fônon muito forte.

Nos gráficos que mostram o tempo de vida fluorescência das amostras nós traçamos linhas de tendência para mostrar o comportamento das curvas. Fizemos um ajuste polinomial para o QD coloidal e um ajuste de média móvel para o QD em vidro. Para a amostra Col2108 a linha de tendência começa decaindo conforme a temperatura aumenta e depois diminui a taxa assumindo uma tendência a um valor constante. Isso ocorre tanto para a componente t_1 quanto para componente t_2 . Para a amostra CdTe300 as linhas de tendências apresentam comportamentos diferentes. Elas tendem a ficar no mesmo valor, a não ser para duas regiões de temperatura, por volta de 100 K e por volta de 220 K. Nessas regiões de temperatura vemos que os pontos mudam de comportamento. Esse comportamento se assemelha ao comportamento apresentado para as medidas de capacitância e difusividade térmica, das Figura 84 e Figura 85. Comportamentos anômalos nas nossas medidas foram observados nas mesmas

regiões de temperatura que foram observados naquela situação. Podemos ver isso mais facilmente com a sobreposição dos gráficos da Figura 96 e da Figura 86, mostrada na Figura 98

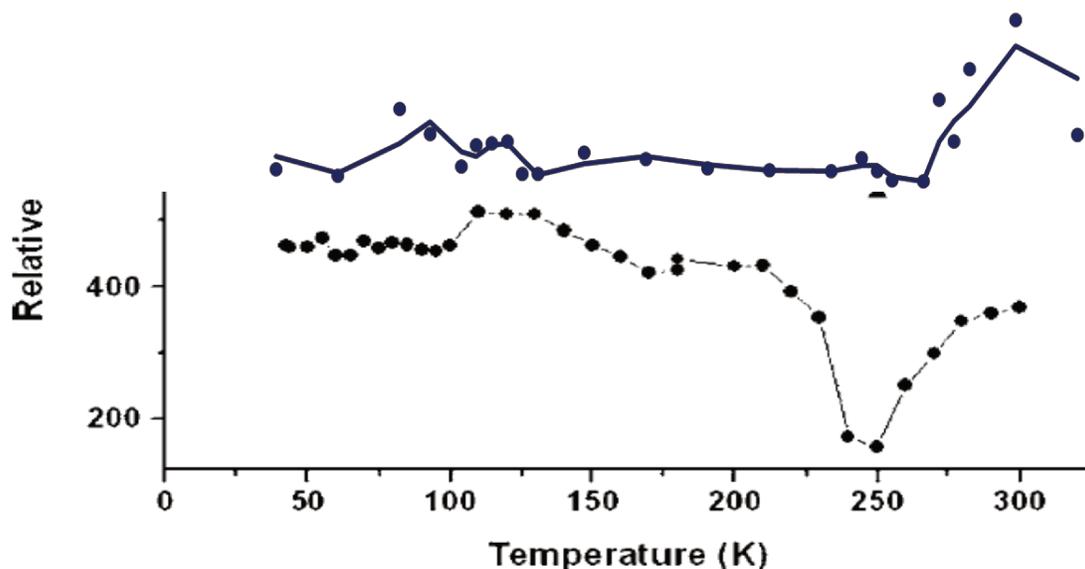


Figura 98 Sobreposição dos gráficos do tempo de vida e intensidade do laser de prova

Nossa conclusão nessa seção, portanto, é que demonstramos inequivocamente a importância do stress induzido por descasamento de coeficiente de dilatação térmica em quantum dots em vidros. O gráfico da figura 80 não deixa margem a dúvida pois é uma comparação direta entre QD coloidal e QD embebidos em uma matriz vítrea. O stress gerado podem ser tão grande ao ponto de causar transições de fase nos semicondutores. As transições de fase nas regiões de 100 K e 220 K observadas por Moreira[67] foi confirmada pelas nossas medidas do tempo de vida de fluorescência nas mesmas amostras.

Publicações do grupo em quantum dots.

1. S. A. O. Gomes, C. V. Stahl, D. B. Almeida, J. R. Santos-Mallet, R. F. S. Menna-Barreto, C. L. Cesar and D. Feder, *“Quantum Dots’ Cytotoxicity: A Comparative Study on Microorganisms”*, review paper, *Sensors* **11**, 11664-11678; (2011) doi:10.3390/s111211664
2. C. V. Stahl, D. B. Almeida, A. A. de Thomaz, R. F. S. Menna-Barreto, J. R. Santos-Mallet, C. L. Cesar, S. A. O. Gomes and D. Feder, *“Studying nanotoxic effects of CdTe quantum dots in Trypanosoma cruzi”*, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **106** (2) 158-165 (2011)
3. G. Kellermann, E. Rodriguez, E. Jimenez, C. L. Cesar, L. C. Barbosa and A. F. Craievich, *“Structure of PbTe(SiO₂)/SiO₂ multilayers deposited on Si(111)”*, *J. Appl. Crystallography* **43**, 385-393 (2010)
4. D. Feder, S. A. O. Gomes, A. A. de Thomaz, D. B. Almeida, W. M. Faustino, A. Fontes, C. V. Stahl, J. R. Santos-Mallet and C. L. Cesar, *“In vitro and In Vivo documentation of Quantum Dots labeled Trypanosoma cruzi – Rhodnius prolixus Interaction using Confocal Microscopy”*, *Parasitology Res.*, **106** (1), 85 (2009)
5. C. R. Chaves, A. Fontes, P. M. A. Farias, B. S. Santos, F. D. de Menezes, R. C. Ferreira, C. L. Cesar, A. Galembeck and R. C. B. Q. Figueiredo, *“Application of core-shell PEGylated CdS/Cd(OH)₂ quantum dots as biolabels of Trypanosoma cruzi parasites”*, *Appl. Surf. Science* **255** (3) 728-730 (2008)
6. B. S. Santos, P. M. A. Farias, F. D. Menezes, A. G. Brasil Jr, A. Fontes, L. Romão, J. O. Amaral, V. Moura-Neto, D. P. L. A. Tenório, C. L. Cesar, L. C. Barbosa and R. Ferreira, *“New highly fluorescent biolabels based on II-VI semiconductor hybrid organic-inorganic nanostructures for bioimaging”*, *Appl. Surf. Science* **255** (3) 790-792 (2008)
7. E. Rodriguez, G. Kellermann, A. F. Craievich, E. Jimenez, C. L. Cesar and L. C. Barbosa, *“All-optical switching device for infrared based on PbTe quantum dots”*, *Superlattices and Microstructures* **43**, 626–634 (2008)
8. P. M. A. Farias, B. S. Santos, A. A. de Thomaz, R. Ferreira, F. D. Menezes, C. L. Cesar and A. Fontes, *“Fluorescent II-VI Semiconductor Quantum Dots in Living Cells: Nonlinear Microspectroscopy in an Optical Tweezers System”*, *J. Phys. Chem. B*, **112**, 2734-2737 (2008)
9. P. M. A. de Farias, B. S. Santos, F. D. Menezes, A. G. Brasil Jr., R. Ferreira, M. A. Motta, A. G. Castro-Neto, A. A. S. Vieira, D. C. N. Silva, A. Fontes and C. L. Cesar, *“Highly fluorescent semiconductor core-shell CdTe–CdS nanocrystals for monitoring living yeast cells activity”*, *Appl. Phys. A*: **89** (4), 957 (2007)
10. S. G. C. Moreira, M. Mansanares, E. C. da Silva, L. C. Barbosa and C. L. Cesar, *“Temperature Induced Stress Phase Transition in CdTe Quantum Dots Observed by Dielectric Constant and Thermal Diffusivity Measurements”*, *Appl. Phys. Lett.* **91**, 021101 (2007)
11. L. A. Padilha, J. Fu, D. J. Hagan, E. W. Van Stryland, C. L. Cesar, L. C. Barbosa and C. H. B. Cruz. *“Frequency Degenerate and Non-degenerate Two-Photon Absorption Spectra in Direct Band-Gap Semiconductors Quantum-Dots”*, *Phys. Rev. B* **75**, 075325 (2007)
12. P. M. A. Farias, B. S. Santos, F. D. Menezes, R. Ferreira, A. Fontes, H. F. Carvalho, L. Romão, V. Moura-Neto, J. C. O. F. Amaral, C. L. Cesar, R. C. B. Q. Figueiredo and F. R. B. Lorenzato, *“Quantum Dots as Fluorescent Bio-labels in Cancer Diagnostic”*, *Phys. Stat. Sol. (C)* **3**, (11), 4001–4008 (2006)
13. E. Rodriguez, E. Jimenez, C. L. Cesar, L. P. Cardoso and L. C. Barbosa, *“Plasma Dynamics Studies During the Preparation of PbTe Thin Film on Glass Substrate”*, *Vacuum* **80** (8), 841-849 (2006)
14. F. D. de Menezes, A. G. Brasil Jr., W. L. Moreira, L. C. Barbosa, C. L. Cesar, R. Ferreira, P. M. A. de Farias and B. S. Santos, *“CdTe/CdS core shell quantum dots for photonics applications”*, *Microelectronics Journal* **36** (11), 989-991 (2005)

15. P. M. A. de Farias, B. S. Santos, F. D. Menezes, R. C. Ferreira, M. L. Barjas-Castro, V. Castro, P. R. M. Lima, A. Fontes and **C. L. Cesar**, “*Core-shell CdS/Cd(OH)₂ Quantum Dots: Synthesis and Bioconjugation to Target Red Cells Antigens*”, J. Microscopy 219 (3), 103-108 (2005)
16. L. A. Padilha, J. Fu, D. J. Hagan, E. W. Van Stryland, **C. L. Cesar**, L. C. Barbosa and C. H. Brito Cruz, “*Two-photon absorption in CdTe quantum dots*”, Optics Express **13** (17) 6460-6467 (2005)
17. P. M. A. Farias, B. S. Santos, F. D. de Menezes, R. C. Ferreira, M. L. Barjas-Castro, V. Castro, P. R. M. Lima, A. Fontes and C. L. Cesar, “*Investigation of red blood cell antigens with highly fluorescent and stable semiconductor quantum dots*”, J. Biomed. Opt. **10** (4), 044023 (2005) ISSN: 1083-3668, publisher: SPIE
18. E. Rodriguez, E. Jimenez, C. L. Cesar and L. C. Barbosa, “*1D Photonic Band Gap Silica Doped PbTe Quantum Dot Optical Device*”, Glass Technol. **46** (2), 47-49 (2005)
19. L. A. Padilha, A. A. R. Neves, E. Rodriguez, **C. L. Cesar**, L. C. Barbosa and C. H. Brito Cruz, “*Ultrafast optical switching demonstrated with CdTe nanocrystals in a glass matrix*”, Appl. Phys. Lett. **86** (16), 161111 (2005)
20. E. Rodriguez, E. Jimenez, A. A. R. Neves, L. A. Padilha, G. J. Jacob, **C. L. Cesar** and L. C. Barbosa, “*SiO₂/PbTe Quantum Dots Multilayer Production and Characterization*”, Appl. Phys. Lett. **86** (11), 113117 (2005)
21. E. Rodriguez, E. Jimenez, G. J. Jacob, A. A. R. Neves, C. L. Cesar and L. C. Barbosa, “*Fabrication and Characterization of a PbTe Quantum Dots Multilayer Structure*”, Physica E: Low-Dimensional Systems & Nanostructures, **26** (1-4), 361-365 (2005)
22. P. M. A. de Farias, B. S. Santos, F. D. Menezes, R. L. Longo and **C. L. Cesar**; “*CdS Nanoparticles: Structural and Energetical correlations*”; Materials Chemistry and Physics **89** (1) 21-27 (2005)
23. L. A. Padilha, A. A. R. Neves, **C. L. Cesar**, L. C. Barbosa and C. H. Brito Cruz; “*Recombination Processes in CdTe Quantum-Dot-Doped Glasses*”, Appl. Phys. Lett. 85 (15) 3256-3258 (2004)
24. **C. L. Cesar**, G. J. Jacob, G. E. Tudury, M. V. Marquezini and L. C. Barbosa; “*PbTe Quantum Dot Doped Glasses: Growth, Linear and Non-Linear Optical Properties*”; Atti della Fondazione G. Ronchi Journal, Anno LIX, (4) 519-528 (2004)
25. G. J. Jacob, **C. L. Cesar** and L. C. Barbosa, “*Tellurite Glasses Doped with PbTe Quantum Dots*”, Physics and Chemistry of Glasses, 43C, 250-252 (2002)
26. G. E. Tudury, M. V. Marquezini, L. G. Ferreira, L. C. Barbosa and **C. L. Cesar**, “*Effect of band anisotropy on electronic structure of PbS, PbSe, and PbTe quantum dots*”; Phys. Rev. B; **62**: (11) 7357-7364 (2000)
27. M. L. Redígolo, W. A. Arellano, L. C. Barbosa, C. H. Brito Cruz, **C. L. Cesar** and A. M. de Paula; “*Temperature Dependence of the Absorption Spectra in CdTe-Doped-Glasses*”, Semicond. Sci. Technol. **14** (1), 58-63 (1999)
28. E. R. Thoen, P. Langlois, G. Steinmeyer, E. P. Ippen, G. E. Tudury, L. C. Barbosa, C. H. Brito Cruz, and **C. L. Cesar**; “*Coherent Acoustic Phonons in PbTe Quantum Dots*”, Appl. Phys. Lett. **73** (15), 2149-2151 (1998).
29. A. M. de Paula, L. C. Barbosa, C. H. Brito Cruz, O. L. Alves, J. A. Sanjurjo and **C. L. Cesar**; “*Quantum Confinement effects on the Optical Phonons of CdTe Quantum Dots*”, Superlattices and Microstructures **23** (5) 1103-1106 (1998)
30. L. C. Barbosa, V. C. S. Reynoso, A. M. de Paula, C. R. M. de Oliveira, O. L. Alves, A. F. Craievich, R. E. Marotti, C. H. Brito Cruz and **C. L. Cesar**; “*CdTe Quantum Dots by Melt Heat Treatment in Borosilicate Glasses*”; J. Non Crystal. Solids **219**, 205-211 (1997)
31. C. H. Brito Cruz, **C. L. Cesar**, L. C. Barbosa, A. M. de Paula and S. Tsuda; “*Ultrafast Processes in Semiconductor Doped Glasses*”, Appl. Surf. Science **109/110**, 30 (1997)

32. V. C. S. Reynoso, Y. Liu, R. F. C. Rojas, J. A. Medeiros Neto, A. M. de Paula, O. L. Alves, **C. L. Cesar** and L. C. Barbosa; *"CdTe Quantum Dots in Er³⁺ Doped Borosilicate Glass"*, J. Mat. Sci. Lett. **15** (21), 1879-1881 (1996)
33. Y. Liu, V. C. S. Reynoso, R. F. Rojas, J. A. Medeiros Neto, **C. L. Cesar**, O. L. Alves and L. C. Barbosa; *"Optical Properties of CdTe Quantum Dots in Praseodymium Doped Borosilicate Glass"*. J. Mat. Sci. Lett. **15** (21), 1875-1878 (1996)
34. A. M. de Paula, L. C. Barbosa, C. H. Brito Cruz, O. L. Alves, J. A. Sanjurjo and **C. L. Cesar**; *"Size effects on the phonon spectra of quantum dots in CdTe-doped-glasses"*, Appl. Phys. Lett. **69** (3), 357-359 (1996)
35. V. C. S. Reynoso, Y. Liu, R. F. C. Rojas, N. Aranha, **C. L. Cesar**, L. C. Barbosa and O. L. Alves; *"On the Influence of Semiconductor Concentration to the Size Dispersion of Quantum Dots in Glass"*, J. Mater. Sci. Lett. **15** (12), 1037-1040 (1996)
36. Y. Liu, V. C. S. Reynoso, R. F. C. Rojas, C. H. Brito Cruz, **C. L. Cesar**, H. L. Fragnito, L. C. Barbosa and O. L. Alves; *"Shell-Core CdTeS quantum dots in glass"*, J. Mater. Sci. Lett. **15** (11), 980-983 (1996)
37. Y. Liu, V. C. S. Reynoso, R. F. C. Rojas, C. H. Brito Cruz, **C. L. Cesar**, H. L. Fragnito, O. L. Alves and L. C. Barbosa; *"Laser Induced Darkening in CdTe Quantum Dots Without Traps"*, J. Mater. Sci. Lett. **15** (10), 892-894 (1996)
38. Y. Liu, V. C. S. Reynoso, L. C. Barbosa, C. H. Brito Cruz, **C. L. Cesar**, H. L. Fragnito and O. L. Alves; *"Improvement of size dispersion in CdTe quantum dots in glass by using double annealing process"*, J. Mater. Sci. Lett. **15** (2), 142-144 (1996)
39. V. C. S. Reynoso, A. M. de Paula, R. F. Cuevas, J. A. Medeiros Neto, O. L. Alves, **C. L. Cesar** and L. C. Barbosa; *"PbTe quantum dot doped glasses with absorption edge in the 1.5 μm wavelength region"*, Electronics Letters **31** (12), 1013-1015 (1995)
40. Y. Liu, V. C. S. Reynoso, L. C. Barbosa, R. F. C. Rojas, H. L. Fragnito, **C. L. Cesar** and O. L. Alves; *"Trap elimination in CdTe quantum dots in glasses"*, J. Materials Science Lett. **14** (9), 635-639 (1995)
41. C. R. M. de Oliveira, A. M. de Paula, F. O. Plentz Filho, J. A. Medeiros Neto, L. C. Barbosa, O. L. Alves, E. A. Menezes, J. M. M. Rios, H. L. Fragnito, C. H. Brito Cruz and **C. L. Cesar**; *"Probing of the quantum dot size distribution in CdTe-doped-glasses by photoluminescence excitation spectroscopy"*, Appl. Phys. Lett. **66** (4), 439-441 (1995)
42. H. L. Fragnito, J. M. M. Rios, A. S. Duarte, E. Palange, J. A. Medeiros Neto, **C. L. Cesar**, L. C. Barbosa, O. L. Alves and C. H. Brito Cruz; *"Nonlinear optical properties and femtosecond dynamics of CdTe quantum dots"*, J. Phys. : Condens. Matter **5**, A179 (1993)
43. J. A. Medeiros Neto, L. C. Barbosa, **C. L. Cesar**, O. L. Alves and F. Galembeck; *"Growth kinetics study of CdTe_xS_{1-x} quantum dots in a borosilicate glass"*, Bol. Soc. Esp. Ceram. Vidrio **31** (3), 415 (1992)
44. J. A. Medeiros Neto, L. C. Barbosa, **C. L. Cesar**, O. L. Alves and F. Galembeck; *"Quantum size effects on CdTe_xS_{1-x} semiconductor doped glass"*, Appl. Phys. Lett. **59**, 2715 (1991)

Capítulo 6

Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS)

6.1 Introdução

A técnica de Fluorescence Correlation Spectroscopy [FCS], que consiste na análise da correlação da flutuação da intensidade da fluorescência, foi desenvolvida em 1972 por Madge, Elson e Webb[65], e desde o início utilizada para monitorar não invasivamente a difusão e dinâmica da interação DNA-medicamentos. Percebe-se, portanto, que a técnica foi desenvolvida bem antes do aparecimento do primeiro microscópio confocal de varredura a laser comercial, o Bio-Rad MRC 500, em 1987[94].

No FCS a fluorescência, proveniente do volume focal da objetiva do microscópio, é detectada por uma fotomultiplicadora no regime de contagem de fótons, gerando um sinal eletrônico em tempo real que é utilizado, então, para construir uma curva de correlação em função do tempo. Em uma explicação intuitiva para a origem da curva de FCS a intensidade da fluorescência flutua

devido ao movimento Browniano das moléculas que passam pelo volume focal de excitação. Moléculas maiores levam mais tempo para atravessar esse volume focal do que moléculas menores, devido à diferença entre as massas. Moléculas no volume focal estão absorvendo e emitindo fótons continuamente. A curva de autocorrelação entre os fótons emitidos mostra um tempo característico da ordem do tempo de difusão da molécula através do volume focal de excitação. Esses tempos de difusão dependem da temperatura e viscosidade da solução e do raio hidrodinâmico de cada molécula emissora. A Figura 67 mostra um esquema do FCS. Essa técnica permite, portanto, acompanhar reações químicas e suas constantes de equilíbrio no tempo em um volume muito pequeno de forma não invasiva, ou medir o raio hidrodinâmico, do qual se extrai a massa molecular, de moléculas únicas, ou seja, atua como um espectrômetro de massa (embora sem a mesma precisão) com sensibilidade para uma única molécula, ou acompanhar a concentração de diferentes moléculas ao longo do tempo, ou, finalmente, como um sensor da viscosidade local da solução. Todas essas são informações muito valiosas para sistemas biológicos, sobretudo porque podem ser obtidas em tempo real de forma não destrutiva, não invasiva e com alta localização espacial.

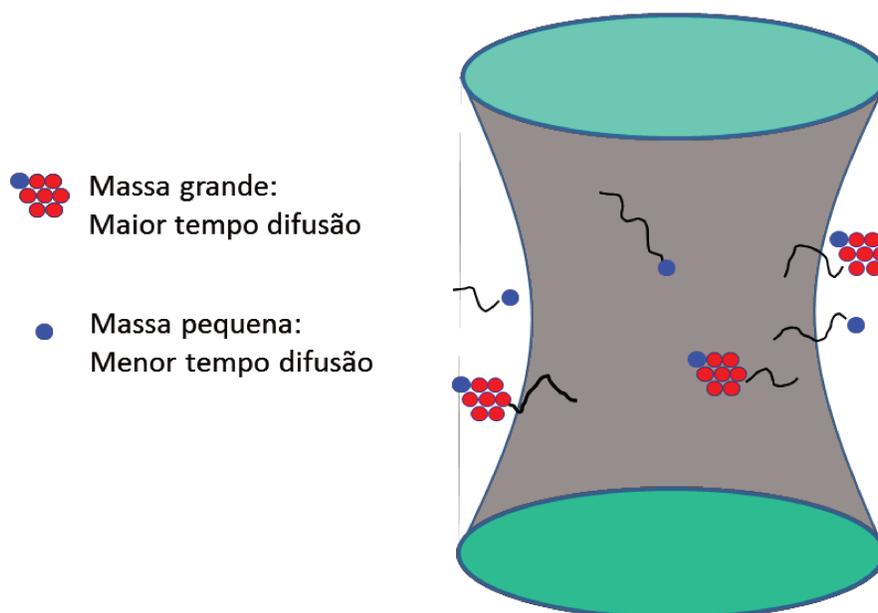


Figura 99 Esquema do FCS ilustrando difusão de moléculas com diferentes massas

Uma outra característica importante do FCS se refere ao número de moléculas no volume de excitação/detecção. Quando existem apenas algumas

moléculas nesse volume em um dado tempo, as flutuações devido à difusão são grandes comparadas ao sinal médio de fluorescência[95]. Por outro lado, quando o número de moléculas no volume focal é muito grande a flutuação relativa é pequena. Dessa forma se percebe a importância de existirem poucas moléculas no volume de detecção, o que pode ser obtido com um volume muito pequeno ou uma diluição muito grande, ou uma combinação das duas estratégias. Além disso, se percebe que o sistema de detecção deve ter sensibilidade para a emissão de uma única molécula.

Isso explica o fato de que apesar da técnica ter sido demonstrada heroicamente em 1972, o número de publicações com a mesma só disparou após o surgimento dos microscópios confocais com os trabalhos de Rigler et al em 1992-93[96, 97]. No trabalho de 1972 o volume focal era muito grande e o detector não tinha sensibilidade para detectar fluorescência de um único fluoróforo, algo que só se tornou possível na década de 1980. Dessa forma, foi necessário detectar sinais de fluorescência provenientes de $\sim 10^3$ a 10^4 fluoróforos, com baixa razão flutuação/sinal médio. Um espectro de FCS requeria longos tempos de aquisição, da ordem de 10 minutos a horas, para que a média das flutuações ultrapassasse ruído espúrio. Rigler percebeu que o volume focal do microscópio confocal, com utilização do pinhole, pode ser tão pequeno quanto sub femtolitros, e que a utilização de fotomultiplicadoras de alta sensibilidade no modo photocounting lhe permitia atingir sensibilidade de uma única molécula abaixando o tempo de aquisição dos espectros de FCS para segundos ou poucos minutos [96].

Na configuração moderna utiliza-se uma objetiva de alta abertura numérica para focalizar o feixe de laser, no limite da difração, e um pinhole para obter volume de excitação e coleta da ordem de centenas de atolitros. Para termos uma idéia de tamanho desse volume focal podemos fazer um cálculo aproximado considerando o volume focal como um cilindro. O raio do cilindro é de aproximadamente 200nm[98] para um feixe de laser de 488nm focalizado por uma objetiva de abertura numérica de 1.4. A altura correspondente, parâmetro confocal, é 1200nm[98]. Com esses valores o volume focal aproximado seria de

0.150 femtolitros ou 150 atolitros. Considerando uma solução com moléculas fluorescentes com uma concentração da ordem de 100 nanoMolar, aproximadamente 9 moléculas estariam contidas nesse volume focal, ou menos do que uma molécula para 10 nM. Com esse pequeno número de partículas dentro do volume focal pequenas flutuações se tornam mais facilmente detectáveis. No FCS é necessário distinguir o sinal de fluorescência de outros sinais ópticos de fundo, como luz espalhada e Raman do solvente. Vale notar que tanto a luz espalhada quanto o Raman são provenientes do solvente com um número de moléculas ordens de grandeza superior ao das moléculas fluorescentes. Um filtro dicróico com alta rejeição para o laser de excitação diminui muito a intensidade de luz espalhada que chega ao detector. Uma grande diminuição do sinal de Raman do solvente é obtida com a diminuição do volume de excitação. Uma outra inovação moderna em FCS foi o uso da excitação por absorção de dois fótons em que a rejeição tanto do espalhamento Rayleigh quanto Raman, em comprimentos de onda muito acima da região de fluorescência, é muito grande e a relação sinal fluorescência/sinal espúrio se torna muito grande. No nosso sistema não temos encontrado dificuldades para obtenção de boas curvas de FCS tanto com excitação contínua quanto com multifóton. Na realidade a excitação contínua apresenta curvas de FCS melhores do que na excitação por 2 fótons devido ao menor ruído do laser de excitação.

Neste capítulo apresentaremos o cálculo da função de autocorrelação para o processo de difusão do movimento Browniano a partir do coeficiente de correlação. Em seguida discutiremos a montagem experimental e finalmente a aplicação do FCS para a medida do raio hidrodinâmico de quantum dots de CdTe. O fenômeno de “blinking” (intermitência) da fluorescência foi detectado durante nossas medidas. Desenvolvemos um método para lidar com esse fenômeno e calcular o raio hidrodinâmico dos QDs.

