



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

ARTHUR CÉSARE MESSIAS VIANA PEREIRA

**ESPECTROSCOPIA NÃO LINEAR E GERAÇÃO DE IMAGEM FOTOACÚSTICA
COM NANOPARTÍCULAS DE NITRETO DE TITÂNIO**

Recife

2021

ARTHUR CÉSARE MESSIAS VIANA PEREIRA

**ESPECTROSCOPIA NÃO LINEAR E GERAÇÃO DE IMAGEM FOTOACÚSTICA
COM NANOPARTÍCULAS DE NITRETO DE TITÂNIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Física.

Área de concentração: Óptica.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Stevens
Leônidas Gomes

Recife

2021

Catálogo na fonte
Bibliotecária Monick Raquel Silvestre da S. Portes, CRB4-1217

P436e Pereira, Arthur Césare Messias Viana
Espectroscopia não linear e geração de imagem fotoacústica com nanopartículas de nitreto de titânio / Arthur Césare Messias Viana Pereira. – 2021.
82 f.: il., fig.

Orientador: Anderson Stevens Leônidas Gomes.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN, Física, Recife, 2021.
Inclui referências.

1. Óptica. 2. Fotoacústica. I. Gomes, Anderson Stevens Leônidas (orientador). II. Título.

535.2 CDD (23. ed.) UFPE- CCEN 2021 - 125

ARTHUR CÉSARE MESSIAS VIANA PEREIRA

**ESPECTROSCOPIA NÃO LINEAR E GERAÇÃO DE IMAGEM FOTOACÚSTICA
COM NANOPARTÍCULAS DE NITRETO TITÂNIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Física.

Aprovada em: 23/07/2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Anderson Stevens Leônidas Gomes
Orientador
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Lúcio Hora Acioli
Examinador Interno
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Denise Maria Zezell
Examinadora Externa
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

AGRADECIMENTOS

Agraço à minha família, em especial minha mãe e meus irmãos, pelo exemplo e por todo carinho, apoio e por sempre acreditarem em mim.

À minha namorada, Bruna, pelo carinho, compreensão e que, apesar da distância, sempre se fez presente.

Ao meu orientador, prof. Dr. Anderson Gomes, pela confiança, apoio e ensinamentos que foram fundamentais para a minha formação.

Aos meus colegas de laboratório: Edwin, Cecília, Polly, Manoel, Jéssica e, principalmente, Avishek Das, pela amizade e por toda a ajuda que obtive durante essa jornada.

Aos amigos que fiz na UFBA, em especial Tales, Álvaro e Gabriel, que além da amizade, estavam sempre dispostos a esclarecerem eventuais dúvidas.

Agradeço também aos professores que ministraram as disciplinas que cursei. Apesar das provas desafiadoras (às vezes com duração de 14h), contribuíram fortemente para a minha formação e para o meu conhecimento.

À FACEPE pelo auxílio financeiro sem o qual esse trabalho não poderia ser concluído.

RESUMO

A fotoacústica é uma técnica de caracterização óptica multimodal que vem sendo altamente explorada no estudo de efeitos não lineares oriundos da absorção de um ou mais fótons e em processos de imageamento. A geração de imagem é essencial para realização de diagnóstico e uma maneira de se obter uma imagem de melhor qualidade é por meio do uso de agentes de contraste biológicos. Recentemente, nanopartículas plasmônicas, como o nitreto de titânio (TiN), vem sendo usadas como agentes de contraste biológico por terem uma baixa toxicidade, além de uma alta mobilidade intracelular. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a resposta fotoacústica de nanopartículas esféricas de TiN para aplicações em diagnóstico por imagem. Este trabalho está dividido em 4 capítulos, sendo o primeiro deles uma introdução geral. No capítulo 2, descrevemos os fundamentos do efeito fotoacústico, suas equações e as técnicas que serão exploradas, como a espectroscopia fotoacústica e o imageamento fotoacústico. No capítulo 3, trazemos a montagem experimental para dois sistemas que serão utilizados para medidas: um de espectroscopia fotoacústica e outro de imageamento fotoacústico, bem como os seus respectivos programas de aquisição de dados desenvolvidos em LABVIEW. Em seguida, no capítulo 4, apresentamos os resultados obtidos com as nanopartículas de TiN. Os resultados mostram uma semelhança entre o espectro de absorção óptico e o espectro fotoacústico medido quando utilizado o sistema desenvolvido, apresentando um pico de absorção em 700 nm, que se encontra dentro da primeira janela biológica, o que auxilia em um melhor imageamento. Além disso, com o auxílio de uma lente de distância focal de 100 mm, foi possível realizar microscopia fotoacústica com uma resolução de 50 μm e com um excelente contraste. Com essa mesma resolução, foram obtidos resultados com excitação e aquisição da imagem fotoacústica com excelente contraste através de tecido biológico com 1 mm de espessura a partir de um feixe de 700 nm e 1064 nm. O imageamento em 1064 nm apresentou um melhor contraste devido à absorção de dois fótons no material, fenômeno esse que foi comprovado através de medidas de não linearidade de TiN nesse comprimento de onda específico.

Palavras Chave: fotoacústica; nanopartículas de TiN; imageamento fotoacústico.

ABSTRACT

Photoacoustics is a multimodal optical characterization technique that has been highly explored in the study of non-linear effects arising from the absorption of one or many photons as well as in image generation. Imaging is essential for making diagnosis possible and one way to obtain a better quality image is using biological contrast agents. Recently, plasmonic nanoparticles, such as titanium nitride (TiN), have been used as biological contrast agent due to their low toxicity and high intracellular mobility. Thus, the objective of this work was to study the photoacoustic response of spherical titanium nitride (TiN) nanoparticles for diagnostic imaging applications. This work is divided into 4 chapters, the first of which is a general introduction. In chapter 2, we describe the fundamentals of the photoacoustic effect, its equations and the techniques that will be explored, such as photoacoustic spectroscopy and photoacoustic imaging. In chapter 3, we discuss the experimental setup for two systems that will be used