6.2 Função de Autocorrelação

O coeficiente de correlação convencional da estatística entre duas variáveis aleatórias x e y é definido por

$$r(x, y) = \frac{\text{cov}(x, y)}{\sqrt{\text{cov}(x, x)}\sqrt{\text{cov}(y, y)}} \quad (6.1)$$

Onde $\text{cov}(x, y) = \langle (x - \bar{x})(y - \bar{y}) \rangle$ e $\bar{z} = \langle z \rangle = E(z)$ denota a esperança da variável z . Esse coeficiente está obrigatoriamente entre -1 e $+1$. Podemos mostrar esse fato facilmente através da relação, para $\forall \lambda \in \mathbb{R}$.

$$\langle [(x - \bar{x}) - \lambda(y - \bar{y})]^2 \rangle \geq 0 \quad (6.2)$$

Por outro lado, elevando ao quadrado a inequação (6.2), temos que

$$\langle [(x - \bar{x}) - \lambda(y - \bar{y})]^2 \rangle = \lambda^2 \langle (y - \bar{y})^2 \rangle - 2\lambda \langle (x - \bar{x})(y - \bar{y}) \rangle + \langle (x - \bar{x})^2 \rangle \quad (6.3)$$

Tomando os termos na notação $\text{cov}(x, y) = \langle (x - \bar{x})(y - \bar{y}) \rangle$

$$\lambda^2 \text{cov}(y, y) - 2\lambda \text{cov}(x, y) + \text{cov}(x, x) \geq 0 \quad \forall \lambda \quad (6.4)$$

A desigualdade dessa parábola só será verdadeira se

$$4 \text{cov}^2(x, y) - 4 \text{cov}(x, x) \text{cov}(y, y) \leq 0 \quad (6.5)$$

$$\frac{\text{cov}^2(x, y)}{\text{cov}(x, x) \text{cov}(y, y)} \leq 1 \quad (6.6)$$

$$-1 \leq \frac{\text{cov}(x, y)}{\sqrt{\text{cov}(x, x)}\sqrt{\text{cov}(y, y)}} \leq 1 \quad (6.7)$$

Para calcular a função de autocorrelação basta fazer $x = y$ na equação (6.1). O FCS entretanto não normaliza o coeficiente por $\frac{1}{\sqrt{\text{cov}(x, x)}\sqrt{\text{cov}(x, x)}}$ mas sim por $\frac{1}{\langle x \rangle^2}$. A função de autocorrelação normalizada do FCS é definida por

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (6.8)$$

Onde $\delta F(t)$ e $\delta F(t+\tau)$ são a flutuação do sinal de fluorescência no tempo t e no tempo $t+\tau$. $G(0)$ é uma variância adimensional normalizada de $\delta F(t)$

$$G(0) = \frac{\langle \delta F(t)^2 \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (6.9)$$

O número de partículas entrando e saindo do volume focal segue uma distribuição de Poisson, com a densidade de probabilidade dada por

$$f_{\text{Poisson}}(n) = \frac{e^{-\lambda} \lambda^n}{n!} \quad (6.10)$$

Sendo que

$$\langle n \rangle = e^{-\lambda} \sum_0^{\infty} n \frac{\lambda^n}{n!} \quad (6.11)$$

$$\langle n^2 \rangle = e^{-\lambda} \sum_0^{\infty} n^2 \frac{\lambda^n}{n!} \quad (6.12)$$

Podemos usar duas identidades matemáticas para calcular o valor médio do número de partículas e a variância dessa distribuição

$$\lambda \frac{d}{d\lambda} e^{\lambda} = \lambda \frac{d}{d\lambda} \sum_0^{\infty} \frac{\lambda^n}{n!} = \sum_0^{\infty} n \frac{\lambda^n}{n!} \quad (6.13)$$

$$\lambda^2 \frac{d^2}{d\lambda^2} e^{\lambda} = \lambda^2 \frac{d^2}{d\lambda^2} \sum_0^{\infty} \frac{\lambda^n}{n!} = \sum_0^{\infty} n^2 \frac{\lambda^n}{n!} - \sum_0^{\infty} n \frac{\lambda^n}{n!} \quad (6.14)$$

$$\langle n \rangle = \lambda \quad (6.15)$$

$$\langle n^2 \rangle = \lambda^2 + \lambda \quad (6.16)$$

$$\sigma^2 = \langle n^2 \rangle - \langle n \rangle^2 = \lambda \quad (6.17)$$

O sinal medido de fluorescência vai ser proporcional ao número de partículas

$$\langle F(t) \rangle = q \langle N(t) \rangle \quad (6.18)$$

Logo

$$G(0) = \frac{\langle \delta F(t)^2 \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} = \frac{q^2 \langle \delta N(t)^2 \rangle}{q^2 \langle N(t) \rangle^2} = \frac{1}{\langle N(t) \rangle} \quad (6.19)$$

A partir da equação (6.19) podemos concluir que a função de autocorrelação no tempo zero é inversamente proporcional ao número de partículas dentro do volume focal. Esse fato mostra que existe um compromisso em relação ao número de partículas no volume focal. Se for pequeno demais o sinal de fluorescência será muito pequeno, e o tempo de aquisição de um espectro aumenta demasiadamente. Por outro lado, se for muito alto, a razão flutuação/sinal médio se torna muito pequena e a curva de autocorrelação desaparece. Com essa conclusão fica claro que o número de partículas no volume focal é o principal determinante para um bom sinal de FCS.

Em termos experimentais o que se mede é o sinal de fluorescência em função do tempo e não sua flutuação, que é dado por

$$N(t) = \langle N \rangle + \delta N(t) \quad (6.20)$$

Utilizando a relação da equação (6.20) na função de autocorrelação (6.8)

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta N(t) \delta N(t+\tau) \rangle}{\langle N(t) \rangle^2} = \frac{\langle [N(t) - \langle N(t) \rangle][N(t+\tau) - \langle N(t+\tau) \rangle] \rangle}{\langle N(t) \rangle^2} \quad (6.21)$$

$$G(\tau) = \frac{\langle N(t)N(t+\tau) - N(t)\langle N(t+\tau) \rangle - \langle N(t) \rangle N(t+\tau) + \langle N(t) \rangle \langle N(t+\tau) \rangle \rangle}{\langle N(t) \rangle^2} \quad (6.22)$$

$$G(\tau) = \frac{\langle N(t)N(t+\tau) \rangle}{\langle N(t) \rangle^2} - \frac{\langle N(t) \rangle \langle N(t+\tau) \rangle}{\langle N(t) \rangle^2} \quad (6.23)$$

$$G(\tau) = \frac{\langle N(t)N(t+\tau) \rangle}{\langle N(t) \rangle^2} - 1 \quad (6.24)$$

Também pode-se definir uma nova função de autocorrelação $g(\tau)$ dada por

$$g(\tau) = \frac{\langle N(t)N(t+\tau) \rangle}{\langle N(t) \rangle^2} \quad (6.25)$$

Com

$$g(\tau) = G(\tau) + 1 \quad (6.26)$$

6.2.1 Cálculo da Função de Autocorrelação

Para o cálculo da função de autocorrelação o detector funciona no modo de contagem de fótons. Nesse modo o detector soma o número de fótons que atinge sua superfície num determinado intervalo de tempo. Se $N(t)$ é o número de fótons detectados num intervalo Δt [99] então

$$N(t) = \Delta t \int_v d^3r W(\vec{r}) Q C(\vec{r}, t) \quad (6.27)$$

A integral é feita sobre o volume focal. $W(\vec{r})$ é o perfil do feixe de laser, Q é um parâmetro que leva em conta a seção de choque de absorção, a eficiência quântica das moléculas fluorescentes e a eficiência de coleta do sistema. $C(\vec{r}, t)$ é a concentração da solução. Escrevendo a equação (6.27) em termos da flutuação do número de partículas temos

$$\delta N(t) = \Delta t \int_v d^3r W(\vec{r}) Q \delta C(\vec{r}, t) \quad (6.28)$$

A flutuação do número de partículas é proveniente apenas da flutuação da concentração da amostra já que o perfil do feixe $W(\vec{r})$ é constante dependendo apenas das características do sistema e o parâmetro Q não sofre variação devido à excitação da amostra.

O cálculo da autocorrelação é feito fazendo uma média temporal sobre os valores do número de fótons do tempo inicial e passado o tempo τ

$$g(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle^2} \frac{1}{T} \sum_{i=0}^{T-1} \delta N(t) \delta N(t + \tau) \quad (6.29)$$

Podemos usar a ergodicidade do sistema e trocar a média temporal por uma média espacial[99]

$$g(t) = \frac{1}{\langle N \rangle^2} \langle \delta N(0) \delta N(t) \rangle \quad (6.30)$$

Em termos da definição (6.28) podemos reescrever a função de autocorrelação como

$$g(t) = \frac{(\Delta t)^2}{\langle N \rangle^2} \iint d^3r d^3r' W(\vec{r}) W(\vec{r}') Q^2 \langle \delta C(\vec{r}, 0) \delta C(\vec{r}', t) \rangle \quad (6.31)$$

O perfil $W(\vec{r})$ do feixe é conhecido já que depende apenas do sistema. O parâmetro Q é intrínseco da molécula e consideraremos que a eficiência de detecção não depende da posição da molécula no volume focal. O termo que falta para resolver a integral da equação (6.31) é o referente à flutuação da concentração. Para calcular esse termo levaremos em conta apenas a difusão Browniana como fonte de flutuação da concentração. Assim a concentração seguirá a Lei de Fick

$$\frac{\partial \delta C(\vec{r}, t)}{\partial t} = -D \nabla^2 \delta C(\vec{r}, t) \quad (6.32)$$

Onde D é o coeficiente de difusão da partícula. A condição de contorno é $\delta C(\vec{r}, t) = 0; \vec{r} \rightarrow \infty$. Para resolver a equação diferencial utilizaremos a Transformada de Fourier do espaço \vec{r} para o espaço \vec{v}

$$\frac{d \delta C(\vec{v}, t)}{dt} = -D v^2 \delta C(\vec{v}, t) \quad (6.33)$$

A solução da equação (6.33) é

$$\delta\tilde{C}(\vec{v}, t) = \delta\tilde{C}(\vec{v}, 0) e^{-Dv^2 t} \quad (6.34)$$

De posse dessa informação e utilizando a Transformada de Fourier inversa, poderemos reescrever o termo $\langle \delta C(\vec{r}, 0) \delta C(\vec{r}', t) \rangle$ da seguinte forma

$$\langle \delta C(\vec{r}, 0) \delta C(\vec{r}', t) \rangle = \frac{1}{(2\pi)^{3/2}} \int d^3\vec{v} e^{-i\vec{v}\cdot\vec{r}'} \langle \delta C(\vec{r}, 0) \delta\tilde{C}(\vec{v}, t) \rangle \quad (6.35)$$

Aplicando a solução (6.34) para a concentração no espaço de Fourier

$$\langle \delta C(\vec{r}, 0) \delta C(\vec{r}', t) \rangle = \frac{1}{(2\pi)^{3/2}} \int d^3\vec{v} e^{-i\vec{v}\cdot\vec{r}'} e^{-Dv^2 t} \langle \delta C(\vec{r}, 0) \delta\tilde{C}(\vec{v}, 0) \rangle \quad (6.36)$$

Agora aplicamos a Transformada de Fourier direta, retornando o termo da concentração para o espaço \vec{r}

$$\langle \delta C(\vec{r}, 0) \delta C(\vec{r}', t) \rangle = \frac{1}{(2\pi)^3} \int d^3\vec{v} e^{-i\vec{v}\cdot\vec{r}'} e^{-Dv^2 t} \int d^3\vec{r}'' e^{i\vec{v}\cdot\vec{r}''} \langle \delta C(\vec{r}, 0) \delta\tilde{C}(\vec{r}'', 0) \rangle \quad (6.37)$$

Como as concentrações utilizadas no FCS tem que ser muito baixas, para se obter poucas moléculas no volume focal, o termo da concentração pode ser reescrito como

$$\langle \delta C(\vec{r}, 0) \delta\tilde{C}(\vec{r}'', 0) \rangle = \langle C \rangle \delta(\vec{r} - \vec{r}'') \quad (6.38)$$

O termo $\delta(\vec{r} - \vec{r}'')$ é a função delta de Dirac em três dimensões. Com a delta de Dirac fica fácil fazer a integral em \vec{r}''

$$\langle \delta C(\vec{r}, 0) \delta C(\vec{r}', t) \rangle = \frac{1}{(2\pi)^3} \int d^3\vec{v} e^{-i\vec{v}\cdot\vec{r}'} e^{-Dv^2 t} \int d^3\vec{r}'' e^{i\vec{v}\cdot\vec{r}''} \langle C \rangle \delta(\vec{r} - \vec{r}'') \quad (6.39)$$

$$\langle \delta C(\vec{r}, 0) \delta C(\vec{r}', t) \rangle = \frac{\langle C \rangle}{(2\pi)^3} \int d^3\vec{v} e^{i\vec{v}\cdot(\vec{r}-\vec{r}')} e^{-Dv^2 t} \quad (6.40)$$

Agora podemos substituir o resultado (6.40) na função de autocorrelação (6.31)

$$g(t) = \frac{(\Delta t)^2}{\langle N \rangle^2} \frac{\langle C \rangle}{(2\pi)^3} Q^2 \iint d^3r d^3r' W(\vec{r}) W(\vec{r}') \int d^3\vec{v} e^{i\vec{v}\cdot(\vec{r}-\vec{r}')} e^{-Dv^2t} \quad (6.41)$$

As integrais em \vec{r} e \vec{r}' são as Transformadas de Fourier do perfil do feixe

$$g(t) = \frac{(\Delta t)^2}{\langle N \rangle^2} \langle C \rangle Q^2 \int d^3\vec{v} e^{-Dv^2t} |\tilde{W}(\vec{v})|^2 \quad (6.42)$$

Nesse ponto precisamos definir a forma do feixe para determinar a distribuição de intensidade $W(\vec{r})$. Utilizaremos nos cálculos um perfil de feixe Gaussiano[100]. Ao ser focalizado pela objetiva, o feixe não tem uma geometria completamente Gaussiana, porém com o emprego do pinhole para a diminuição do volume foca a aproximação Gaussiana torna-se bastante satisfatória[101].

O perfil do feixe Gaussiano é dado por

$$W(\vec{r}) = W_0 e^{-2\left(\frac{x^2+y^2}{\omega_x^2} + \frac{z^2}{\omega_z^2}\right)} \quad (6.43)$$

Onde ω_x e ω_z é a cintura do feixe na direção lateral (perpendicular a propagação do feixe) e a cintura do feixe na direção axial (na direção de propagação do feixe) respectivamente. Essas são as distâncias para as quais a intensidade do feixe cai para e^{-2} nas respectivas direções. Os termos ω_x e ω_z são os termos que definem a resolução lateral (direção x e y) e axial (direção z). Por causa da assimetria entre as coordenadas xy e z a resolução axial é maior do que a resolução lateral. Sem a correção do pinhole essa diferença está na ordem de 10 vezes, enquanto com a utilização do pinhole essa diferença cai para a ordem de 2 a 3 vezes[98].

Para resolver a integral da equação (6.42) precisamos do perfil do feixe no espaço de Fourier e não no espaço real. Fazendo a transformada do perfil do feixe temos

$$\tilde{W}(\vec{v}) = W_0 \frac{1}{(2\pi)^{3/2}} \int_{-\infty}^{\infty} e^{-2\left(\frac{x^2+y^2+z^2}{\omega_x^2+\omega_y^2+\omega_z^2}\right)} e^{i\vec{v}\cdot\vec{r}} d^3r \quad (6.44)$$

Fazendo o produto escalar $\vec{v}\cdot\vec{r}$

$$\tilde{W}(\vec{v}) = W_0 \frac{1}{(2\pi)^{3/2}} \int_{-\infty}^{\infty} e^{-2\left(\frac{x^2+y^2+z^2}{\omega_x^2+\omega_y^2+\omega_z^2}\right)} e^{i(v_x x + v_y y + v_z z)} d^3r \quad (6.45)$$

Nesse ponto podemos separar e resolver as integrais de cada coordenada. Começando com a coordenada x

$$\tilde{W}(\vec{v}_x) = \int_{-\infty}^{\infty} e^{-2\left(\frac{x^2}{\omega_x^2}\right)} e^{i(v_x x)} dx \quad (6.46)$$

Completando o quadrado

$$\tilde{W}(\vec{v}_x) = \int_{-\infty}^{\infty} e^{-2\left(\frac{x^2}{\omega_x^2}\right)} e^{i v_x x} e^{\frac{(v_x \omega_x)^2}{8}} e^{-\frac{(v_x \omega_x)^2}{8}} dx \quad (6.47)$$

$$\tilde{W}(\vec{v}_x) = e^{-\frac{(v_x \omega_x)^2}{8}} \int_{-\infty}^{\infty} e^{(-1)\left(\frac{2x^2}{\omega_x^2} + \frac{v_x x}{i} + \frac{(v_x \omega_x)^2}{8}\right)} dx \quad (6.48)$$

$$\tilde{W}(\vec{v}_x) = e^{-\frac{(v_x \omega_x)^2}{8}} \int_{-\infty}^{\infty} e^{-\left(\frac{\sqrt{2}x}{\omega_x} + \frac{\omega_x v_x}{2\sqrt{2}i}\right)^2} dx \quad (6.49)$$

A integral restante da equação (6.49) vale $\int_{-\infty}^{\infty} dx e^{-ax^2} = \frac{1}{\sqrt{a}} \int_0^{\infty} u^{-1/2} e^{-u} du = \frac{1}{\sqrt{a}} \left(-\frac{1}{2}\right)! = \sqrt{\frac{\pi}{a}}$. Para poder aplicar o resultado na integral da equação (6.49) fazemos uma transformação de variável, logo

$$\tilde{W}(\vec{v}_x) = e^{-\frac{(v_x \omega_x)^2}{8}} \int_{-\infty}^{\infty} e^{-\left(\frac{\sqrt{2}x}{\omega_x} + \frac{\omega_x v_x}{2\sqrt{2}i}\right)^2} dx = e^{-\frac{(v_x \omega_x)^2}{8}} \int_{-\infty}^{\infty} e^{-u^2} \frac{\omega_x}{\sqrt{2}} dv \quad (6.50)$$

$$u = \frac{\sqrt{2}x}{\omega_x} + \frac{\omega_x v_x}{2\sqrt{2}i} \quad du = \frac{\sqrt{2}}{\omega_x} dx \quad (6.51)$$

$$\tilde{W}(v_x) = \frac{\omega_x}{\sqrt{2}} e^{-\frac{(v_x \omega_x)^2}{8}} \int_{-\infty}^{\infty} e^{-u^2} du = e^{-\frac{(v_x \omega_x)^2}{8}} \frac{\omega_x}{\sqrt{2}} \sqrt{\pi} \quad (6.52)$$

Os mesmos procedimentos são repetidos para a direção y e z, obtendo

$$\tilde{W}(v_y) = e^{-\frac{(v_y \omega_y)^2}{8}} \omega_y \frac{\sqrt{\pi}}{\sqrt{2}} \quad (6.53)$$

$$\tilde{W}(v_z) = e^{-\frac{(v_z \omega_z)^2}{8}} \omega_z \frac{\sqrt{\pi}}{\sqrt{2}} \quad (6.54)$$

Retomando as três direções na mesma expressão

$$\tilde{W}(\vec{v}) = \frac{W_0 \omega_x^2 \omega_z}{8} e^{-\frac{1}{8}(\omega_x^2(v_x^2+v_y^2)+\omega_z^2 v_z^2)} \quad (6.55)$$

Podemos substituir agora o valor do $|\tilde{W}(\vec{v})|^2$ na equação (6.42)

$$g(t) = \frac{(\Delta t)^2}{\langle N \rangle^2} \langle C \rangle Q^2 \int d^3 \vec{v} e^{-Dv^2 t} \left(\frac{W_0 \omega_x^2 \omega_z}{8} \right)^2 e^{-\frac{1}{4}(\omega_x^2(v_x^2+v_y^2)+\omega_z^2 v_z^2)} \quad (6.56)$$

$$g(t) = \frac{(\Delta t)^2}{\langle N \rangle^2} \langle C \rangle Q^2 \left(\frac{W_0 \omega_x^2 \omega_z}{8} \right)^2 \int d^3 \vec{v} e^{-Dv^2 t} e^{-\frac{1}{4}(\omega_x^2(v_x^2+v_y^2)+\omega_z^2 v_z^2)} \quad (6.57)$$

Definindo o tempo de difusão da partícula como $\tau_D = \frac{\omega_x^2}{4D}$ (6.58), e um parâmetro k (6.59), adimensional, relacionando ω_x e ω_z através da expressão $k = \frac{\omega_z}{\omega_x}$ e reescrevendo v^2 em função das suas componentes v_x, v_y e v_z

$$g(t) = \frac{(\Delta t)^2}{\langle N \rangle^2} \langle C \rangle Q^2 \left(\frac{W_0 \omega_x^2 \omega_z}{8} \right)^2 \int d^3 \vec{v} e^{-\frac{\omega_x^2}{4\tau_D}(v_x^2+v_y^2+v_z^2)t} e^{-\frac{\omega_z^2}{4}(v_x^2+v_y^2)+k^2 v_z^2} \quad (6.60)$$

Novamente podemos separar a integral da equação (6.60) em três integrais separadas para as coordenadas v_x, v_y e v_z . Começando por v_x

$$I_1 = \int_{-\infty}^{\infty} e^{-\frac{\omega_x^2}{4} \left(1 + \frac{t}{\tau_D}\right) v_x^2} dv_x = \frac{2}{\omega_x} \sqrt{\frac{\pi}{\left(1 + \frac{t}{\tau_D}\right)}} \quad (6.61)$$

A coordenada y tem exatamente a mesma expressão que a coordenada x

$$I_2 = \int_{-\infty}^{\infty} e^{-\frac{\omega_x^2}{4} \left(1 + \frac{t}{\tau_D}\right) v_y^2} dv_y = \frac{2}{\omega_x} \sqrt{\frac{\pi}{\left(1 + \frac{t}{\tau_D}\right)}} \quad (6.62)$$

A coordenada z tem um termo k^2 mas mantém a mesma forma

$$I_3 = \int_{-\infty}^{\infty} e^{-\frac{\omega_x^2}{4} \left(k^2 + \frac{t}{\tau_D}\right) v_z^2} dv_z = \frac{2}{\omega_x} \sqrt{\frac{\pi}{\left(k^2 + \frac{t}{\tau_D}\right)}} = \frac{2}{\omega_z} \sqrt{\frac{\pi}{\left(1 + \frac{t}{k^2 \tau_D}\right)}} \quad (6.63)$$

Juntando os resultados (6.61), (6.62) e (6.63) na equação (6.60) temos

$$g(t) = \frac{(\Delta t)^2}{\langle N \rangle^2} \langle C \rangle Q^2 \left(\frac{W_0 \omega_x^2 \omega_z}{8} \right)^2 \frac{2}{\omega_x} \sqrt{\frac{\pi}{\left(1 + \frac{t}{\tau_D}\right)}} \frac{2}{\omega_x} \sqrt{\frac{\pi}{\left(1 + \frac{t}{\tau_D}\right)}} \frac{2}{\omega_z} \sqrt{\frac{\pi}{\left(1 + \frac{t}{k^2 \tau_D}\right)}} \quad (6.64)$$

$$g(t) = \frac{(\Delta t)^2}{\langle N \rangle^2} \langle C \rangle Q^2 \left(\frac{W_0 \omega_x^2 \omega_z}{8} \right)^2 \frac{2^3}{\omega_x^2 \omega_z} \frac{\pi^{3/2}}{\left(1 + \frac{t}{\tau_D}\right)} \frac{1}{\sqrt{\left(1 + \frac{t}{k^2 \tau_D}\right)}} \quad (6.65)$$

$$g(t) = \frac{(\Delta t)^2}{\langle N \rangle^2} \langle C \rangle Q^2 \frac{W_0^2 \omega_x^2 \omega_z}{8} \frac{\pi^{3/2}}{\left(1 + \frac{t}{\tau_D}\right)} \frac{1}{\sqrt{\left(1 + \frac{t}{k^2 \tau_D}\right)}} \quad (6.66)$$

Para finalizar o cálculo da função de autocorrelação falta calcular o valor de $\langle N \rangle^2$. Pela definição (6.27)

$$N(t) = \Delta t \int_v d^3 r W(\vec{r}) Q C(\vec{r}, t) \quad (6.67)$$

Tomando o valor médio

$$\langle N(t) \rangle = \Delta t Q \langle C(\vec{r}, t) \rangle \int_v d^3 r W(\vec{r}) \quad (6.68)$$

Falta apenas calcular a integral no volume do perfil do feixe

$$\int_v d^3r W(\vec{r}) = \int_v d^3r W_0 e^{-2\left(\frac{x^2+y^2+z^2}{\omega_x^2+\omega_z^2}\right)} = \frac{W_0 \omega_x^2 \omega_z \pi^{3/2}}{2^{3/2}} \quad (6.69)$$

Logo

$$\langle N(t) \rangle = \Delta t Q \langle C(\vec{r}, t) \rangle \frac{W_0 \omega_x^2 \omega_z \pi^{3/2}}{2^{3/2}} \quad (6.70)$$

Substituindo o valor de $\langle N \rangle$ na função de autocorrelação (6.66) obtemos

$$g(t) = \frac{(\Delta t)^2}{\left(\Delta t Q \langle C \rangle \frac{W_0 \omega_x^2 \omega_z \pi^{3/2}}{2^{3/2}} \right)^2} \langle C \rangle Q^2 \frac{W_0^2 \omega_x^2 \omega_z \pi^{3/2}}{8} \frac{1}{(1 + t/\tau_D)} \frac{1}{\sqrt{(1 + t/k^2 \tau_D)}} \quad (6.71)$$

$$g(t) = \frac{1}{\langle C \rangle \omega_x^2 \omega_z \pi^{3/2}} \frac{1}{(1 + t/\tau_D)} \frac{1}{\sqrt{(1 + t/k^2 \tau_D)}} \quad (6.72)$$

Definindo o volume efetivo V_{ef}

$$V_{ef} = \frac{\left(\int_v d^3r W(\vec{r}) \right)^2}{\int_v d^3r W^2(\vec{r})} = \frac{\left(\frac{W_0 \omega_x^2 \omega_z \pi^{3/2}}{2^{3/2}} \right)^2}{\frac{W_0^2 \pi^{3/2} \omega_x^2 \omega_z}{2^3}} = \omega_x^2 \omega_z \pi^{3/2} \quad (6.73)$$

A função de autocorrelação pode ser escrita como

$$g(t) = \frac{1}{\langle C \rangle V_{ef}} \frac{1}{(1 + t/\tau_D)} \frac{1}{\sqrt{(1 + t/k^2 \tau_D)}} \quad (6.74)$$

A concentração de qualquer solução é definida pelo número de partículas contido num determinado volume

$$C = \frac{N}{V} \Rightarrow \langle C \rangle = \frac{\langle N \rangle}{V_{ef}} \quad (6.75)$$

Com isso a função de autocorrelação devido à difusão é dada por

$$g(t) = \frac{1}{\langle N \rangle} \frac{1}{(1 + t/\tau_D)} \frac{1}{\sqrt{(1 + t/k^2\tau_D)}} \quad (6.76)$$

Um ajuste da curva de autocorrelação medida com a equação (6.76) nos permite obter três parâmetros da função de autocorrelação. O valor de $g(t)$ no tempo zero é inversamente proporcional ao número médio de partículas no volume focal. Com essa informação e utilizando a definição de volume efetivo é possível calcular a concentração de partículas fluorescentes da amostra. O outro parâmetro é o tempo de difusão da molécula τ_D e o terceiro parâmetro é o k^2 que fornece a relação entre ω_x e ω_z .

Qualquer outro fenômeno que cause flutuação na fluorescência simultaneamente com a difusão deveria ser levado em conta no cálculo da função de autocorrelação. Porém se esse fenômeno acontece em uma escala de tempo diferente da escala de tempo da difusão é possível incorporá-lo na função de autocorrelação sem recalculá-la totalmente[95]. A função de autocorrelação teria a seguinte forma

$$g(t) = g(t)_{\text{difusão}} \cdot g(t)_{\text{dinâmica}} \quad (6.77)$$

Obviamente esse argumento só é válido se a dinâmica não alterar a difusão da partícula[102]. O estado tripleto se encaixa nesses requisitos e pode ser descrito por um decaimento exponencial

$$g(t)_{\text{tripleto}} = 1 - T + T e^{-\frac{t}{\tau_{\text{tripleto}}}} \quad (6.78)$$

Isso adicionará um ombro nas curvas medidas para tempos muito curtos. É possível normalizar a equação (6.78) dividindo por $(1-T)$ [103]. A função de autocorrelação total será

$$g(t) = \left(\frac{1 - T + T e^{-\frac{t}{\tau_{\text{tripleto}}}}}{1 - T} \right) \frac{1}{\langle N \rangle} \frac{1}{(1 + t/\tau_D)} \frac{1}{\sqrt{(1 + t/k^2\tau_D)}} \quad (6.79)$$

Outro fenômeno de flutuação rápida, mais rápido até do que a transição para o estado tripleto, vem das flutuações devido à rotação das moléculas. Essa flutuação só pode ser observada com um polarizador na frente dos detetores. A Figura 100 mostra uma curva típica de autocorrelação com as regiões referentes a cada fase do processo destacadas incluindo as flutuações de rotação.

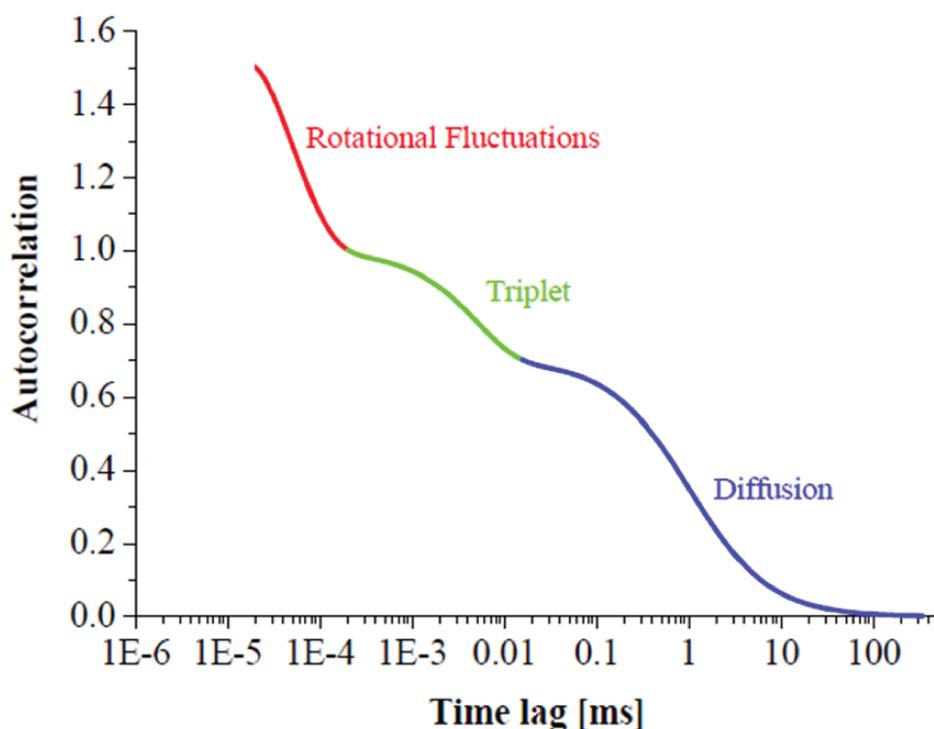


Figura 100 Curva de autocorrelação incluindo dinâmica rotacional, estado tripleto e difusão[104]

6.3 Raio Hidrodinâmico e Calibração do Raio Lateral

Se a partícula que está difundindo pelo volume focal for esférica podemos associar a ela um raio hidrodinâmico que pode ser calculado a partir da equação de Stokes-Einstein

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R} \Rightarrow R = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad (6.80)$$

Onde k é a constante de Boltzmann, T a temperatura, η a viscosidade do meio e D o coeficiente de difusão. Geralmente, o coeficiente de difusão das partículas estudadas não é conhecido. Mas podemos usar a definição do tempo de difusão $\tau_D = \frac{\omega_x^2}{D}$ e calcular o raio hidrodinâmico obtendo τ_D da função de autocorrelação.

$$R = \frac{4kT\tau_D}{6\pi\eta\omega_x^2} \quad (6.81)$$

Para isso é necessário conhecer o raio lateral do feixe ω_x . Desse modo é preciso uma calibração com uma partícula fluorescente conhecida em um solvente com o coeficiente de difusão bem determinado para inverter a equação (6.81) para determinar o raio lateral ω_x a partir do τ_D . Além disso o ajuste da curva de FCS com a partícula padrão nos permite determinar o k da equação (6.79). Tanto ω_x quanto k são constantes que dependem apenas da geometria do feixe incidente.

6.4 FCS para Medir Propriedades Hidrodinâmicas de QDS

As técnicas mais utilizadas para a análise dos QDs exigem que eles estejam em ambiente isolado e seco, como Microscopia Eletrônica de Transmissão e Difração de Raios-X. Apesar de serem técnicas que oferecem informações com alta precisão, o fato dos QDs não estarem na sua forma coloidal elimina a possibilidade de qualquer medida da interação com o ambiente, impedindo assim extração de informação da física da superfície dos QDs. Além disso, todo o processo de preparação da amostra, aquisição e análise de imagens da Microscopia Eletrônica de Transmissão da Alta Resolução [HRTEM – High Resolution Transmission Electron Microscopy], requer um tempo grande para serem realizadas, e podem gerar efeitos indesejados como coagulação de quantum dots em aglomerados na secagem. Uma medida de tamanho das

partículas com HRTEM, por exemplo, é feita através da análise de centenas de partículas visíveis na imagem adquirida, representando uma estatística pobre na determinação do tamanho médio. Nesse aspecto existe uma outra questão fundamental sobre a medida de tamanhos de quantum dots: TEM vê, basicamente, os núcleos atômicos, e não a nuvem eletrônica. Mas do ponto de vista da física do confinamento a dimensão que interessa é do potencial que confina o elétron, que obviamente está espalhado para além da posição dos últimos núcleos do quantum dot. Intuitivamente, mesmo que não existisse qualquer erro sistemático na técnica de HRTEM, ela tenderia a observar dimensões menores do que as dimensões do confinamento quântico, refletido nas propriedades ópticas. Outras técnicas como espalhamento de Raio-X ou SAXS [Small Angle X-Ray Scattering], por outro lado, são capazes de analisar um grande número de QDs, como 10^{15} , porém a análise é feita sobre um volume grande de partículas, e não sobre várias partículas isoladas, ao contrário da técnica de HRTEM e FCS nas quais a estatística é obtida sobre observações de quantum dots isolados. Raios-X, portanto, não possui sensibilidade de detecção de um único quantum dot. Se a amostra for heterogênea resultados de raios-X podem sair distorcidos. É comum o aparecimento de aglomerados de quantum dots principalmente na secagem, que podem ser descartados facilmente no HRTEM ou eliminados na solução utilizada no FCS ou por precipitação ou filtragem, mas que distorcem a estatística das medidas de raios-X.

O FCS oferece a possibilidade de medir propriedades praticamente de partículas únicas, sobre um grande número de partículas e no ambiente coloidal, além de ser uma técnica com poucos requisitos de preparação de amostra e de sistema experimental. Dessa maneira o FCS se torna uma técnica muito atrativa para a análise de propriedades hidrodinâmicas de QDs. A medida do raio hidrodinâmico do QD sai prontamente da curva de correlação. Vale lembrar que os quantum dots fluorescentes sempre exigem uma cap layer para evitar os traps de superfície e que essa cap layer aumenta o raio hidrodinâmico dos mesmos.

6.5 Sistema Experimental

O sistema utilizado para as medidas de FCS foi o Zeiss LSM 780 reto. A objetiva utilizada foi a Plan-Apochromat 40x/1.0 Water DIC (WD:2.5mm). Essa objetiva, quando imersa em água, corrige as aberrações por descasamento de índices de refração, garantindo o menor volume focal possibilitado pela sua abertura numérica. Ela possui um revestimento de plástico para possibilitar sua imersão na solução líquida. Para criar espaço suficiente entre a objetiva e a lamínula para focalização do feixe, nós mergulhamos a objetiva em uma gota de 40 μl da amostra e a retraímos alguns micrômetros para preencher o espaço entre a objetiva e a lamínula como mostrado na Figura 101

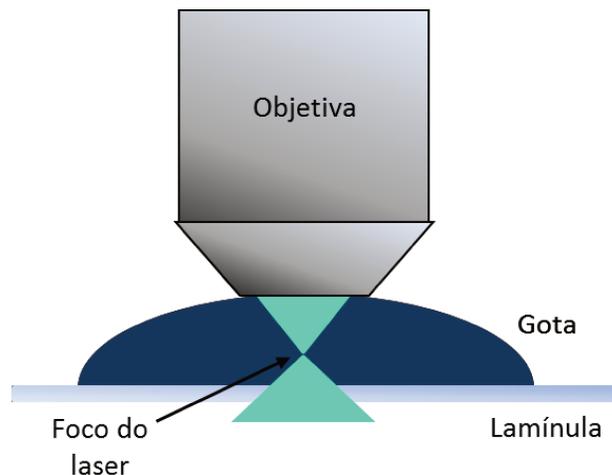


Figura 101 Objetiva em contato com o líquido da amostra para aquisição do FCS

A Figura 102 mostra o esquema do sistema experimental utilizado na medida de FCS. A linha 488 nm do laser de Argônio passa pelos espelhos de varredura e é focalizada na amostra. Para medida de FCS os espelhos de varredura permanecem fixos no ponto central da área de varredura, ou seja, o feixe de excitação permanece imóvel. O sinal de fluorescência coletado passa também pelos espelhos de varredura, é focalizado no pinhole, o que o torna confocal, e direcionado para os APDs dentro do scanner. O espelho dicróico DM2 elimina o laser refletido e transmite a fluorescência.

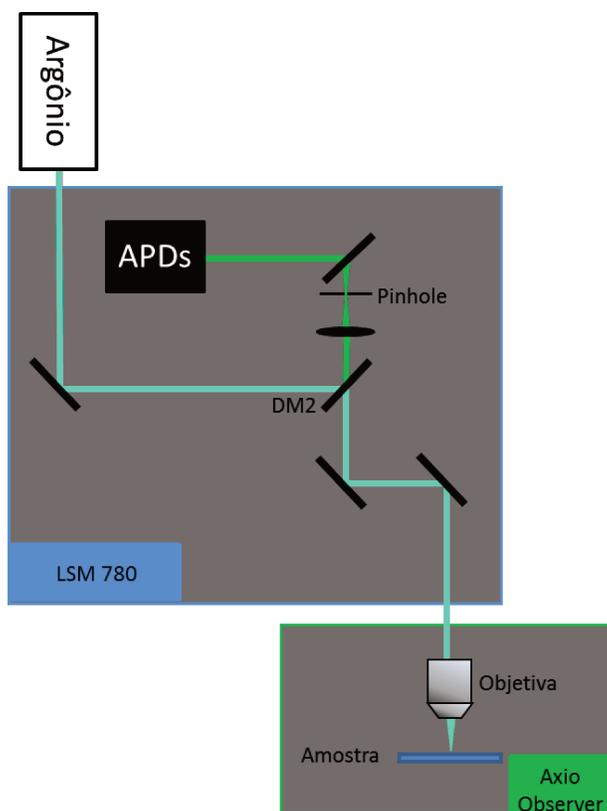


Figura 102 Esquema experimental para a medida do FCS

O programa da Zeiss no modo FCS fixa os espelhos de varredura e habilita o modo de contagem de fótons dos APDs. A faixa de comprimento de ondas para aquisição do FCS é escolhida através do software. O próprio programa calcula e apresenta a curva de autocorrelação do sinal de fluorescência, e faz o ajuste da curva da expressão (6.79). Outros modelos também são possíveis, por exemplo, desprezando a transição para o estado tripleto, ou considerando difusão em duas ou uma dimensão, com expressões ligeiramente diferentes da equação (6.79). Moléculas que se movem apenas em uma superfície de membranas, ou em uma dimensão, ao longo de microtubulos, são comuns na biologia. Por isso modelos em 2 e 1 dimensão são necessários. No nosso experimento, entretanto, a difusão é volumétrica e utilizamos o modelo de difusão em três dimensões da equação (6.79). Entretanto, incluímos a transição para o estado tripleto nas medidas com a rodamina mas não com os quantum dots. Uma foto do programa do microscópio para aquisição do FCS é mostrada na Figura 103. O gráfico superior mostra as flutuações da fluorescência ao longo do tempo. Na gráfico de baixo aparece a

curva de autocorrelação com o tempo em uma escala logarítmica. O software nos permite escolher o tempo total da curva de FCS e definir o número de aquisições para construção da curva média nesse tempo. Abaixo da curva de FCS aparecem os parâmetros ajustados. Clicando na ícone Fit o programa mostra a curva experimental de FCS junto com a curva ajustada, e a dispersão dos resíduos, como mostra a Figura 104. Tanto a curva de FCS quanto os parâmetros ajustados podem ser exportados na forma de imagem ou como texto para uma planilha Excel onde o gráfico pode ser redesenhado em um formato mais adequado a uma apresentação, podendo escolher escalas, cores, espessuras das curvas etc, como mostra a Figura 105 em que a mesma curva de FCS da Figura 104 foi reconstruída no Excel. A tabela com os parâmetros ajustados é usualmente exportada como uma tabela do Excel.

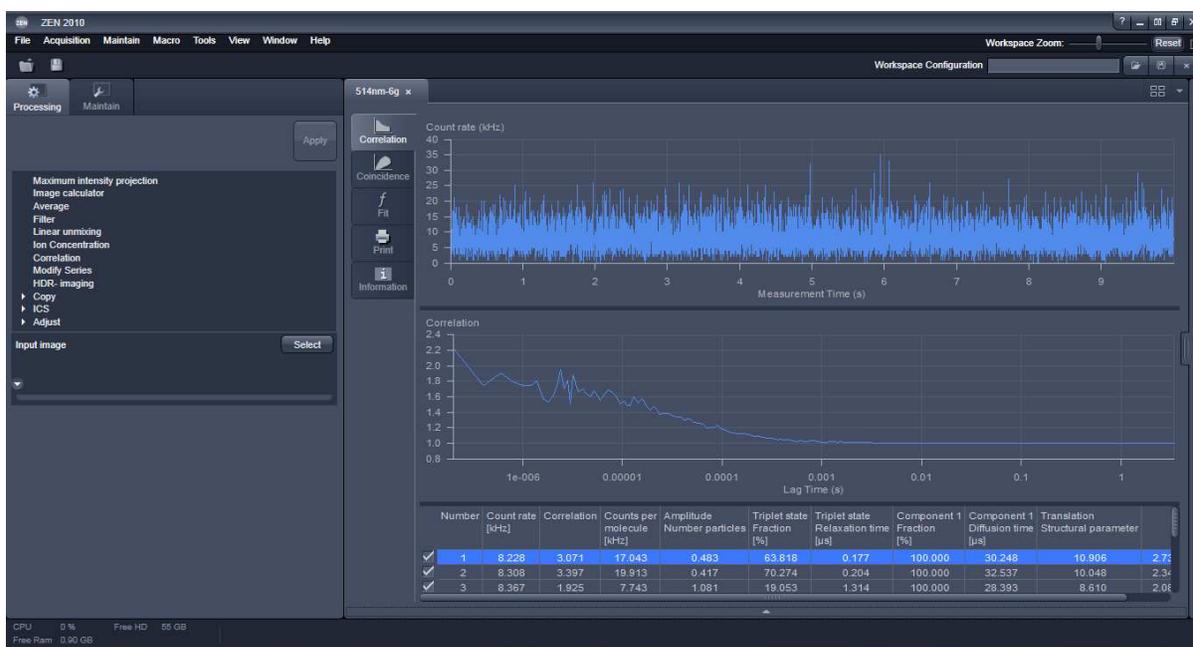


Figura 103 Tela do programa de aquisição do FCS

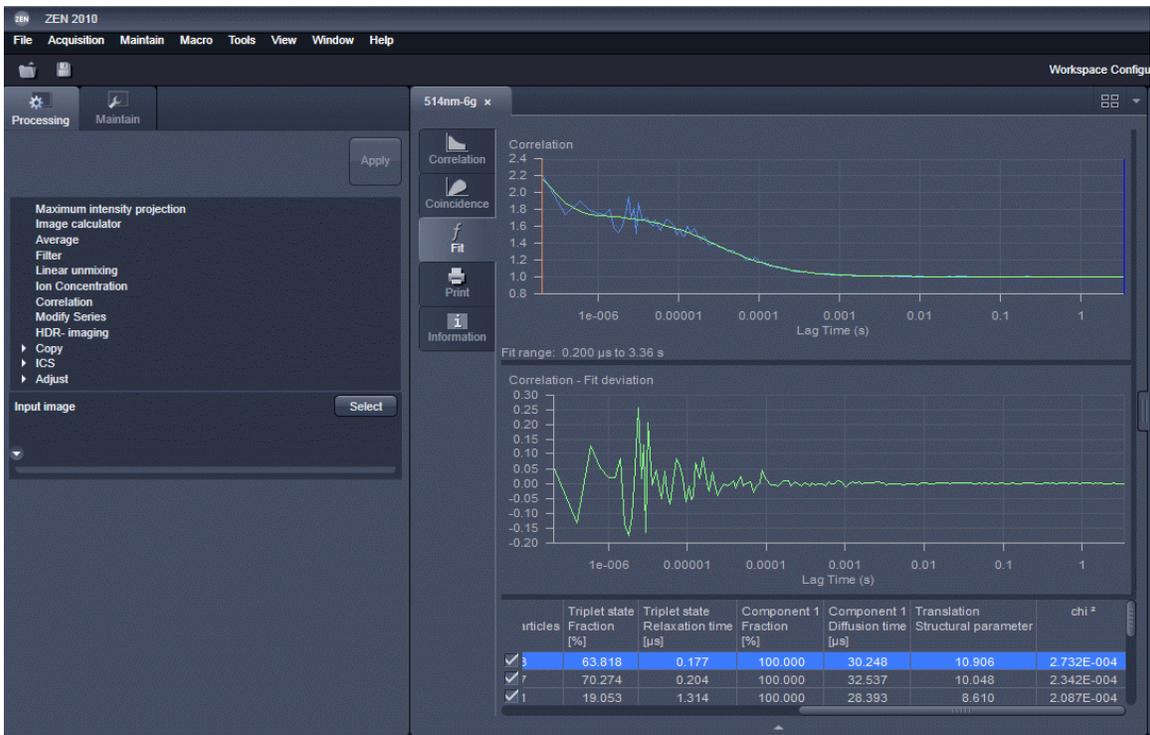


Figura 104 tela do módulo de FCS do programa no modo Fit

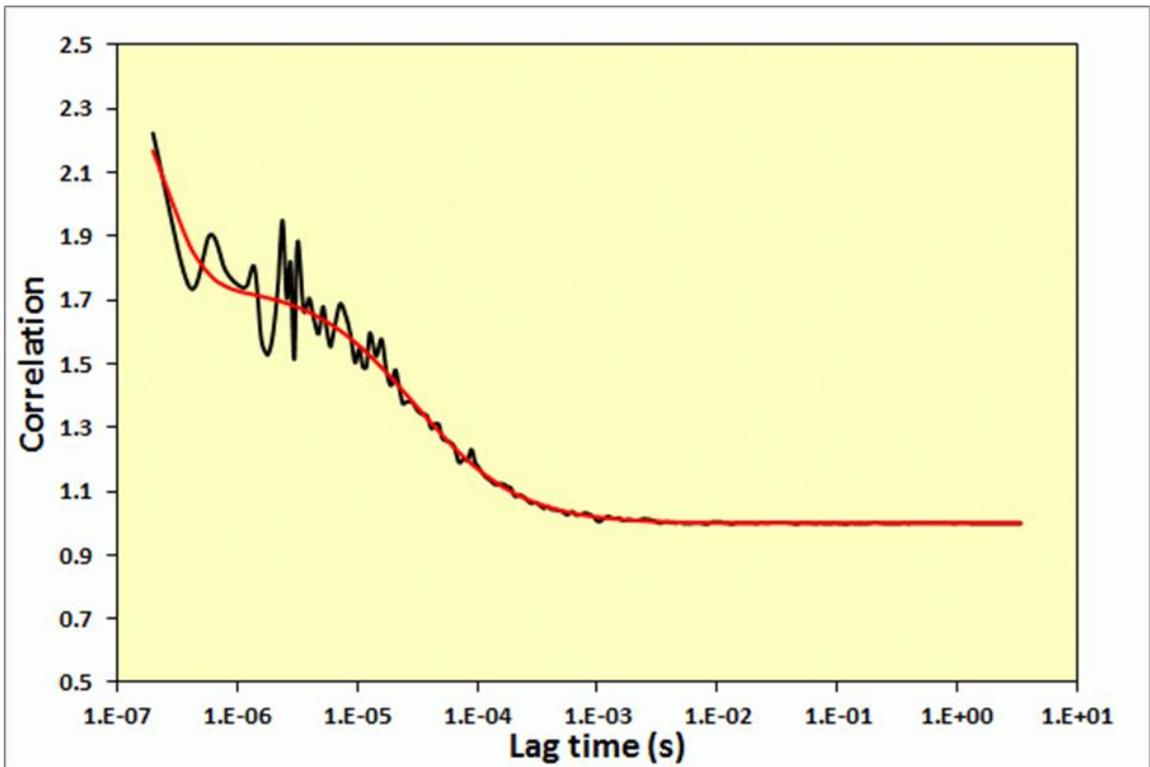


Figura 105 Mesma curva de FCS experimental e ajuste da Figura 104 reconstruída na planilha Excel após exportação dos dados na forma texto.

6.6 Resultados de FCS em QD

Nosso objetivo nessa seção foi utilizar o FCS para medir o raio hidrodinâmico dos QDs e compará-los com os raios obtidos através de outras técnicas, como estimativa do tamanho através do pico de absorção e microscopia eletrônica. O primeiro passo para a medida do raio hidrodinâmico com o FCS é a calibração do volume focal a partir dos tempos de difusão de uma molécula com coeficiente de difusão conhecido. O corante escolhido foi a rodamina B (RB). Uma solução com concentração da ordem de 10 nM foi preparada diluindo-se a RB em pó em água MilliQ. Dessa solução retiramos 40 μl que pingamos em uma lamínula posicionada na objetiva do microscópio. O QD utilizado em todas as medidas foi o Col2909. Fizemos 10 medidas com excitação na linha 488 nm do laser de Argônio e o pinhole ajustado para 35 μm . A potência do laser tem que ser ajustada para evitar a saturação das moléculas[105], a potência utilizadas foi de 0.5 μW , medida após a objetiva. A Tabela 5 mostra os resultados obtidos

Medida	Número Médio de Partículas	Fração do Estado Tripleto [%]	Relaxação do Estado Tripleto [μs]	Tempo de Difusão [μs]	k^2
1	0.545	59.425	0.512	20.716	7.42
2	0.682	50.144	0.84	21.664	11.713
3	0.269	78.43	0.159	17.743	11.713
4	0.61	57.749	1.121	25.874	3.872
5	0.753	46.376	0.904	22.976	4.472
6	0.947	39.199	2.049	26.698	10.697
7	0.771	38.303	0.643	19.513	5.955
8	1.012	24.176	2.154	19.78	11.853
9	1.218	37.326	15.5	32.879	7.984
10	0.64	51.42	1.178	22.025	22.197
11	1.104	33.291	6.778	32.874	4.335
12	0.627	51.603	0.577	18.508	11.414
13	0.906	33.122	1.603	20.465	12.074
14	1.224	27.944	6.684	29.574	10.221
15	0.947	22.972	1.763	19.942	16.863
20	1.314	21.285	8.916	30.304	7.52
Média	0.848	42.048	3.211	23.846	10.019

Tabela 5 Medidas do tempo de difusão para RB excitada pelo 488nm

O tempo médio de difusão foi de $23.846\mu s$. O coeficiente de difusão da rodamina B é $D = 4.3 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ a 25°C [106]. Todas as medidas foram mantidas sobre as mesmas condições utilizando um aquecedor de objetiva que fixava a temperatura em 30°C . O coeficiente de difusão da RB pode ser calculado para outras temperaturas a partir da equação

$$D_{25^\circ \text{C}} = D_{X^\circ \text{C}} \frac{T_{25^\circ \text{C}} \eta_{X^\circ \text{C}}}{T_{X^\circ \text{C}} \eta_{25^\circ \text{C}}} \quad (6.82)$$

Onde T é a temperatura absoluta e η a viscosidade da solução. A viscosidade é apresentada na Tabela 6 para várias temperaturas. Dessa forma o coeficiente de difusão da RB $D_{30^\circ \text{C}} = 4.9 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

Temp ($^\circ \text{C}$)	Viscosidade (mPa*s)	Temp ($^\circ \text{C}$)	Viscosidade (mPa*s)
10	1.306	60	0.466
20	1.002	70	0.404
30	0.797	80	0.354
40	0.653	90	0.313
50	0.547	100	0.278

Tabela 6 Valores da viscosidade da água em função da temperatura[107]

Podemos calcular o raio lateral do volume focal através de

$$\tau_D = \frac{\omega_x^2}{D} \Rightarrow \omega_x = \sqrt{\tau_D D} \quad (6.83)$$

Obtendo o valor: $\omega_x = 216 \text{ nm}$. A Tabela 5 mostra também os valores de k^2 . Com o valor de k e o valor de ω_x calculado, é possível calcular o valor de ω_z , o valor médio de k^2 é 10.019, portanto

$$k = 3.165 \quad (6.84)$$

$$k = \frac{\omega_z}{\omega_x} \Rightarrow \omega_z = 683.700 \text{ nm} \quad (6.85)$$

O mesmo procedimento foi realizado para diferentes tamanhos de pinhole. A Tabela 7 mostra os resultados para essas medidas.

Laser (nm)	pinhole (μm)	$\tau_d(\mu\text{s})$	ω_x (nm)	ω_z (nm)
488	20	20.1	198.2	627.3
488	25	22.4	209.3	662.4
488	30	23.5	214.3	678.4
488	35	23.8	216.0	683.7
488	40	25.7	224.1	709.2
488	45	26.9	229.0	724.8
488	50	28.9	237.6	752.0
488	55	29.0	238.2	753.8
488	60	30.4	243.6	770.9
488	65	31.3	247.3	782.7

Tabela 7 Valores de ω_x e ω_z em função do tamanho do pinhole.

Com os valores de ω_x para cada tamanho de pinhole é possível calcular o raio hidrodinâmico do QD a partir do seu tempo de difusão. A Tabela 8 mostra o tempo de difusão do QD em função da potência do laser para o pinhole de $35 \mu\text{m}$

Potência (%)	Número Médio de Partículas	Tempo de Difusão [μs]		Potência (%)	Número de Partículas	Tempo de Difusão [μs]
0.2	1.58	89.636		1.2	1.29	30.208
0.3	1.30	71.688		1.3	1.35	32.305
0.4	1.14	56.470		1.4	1.39	30.272
0.5	1.16	55.236		1.5	1.49	27.584
0.6	1.18	47.597		1.6	1.40	25.805
0.7	1.17	45.518		1.7	1.49	25.680
0.8	1.19	39.390		1.8	1.55	24.618
0.9	1.15	35.462		1.9	1.50	23.275
1.0	1.22	32.185		2.0	1.56	25.442
1.1	1.28	32.682				

Tabela 8 Tempo de difusão do QD em função da potência do laser.

A surpresa nos dados da Tabela 8 foi a observação de que o tempo de difusão do QD depende da potência do laser. Teoricamente, esse tempo de difusão, calculado pela relação $\tau_D = \frac{\omega_x^2}{4D}$, só deveria depender do raio lateral do foco e do coeficiente de difusão da partícula, o qual é função apenas da temperatura e da viscosidade do meio. Esse fato leva a uma conclusão desagradável, pois o raio hidrodinâmico dos quantum dots seria extraído do tempo de difusão. Entretanto, qual tempo de difusão deve ser utilizado?

Efeito do Blinking no tempo de difusão aparente

Para prosseguir é necessário então encontrar uma explicação para a dependência do tempo de difusão em função da potência do laser. A explicação para esse comportamento é o blinking dos quantum dots, ou seja, períodos em que o quantum dot deixa de emitir, caindo no estado denominado desligado [105].

Ao se analisar o sinal de fluorescência de um QD em função do tempo percebe-se que o sinal não é constante. Existem períodos em que o quantum dot está emitindo (ligado) e existem períodos em que o quantum dot não está emitindo (desligado). A Figura 106 mostra o sinal de fluorescência em função do tempo para um único QD.

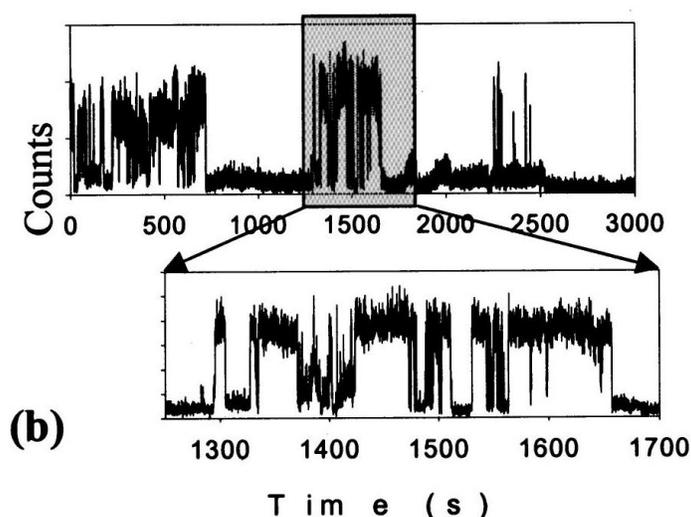


Figura 106 Sinal de fluorescência do QD em função do tempo[108].

A distribuição de probabilidade dos tempos do estado desligado segue uma lei de potência

$$P(t) = At^{-\alpha} \quad (6.86)$$

Com o coeficiente α assumindo valores entre -1.4 e -1.7[108]. A distribuição de probabilidade dos tempos do estado ligado também segue uma lei de potência, com o mesmo coeficiente, porém com um efeito de saturação dependente da temperatura e da potência de excitação, alterando a “cauda” para tempos altos na distribuição[108]. Esse fato é refletido no tempo de difusão medido do QD. Como os tempos de blinking são da mesma ordem que os tempos

de difusão dos quantum dots, quando o blinking acontece a fluorescência do quantum desaparece como se o mesmo tivesse saído do volume focal. Logo, quanto maior a taxa de blinking mais rápido os quantum dots aparentemente abandonam o volume focal com uma difusão aparentemente mais rápida.

Portanto para usar o FCS para calcular o raio hidrodinâmico do QD é necessário levar em conta esse fator. Porém surgiu uma dificuldade nesse ponto. Qual a potência correta para se realizar a medida e calcular o raio hidrodinâmico do QD? Alguns autores utilizam o argumento que o “blinking” não é significativo para baixas potências de laser[105],[109],[110]. Porém, ao analisar, os resultados da

Potência (%)	Número Médio de Partículas	Tempo de Difusão [μ s]		Potência (%)	Número de Partículas	Tempo de Difusão [μ s]
0.2	1.58	89.636		1.2	1.29	30.208
0.3	1.30	71.688		1.3	1.35	32.305
0.4	1.14	56.470		1.4	1.39	30.272
0.5	1.16	55.236		1.5	1.49	27.584
0.6	1.18	47.597		1.6	1.40	25.805
0.7	1.17	45.518		1.7	1.49	25.680
0.8	1.19	39.390		1.8	1.55	24.618
0.9	1.15	35.462		1.9	1.50	23.275
1.0	1.22	32.185		2.0	1.56	25.442
1.1	1.28	32.682				

Tabela 8 vemos que mesmo para baixas potências os tempos de difusão diferem entre si. Em princípio, o tempo de difusão correto é obtido na ausência de blinking, ou seja, para potências de excitação nulas. Nesse caso precisamos de fazer uma extrapolação para potência zero. A estratégia adotada foi, para cada tamanho de pinhole, medir o tempo de difusão variando a potência do laser. A partir desses dados traçar uma curva e do ajuste da mesma extrair o tempo de difusão para a potência tendendo a zero. Foram feitas 15 medidas para cada potência e o tempo de difusão utilizado é a média desses 15 pontos. Da Tabela 9 até a Tabela 18 são mostrados os dados medidos para os tamanhos de pinhole de 20 μ m a 40 μ m e da Figura 107 à Figura 116 são mostradas as curvas traçadas e os ajustes, todos eles com R^2 acima de 0.9.

Pot (%)	$\tau_D(\mu s)$	Pot (%)	$\tau_D(\mu s)$
0.4	59.184	1.3	43.839
0.5	57.35	1.4	37.872
0.6	51.459	1.5	36.875
0.7	50.827	1.6	36.299
0.8	48.805	1.7	34.525
0.9	48.114	1.8	37.12
1.0	47.962	1.9	32.869
1.1	45.696	2.0	32.004
1.2	46.239	2.1	31.254

Tabela 9 Tempo de difusão do QD em função da potência do laser para pinhole de 20 μm

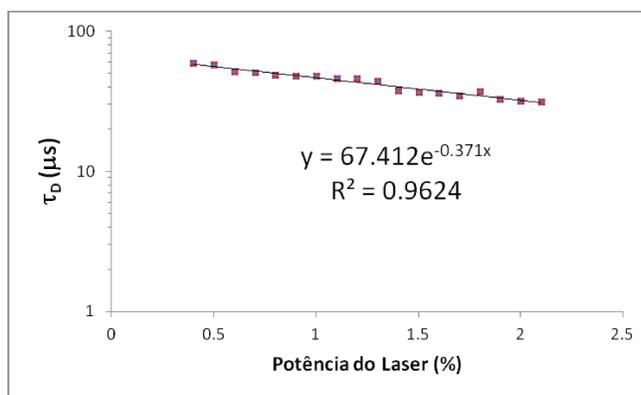


Figura 107 Gráfico do tempo de difusão em função da potência do laser para pinhole de 20 μm

Pot (%)	$\tau_D(\mu s)$	Pot (%)	$\tau_D(\mu s)$
0.4	68.193	1.3	42.012
0.5	60.667	1.4	40.783
0.6	57.279	1.5	40.979
0.7	56.532	1.6	42.541
0.8	52.729	1.7	37.890
0.9	51.221	1.8	38.398
1.0	50.813	1.9	36.289
1.1	46.493	2.0	35.264
1.2	46.828	2.1	34.760

Tabela 10 Tempo de difusão do QD em função da potência do laser para pinhole de 25 μm

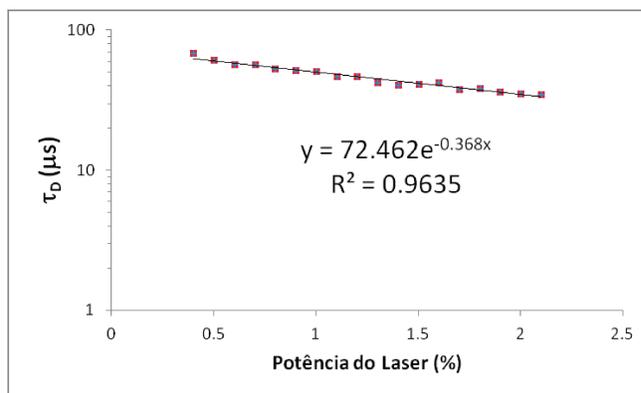


Figura 108 Gráfico do tempo de difusão em função da potência do laser para pinhole de 25 μm

Pot (%)	$\tau_D(\mu s)$	Pot (%)	$\tau_D(\mu s)$
0.4	76.186	1.3	48.915
0.5	71.69433	1.4	48.965
0.6	68.828	1.5	45.184
0.7	61.470	1.6	44.390
0.8	60.555	1.7	42.913
0.9	55.387	1.8	41.748
1.0	52.419	1.9	42.187
1.1	51.186	2.0	42.846
1.2	48.715	2.1	40.740

Tabela 11 Tempo de difusão do QD em função da potência do laser para pinhole de 30 μm

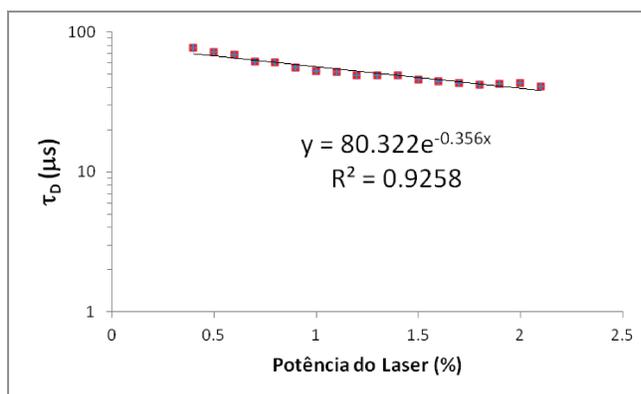


Figura 109 Gráfico do tempo de difusão em função da potência do laser para pinhole de 30 μm

Pot (%)	$\tau_D(\mu s)$	Pot (%)	$\tau_D(\mu s)$
0.4	76.895	1.3	50.767
0.5	73.049	1.4	49.688
0.6	69.580	1.5	48.788
0.7	63.343	1.6	47.786
0.8	62.495	1.7	45.385
0.9	61.225	1.8	45.697
1.0	58.714	1.9	44.034
1.1	55.904	2.0	44.824
1.2	53.832	2.1	42.796

Tabela 12 Tempo de difusão do QD em função da potência do laser para pinhole de 35 μm

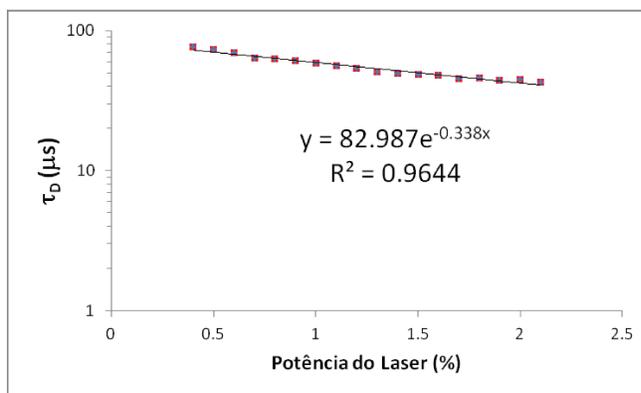


Figura 110 Gráfico do tempo de difusão em função da potência do laser para pinhole de 35 μm

Pot (%)	$\tau_D(\mu s)$	Pot (%)	$\tau_D(\mu s)$
0.4	76.087	1.3	57.454
0.5	74.450	1.4	54.304
0.6	67.967	1.5	54.464
0.7	70.931	1.6	53.140
0.8	71.796	1.7	51.992
0.9	62.456	1.8	51.657
1.0	65.022	1.9	53.122
1.1	60.619	2.0	49.297
1.2	57.601	2.1	47.771

Tabela 13 Tempo de difusão do QD em função da potência do laser para pinhole de 40 μm

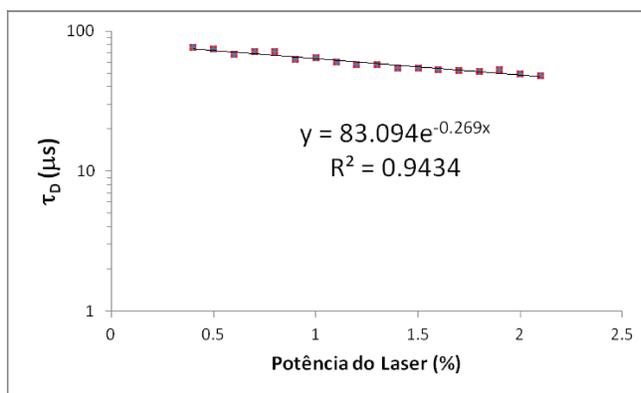


Figura 111 Gráfico do tempo de difusão em função da potência do laser para pinhole de 40 μm

Pot (%)	$\tau_D(\mu s)$	Pot (%)	$\tau_D(\mu s)$
0.4	81.123	1.3	68.049
0.5	79.741	1.4	70.089
0.6	80.663	1.5	54.874
0.7	77.946	1.6	52.403
0.8	73.707	1.7	51.103
0.9	69.906	1.8	49.993
1.0	72.950	1.9	48.934
1.1	74.051	2.0	48.475
1.2	67.357	2.1	47.600

Tabela 14 Tempo de difusão do QD em função da potência do laser para pinhole de 45 μm

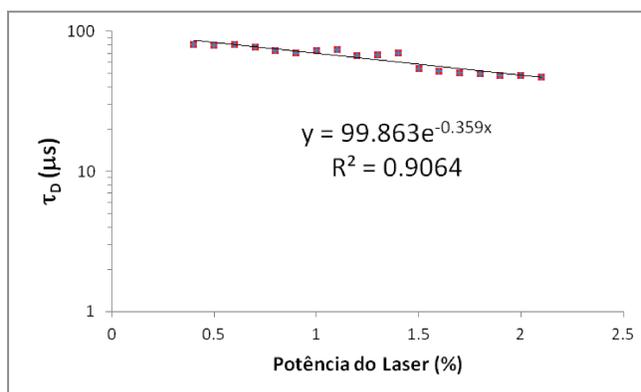


Figura 112 Gráfico do tempo de difusão em função da potência do laser para pinhole de 45 μm

Pot (%)	$\tau_D(\mu s)$	Pot (%)	$\tau_D(\mu s)$
0.4	83.107	1.3	65.761
0.5	81.555	1.4	59.642
0.6	79.599	1.5	54.892
0.7	73.740	1.6	56.049
0.8	70.958	1.7	53.914
0.9	71.923	1.8	52.917
1.0	72.569	1.9	51.197
1.1	66.873	2.0	50.521
1.2	64.420	2.1	51.326

Tabela 15 Tempo de difusão do QD em função da potência do laser para pinhole de 50 μm

Pot (%)	$\tau_D(\mu s)$	Pot (%)	$\tau_D(\mu s)$
0.4	87.571	1.3	63.063
0.5	85.646	1.4	61.521
0.6	79.045	1.5	57.347
0.7	78.686	1.6	57.030
0.8	75.151	1.7	55.541
0.9	71.218	1.8	53.544
1.0	70.135	1.9	52.911
1.1	63.488	2.0	50.030
1.2	64.363	2.1	48.941

Tabela 16 Tempo de difusão do QD em função da potência do laser para pinhole de 55 μm

Pot (%)	$\tau_D(\mu s)$	Pot (%)	$\tau_D(\mu s)$
0.4	88.300	1.3	66.747
0.5	85.443	1.4	57.525
0.6	82.257	1.5	56.509
0.7	76.458	1.6	53.702
0.8	75.755	1.7	55.950
0.9	70.844	1.8	53.077
1.0	67.650	1.9	52.934
1.1	65.808	2.0	52.035
1.2	64.004	2.1	55.511

Tabela 17 Tempo de difusão do QD em função da potência do laser para pinhole de 60 μm

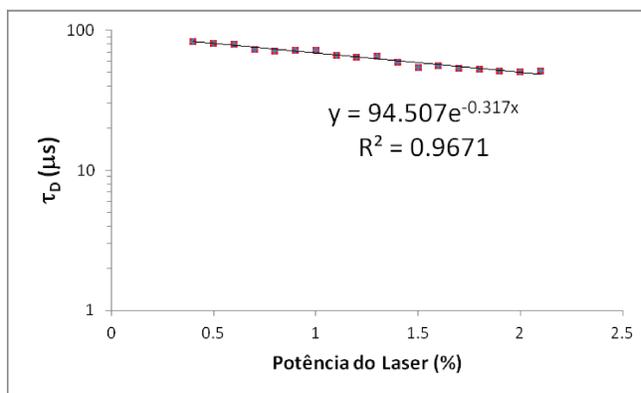


Figura 113 Gráfico do tempo de difusão em função da potência do laser para pinhole de 50 μm

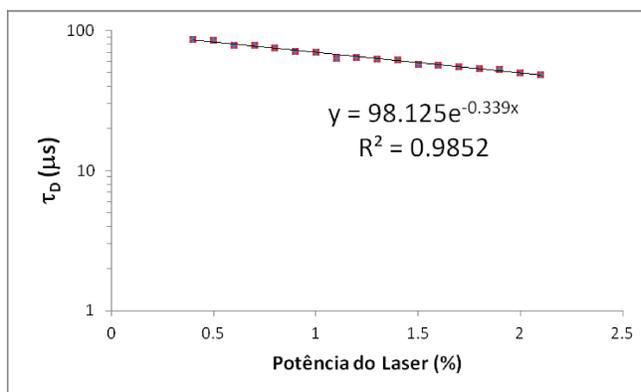


Figura 114 Gráfico do tempo de difusão em função da potência do laser para pinhole de 55 μm

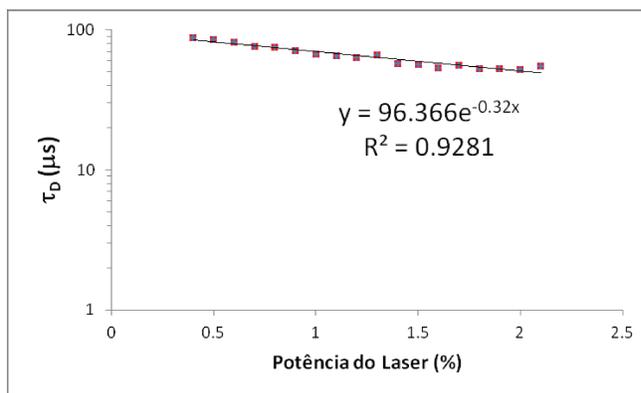


Figura 115 Gráfico do tempo de difusão em função da potência do laser para pinhole de 60 μm

Pot (%)	$\tau_D(\mu s)$	Pot (%)	$\tau_D(\mu s)$
0.4	93.546	1.3	66.439
0.5	87.461	1.4	64.427
0.6	84.000	1.5	64.595
0.7	83.261	1.6	63.054
0.8	79.986	1.7	53.957
0.9	80.497	1.8	50.859
1.0	71.998	1.9	49.790
1.1	66.966	2.0	48.144
1.2	66.965	2.1	46.175

Tabela 18 Tempo de difusão do QD em função da potência do laser para pinhole de 65 μm

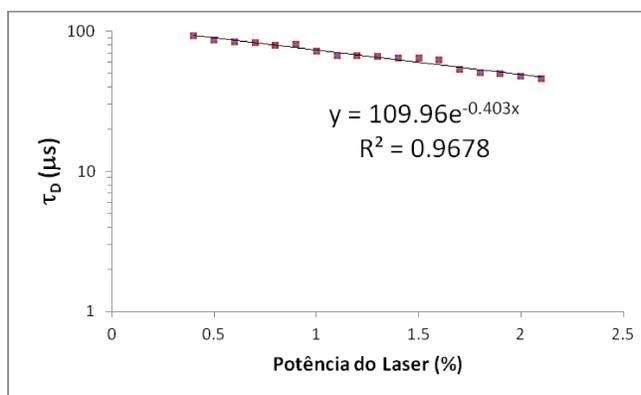


Figura 116 Gráfico do tempo de difusão em função da potência do laser para pinhole de 65 μm

Fazendo o valor de x tendendo a zero nas equações dos ajustes e utilizando a equação (6.81) podemos calcular o raio hidrodinâmico do QD. A Tabela 19 a seguir mostra o tamanho do QD calculado para cada tamanho de pinhole

Pinhole(μs)	Raio (nm)		Pinhole(μs)	Raio (nm)
20	1.92		50	1.88
25	1.86		55	1.94
30	1.96		60	1.82
35	1.99		65	2.02
40	1.85		Média	1.94
45	2.13		Desv. Pad.	0.09

Tabela 19 Raio hidrodinâmico do QD em função do tamanho do pinhole

O resultado dessas medidas mostra, então, um quantum dot com raio médio de 1.94 nm e dispersão das medidas em torno de 5%.

6.7 Comparação das medidas dos raios dos QDS

Nós comparamos o raio dos QDs medido pelo FCS com outra técnica muito utilizada, a estimativa através do pico de absorção. Na realidade, essa estimativa do tamanho do QD é no fundo uma medida de microscopia eletrônica. Isso porque o método utilizado foi uma calibração feita para uma mesma amostra entre as medidas do pico de absorção e do raio médio obtido pela microscopia eletrônica.

Com essa calibração obtem-se o que é conhecido como “sizing curve” do QD, ou curva de tamanho. Essa calibração tem que ser feita para cada tipo de QD. Não podemos utilizar uma curva de tamanho de um QD de CdTe para um QD de CdSe, ou de um QD de CdTe com encapsamento de AMA com um CdTe encapsado com TOPO (trioctilfosfina). Além do mais a medida do pico de absorção vai ser uma média sobre todos os QDs dentro do feixe de absorção enquanto na medida de microscopia eletrônica é feita sobre o número de partículas que foi possível identificar na micrografia. O primeiro fator torna a técnica pouco maleável e o segundo fator torna a estatística pobre. Como foi visto, o FCS consegue cobrir essas duas necessidades. O FCS consegue fazer uma média sobre um grande número de partículas (característica da absorção) e consegue também ser sensível a partículas únicas (característica da microscopia eletrônica).

A curva de tamanho que utilizamos para comparar com nossos resultados foi obtida por Yu[111]. Sua expressão é

$$D(nm) = (9.8127 \times 10^{-7})\lambda^3 - (1.7147 \times 10^{-3})\lambda^2 + 1.0064\lambda - 194.84 \quad (6.87)$$

Onde D é o diâmetro do QD e λ o comprimento de onda do pico de absorção. Como visto na seção da descrição da amostras o pico de absorção da amostra Col2909 foi em 501 nm. Utilizando esse valor na curva de tamanho o raio desse QD é de 1.70 nm.

Podemos estimar o raio do QD pela energia da primeira transição calculada nos modelos teóricos apresentados na tese. O comprimento de onda de 501 nm equivale a uma energia de 2.47 eV (lembrando que $E(eV) = 1240/E(nm)$). Voltando aos gráficos da energia em função do raio do QD podemos calcular a energia da transição como a diferença entre o nível do elétron e do heavy-hole ímpar. A energia de 2.47 eV corresponde a um raio entre 1.8 e 1.9 nm no nosso método heurístico e um raio entre 2.2 e 2.3 nm para o método $\vec{k} \cdot \vec{p}$. Os valores calculados para o raio nos diferentes métodos estão apresentados na Tabela 20

Método	Raio (nm)
Absorção	1.70
$\vec{k} \cdot \vec{p}$	2.25
Método heurístico	1.85
FCS	1.94

Tabela 20 Raio da amostra Col2909 calculada pelos diferentes métodos

Os dados mostram que o valor medido pelo FCS se aproxima do valor previsto pelo método heurístico, enquanto os valores do método $\vec{k} \cdot \vec{p}$ e da absorção estão distantes entre si e também distantes dos nossos resultados. Um dos motivos para a absorção estimar o valor do raio tão baixo vem da característica da medida da microscopia eletrônica. Na microscopia eletrônica o feixe de elétrons é sensível apenas aos núcleos dos átomos. Porém os elétrons não estão presos nessas posições. A nuvem eletrônica se estende um pouco mais do que as posições dos núcleos. As nossas imagens não permitiram a visualização da cap layer, que exigiria uma microscopia eletrônica muito mais sofisticada. Além do mais as amostras estão secas portanto pode ter havido alguma alteração de tamanho durante o processo de secagem. Como concluímos no Capítulo 5 o método $\vec{k} \cdot \vec{p}$ superestima os níveis eletrônicos resultando em raios maiores do que o real. O FCS mede o raio hidrodinâmico da partícula. O raio hidrodinâmico vai incluir a nuvem eletrônica acrescida da cap layer da partícula. Portanto é esperado que o raio medido pelo FCS seja ligeiramente maior do que o raio calculado pela teoria.

Em conclusão, nesse capítulo, mostramos que a técnica de FCS pode ser usada para estimar os tamanhos dos quantum dots mesmo na presença de blinking. Os valores obtidos são compatíveis com os valores calculados pelo método heurístico do confinamento quântico, acrescido de uma cap layer. Os resultados do método $\vec{k} \cdot \vec{p}$ é incompatível com nossos resultados de FCS pois quantum dot com cap layer não pode ser menor do que a região de confinamento quântico. Por outro lado medidas baseadas em microscopia eletrônica de transmissão tendem a apresentar um raio muito pequeno. Como o FCS é sensível ao raio hidrodinâmico trata-se de uma das melhores técnicas para caracterização

das cap layers dos quantum dots. Finalmente, o FCS está se mostrando uma técnica apropriada para o estudo de blinking dos quantum dots. Blinking foi considerado uma característica indesejável dos quantum dots até o aparecimento das técnicas de super resolução onde acender e apagar permite a localização de um quantum dot único. Isso significa que o entendimento dos processos de blinking se tornou mais importante.

Capítulo 7

Aplicações das Plataformas Integradas

7.1 Introdução

Neste capítulo apresentaremos os resultados das aplicações das plataformas integradas. Focaremos a descrição no diferencial que as técnicas integradas trouxeram aos trabalhos, que é o principal objetivo dessa tese. O tratamento teórico das técnicas apresentadas neste capítulo foram feitas em outras teses do grupo ou nos capítulos anteriores dessa tese. Uma lista das teses sobre o tema pinça óptica está na introdução do Capítulo 3. A descrição teórica da fluorescência excitada por um ou dois fótons pode ser encontrada na minha tese de mestrado[112]. Na tese de mestrado de Vitor Pelegati a teoria de geração de terceiro harmônico foi abordada. Finalmente, no Capítulo 4 podemos encontrar a teoria referente ao FLIM. A integração dessas técnicas foi descrita no Capítulo 2.

Começaremos apresentando um trabalho onde a integração pinças ópticas com microscopia confocal possibilitou o estudo da interação parasita-vetor. Em seguida descreveremos os resultados da integração fluorescência e segundo harmônico para o estudo de desenvolvimento de próstata e câncer de ovário. Por

último os resultados da integração de fluorescência, segundo/terceiro harmônico e FLIM para o estudo de osteogênese imperfeita, câncer epitelial e câncer de ovário.

7.2 Aplicação de Pinças Ópticas e Microscopia Confocal

No Capítulo 3 vimos o grande interesse da Biologia em estudar a interação parasita-vetor. Nestes trabalhos desenvolvemos uma plataforma para tornar esse estudo mais eficiente. A microscopia confocal permite a aquisição de imagens apenas das regiões de interesse das células ou tecidos, sem ou com especificidade química obtida com a escolha de pares corantes/anticorpos. Desse modo a visualização dos processos na interação parasita-vetor com a microscopia confocal fornece informações que não podiam ser obtidas antes. Entretanto, esperar que o parasita se ligue ao intestino (*T. cruzi*) ou a glândula salivar (*T. rangeli*) do inseto hospedeiro é um processo lento e com pouca eficiência. Nesse ponto a pinça óptica integrada a microscopia confocal foi crucial para maximizar a chance de interação. Nós utilizamos quantum dots de CdSe para marcar os parasitas e as células do inseto. A Figura 117 mostra a imagem de fluorescência dos QDs do *T. cruzi* ligado ao intestino do barbeiro.

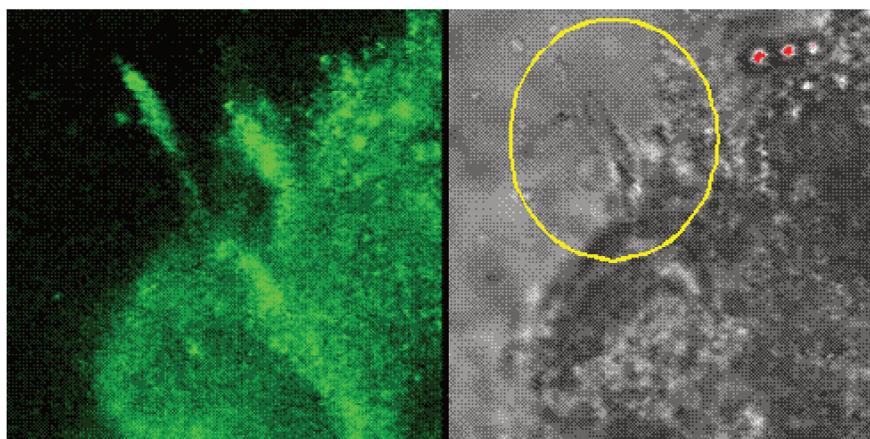


Figura 117 Imagem do *T. cruzi* ligado ao intestino do barbeiro, verde: fluorescência, cinza: transmissão do laser

O parasita era capturado pela pinça óptica e trazido para perto do intestino do inseto para disparar o processo de interação. Sem a utilização da pinça óptica teríamos que esperar o tempo necessário para que o parasita encontrasse as células do intestino e se ligasse a elas. Além do mais, sem a utilização da pinça, tínhamos que procurar por todo o intestino do barbeiro até encontrar algum parasita ligado. Dessa forma a pinça eliminou as duas características que tornavam o estudo dessa interação ineficiente. Com o controle do gatilho em nossas mãos podíamos estudar quantos parasitas fossem necessário e em várias situações diferentes.

Realizamos o estudo da interação do *T. rangeli* com a glândula salivar do barbeiro. O procedimento foi o mesmo do *T. cruzi*, capturávamos o *T. rangeli*, e trazíamos para perto da glândula para disparar a interação. Após estar ligado, fazíamos imagens de fluorescência do processo. A Figura 118 mostra a imagem obtida. O trabalho completo pode ser encontrado em

A. A. de Thomaz; D. B. Almeida; W. M. Faustino; G. J. Jacob; A. Fontes; L. C. Barbosa; C. L. Cesar; C. V. Stahl; J. R. Santos-Mallet; S. A. O. Gomes; D. Feder; “*Study of optically trapped living Trypanosoma cruzi/Trypanosoma rangeli-Rhodnius prolixus interactions by real time confocal images using CdSe quantum dots*”. Proc. SPIE 7038, Optical Trapping and Optical Micromanipulation V, 703810 (August 29, 2008); doi:10.1117/12.795370

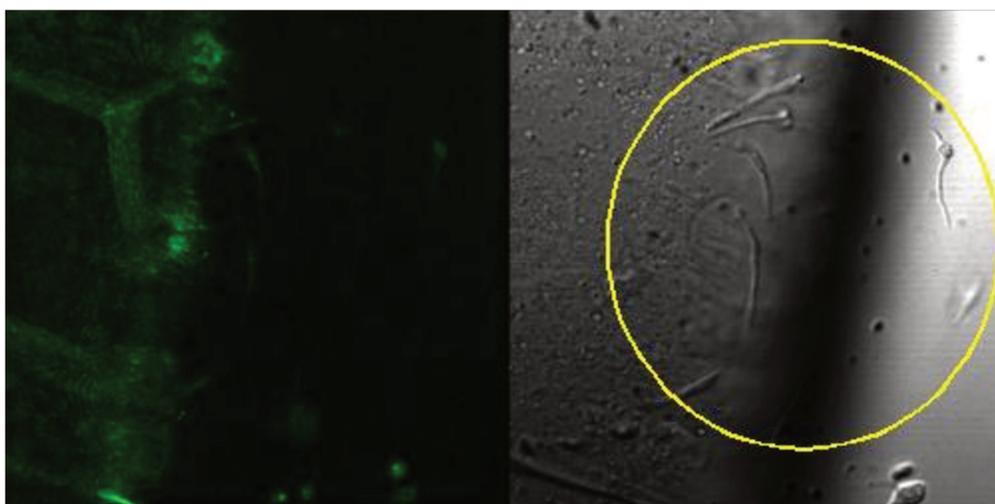


Figura 118 *T. rangeli* ligado a glândula salivar (dentro do círculo amarelo). Verde: fluorescência. Cinza: transmissão do laser

7.3 Aplicações de Fluorescência e SHG/THG

SHG e TPEF na remodelação de tecidos:

A remodelação da matriz extracelular é um fator importante para o desenvolvimento de órgãos. No caso da próstata de ratos, o órgão apresenta crescimento e mudanças morfológicas logo após o nascimento. Esses processos envolvem crescimento de estruturas epiteliais, diferenciação, “branching” e canalização. Esse desenvolvimento pós natal coincide com uma importante janela fisiológica que irá influenciar a futura fisiologia da próstata e sua susceptibilidade a doenças. As MMPs (matrix metalloproteinase) constituem uma família de endopeptídeos dependentes de zinco que preferencialmente clivam as proteínas da matriz extracelular. Sem essa quebra das fibras de colágeno da matriz extracelular um órgão não pode crescer, o que é indesejável no processo de desenvolvimento. Por outro, para um tumor de câncer crescer, também é necessário a quebra dessas estruturas. Percebe-se, portanto, que essas enzimas desempenham um papel chave no desenvolvimento normal e fisiologia bem como no processo inicial do câncer e sua progressão. Por outro lado é possível manipular a ação das MMP's utilizando small interfering RNA (siRNA) específicos para cada MMP e com isso observar o papel dessas enzimas no crescimento de órgãos.

O objetivo do trabalho foi avaliar aspectos da função da MMP-2 no desenvolvimento da próstata de rato sobre a ação de siRNA para MMP-2, uma das MMP's. Os órgãos foram crescidos fora do corpo do animal numa câmara especial para avaliação do tamanho e forma. A Figura 119 mostra a diferença no tamanho do órgão controle e do órgão com a expressão da MMP-2 bloqueada.

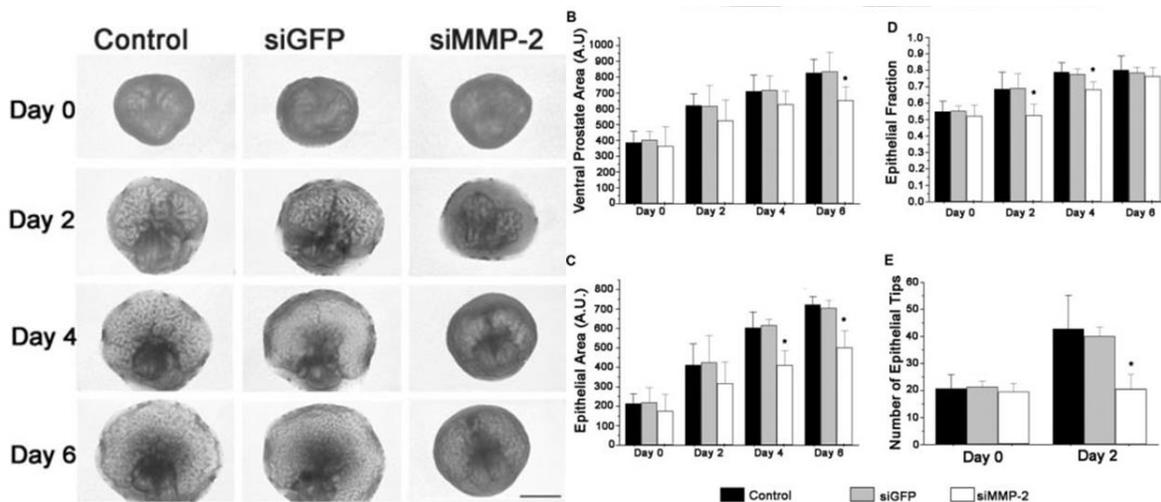


Figura 119 Diferenças das características do órgão controle, com expressão de GFP e com a MMP-2 silenciada.

Podemos ver claramente pela Figura 119 que o tamanho, área, fração epitelial, área epitelial e o número de tips epiteliais é diferente no órgão controle e no órgão com a MMP-2 silenciada. Cortes histológicos foram feitos para avaliar o desenvolvimento celular. Um dos desafios desse trabalho era visualizar a matriz extracelular separada das células epiteliais. Como a matriz extracelular possui uma grande quantidade de colágeno o segundo harmônico é uma técnica ótima para visualizar essa matriz, sem a necessidade de qualquer outro tipo de processamento na amostra. A Figura 120 mostra a imagem de fluorescência da eosina-hematoxilina das células epiteliais e das fibras de colágeno pelo segundo harmônico.

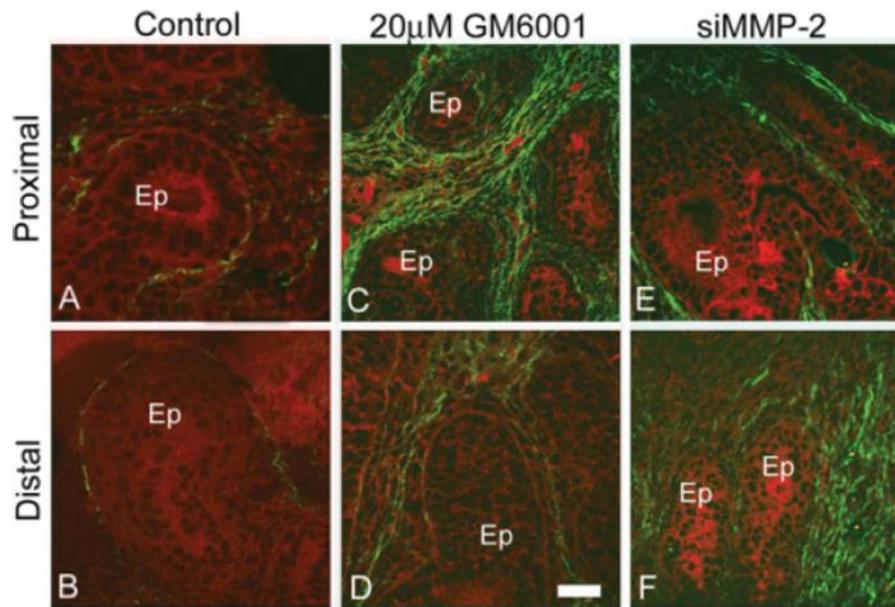


Figura 120 Imagens de fluorescência (vermelho) das células epiteliais e SHG das fibras de colágeno (verde) da próstata com diferentes tratamentos

Podemos ver nas imagens da Figura 120 a alta presença das fibras de colágeno no órgão tratado com GM6001, um inibidor de amplo espectro das MMPs, e no órgão com a expressão de MMP-2 silenciada. O SHG foi capaz de coletar sinal apenas da fibra de colágeno enquanto a fluorescência gerou sinal das células epiteliais. A alta presença de colágeno significa que as células epiteliais não tiveram espaço suficiente para se desenvolver e fazer o órgão crescer. As imagens de SHG mostram bem como as fibras de colágeno envolvem as células não deixando nenhum espaço para crescimento.

A utilização do segundo harmônico, neste trabalho, possibilitou o entendimento no nível celular do que estava acontecendo com o desenvolvimento do órgão. Apenas com a fluorescência não era possível perceber a alta presença da matriz de colágeno nos órgãos com a produção de MMP-2 inibidas. Métodos de análise bioquímica confirmaram a quantidade de colágeno em cada caso da Figura 120. Entretanto esses métodos não revelam a composição estrutural que as imagens de fluorescência/SHG revelam. Isso quer dizer que essas técnicas utilizadas em conjunto fornecem todas as informações necessárias para a análise do desenvolvimento da próstata em oposição a utilização das técnicas separadas

que forneceriam fragmentos das informações. Esses resultados foram publicados no trabalho:

A. Bruni-Cardoso, V. Pascoal, **A. A. de Thomaz**, C. L. Cesar and H. F. Carvalho. “*MMP-2 Silencing by siRNA Inhibits Morphogenesis of the Rat Ventral Prostate in Vitro*”, *Developmental Dynamics* 239 (3), 737-746 (2010)

Aplicações de SHG e TPEF na anatomia patológica:

Com o desenvolvimento dos microscópios ópticos no século XIX a anatomia patológica evoluiu da inspeção a olho nú para observação microscópica dos tecidos. Rudolf Virchow é considerado o pai da anatomia patológica moderna com seus trabalhos da década de 1850, que incluíram não apenas a descrição dos tecidos mas protocolos de marcação e métodos de coloração para tornar as estruturas visíveis nos microscópios de transiluminação da época. Desde o século XX o currículo de medicina inclui disciplinas de anatomia patológica e embriologia nas quais os estudantes são treinados para reconhecer estruturas normais e patológicas de amostras produzidas com protocolo altamente padronizado.

É fácil reconhecer a importância dessa área na medicina atual ao se perceber que, mesmo com todo o desenvolvimento na área de imagens como ressonância magnética, tomografias computadorizadas e ultrassom, a última palavra no diagnóstico de um câncer e outras doenças é dada pelo patologista que analisa as biopsias. Cirurgiões, às vezes, permanecem horas parados com o paciente aberto esperando laudo de um patologista para decidir o curso a seguir na cirurgia. Trata-se, enfim, do padrão-ouro da anatomia patológica e do diagnóstico.

Entretanto a tecnologia mudou e as possibilidades de visualização com os novos microscópios ópticos aumentaram muito. Isso significa que os patologistas agora possuem acesso a instrumentos mais poderosos para identificar, medir, contar, discriminar desde organelas sub-celulares até células e tecidos. A anatomia patológica, entretanto, tem até a obrigação de ser conservadora, e não pode substituir uma metodologia com centenas de anos de comprovada utilidade

com a primeira novidade tecnológica que surge. Essa grande capacidade diagnóstica da anatomia patológica adveio de um processo sócio-coletivo que acumulou observações pertinentes de pesquisadores durante essa centena de anos, retro-alimentada com o fato de que os próprios estudantes são treinados a reconhecer padrões criados com determinada metodologia. Ou seja, uma mudança na metodologia pode destruir o reconhecimento de padrões dos estudantes. Dessa forma, novas metodologias devem percorrer uma trajetória de comparação com padrão ouro, mostrar capacidade de visualizações com maior poder de discriminação, e ser incorporada ao longo tempo no processo educativo dos residentes e estudantes de medicina.

Um aspecto muito importante na adoção de novas metodologias será sua compatibilidade com o padrão ouro atual, principalmente no processamento das amostras. A biopsia é uma técnica destrutiva e não pode ser desperdiçada sobre pena de tornar impossível o diagnóstico que pode salvar vidas. O ideal seria a incorporação de métodos que permitam uma reanálise posterior à análise padrão de um patologista pelo método convencional, o que só agregaria valor sem destruir a capacidade diagnóstica hoje existente. As novas microscopias confocais de óptica não linear (NLO) caem nessa categoria, pois permitem a análise de amostras fixadas padrões da anatomia patológica sem prejuízo para a metodologia padrão de diagnóstico.

Nesse aspecto vale um comentário importante. Desde o início se apontou que a grande diferencial das microscopias NLO era sua capacidade de visualização “label free” em células vivas que permitiria acompanhar a evolução de processos celulares em tempo real. Ou seja, se trataria de uma técnica com grande valor para estudos de células vivas mas de importância menor em materiais fixados com metodologia padrão. Nossa interação com patologistas, entretanto, está mostrando que as microscopias NLO podem agregar muito valor mesmo no caso de amostras fixadas e processadas com metodologia padrão. A primeira vantagem mais importante foi mencionada acima é a compatibilidade com a metodologia padrão que permite a aquisição de novas informações sem a destruição das antigas. A segunda vantagem é a de calibração das novas

técnicas. Precisamos comparar com a metodologia convencional, padrão-ouro, para aprender a reconhecer os padrões de tecidos e estruturas com a nova técnica, ou seja, a comparação com método bem conhecido serve como calibração do novo método. A terceira vantagem é que a microscopia NLO traz novas informações, permitindo discriminar estruturas que antes era impossível ou requeria processamento especial diferente do padrão-ouro, exigindo uma tomada de decisão do médico sobre qual dos dois utilizar.

Finalmente, existe uma imensa vantagem na utilização da microscopia NLO em amostras padrões da anatomia patológica, que é o acesso a uma biblioteca imensa de amostras já existente e acumuladas ao longo do tempo. O photobleaching da fluorescência usualmente torna inúteis amostras estocadas por tempos da ordem de dias, sem dúvida alguma, nada pode ser feito com amostras estocadas por meses ou anos. Mas as técnicas NLO label free como SHG e THG perduram por tanto tempo quanto a conservação de tecidos. Após processados os tecidos podem ser conservados por séculos e mesmo milênios, como se observou em múmias egípcias. Nossos próprios resultados mostraram que SHG e THG e mesmo fluorescência da eosina estão presentes em amostras com mais de 10 anos de estocagem. Esse fato claramente abre a possibilidade de reanalisar um banco de dados imenso de amostras com nova metodologia. Só na medicina da UNICAMP, por exemplo, temos acesso a uma biblioteca com mais de 20 anos de amostras. Esse fato também abre a possibilidade de realização de estudos retrospectivos. A evolução de muitas doenças pode levar décadas e um estudo com uma nova técnica que não pode ser usada com amostras estocadas só estaria completo nessa escala de tempo. Entretanto, se as amostras já existem esse estudo pode ser feito em tempo muito mais curto dependente apenas do grau de utilização dos equipamentos. Por essas razões consideramos valiosos estudos realizados com microscopia NLO em amostras padrão da anatomia patológica. Uma outra vantagem inesperada das microscopias NLO em amostras H&E foi a ressonância do THG com a hematoxilina, não fluorescente, que amplifica a intensidade das imagens dos núcleos. Nesse caso o SHG permite a

visualização das fibrilas de colágeno e o THG dos núcleos, enquanto o resto da TPEF visualiza estruturas marcadas com eosina.

A anatomia patológica usa como padrão para análises cortes histológicos fixados em paraformaldeído, emblocados em parafina e finalmente corados com eosina-hematoxilina (HE). Só em casos especiais as amostras são coradas com outros imuno-cromóforos ou imuno-fluoróforos. A hematoxilina cora os núcleos em um tom azulado e a eosina cora predominantemente o citoplasma, fibras de colágeno e outras estruturas composta de substâncias com caráter básico. Entre os profissionais dessa área o uso dessa técnica ficou conhecida como a era marrom, pois as imagens geralmente apresentam diferentes tons dessa cor. A Figura 121 mostra um exemplo de imagem com essa coloração

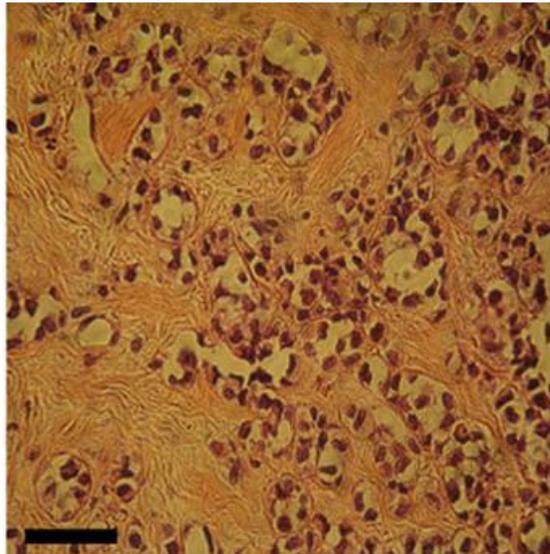
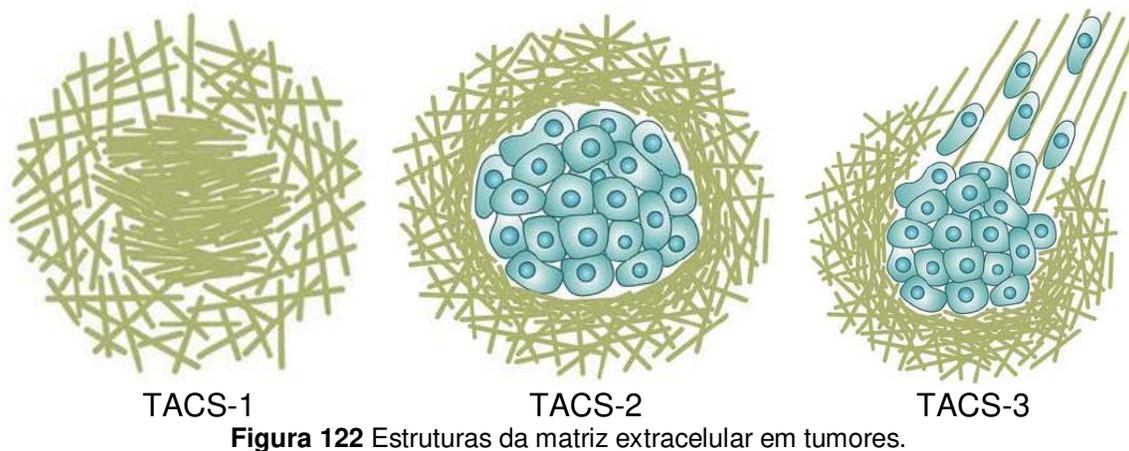


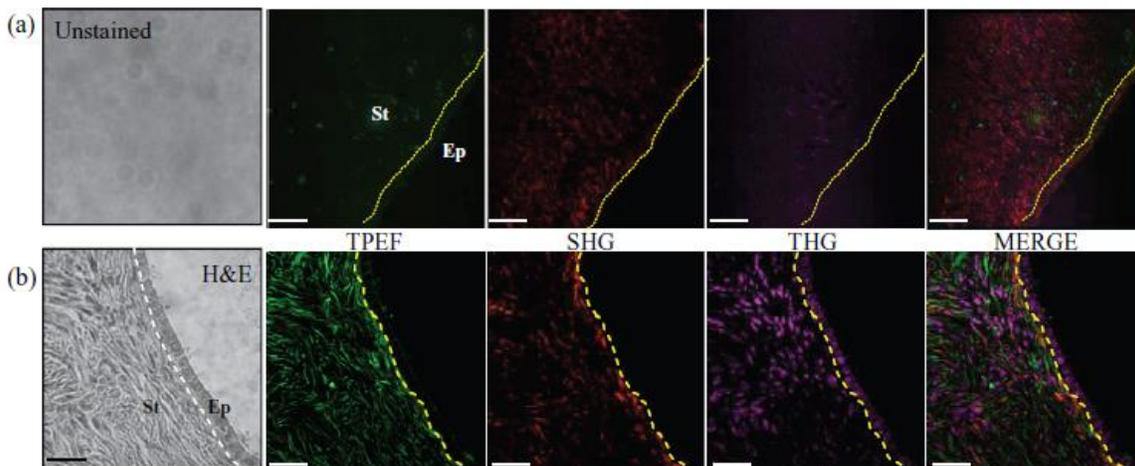
Figura 121 Exemplo de tecido corado por HE, tecido mamário diagnosticado como carcinoma invasivo lobular

Entre as técnicas de NLO o SHG merece um destaque especial pela sua capacidade de visualização da matriz extracelular formada por fibrilas de colágeno. Marcação específica de fibrilas de colágeno requerem o uso do fluoróforo picosirius que se liga na superfície externa das fibrilas. Sendo um método fluorescente não pode, obviamente, ser utilizado em amostras estocadas por longo tempo e não pode ser aplicado em amostras processadas desde o início com H&E. O SHG é capaz de visualizar as fibrilas com mais intensidade no seu

interior, bem melhor do que o picrosirius que delimita apenas as interfaces das mesmas, e pode ser utilizado em amostras estocadas por décadas e processadas com H&E, ou só com parafina. Logo após a utilização do SHG em sistemas de varredura laser pesquisadores perceberam a grande importância da mesma no estudo da microanatomia dos tumores de câncer. O grupo da Patricia J. Keely da University of Wisconsin-Madison foi pioneiro na classificação desses estudos. Da mesma forma como a matriz extracelular impede o crescimento de órgãos ele impede o extravasamento de células cancerosas de um tumor capazes de causar metástase. Para a migração celular uma sinalização bioquímica promove um reordenamento da matriz extracelular e uma reorganização das fibras de colágeno com respeito ao tumor. Baseados nas observações de SHG o grupo da Keely classificou as Tumor-associated collagen signatures (TACS) em TACS-1, TACS-2 e TACS-3, mostradas na Figura 122. No TACS-1 existe um adensamento local de colágeno não normal mas ainda não patológico. No TACS-2 o tumor está formado e as fibras de colágeno se organizam paralelamente à superfície do mesmo. Nesse caso as células cancerosas não conseguem migrar e ficam restritas à região tumoral. No TACS-3 as fibrilas de colágeno se tornam perpendiculares à superfície do tumor e são utilizadas pelas próprias células tumorais para migração. A presença de TACS-3, portanto, é um indicativo de metástase e de invasividade dos tumores. Transformadas de Fourier em 2D podem ser utilizadas para identificar a orientação das fibras pois os vetores transformados k de planos equidistantes no espaço real são perpendiculares aos planos. Em estruturas mais desorganizadas as transformadas de Fourier tendem a formar elipsóides com o semi-eixo maior perpendicular a uma direção média dos planos das fibras. Nesse ponto vale um comentário sobre outra vantagem da técnica de SHG, que é sua seletividade. Na imagem de SHG só as fibras de colágeno são visualizadas e a transformada de Fourier é feita apenas sobre essa estrutura. Em uma imagem de transiluminação usual muitas estruturas são visualizadas o que distorceria completamente a informação obtida com transformada de Fourier. A capacidade de visualizar seletivamente apenas determinadas estruturas, assim como de recombiná-las para visualização do conjunto, são super importantes na análise da morfologia das estruturas.



Com o propósito de comparação nós analisamos lâminas do laminário do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) da Unicamp. A lâminas documentam casos de vários tipos de câncer de ovário do período de 1994 a 2009. Cada lâmina corada com HE foi diagnosticada por um patologista certificado, baseado no critério estabelecido pelo World Health Organization. As técnicas fotônicas utilizadas foram a TPEF, SHG e THG. O sinal TPEF foi proveniente da coloração com HE, o sinal de SHG proveniente das fibras de colágeno e o sinal do THG dos núcleos. O contraste fornecido por essas técnicas é bem mais evidente do que o contraste fornecido apenas pelo HE. A Figura 123 mostra as imagens de TPEF/SHG/THG de uma amostra de ovário sem corar e outra corada com HE.



A partir da análise da matriz de colágeno foi possível identificar os diferentes tipos de tumores. A anisotropia das fibras e a assinatura de colágeno associada ao tumor (TACS) foram identificadas pela Transformada de Fourier Discreta 2D. A Figura 124 mostra uma análise feita num tecido normal e num diagnosticado com metástase

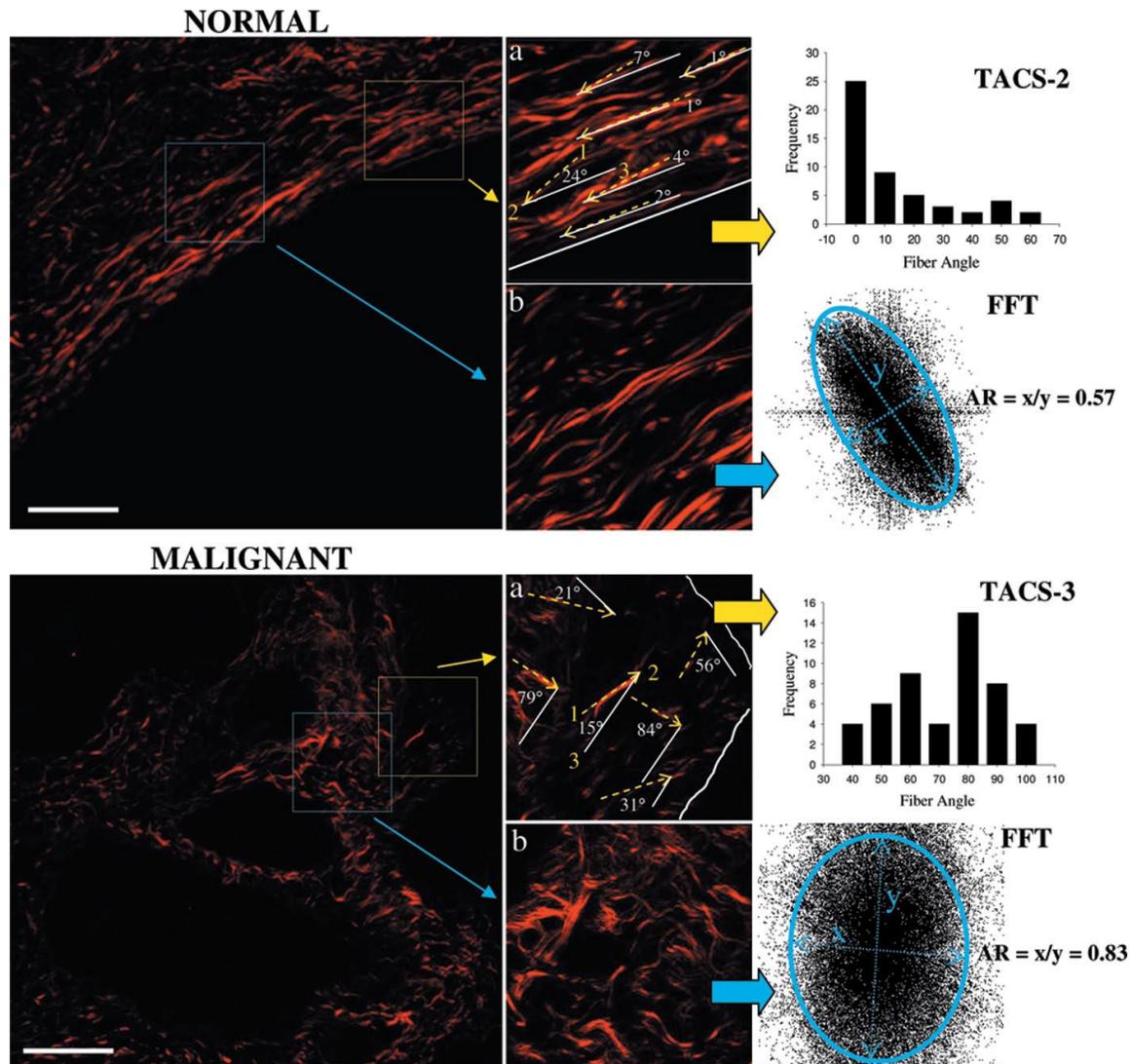


Figura 124 Análise da matriz de colágeno por FFT de um tecido normal e um tumor maligno

A razão de aspecto (aspect ratio), que é a razão entre o eixo menor e o eixo maior da elipse na FFT pode ser utilizado para identificar os diferentes tipos de tumores como mostra a Figura 125. Apesct ratio de 45° indica um tecido normal, aspect ratio de 3 adenoma seroso, aspect ratio de 2 borderline e um aspect ratio de 10 indica adenocarcinoma.

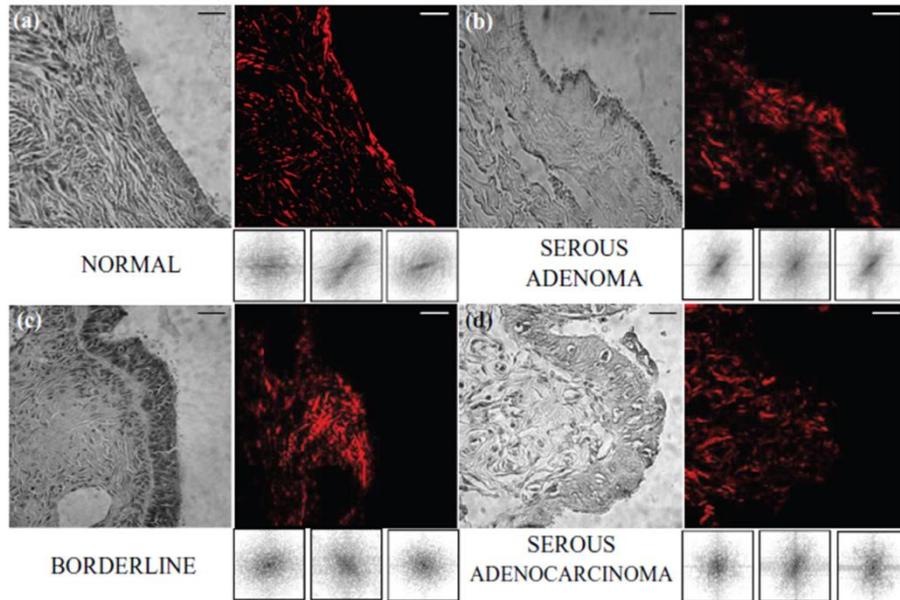


Figura 125 Análise do aspect ratio da FFT para identificação dos tipos de tumores

Mudanças no número e na forma dos núcleos também são fatores que fornecem informação sobre o tumor. O THG é ideal para essa análise. Juntamente com a análise da matriz de colágeno pelo SHG é possível identificar mudanças epiteliais, como mostra a Figura 126

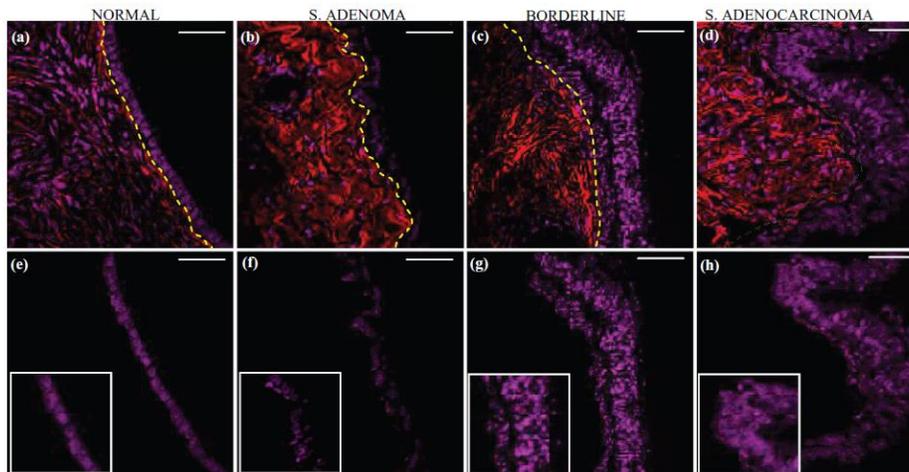


Figura 126 Imagens de SHG e THG para identificação dos diferentes tipos de tumores mucinosos

Os papers referentes a esses resultados são

J. Adur, V. B. Pelegati, **A. A. de Thomaz**, M. O. Baratti, L.A.L.A Andrade, F. Bottcher-Luiz, H. F. Carvalho and C. L. Cesar, “*Second harmonic generation microscopy as a powerful diagnostic imaging modality for human ovarian cancer*”, J. Biophotonics 1–13 (2012) / DOI 10.1002/jbio.201200108

J. Adur, V. B. Pelegati, L. F. L. Costa, L. Pietro, **A. A. de Thomaz**, D. B. Almeida, F. Bottcher-Luiz, L. A. L. A. Andrade and C. L. Cesar, "Recognition of serous ovarian tumors in human samples by multimodal nonlinear optical microscopy", J. Biomedical Opt. 16 (9), 096017 (2011)

Aplicações de SHG, THG, TPEF

Osteogenesis imperfecta: Osteogenesis imperfecta (OI), também conhecida como doença de Ekman-Lobstein, ou doença dos ossos de vidro, é uma doença de origem genética na qual o indivíduo nasce sem a capacidade de sintetizar colágeno. Sem a sustentação da matriz de colágeno os ossos se tornam muito frágeis, quebrando-se facilmente. OI é classificada em 4 tipos, I, II, III e IV baseados em achados clínicos e radiológicos, embora os tipos I e IV representem bem mais do que 50% dos casos e envolvam mutações nos genes conhecidos como COL1A1 ou COL1A2. O procedimento padrão para diagnosticar a doença envolve um exame clínico, radiológico e a confirmação diagnóstica é feita através de uma biopsia de ossos, altamente invasiva. Outros métodos moleculares mais modernos como análise de DNA, medidas bioquímicas do colágeno derivado de fibroblastos da derme são muito demorados e invasivos[113].

Embora a manifestação primária da OI seja na estrutura de colágenos defeituosa dos ossos, o fato é que todas as estruturas de colágeno do corpo são afetadas. Nesse aspecto a microscopia SHG se apresenta como uma ferramenta ideal para uma análise pouco invasiva e rápida da doença. Uma biopsia de pele, muito menos invasiva do que uma biopsia de osso, sem necessidade de maiores processamentos da amostra, pode levar a um diagnóstico, ou um pré-diagnóstico para uma triagem antes de levar a cabo exames mais demorados e invasivos, da doença. Nossos resultados iniciais, utilizando apenas SHG e TPEF, mostraram o grande potencial dessa técnica para o diagnóstico dessa doença, conseguindo não apenas discriminar tecido sadio de tecido doente como classificar o tipo de OI.

As imagens adquiridas de um tecido normal, com o tipo III de OI e tipo IV de OI são mostradas na Figura 127. Essas imagens mostram a diferença na matriz

de colágeno entre as diferentes amostras, tanto nas imagens adquiridas quanto na análise das mesmas. A anisotropia das fibras de colágeno (aspect ratio da FFT) é bem forte nas duas amostras que apresentam a OI. Sendo que os asteriscos indicam uma mudança significativa em relação ao valor do caso sadio. Entre as técnicas de análise de textura de imagens estão as técnicas baseadas na matriz de co-ocorrência em escala de cinza [114] das quais se podem extrair medidas como uniformidade, energia, entropia, energia etc. Em um esforço para incentivar o uso das técnicas de análise de imagens o National Institute of Health [NIH] dos EUA desenvolveu e liberou na internet, grátis, o software ImageJ que constrói a matriz de co-ocorrência e extrai dela os parâmetros desejados, assim como outras análises como transformada de Fourier, aspect ratio, contagem de estruturas etc. Nossas análises de imagem foram todas realizadas com o ImageJ. Da matriz de co-ocorrência de escala de cinza, calculamos a uniformidade, entropia e correlação com os vizinhos. Podemos observar que todos esse parâmetros são característicos para cada caso também.

Da nossa análise de textura extraímos 4 curvas de correlação, contraste, energia e homogeneidade. Percebemos que energia e contraste foram as mais sensíveis para discriminar pele normal de pele com OI. Além disso, dois métodos de pontuação [scoring methods], a densidade de colágeno e energia, foram capazes de discriminar casos de OI de acordo com suas severidades.

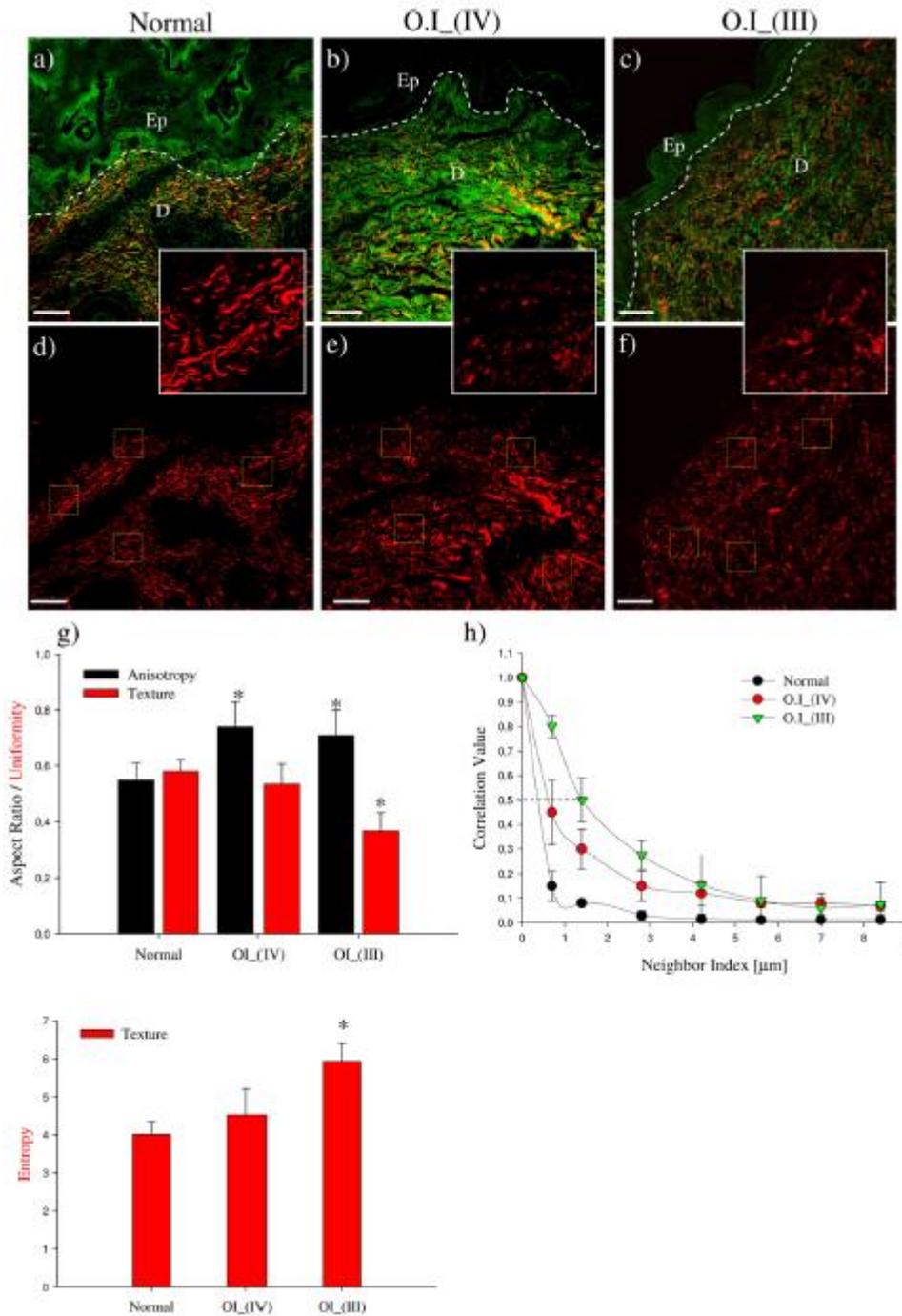


Figura 127 Imagens de TPEF (verde) e SHG (vermelho) de amostra normal, com OI III e OI IV

Câncer de mama: No caso de câncer de mama, a análise de imagens de SHG/THG também se mostrou capaz de diferenciar entre os diferentes tipos de tumor. A Figura 128 mostra as imagens e análises feitas, bem como a identificação de 4 tipos diferentes de câncer de mama.

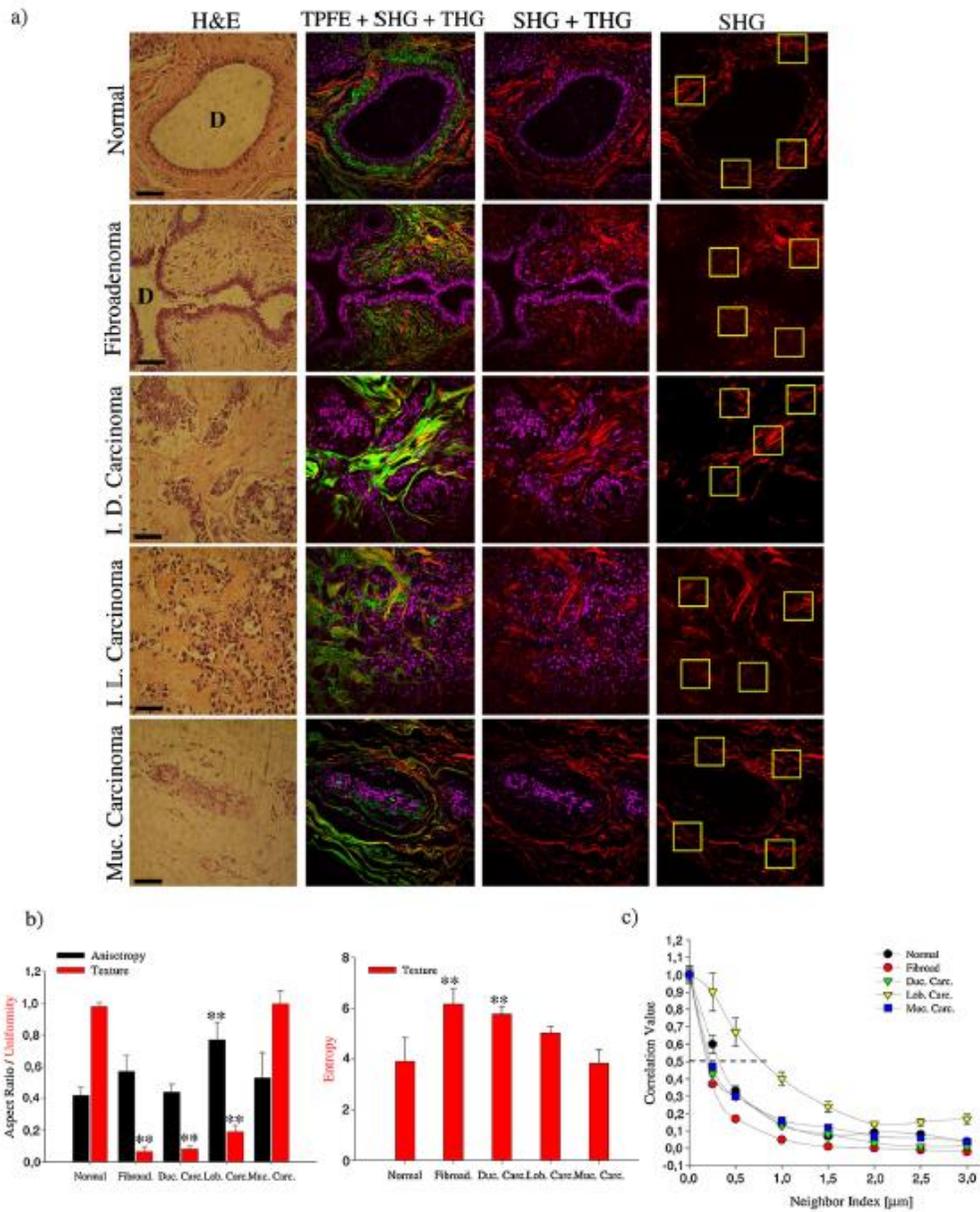


Figura 128 Imagens de TPEF (verde), SHG (vermelho) e THG (magenta) de diferentes amostras de mama, sadia e diagnosticadas com tumor

Esses resultados mostram que as técnicas fotônicas podem ser empregadas para fazer um estudo retrospectivo em laminários com lâminas estocadas por um longo período de tempo. Usando TPEF-SHG-THG nós obtivemos informações sobre a interface epitélio/estroma, como a transformação da superfície epitelial (THG) e a arquitetura das fibras de colágeno (SHG), para amostras de diferentes cânceres de mama e ovário e osteogenesis imperfecta. Além de diferenciar diferentes tipos de tumores e também identificar o estágio de TACS. Esses resultados podem ser encontrados em

J. Adur, V. B. Pelegati, **A. A. de Thomaz**, L. d'Souza-Li, M. C. Assunção, F. Bottcher-Luiz, L. A. L. A. Andrade and C. L. Cesar, "Quantitative changes in human epithelial cancers and osteogenesis imperfecta disease detected using nonlinear multicontrast microscopy", J. Biomedical Opt. 17(8), 081407 (2012)

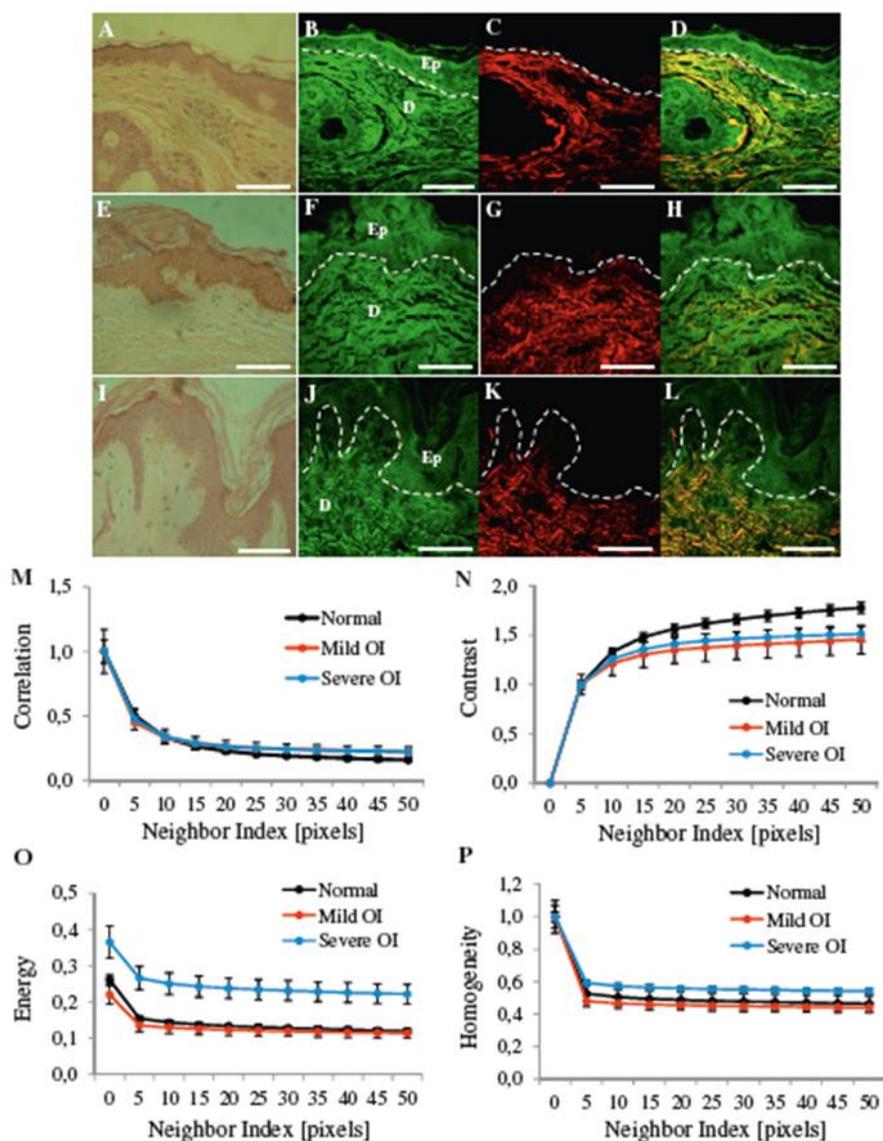


Figura 129 Doze imagens de (354.30 x 354.30 μm): pele normal (A, B, C, D), OI-Tipo I (E, F, G, H) e OI-Type III (I, J, K, L). Amostras H&E (A, E, I), imagens TPEF em verde (B, F, J), imagens SHG em vermelho (C, G, K) e imagens de superposição TPEF+SHG (D, H, L). Análise de Textura analysis (M, N, L, O) usando GLCM em uma amostragem com n=12 normais, n=3 OI leves e n=9 OI severas. Linha preta (normal), linha vermelha (OI leve), e linha azul (OI severa).

Dando continuidade ao trabalho com OI, em mais amostras incluindo seccionamento em 3D, utilizamos a análise de textura para extrair 4 curvas: correlação, contraste, energia e homogeneidade. Além disso foi possível calcular a

densidade de colágeno nas imagens em 3D. Percebemos que energia e contraste foram as mais sensíveis para discriminar pele normal de pele com OI. Além disso, dois métodos de pontuação [scoring methods], a densidade de colágeno e energia, foram capazes de discriminar casos de OI de acordo com suas severidades.

Esses resultados mostram então que a microscopia SHG e TPEF podem não apenas diagnosticar a presença da OI como também classificar a severidade da doença. Isso com um procedimento rápido e pouco invasivo. Esses resultados foram submetidos e estão em fase de revisão na revista Plos One:

J. Adur, L. D'Souza-Li, M. V. Pedroni, C. E. Steiner, V. B. Pelegati, **A. A. de Thomaz**, H. F. Carvalho and C. L. Cesar, "*The Severity of Osteogenesis Imperfecta and Type I Collagen Pattern as Determined by Nonlinear Microscopy: a Preliminary Study in Skin Human Samples*", accepted in Plos One.

7.4 Aplicações de FLIM, SHG e THG

As técnicas integradas de SHG e THG podem revelar informações estruturais sobre a matriz de colágeno, tecido epitelial e núcleos. Entretanto, nenhuma informação metabólica é obtida com essas técnicas. A informação metabólica pode ser acessada através das imagens de FLIM. Moléculas em diferentes ambientes químicos terão tempos de vida da fluorescência diferentes. Esse fato torna a integração do FLIM com SHG/THG para análise de tumores um passo praticamente natural. Dessa forma adquirimos imagens de SHG/THG/FLIM de câncer de ovário. Nesta parte nos concentraremos nos resultados de FLIM, pois os resultados de SHG/THG já foram discutidos.

Durante a avaliação desse trabalho para publicação, os revisores nos questionaram sobre a utilidade do FLIM em amostras fixadas. A questão sobre a relevância do FLIM para o estudo de amostras fixadas foi respondida por Conklin[115] do grupo da Patricia Keely. Trabalhando com modelos de

camundongo Conklin comparou amostras fixadas e não fixadas e chegou a conclusão que o processo de fixação deixava traços significativos das proteínas NADH e FAD capazes de fornecer informação sobre os processos metabólicos no momento da biopsia. Outros trabalhos mostraram que o ambiente químico em torno das moléculas é preservado após fixação[116]. Essa informação é perdida, entretanto, se a amostra for corada com H&E. Isso não chega a representar um problema porque o procedimento padrão da anatomia patológica é de fixar e emblocar em parafina as amostras antes de estocá-las no que chamam de blocário. O processo de corar com H&E pode ser realizado em qualquer momento, envolvendo apenas cortar um fatia com espessura de 5 μm e mergulhá-la em soluções padrões com um dos corantes, lavar e mergulhar no outro corante. Nosso processo de fixação é idêntico ao processo desses autores, portanto nós podemos comparar estados metabólicos em diferentes amostras mesmo após o processo de fixação.

A Figura 130 mostra as imagens de FLIM adquiridas para os vários tipos de câncer de ovário. O tempo de vida médio é mostrado na escala de cores. Podemos ver pela cor das amostras diagnosticadas com tumores que o tempo de vida médio da fluorescência é maior do que no tecido sadio. E mesmo entre os tipos de tumores é possível identificar diferenças no tempo de vida. Os metabolismos diferentes apresentam diferentes picos no tempo de vida. De maneira geral, o tempo de vida da fluorescência dos tumores mucinosos são mais altos do que os dos tumores serosos.

Os resultados dessas aplicações podem ser encontrados nos seguintes papers

J. Adur, V. B. Pelegati, **A. A. de Thomaz**, M. O. Barati, D. B. Almeida, L. A. L. A. Andrade, F. Bottcher-Luiz, H. F. Carvalho and C. L. Cesar, “*Optical Biomarkers of Serous and Mucinous Ovarian Tumor Assessed with Nonlinear Optics Microscopies*”, PLoS One, 7 (10) e47007 (2012)

J. Adur, V. B. Pelegati, **A. A. de Thomaz**, L. d’Souza-Li, M. C. Assunção, F. Bottcher-Luiz, L. A. L. A. Andrade and C. L. Cesar, “*Quantitative changes in human epithelial cancers and osteogenesis imperfecta disease detected using nonlinear multicontrast microscopy*”, J. Biomedical Opt. 17(8), 081407 (2012)

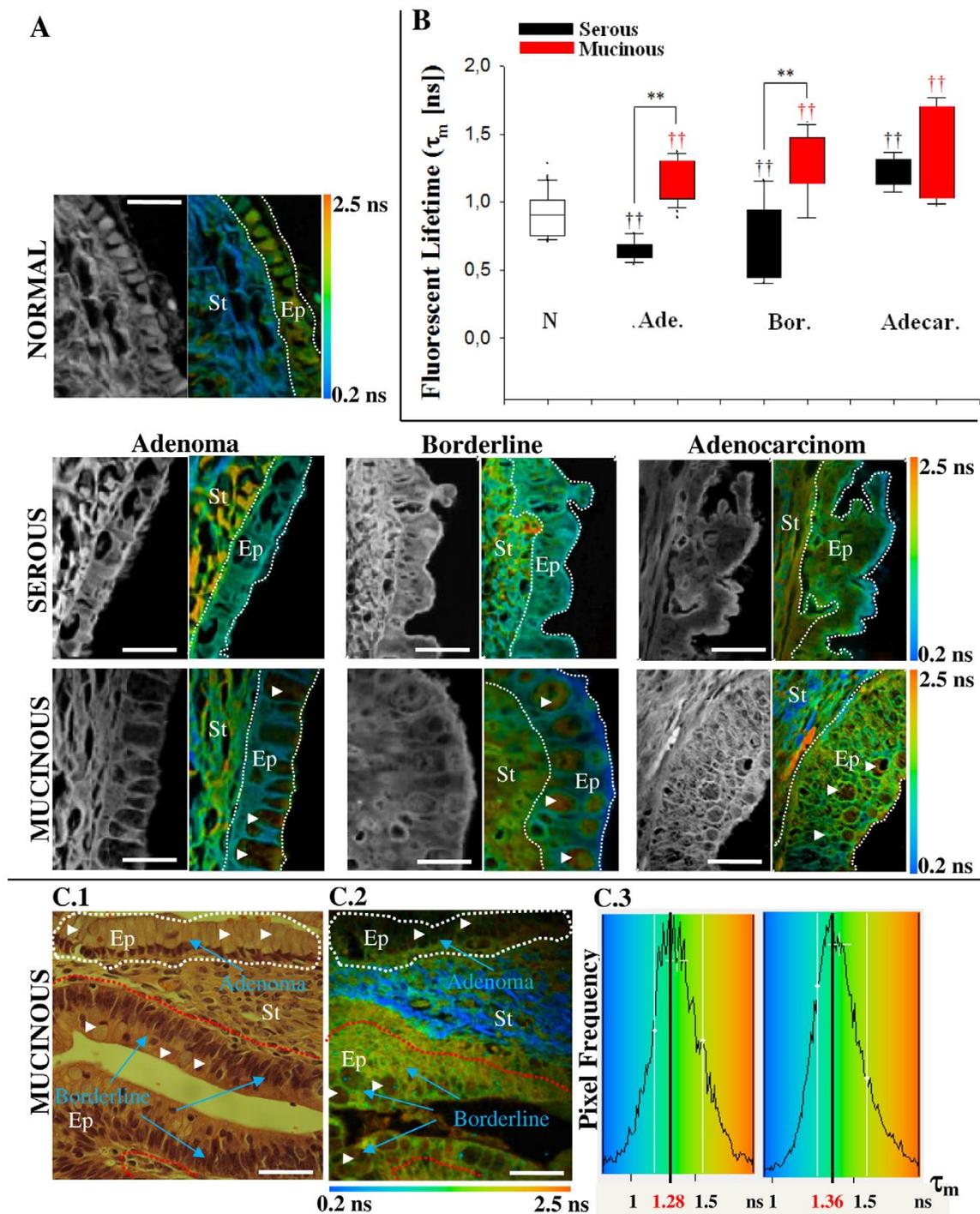


Figura 130 Imagens de FLIM para os diferentes tipos de câncer de ovário

Os resultados apresentados nesse capítulo mostram a importância que as novas metodologias vão alcançando na área médica. Como se tratam de técnicas internacionalmente muito modernas, as quais poucos médicos têm acesso, é preciso esperar a evolução temporal da curva de aprendizado para que seja possível extrair das mesmas toda a riqueza de informação nelas contidas. Em

termos de Brasil me sinto recompensado com esses resultados pelo trabalho de ter desenvolvido a instrumentação e as técnicas tendo obtido as primeiras imagens de SHG e de FLIM do país e ter participado ativamente na aquisição da primeira imagem de THG e CARS do Brasil.

Até onde sabemos apenas a Profa. Ana Maria de Paula da UFMG, ex pos doctor do grupo da UNICAMP, possui hoje instrumentação para aquisição de imagens de TPEF, SHG e FLIM no Brasil. Também nos sentimos recompensados pelo fato de que espalhamos, através de apresentações em congressos e publicação de capítulos de livros, informações sobre as utilidades desses novos métodos junto a comunidade de médicos e biólogos. O workshop oferecido pelo INFABIC com aulas expositivas e experimentos hands on tem sido um fator muito importante na divulgação desses métodos junto a essas comunidades. Há uns 5 anos praticamente ninguém dessa comunidade, a não ser pesquisadores muito próximos de nosso grupo, falavam sobre SHG e FLIM. Hoje vários grupos em todo o país e do exterior, incluindo pesquisadores de Berkeley, California, nos procuram para aquisição desse tipo de imagens.

Capítulo 8

Conclusões e Perspectivas

Nessa tese de doutorado fomos capazes de desenvolver uma plataforma integrada e demonstrar suas aplicações. A próxima revolução tecnológica, provavelmente do controle dos processos biológicos, está prevista para 2015. Ter uma ferramenta dessa disponível é crucial para poder embarcar no começo dessa onda de revolução.

No Capítulo 2, demonstramos como a integração é feita do ponto de vista das diferentes técnicas. Detalhamos também as características de cada sistema disponível no grupo. Dessa forma deixamos claro como é possível fazer a integração de diferentes técnicas fotônicas num único equipamento. As técnicas integradas foram fluorescência excitada por um e dois fótons, SHG, THG, FLIM, pinças ópticas, FCS e um criostato para medidas em função da temperatura.

Prosseguindo para o Capítulo 3, apresentamos a aplicações de pinças ópticas para medir a quimiotaxia de *T. cruzi*/*T. rangeli* pelo intestino e glândula salivar do inseto hospedeiro respectivamente. As medidas dos vetores de força nos possibilitou identificar a atração to *T. cruzi* em relação ao intestino do barbeiro, mas não em relação e outros órgãos do inseto. A mesma identificação foi feita com o *T. rangeli* sendo atraído pela glândula salivar mas não pelo intestino. O próximo

passo aqui é identificar as moléculas atratores e identificar o mecanismo de adesão entre o parasita e a parede do intestino.

O Capítulo 4 tratou da teoria das imagens por FLIM. Essa técnica foi adicionada nessa tese de doutorado ao arsenal de técnicas fotônicas já integradas e demonstradas em outras teses do grupo. A capacidade de análise do ambiente químico que o FLIM fornece é um complemento as análises de fluorescência, SHG e THG. Enquanto basicamente, essas três técnicas fornecem informações estruturais dos tecidos o FLIM revela o ambiente químico e metabolismo das células. Além disso, o FLIM pode ser usado como sensor para concentração de substâncias químicas, temperatura ou pH, já que todos esses fatores alteram o tempo de vida da fluorescência. Além de ser mais uma forma de discriminar sinais gerados na amostra. Sinais de espalhamento de laser, como SHG, THG e Raman, tem seu tempo de vida muito curto em relação a sinais de absorção de laser como fluorescência. Mesmo entre corantes esse fato pode ser utilizado já que diferentes corantes possuem diferentes tempos de vida.

O foco do Capítulo 5 foi esclarecer o papel do stress da matriz de vidro em quantum todos inseridos na mesma. Esse era um assunto de interesse do grupo desde 1998 que só foi esclarecido totalmente nessa tese. A revisão da teoria do cálculo dos níveis de energia mostrou que a teoria mais empregada até o momento superestimava o tamanho dos QDs para semicondutores com o gap pequeno. Desenvolvemos um método para calcular os níveis de energia levando em conta a dispersão de energia do bulk. Nosso método heurístico conseguiu prever tamanhos de QDs mais realistas. Isso ficou comprovado com a medida do raio hidrodinâmico dos QDs a partir do FCS. A partir das medidas dos picos de emissão em função da temperatura fomos capazes de diferenciar o comportamento de quantum dots em matriz de vidro e quantum dots coloidais. Pela análise dos dados ficou claro que o stress causado pela matriz de vidro, devido a diferencia entre os coeficientes de expansão, causa um comportamento anômalo nos QDs fazendo surgir até transições de fase devido a pressão. As medidas do tempo de vida da fluorescência corroboram essas conclusões e fechamos a discussão que se estendia desde 1998. Vale a pena ressaltar que o

mesmo equipamento que pode ser utilizado para medidas de processo celulares foi utilizado para as medidas nos QDs.

A técnica FCS foi abordada no Capítulo 6. Realizamos os cálculos teóricos mostrando como obter o coeficiente de difusão a partir das medidas de FCS. Aplicamos essa teoria para a medida do raio hidrodinâmicos dos QDs. É interessante notar que a maioria dos trabalhos encontrados na literatura para o cálculo dos tamanhos dos QDs a partir do FCS não levam em conta o blinking. Isso tornava os cálculos muito subjetivos. Nesta tese desenvolvemos um método para eliminar essa subjetividade e calcular o tamanho do QD já levando em conta a cap layer. Nossos resultados medidos estão de acordo com o método heurístico para cálculo do tamanho do QD desenvolvido no Capítulo 5. Foi discutido também o papel do blinking para aplicação dos QDs para microscopia de superresolução. Como a técnica de superresolução necessita que os marcadores fluoresçam em tempos diferentes, o blinking torna os QDs ótimos candidatos para essa aplicação. O melhor entendimento desse processo possibilitará a utilização dos QDs como marcadores de microscopia de superresolução.

As aplicações das plataformas integradas foram mostradas no Capítulo 7. Temos aplicações em desenvolvimento de próstata, câncer de ovário, câncer de mama, osteogenesis imperfecta e interação de parasita-vetor. As técnicas foram utilizadas em conjunto e forneceram informações que não podiam ser acessadas com as técnicas antigas. Dessa forma a integração das técnicas fônicas em um microscópio confocal fica demonstrada sem nenhuma dúvida.

Concluindo, o objetivo do desenvolvimento de uma plataforma fotônica integrada foi atingido. As aplicações em várias áreas, desde quantum dots até câncer, demonstram a versatilidade do sistema e formam a base para novas análises.

Apêndice 1

Lista de Trabalhos Desenvolvidos Durante o Período da Tese

Artigos publicados em revistas indexadas:

- 1) J. Adur, V. B. Pelegati, A. A. de Thomaz, M. O. Barati, D. B. Almeida, L. A. L. A. Andrade, F. Bottcher-Luiz, H. F. Carvalho and C. L. Cesar, ***“Optical Biomarkers of Serous and Mucinous Ovarian Tumor Assessed with Nonlinear Optics Microscopies”***, PLoS One, **7** (10) e47007 (2012)
- 2) J. Adur, V. B. Pelegati, A. A. de Thomaz, M. O. Baratti, L.A.L.A Andrade, F. Bottcher-Luiz, H. F. Carvalho and C. L. Cesar, ***“Second harmonic generation microscopy as a powerful diagnostic imaging modality for human ovarian cancer”***, J. Biophotonics 1–13 (2012) / DOI 10.1002/jbio.201200108
- 3) B. Pelegati, J. F. Adur, A. A. de Thomaz, D. B. Almeida, M. O. Baratti, L.A.L.A. Andrade, F. Bottcher-Luiz and C. L. Cesar, ***“Harmonic Optical Microscopy and Fluorescent Lifetime Imaging platform for multimodal imaging”***, Microsc. Res. Tech. **75** (10), 1383-94 (2012), DOI: 10.1002/jemt.22078
- 4) J. Adur, V. B. Pelegati, A. A. de Thomaz, L. d’Souza-Li, M. C. Assunção, F. Bottcher-Luiz, L. A. L. A. Andrade and C. L. Cesar, ***“Quantitative changes in human epithelial cancers and osteogenesis imperfecta disease detected using nonlinear multicontrast microscopy”***, J. Biomedical Opt. **17**(8), 081407 (2012)
- 5) J. Adur, V. B. Pelegati, L. F. L. Costa, L. Pietro, A. A. de Thomaz, D. B. Almeida, F. Bottcher-Luiz, L. A. L. A. Andrade and C. L. Cesar, ***“Recognition of serous ovarian tumors in human samples by multimodal nonlinear optical microscopy”***, J. Biomedical Opt. **16** (9), 096017 (2011)

- 6) A. Fontes, M. L. Barjas Castro, M. M. Brandão, H. P. Fernandes, A. A. de Thomaz, R. R. Huruta, L. Y. Pozzo, L. C. Barbosa, F. F. Costa, S. T. O. Saad and C. L. Cesar, "**Mechanical and electrical properties of red blood cells using optical tweezers**", J. Opt. **13** 044012 (2011)
- 7) A. A. de Thomaz, A. Fontes, C. V. Stahl, L. Y. Pozzo, D. C. Ayres, D. B. Almeida, P. M. A. Farias, B. S. Santos, J. Santos-Mallet, S. A. O. Gomes, S. Giorgio, D. Feder and C. L. Cesar, "**Optical tweezers for studying taxis in parasites**", J. Opt. **13** 044015 (2011)
- 8) C. V. Stahl, D. B. Almeida, A. A. de Thomaz, R. F. S. Menna-Barreto, J. R. Santos-Mallet, C. L. Cesar, S. A. O. Gomes and D. Feder, "**Studying nanotoxic effects of CdTe quantum dots in Trypanosoma cruzi**", Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **106** (2) 158-165 (2011)
- 9) Bruni-Cardoso, V. Pascoal, A. A. de Thomaz, C. L. Cesar and H. F. Carvalho. "**MMP-2 Silencing by siRNA Inhibits Morphogenesis of the Rat Ventral Prostate in Vitro**", Developmental Dynamics **239** (3), 737-746 (2010).
- 10) D. Feder, S. A. O. Gomes, A. A. de Thomaz, D. B. Almeida, W. M. Faustino, A. Fontes, C. V. Stahl, J. R. Santos-Mallet and C. L. Cesar, "**In vitro and In Vivo documentation of Quantum Dots labeled Trypanosoma cruzi – Rhodnius prolixus Interaction using Confocal Microscopy**", Parasitology Res., **106** (1), 85 (2009)
- 11) L. Y. Pozzo, A. Fontes, A. A. de Thomaz, P. M. A. Farias, B. S. Santos, D. C. Ayres, S. Giorgio and C. L. Cesar, "**Studying Chemotaxis Using Optical Tweezers: Applications for Leishmania amazonensis parasites**", Micron, 40 617-620 (2009)
- 12) A. Fontes, H. P. Fernandes, A. A. de Thomaz, L. Y. Pozzo, L. C. Barbosa, M. L. Barjas-Castro and C. L. Cesar, "**Measuring Electrical and Mechanical Properties of Red Blood Cells Using a Double Optical Tweezers to Understand Cell Agglutination**", J. Biomedical Optics **13** (1) 014001 (2008)
- 13) P. M. A. Farias, B. S. Santos, A. A. de Thomaz, R. Ferreira, F. D. Menezes, C. L. Cesar and A. Fontes, "**Fluorescent II-VI Semiconductor Quantum Dots in Living Cells: Nonlinear Microspectroscopy in an Optical Tweezers System**", J. Phys. Chem. B, **112**, 2734-2737 (2008)
- 14) A. A. R. Neves, A. Fontes, L. Y. Pozzo, A. A. de Thomaz, E. Chillce, E. Rodriguez, L. C. Barbosa and C. L. Cesar, "**Electromagnetic forces for an arbitrary optical trapping of a spherical dielectric**", Optics Express **14** (26), 13101 (2006)
- 15) A. Fontes, A. A. R. Neves, W. L. Moreira, A. A. Thomaz, L. C. Barbosa, A. M. de Paula and C. L. Cesar, "**Double Optical Tweezers for Ultra Sensitive Force Spectroscopy in Microsphere Mie Scattering**", Appl. Phys. Lett. **87**, 221109 (2005)

16) A. Fontes, K. Ajito, A. A. R. Neves, W. L. Moreira, A. A. Thomaz, L. C. Barbosa, A. M. de Paula and **C. L. Cesar**, ***“Raman, Hyper-Raman, Hyper-Rayleigh, Two-Photon Excited Luminescence and Morphology-Dependent-Modes in a single Optical Tweezers System”***, Phys. Rev. E. **72**, 012903 (1-4) (2005)

Resumos Curtos publicados em journals:

1) K. Metze, G. Vieira-Damiani, R. L. Adam, D. P. Ferro, A. A. de Thomaz, V. Pelegati and C. L. Cesar, ***“Why is a blood channel located in the external part of the media layer in aortas with acute dissection?”***, HISTOPATHOLOGY **61** SI Supplement: 1, 40-40, (2012)

2) H. P. Fernandes, A. Fontes, A. A. de Thomaz, L. C. Barbosa, D. N. Silva, V. Castro, M. L. Barjas-Castro and C. L. Cesar, ***“Measuring Red Blood Cells Electrical Membrane Charges Using Optical Tweezers”***, Transfusion **49** (suppl. 3) 138A-138A (2009)

3) K. Metze, G. Vieira, R. L. Adam, D. P. Ferro, A. A. de Thomaz and C. L. Cesar, ***“Computerized texture analysis of histologic sections: comparison of aortas of normotensive and hypertensive patients”***, Virchows Archiv **455** (suppl. 1) 81-82 (2009)

4) H. P. Fernandes, A. Fontes, A. A. de Thomaz, L. C. Barbosa, V. Castro, C. L. Cesar and M. L. Barjas-Castro, ***“Sensitive and Simple Methodologies for Measuring of Red Blood Cell (RBC) Electrical Properties and Cell Aggregation”***, Blood **112** (11) 367-368 (2008)

5) C. S. Vieira, A. A. de Thomaz, D. B. Almeida, A. Fontes, W. M. Faustino, C. L. Cesar, S. A. O. Gomes, J. Santos-Mallet and D. Feder, ***“Confocal imaging of Living Trypanosoma cruzi - vector interaction with CdTe quantum dots stained”***, apresentação Oral na XXIV Reunião da Sociedade de Protozoologia e XXXV Reunião para Pesquisa Básica em Doença de Chagas, Águas de Lindóia, 27-29 outubro de 2008

6) **C. L. Cesar**, A. Fontes, A. A. de Thomaz, A. A. R. Neves, W. M. Moreira, L. C. Barbosa, A. M. de Paula, K. Ajito, P. M. A. de Farias and B. S. Santos, ***“Photonic Microscopies, Microspectroscopies and Manipulations”***, Braz. J. Morphol. Sci., supplement 2005, página 13 (2005), invited paper na XX Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, Agosto 28-31, Águas de Lindóia, SP, Brasil.

7) A. A. R. Neves, A. Fontes, A. A. de Thomaz, L. C. Barbosa and **C. L. Cesar**, ***“Ultrasensitive 3D Forces on a Dielectric Microsphere in Optical Tweezers”***, Braz. J. Morphol. Sci., supplement 2005, página 204 (2005) XX Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, Agosto 28-31, Águas de Lindóia, SP, Brasil.

Congressos Internacionais 2012:

- 1) K. Metze, G. Vieira-Damiani, R. L. Adam, D. P. Ferro, A. A. de Thomaz, V. Pelegati and C. L. Cesar, ***“Why is a blood channel located in the external part of the media layer in aortas with acute dissection?”***, Meeting Abstract: 116, 29th Congress of the International Academy of Pathology, Cape Town, South Africa, Sept 30- Oct 05 (2012)
- 2) A. A. de Thomaz, D. B. Almeida, E. Jimenez, V. Pelegati, J. Adur, H. F. Carvalho and C. L. Cesar, ***“Fluorescence Lifetime Imaging, Energy Transfer and Fluorescence Correlation Spectroscopy in Si and CdTe colloidal Quantum Dots”***, ORAL, SPIE Photonics West 2012, San Francisco, California, USA, January 21-26 (2012).
- 3) V. B. Pelegati, J. Adur, A. A. de Thomaz, D. B. Almeida, M. O. Baratti, H. F. Carvalho and C. L. Cesar, ***“Multimodal Optical Setup for Nonlinear and Fluorescence Lifetime Imaging Microscopies: Improvement on a Commercial Confocal Inverted Microscope”***, ORAL, SPIE Photonics West 2012, San Francisco, California, USA, January 21-26 (2012).
- 4) J. Adur, V. B. Pelegati, A. A. de Thomaz, F. Bottcher-Luiz, L. A. L. A. Andrade, D. B. Almeida, H. F. Carvalho and C. L. Cesar, ***“Combined nonlinear laser imaging (two-photon excitation fluorescence, second and third harmonic generation, and fluorescence lifetime imaging microscopies) in ovarian tumors”***, ORAL, San Francisco, California, USA, January 21-26 (2012).
- 5) G. Vieira- Damiani, J. Adur, D. P. Ferro, R. L. Adam, V. B. Pelegati, A. A. de Thomaz, C. L. Cesar and K. Metze, ***“Analysis of human aorta using fluorescence lifetime imaging (FLIM)”***, ORAL, San Francisco, California, USA, January 21-26 (2012).
- 6) V. B. Pelegati, A. A. de Thomaz, D. B. Almeida, J. Adur, M. O. Baratti, H. F. Carvalho and C. L. Cesar, ***“Totally Integrated Linear and Non-Linear Optics Multimodal Microscopy Platform to Understand Single Cell Processes”***, POSTER, SPIE Photonics West 2012, San Francisco, California, USA, January 21-26 (2012).

- 7) P. Bordeaux-Rego, M. F. Andreoli-Risso, A. S. S. Duarte, T. B. Ribeiro, M. O. Baratti, B. Vidal, J. B. Miranda, J. Adur, A. A. de Thomaz, V. B. Pelegati, F. F. Costa, H. F. Carvalho, C. L. Cesar, A. Luzo, P. Kharmadayan and S.T. Olalla-Saad, **“Second Harmonic Generation Microscopy Used to Evaluated Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells for Cartilage Repair”**, POSTER, San Francisco, California, USA, January 21-26 (2012).
- 8) M. F. Andreoli-Risso, A. S. S. Duarte, T. B. Ribeiro, P. Bordeaux-Rego, A. Luzo, M. O. Baratti, J. Adur, A. A. de Thomaz, V. B. Pelegati, H. F. Carvalho, C. L. Cesar, P. Kharmadayan, F. F. Costa and S. T. Olalla-Saad, **“Second Harmonic Generation Microscopy Used to Evaluated the Effect of the Dimethyl Sulfoxide Cryopreservation Process in Collagen Fibers of Differentiated Chondrocytes”**, POSTER, San Francisco, California, USA, January 21-26 (2012).
- 9) D. P. Ferro, G. Vieira-Damiani, R. L. Adam, A. A. de Thomaz, V. B. Pelegati, C. L. Cesar and K. Metze, **“Non linear optics for the study of human scar tissue”**, POSTER, San Francisco, California, USA, January 21-26 (2012).
- 10) J. Adur, A. E. Ferreira, L. D’Souza-Li, V. B. Pelegati, A. A. de Thomaz, D. B. Almeida, M. O. Baratti, H. F. Carvalho and C. L. Cesar, **“Quantitative Second Harmonic Generation Imaging to Detect Osteogenesis Imperfecta in Human Skin Samples”**, POSTER, San Francisco, California, USA, January 21-26 (2012).

Congressos Internacionais 2011:

- 11) J. Adur, M. Bianchi, S. Viale, V. B. Pelegati, A. A. de Thomaz, M. F. Izaguirre, V. H. Casco and C. L. Cesar, **“Human Colon Cancer Characterization by Nonlinear Optical Microscopy”**, aceito para XI InterAmerican Congress of Microscopy CIASEM 2011, a ser realizado no período de 25-29/setembro de 2011 em Mérida, Yucatan, México. Poster.
- 12) J. Adur, V. B. Pelegati, M. Baratti, A. A. de Thomaz, F. Böttcher-Luiz, L. A. L. A. Andrade, H. F. Carvalho and C. L. Cesar, **“Multimodal nonlinear optical imaging in histopathology sections reveals differences between normal and tumor stromal of human ovarian”**, accepted to The XI Brazilian Symposium on Extracellular Matrix and VI International Symposium on Extracellular Matrix (SIMEC 2011), a ser realizado no período 21-24/agosto de 2011 em Búzios, RJ, Brasil.

- 13) J. Adur, V. B. Pelegati, A. A. de Thomaz, D. B. Almeida, L. A. L. A. Andrade, F. Böttcher-Luiz and C. L. Cesar, **“Multimodal Nonlinear Optical Microscopy used to Discriminate Epithelial Ovarian Cancer”**, European Conference on Biomedical Optics, Munique 22 a 26 de maio 2010. Oral.
- 14) G. Vieira, V. B. Pelegati, A. A. de Thomaz, D. P. Ferro, R. L. Adam, C. L. Cesar and K. Metze, **“Second-harmonic generation and multiphoton microscopy for automatic texture analysis of human of elastic fibers and collagen distribution in human thoracic aorta”**, Photonics West, 22 - 27 January 2011, San Francisco, California, USA, ORAL paper [7903-09].
- 15) B. Favetta, V. B. Pelegati, A. A. de Thomaz, T. M. Augusto, H. F. Carvalho and C. L. Cesar, **“Assessing changes in collagen levels of castrated rat prostates using second-harmonic generation and two-photon fluorescence”**, Photonics West, 22 - 27 January 2011, San Francisco, California, USA, POSTER [7903-108].

Congressos Internacionais 2010:

- 16) G. Vieira, D. P. Ferro, R. L. Adam, A. A. Thomaz, V. B. Pelegati, C. L. Cesar and K. Metze, **“Elastic fibers and collagen distibution in human thoraic aorta”**, 17 International Microscopy Congress [IMC17], 19-24 September/2010, Rio de Janeiro, Brazil.
- 17) A. A. de Thomaz, L. Lamonier, V. B. Pelegati, F. Bottcher-Luiz, L. Pietro, L. A. Andrade, C. L. Machado and C. L. Cesar, **“Collagen distribution in Human Ovarian Neoplasias studied by Second Harmonic Generation”**, 17 International Microscopy Congress [IMC17], 19-24 September/2010, Rio de Janeiro, Brazil.
- 18) B. Favetta, V. B. Pelegati, A. A. de Thomaz, T. M. Augusto, H. F. Carvalho and C. L. Cesar, **“Assessing Changes in Collagen Levels of Prostate Tissue from Castrated Rats Using Second Harmonic Generation and Two Photon Fluorescence”**, 17 International Microscopy Congress [IMC17], 19-24 September/2010, Rio de Janeiro, Brazil.
- 19) A. Bruni-Cardoso, V. Pascoal, A. A. de Thomaz, C. L. Cesar and H. F. Carvalho, **“Effects of MMP-2 Silencing in the Development of Rat Ventral Prostate Studied by SHG Microscopy”**, 17 International Microscopy Congress [IMC17], 19-24 September/2010, Rio de Janeiro, Brazil.

- 20) A. A. de Thomaz, C. V. Stahl, A. Fontes, L. Y. Pozzo, S. Giorgio, S. A. O. Gomes, D. Feder and C. L. Cesar, **“Studying chemotaxis of parasites using Optical Tweezers”**, 17 International Microscopy Congress [IMC17], 19-24 September/2010, Rio de Janeiro, Brazil.
- 21) S. A. O. Gomes, C. V. Stahl, A. A. de Thomaz, D. B. Almeida, J. R. Santos-Mallet, C. L. Cesar and D. Feder, **“Quantum Dots-Lectin bioconjugated labeled Trypanosoma cruzi by confocal microscopy”**, 17 International Microscopy Congress [IMC17], 19-24 September/2010, Rio de Janeiro, Brazil.
- 22) C. V. Stahl, D. B. Almeida, A. A. de Thomaz, R. F. S. Menna-Barreto, J. R. Santos-Mallet, C. L. Cesar, S. A. O. Gomes and D. Feder, **“Ultrastructural effect of CdTe Quantum dots in Trypanosoma cruzi epimastigotes”**, 17 International Microscopy Congress [IMC17], 19-24 September/2010, Rio de Janeiro, Brazil.
- 23) A. Cardoso, A. A. de Thomaz, C. L. Cesar and H. F. Carvalho, **“MMP-2 Silencing by siRNA Inhibits Morphogenesis of the Rat Ventral Prostate In Vitro studied by SHG microscopy”**, Photonics West, 23 - 28 January 2010, San Francisco, California, USA - oral
- 24) L. Pietro, C. L. César, L. Lamonier, L.A. Andrade, A. A. de Thomaz, C. L. Machado and F. Böttcher-Luiz, **“Patterns Of Second Harmonic Generation In Human Ovarian Tissues”**, Photonics West, 23 - 28 January 2010, San Francisco, California, USA, poster
- 25) L. Lamonier, F. Bottcher- Luiz, L. Pietro, L. A. Andrade, A. A. de Thomaz, C. L. Machado and C. L. Cesar, **“Second Harmonic Generation In human Ovarian Neoplasias”**, Photonics West, 23 - 28 January 2010, San Francisco, California, USA, oral. Proc. SPIE, Vol. 7569, 75691U (2010); doi:10.1117/12.842576
- 26) G. Vieira, D. P. Ferro, R. L. Adam, A. A. de Thomaz, C. L. Cesar and K. Metze, **“Confocal Microscopy for automatic measurement of the density and distance between elastin fibers of histologic preparations of normotensive and hipertensive patients”**, Photonics West, 23 - 28 January 2010, San Francisco, California, USA – oral. Proc. SPIE, Vol. 7568, 75680K (2010); doi:10.1117/12.842394
- 27) A. A. de Thomaz, C. V. Stahl, D. B. Almeida, A. Fontes, J. R. Santos-Mallet, C. L. Cesar, D. Feder and S. A. O. Gomes, **“Studying chemotaxis in real time using optical tweezers: Applications for interactions study in Rhodnius prolixus-Trypanosoma cruzi/Trypanosoma rangeli”**, Photonics West, 23 - 28 January 2010, San Francisco, California, USA - oral
- 28) C. V. Stahl, D. B. Almeida, A. A. de Thomaz, A. Fontes, J. R. Santos-Mallet, C. L. Cesar, S. A.O. Gomes and D. Feder, **“Studying nanotoxic effects of CdTe Quantum dots in Trypanosoma cruzi.”** Photonics West, 23 - 28 January

2010, San Francisco, California, USA – oral. Proc. SPIE, Vol. 7575, 757513 (2010); doi:10.1117/12.842558

- 29) D. B. Almeida, E. Rodriguez, A. A. de Thomaz, L. C. Barbosa, E. Jimenez and C. L. Cesar, **“Luminescent thiol capped colloidal PbTe quantum dots synthesized using laser ablation”**, Photonics West, 23 - 28 January 2010, San Francisco, California, USA – oral

Congressos Internacionais 2009:

- 30) H. P. Fernandes, A. Fontes, A. A. de Thomaz, L. C. Barbosa, D. N. Silva, V. Castro, M. L. Barjas-Castro and C. L. Cesar, **“Measuring Red Blood Cells Electrical Membrane Charges Using Optical Tweezers”**, American Association of Blood Banks Annual Meeting & TXPO 2009, 24-27 outubro 2009, New Orleans, EUA.
- 31) K. Metze, G. Vieira, R. L. Adam, D. P. Ferro, A. A. de Thomaz and C. L. Cesar, **“Computerized texture analysis of histologic sections: comparison of aortas of normotensive and hypertensive patients”**, 22nd European Congress of Pathology, 04-09 setembro 2009, Florence, Itália.
- 32) A. A. de Thomaz, D. B. Almeida, A. Fontes, C. V. Stahl, J. R. Santos-Mallet, S. A. O. Gomes, D. Feder and C. L. Cesar, **“Evidence of chemotaxis by quantitative measurement of the force vectors of Trypanosoma cruzi in the vicinity of the Rhodnius prolixus midgut wall cells”**, Optics and Photonics da The International Society for Optical Engineering – SPIE, San Diego, California, EUA, em agosto de 2009. Oral. Proc. SPIE, Vol. 7400, 740009 (2009); doi:10.1117/12.826314
- 33) A. A. de Thomaz, D. B. Almeida, A. Fontes, C. V. Stahl, J. R. Santos-Mallet, S. A.O. Gomes, D. Feder and C. L. Cesar, **“Study of Quantum Dots Labeled Trypanosoma cruzi - Rhodnius prolixus Interaction by Real Time Confocal Images”**, Microscopy and Microanalysis Meeting 2009, Richmond, Virginia, USA, apresentação oral
- 34) A. A. de Thomaz, A. Fontes, D. B. Almeida, C. V. Stahl, J. R. Santos-Mallet, S. A. O. Gomes, D. Feder and C. L. Cesar, **“Trypanosoma cruzi Quantitative Chemotaxis Characterization by Optical Tweezers”**, Microscopy and Microanalysis Meeting 2009, Richmond, Virginia, USA, Poster.
- 35) G. Vieira, R. L Adam, D. P. Ferro, A. A. de Thomaz, C. L. Cesar, and K. Metze, **“Automatic analysis of the elastic fiber texture of the aorta”**, Microscopy and Microanalysis Meeting 2009, Richmond, Virginia, USA. Poster

- 36) A. A. de Thomaz, L. Y. Pozzo, A. Fontes, D. B. Almeida, C. V. Stahl, J. R. Santos-Mallet, S. A. O. Gomes, D. Feder, D. C. Ayres, S. Giorgio and C. L. Cesar, ***“Optical Tweezers Force Measurements to Study Parasites Chemotaxis”***, European Conference on Biomedical Optics, Munique 14 a 18 de julho 2009. Poster. Proc. SPIE, Vol. 7367, 73671A (2009); doi:10.1117/12.831480
- 37) R. L. Adam, G. Vieira, D. P. Ferro, A. A. de Thomaz, C. L. Cesar and K. Metze, ***“Confocal Microscopy for Automatic Texture Analysis of Elastic Fibers in Histologic Preparations”***, European Conference on Biomedical Optics, Munique 14 a 18 de julho 2009. Poster 566. Proc. SPIE, Vol. 7367, 73671O (2009); doi:10.1117/12.831535

Congressos Internacionais 2008:

- 38) H. P. Fernandes, A. Fontes, A. A. de Thomaz, L. C. Barbosa, V. Castro, C. L. Cesar and M. L. Barjas-Castro, ***“Sensitive and Simple Methodologies for Measuring of Red Blood Cell (RBC) Electrical Properties and Cell Aggregation”***, 50th ASH [American Society of Hematology] Annual Meeting, San Francisco, California, 6-9, dezembro de 2008.
- 39) A. A. de Thomaz, D. B. Almeida, W. M. Faustino, G. J. Jacob, A. Fontes, L. C. Barbosa, C. L. Cesar, C. S. Vieira, T. C. M. Gonçalves, J. R. Santos-Mallet, S. A.O. Gomes and D. Feder, ***“Study of optically-trapped living trypanosoma cruzi-rhodnius prolixus interactions by real time confocal images using CdTe quantum dots”***, aceito para apresentação oral na Conferência Optics and Photonics 2007 da The International Society for Optical Engineering – SPIE, San Diego, California, EUA, em agosto de 2008.
- 40) D. B. Almeida, W. M. Faustino, G. J. Jacob, A. A. de Thomaz, L. C. Barbosa, O. L. Alves, P. M. A. Farias, B. S. Santos, A. Fontes, S. A. O. Gomes, D. Feder, I. O. Mazali and C. L. Cesar, ***“ Simple silanization routes of CdSe and CdTe nanocrystals for biological applications”***, aceito para apresentação oral na Conferência Optics and Photonics 2007 da The International Society for Optical Engineering – SPIE, San Diego, California, EUA, em agosto de 2008.

Congressos Internacionais 2007:

- 41) A. A. de Thomaz, W. M. Faustino, A. Fontes, H. P. Fernandes, M. L. Barjas-Castro, K. Metze, S. Giorgio, L. C. Barbosa, C. L. Cesar, ***“Optical tweezers and multiphoton microscopies integrated photonic tool for mechanical***

and biochemical cell processes studies", Oral paper 6644-16 apresentado na Conferência 6644 "Optical Trapping and Optical Micromanipulation IV", Optics and Photonics 2007 da The International Society for Optical Engineering – SPIE, San Diego, California, EUA, 28 a 30 de agosto de 2007.

- 42) A. Fontes, H. P. Fernandes, A. A. de Thomaz, L. C. Barbosa, M. L. Barjas-Castro and C. L. Cesar, ***"Studying red blood cell agglutination by measuring membrane viscosity with optical tweezers"***, Optical Trapping and Optical Micromanipulation IV, Optics and Photonics 2007 da The International Society for Optical Engineering – SPIE, San Diego, California, EUA, 28 a 30 de agosto de 2007.

Bibliografía

1. C. Pérez, *Technological revolutions and financial capital: the dynamics of bubbles and golden ages* (Edward Elgar, 2002).
2. D. Smihula, "Waves of technological innovations and the end of the information revolution. J. Econs. Int. Financ.," *Journal of Economics and International Finance* **2** (2010).
3. "Anthony Atala: Printing a human kidney | Video on TED.com," (2013), http://www.ted.com/talks/anthony_atala_printing_a_human_kidney.html.
4. "Is Vat-Grown Meat Kosher? We Asked A Rabbi," (2013), <http://io9.com/5458425>.
5. D. S. Jones, S. H. Podolsky, and J. A. Greene, "The Burden of Disease and the Changing Task of Medicine," *New England Journal of Medicine* **366**, 2333-2338 (2012).
6. D. T. Burnette, P. Sengupta, Y. Dai, J. Lippincott-Schwartz, and B. Kachar, "Bleaching/blinking assisted localization microscopy for superresolution imaging using standard fluorescent molecules," *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 21081-21086 (2011).
7. E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, and H. F. Hess, "Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution," *Science* **313**, 1642-1645 (2006).
8. M. J. Rust, M. Bates, and X. Zhuang, "Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)," *Nature Methods* **3**, 793-796 (2006).

9. S. W. Hell, and J. Wichmann, "Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy," *Opt. Lett.* **19**, 780-782 (1994).
10. "LSM 780 – for the most delicate specimens in live cell imaging," (2013), http://microscopy.zeiss.com/microscopy/en_de/products/confocal-microscopes/lsm-780.html#inpagetabs-1.
11. "Hamamatsu Learning Center: Avalanche Photodiodes," (2013), <http://learn.hamamatsu.com/articles/avalanche.html>.
12. B. H. GmbH, *The bh TCSPC Handbook*.
13. H. P. K.K., "H7422 series Metal package PMT with cooler - photosensor modules."
14. A. Fukasawa, A. Kamiya, S. Muramatsu, Y. Negi, and M. Suyama, "High-performance HPD for photon counting," 80330S-80330S (2011).
15. H. Photonics, "R10467 hybrid PMTs, data sheet."
16. "Mai Tai One Box Tunable Ultrafast Lasers," (2013), http://www.newport.com/Mai-Tai-One-Box-Tunable-Ultrafast-Lasers/368124/1033/info.aspx#tab_Literature.
17. V. B. Pelegati, "Microscopias de Óptica Não Linear: Fluorescência Excitada por Absorção de Dois Fótons, Geração de Segundo Harmônico e Geração de Terceiro Harmônico," (Tese de Mestrado, UNICAMP, 2010).
18. "CryoVac Products," (2013), <http://www.cryovac.de/products/konti/mikro.html>.

19. S. Chu, J. E. Bjorkholm, A. Ashkin, and A. Cable, "EXPERIMENTAL-OBSERVATION OF OPTICALLY TRAPPED ATOMS," *Physical Review Letters* **57** (1986).
20. A. Ashkin, and J. M. Dziedzic, "OBSERVATION OF RADIATION-PRESSURE TRAPPING OF PARTICLES BY ALTERNATING LIGHT-BEAMS," *Physical Review Letters* **54** (1985).
21. A. Ashkin, "ACCELERATION AND TRAPPING OF PARTICLES BY RADIATION PRESSURE," *Physical Review Letters* **24** (1970).
22. A. Ashkin, and J. M. Dziedzic, "STABILITY OF OPTICAL LEVITATION BY RADIATION PRESSURE," *Applied Physics Letters* **24** (1974).
23. A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, and S. Chu, "Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles," *Opt. Lett.* **11**, 288-290 (1986).
24. S. Chu, L. Hollberg, J. E. Bjorkholm, A. Cable, and A. Ashkin, "3-DIMENSIONAL VISCOUS CONFINEMENT AND COOLING OF ATOMS BY RESONANCE RADIATION PRESSURE," *Physical Review Letters* **55** (1985).
25. W. H. Wright, G. J. Sonek, and M. W. Berns, "PARAMETRIC STUDY OF THE FORCES ON MICROSPHERES HELD BY OPTICAL TWEEZERS," *Applied Optics* **33**, 1735-1748 (1994).
26. W. H. Wright, G. J. Sonek, and M. W. Berns, "Parametric study of the forces on microspheres held by optical tweezers," *Appl. Opt.* **33**, 1735-1748 (1994).
27. A. Fontes, "Sistema de Micromanipulação e Microanálise com Pinças Ópticas " (Tese de Doutorado, UNICAMP, 2004).

28. A. A. R. Neves, "Força optica em pincas : estudo teorico e experimental," (Tese de Doutorado, UNICAMP, 2006).
29. P. G. Saffman, "HAPPEL, J - LOW REYNOLDS NUMBER HYDRODYNAMICS WITH SPECIAL APPLICATIONS TO PARTICULATE MEDIA," *Nature* **212** (1966).
30. L. Y. Pozzo, "Desenvolvimento de Metodologia de Medida Vetorial de Forças em Tempo Real de Microorganismos Utilizando Pinças Ópticas para Estudos de Quimiotaxia e Osmotaxia de Parasitas," (Tese de Mestrado, UNICAMP, 2006).
31. E. M. Purcell, "Life at low Reynolds number," *American Journal of Physics* **45**, 3-11 (1977).
32. A. Bagorda, and C. A. Parent, "Eukaryotic chemotaxis at a glance," *Journal of Cell Science* **121**, 2621-2624 (2008).
33. M. E. Teves, H. A. Guidobaldi, D. R. Unates, R. Sanchez, W. Miska, S. J. Publicover, A. A. M. Garcia, and L. C. Giojalas, "Molecular Mechanism for Human Sperm Chemotaxis Mediated by Progesterone," *Plos One* **4** (2009).
34. R. Sanchez, C. Sepulveda, J. Risopatron, J. Villegas, and L. C. Giojalas, "Human sperm chemotaxis depends on critical levees of reactive oxygen species," *Fertility and Sterility* **93**, 150-153 (2010).
35. J. Y. Wu, L. L. Feng, H. T. Park, N. Havlioglu, L. Wen, H. Tang, K. B. Bacon, Z. H. Jiang, X. C. Zhang, and Y. Rao, "The neuronal repellent Slit inhibits leukocyte chemotaxis induced by chemotactic factors," *Nature* **410**, 948-952 (2001).
36. M. Zheng, G. J. Sun, S. Q. Cai, R. Mueller, and U. Y. Mrowietz, "Significant reduction of T-cell chemotaxis to MCP-1 in patients with primary and metastatic melanoma," *Chinese Medical Journal* **112**, 493-496 (1999).

37. A. M. J. Law, and M. D. Aitken, "Continuous-flow capillary assay for measuring bacterial chemotaxis," *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 3137-3143 (2005).
38. S. Khan, S. Jain, G. P. Reid, and D. R. Trentham, "The fast tumble signal in bacterial chemotaxis," *Biophysical Journal* **86**, 4049-4058 (2004).
39. K. C. Neuman, E. H. Chadd, G. F. Liou, K. Bergman, and S. M. Block, "Characterization of photodamage to *Escherichia coli* in optical traps," *Biophysical Journal* **77**, 2856-2863 (1999).
40. C. C. Bleul, M. Farzan, H. Choe, C. Parolin, I. ClarkLewis, J. Sodroski, and T. A. Springer, "The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry," *Nature* **382**, 829-833 (1996).
41. T. Nagasawa, S. Hirota, K. Tachibana, N. Takakura, S. Nishikawa, Y. Kitamura, N. Yoshida, H. Kikutani, and T. Kishimoto, "Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1," *Nature* **382**, 635-638 (1996).
42. R. D. Nelson, P. G. Quie, and R. L. Simmons, "CHEMOTAXIS UNDER AGAROSE - NEW AND SIMPLE METHOD FOR MEASURING CHEMOTAXIS AND SPONTANEOUS MIGRATION OF HUMAN POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES AND MONOCYTES," *Journal of Immunology* **115**, 1650-1656 (1975).
43. D. F. Blair, "HOW BACTERIA SENSE AND SWIM," *Annual Review of Microbiology* **49**, 489-522 (1995).
44. C. V. Rao, G. D. Glekas, and G. W. Ordal, "The three adaptation systems of *Bacillus subtilis* chemotaxis," *Trends in Microbiology* **16**, 480-487 (2008).

45. V. C. Barros, J. S. Oliveira, M. N. Melo, and N. F. Gontijo, "Leishmania amazonensis: Chemotactic and osmotactic responses in promastigotes and their probable role in development in the phlebotomine gut," *Experimental Parasitology* **112**, 152-157 (2006).
46. W. Pfeffer, "Ueber chemotaktische bewegungen von bakterien, flagellaten und volvocineen," *Unters. Botan. Inst. Tubingen* **2**, 582-661 (1888).
47. J. Adler, "METHOD FOR MEASURING CHEMOTAXIS AND USE OF METHOD TO DETERMINE OPTIMUM CONDITIONS FOR CHEMOTAXIS BY ESCHERICHIA-COLI," *Journal of General Microbiology* **74**, 77-91 (1973).
48. "Center for Disease Control," <http://www.cdc.gov>.
49. "Instituto Oswaldo Cruz - Ciência para a Saúde da População Brasileira," (2013), <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=151&sid=76>.
50. , http://pt.wikipedia.org/wiki/DoenCA_de_chagas.
51. "Doença de chagas | Revista Veterinária," (2013), <http://www.revistaveterinaria.com.br/2011/08/02/doenca-de-chagas/>.
52. "Exposição Carlos Chagas ::: Doença de Chagas ::: Ciclo de Vida do Protozoário," (2013), <http://www.invivo.fiocruz.br/chagas/doen-ciclo-trypanosoma.html>.
53. "Ciências da Terra: Abril 2012," (2013), http://jcienciasdaterra.blogspot.com.br/2012_04_01_archive.html.
54. C. Chagas, "Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., agente etiológico de nova

entidade morbida do homem," Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **1**, 159-218 (1909).

55. N. F. S. Nogueira, M. Gonzales, E. M. Garcia, and W. DeSouza, "Effect of azadirachtin A on the fine structure of the midgut of *Rhodnius prolixus*," *Journal of Invertebrate Pathology* **69**, 58-63 (1997).

56. M. H. de Moraes, A. A. Guarneri, F. P. Girardi, J. B. Rodrigues, I. Eger, K. M. Tyler, M. Steindel, and E. C. Grisard, "Different serological cross-reactivity of *Trypanosoma rangeli* forms in *Trypanosoma cruzi*-infected patients sera," *Parasites & Vectors* **1** (2008).

57. S. A. O. Gomes, A. L. F. de Souza, T. Kiffer-Moreira, C. F. Dick, A. L. A. dos Santos, and J. R. Meyer-Fernandes, "Ecto-phosphatase activity on the external surface of *Rhodnius prolixus* salivary glands: Modulation by carbohydrates and *Trypanosoma rangeli*," *Acta Tropica* **106**, 137-142 (2008).

58. J. R. Lakowicz, and SpringerLink (Online service), "Principles of Fluorescence Spectroscopy," (Springer Science+Business Media, LLC., Boston, MA, 2006).

59. M. Elangovan, R. N. Day, and A. Periasamy, "Nanosecond fluorescence resonance energy transfer-fluorescence lifetime imaging microscopy to localize the protein interactions in a single living cell," *Journal of Microscopy-Oxford* **205**, 3-14 (2002).

60. R. D. Spencer, and G. Weber, "MEASUREMENTS OF SUBNANOSECOND FLUORESCENCE LIFETIMES WITH A CROSS-CORRELATION PHASE FLUOROMETER," *Annals of the New York Academy of Sciences* **158** (1969).

61. W. Becker, *Advanced Time-Correlated Single Photon Counting Technique* (Springer, 2005).

62. A. I. O. A. A. Ekimov, "Quantum size effect in three-dimensional microscopic semiconductor crystals," *JETP Letters* **34** (1981).
63. R. Rossetti, and L. Brus, "Electron-hole recombination emission as a probe of surface chemistry in aqueous cadmium sulfide colloids," *The Journal of Physical Chemistry* **86**, 4470-4472 (1982).
64. M. A. Reed, J. N. Randall, R. J. Aggarwal, R. J. Matyi, T. M. Moore, and A. E. Wetsel, "Observation of discrete electronic states in a zero-dimensional semiconductor nanostructure," *Physical Review Letters* **60**, 535-537 (1988).
65. C. R. M. d. Oliveira, "Estudo de Confinamento quântico em semicondutores II-VI," (Unicamp, 1995).
66. G. E. Tudury, "Medidas de propriedades não lineares resolvidas no tempo em vidros dopados com pontos quânticos semicondutores," in *IFGW(UNICAMP*, 2001).
67. S. G. C. Moreira, E. C. da Silva, A. M. Mansanares, L. C. Barbosa, and C. L. Cesar, "Temperature induced stress phase transition in CdTe quantum dots observed by dielectric constant and thermal diffusivity measurements," *Applied Physics Letters* **91**, 021101-021103 (2007).
68. C. L. Cesar, M. N. Islam, R. D. Feldman, R. F. Austin, D. S. Chemla, L. C. West, and A. E. DiGiovanni, "Detailed characterization of HgCdTe/CdTe multiple quantum wells," *Applied Physics Letters* **56**, 283-285 (1990).
69. Mauro Fernando Soares Ribeiro Junior, "Cálculos de estrutura eletrônica de materiais e nanoestruturas com inclusão de autoenergia: Método LDA - 1/2," in *Instituto de Física(USP*, 2011).
70. J. D. Jackson, *Classical Electrodynamics* (John Wiley & Sons Ltd, 1962).

71. E. O. Kane, "ENERGY BAND STRUCTURE IN P-TYPE GERMANIUM AND SILICON," *Journal of Physics and Chemistry of Solids* **1** (1956).
72. E. O. Kane, "BAND STRUCTURE OF INDIUM ANTIMONIDE," *Journal of Physics and Chemistry of Solids* **1** (1957).
73. E. O. Kane, "Energy Band Theory," in *Handbook on Semiconductors*, T. S. Moss, ed. (North-Holland, New York, 1982), p. 193.
74. P.-O. Lowdin, "A Note on the Quantum-Mechanical Perturbation Theory," *The Journal of Chemical Physics* **19**, 1396-1401 (1951).
75. J. M. Luttinger, "Quantum Theory of Cyclotron Resonance in Semiconductors: General Theory," *Physical Review* **102**, 1030-1041 (1956).
76. P. C. Sercel, and K. J. Vahala, "Analytical formalism for determining quantum-wire and quantum-dot band structure in the multiband envelope-function approximation," *Physical Review B* **42**, 3690-3710 (1990).
77. A. Á. R. Neves, "Nanocristais Coloidais de Semicondutores II-VI e IV-VI" (UNICAMP, 2002).
78. D. J. Norris, and M. G. Bawendi, "Measurement and assignment of the size-dependent optical spectrum in CdSe quantum dots," *Physical Review B* **53**, 16338-16346 (1996).
79. A. L. Efros, and M. Rosen, "The electronic structure of semiconductor nanocrystals," *Annual Review of Materials Science* **30**, 475-521 (2000).
80. A. I. Ekimov, F. Hache, M. C. Schanne-Klein, D. Ricard, C. Flytzanis, I. A. Kudryavtsev, T. V. Yazeva, A. V. Rodina, and A. L. Efros, "Absorption and intensity-dependent photoluminescence measurements on CdSe quantum dots:

assignment of the first electronic transitions," J. Opt. Soc. Am. B **10**, 100-107 (1993).

81. H. Fu, L.-W. Wang, and A. Zunger, "Applicability of the k-p method to the electronic structure of quantum dots," Physical Review B **57**, 9971-9987 (1998).

82. A. L. Efros, and M. Rosen, "Comment on ``Comparison of the k [center-dot] p and the direct diagonalization approaches for describing the electron structure of quantum dots" [Appl. Phys. Lett. [bold 71], 3433 (1997)]," Applied Physics Letters **73**, 1155-1156 (1998).

83. H. Fu, L.-W. Wang, and A. Zunger, "Response to ``Comment on `Comparison of the k [center-dot] p and the direct diagonalization approaches for describing the electronic structure of quantum dots' " [Appl. Phys. Lett. [bold 73], 1155 (1998)]," Applied Physics Letters **73**, 1157-1158 (1998).

84. N. Gaponik, D. V. Talapin, A. L. Rogach, K. Hoppe, E. V. Shevchenko, A. Kornowski, A. Eychmüller, and H. Weller, "Thiol-Capping of CdTe Nanocrystals: An Alternative to Organometallic Synthetic Routes," The Journal of Physical Chemistry B **106**, 7177-7185 (2002).

85. D. B. Almeida, "Pontos quânticos coloidais de semicondutores II-VI encapsados com SiO₂," in *IFGW(UNICAMP, 2008)*.

86. C. S. Vieira, D. B. Almeida, A. A. de Thomaz, R. F. Menna-Barreto, J. R. dos Santos-Mallet, C. L. Cesar, S. A. Gomes, and D. Feder, "Studying nanotoxic effects of CdTe quantum dots in *Trypanosoma cruzi*," Mem Inst Oswaldo Cruz **106**, 158-165 (2011).

87. D. Feder, S. A. Gomes, A. A. de Thomaz, D. B. Almeida, W. M. Faustino, A. Fontes, C. V. Stahl, J. R. Santos-Mallet, and C. L. Cesar, "In vitro and in vivo

documentation of quantum dots labeled *Trypanosoma cruzi*--*Rhodnius prolixus* interaction using confocal microscopy," *Parasitol Res* **106**, 85-93 (2009).

88. P. Dagtepe, V. Chikan, J. Jasinski, and V. J. Leppert, "Quantized Growth of CdTe Quantum Dots; Observation of Magic-Sized CdTe Quantum Dots," *The Journal of Physical Chemistry C* **111**, 14977-14983 (2007).

89. M. E. Soffner, "Efeito Anômalo nas medidas de lente térmica em vidros com pontos quânticos de CdTe," in *IFGW*(UNICAMP, 2005).

90. Y. P. Varshni, "Temperature dependence of the energy gap in semiconductors," *Physica* **34**, 149-154 (1967).

91. F. G. Sanchez-Almazan, H. Navarro-Contreras, G. Ramirez-Flores, M. A. Vidal, O. Zelaya-Angel, M. E. Rodriguez, and R. Baquero, "Temperature dependence of the band gap of Cd_{1-x}Zn_xTe alloys of low zinc concentrations," *Journal of Applied Physics* **79**, 7713-7717 (1996).

92. M. L. Redígolo, "Caracterização óptica de pontos quânticos de CdTe em matriz vítrea," in *IFGW*(Tese de Doutorado, UNICAMP, 2002).

93. A. M. de Paula, L. C. Barbosa, C. H. B. Cruz, O. L. Alves, J. A. Sanjurjo, and C. L. Cesar, "Size effects on the phonon spectra of quantum dots in CdTe-doped glasses," *Applied Physics Letters* **69**, 357-359 (1996).

94. W. B. Amos, and J. G. White, "How the Confocal Laser Scanning Microscope entered Biological Research," *Biology of the Cell* **95**, 335-342 (2003).

95. P. Schuille, "Fluorescence correlation spectroscopy and its potential for intracellular applications," *Cell Biochemistry and Biophysics* **34**, 383-408 (2001).

96. R. Rigler, U. Mets, J. Widengren, and P. Kask, "FLUORESCENCE CORRELATION SPECTROSCOPY WITH HIGH COUNT RATE AND LOW-

BACKGROUND - ANALYSIS OF TRANSLATIONAL DIFFUSION," European Biophysics Journal with Biophysics Letters **22**, 169-175 (1993).

97. R. Rigler, and U. Mets, "Diffusion of single molecules through a Gaussian laser beam," 239-248 (1993).

98. A. A. d. Thomaz, "Ferramenta Biofotônica Integrada para Manipulações e Microscopias Confocais," (Tese de Mestrado, UNICAMP, 2007).

99. O. Krichevsky, and G. Bonnet, "Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications," Reports on Progress in Physics **65**, 251-297 (2002).

100. P. Schwille, F. Oehlenschläger, and N. G. Walter, "Quantitative hybridization kinetics of DNA probes to RNA in solution followed by diffusional fluorescence correlation analysis," Biochemistry **35**, 10182-10193 (1996).

101. S. T. Hess, and W. W. Webb, "Focal volume optics and experimental artifacts in confocal fluorescence correlation spectroscopy," Biophysical Journal **83**, 2300-2317 (2002).

102. A. G. Palmer, 3rd, and N. L. Thompson, "Theory of sample translation in fluorescence correlation spectroscopy," Biophys J **51**, 339-343 (1987).

103. J. Widengren, U. Mets, and R. Rigler, "Fluorescence correlation spectroscopy of triplet states in solution: a theoretical and experimental study," The Journal of Physical Chemistry **99**, 13368-13379 (1995).

104. S. P., and H. E., "Fluorescence Correlation Spectroscopy An Introduction to its Concepts and Applications," <http://www.biophysics.org/Portals/1/PDFs/Education/schwille.pdf>.

105. S. Doose, J. M. Tsay, F. Pinaud, and S. Weiss, "Comparison of photophysical and colloidal properties of biocompatible semiconductor nanocrystals using fluorescence correlation spectroscopy," *Anal Chem* **77**, 2235-2242 (2005).
106. C. T. Culbertson, S. C. Jacobson, and J. Michael Ramsey, "Diffusion coefficient measurements in microfluidic devices," *Talanta* **56**, 365-373 (2002).
107. L. Korson, W. Drost-Hansen, and F. J. Millero, "Viscosity of water at various temperatures," *The Journal of Physical Chemistry* **73**, 34-39 (1969).
108. K. T. Shimizu, R. G. Neuhauser, C. A. Leatherdale, S. A. Empedocles, W. K. Woo, and M. G. Bawendi, "Blinking statistics in single semiconductor nanocrystal quantum dots," *Physical Review B* **63**, 205316 (2001).
109. R. F. Heuff, J. L. Swift, and D. T. Cramb, "Fluorescence correlation spectroscopy using quantum dots: advances, challenges and opportunities," *Physical Chemistry Chemical Physics* **9**, 1870-1880 (2007).
110. T. Liedl, S. Keller, F. C. Simmel, J. O. Radler, and W. J. Parak, "Fluorescent nanocrystals as colloidal probes in complex fluids measured by fluorescence correlation spectroscopy," *Small* **1**, 997-1003 (2005).
111. W. W. Yu, L. Qu, W. Guo, and X. Peng, "Experimental Determination of the Extinction Coefficient of CdTe, CdSe, and CdS Nanocrystals," *Chemistry of Materials* **15**, 2854-2860 (2003).
112. A. A. d. Thomaz, "Ferramenta Biofotônica Integrada para Manipulações e Microscopias Confocais," Tese de Mestrado orientada por Carlos Lenz Cesar (2007).

113. F. S. van Dijk, J. M. Cobben, A. Kariminejad, A. Maugeri, P. G. Nikkels, R. R. van Rijn, and G. Pals, "Osteogenesis Imperfecta: A Review with Clinical Examples," in *Mol Syndromol*(2011), pp. 1-20.
114. R. M. Haralick, K. Shanmugam, and I. h. Dinstein, "Textural Features for Image Classification," *Systems, Man and Cybernetics, IEEE Transactions on SMC-3*, 610-621 (1973).
115. M. W. Conklin, P. P. Provenzano, K. W. Eliceiri, R. Sullivan, and P. J. Keely, "Fluorescence Lifetime Imaging of Endogenous Fluorophores in Histopathology Sections Reveals Differences Between Normal and Tumor Epithelium in Carcinoma In Situ of the Breast," *Cell Biochemistry and Biophysics* **53**, 145-157 (2009).
116. K. W. Eliceiri, C. H. Fan, G. E. Lyons, and J. G. White, "Analysis of histology specimens using lifetime multiphoton microscopy," *Journal of Biomedical Optics* **8**, 376-380 (2003).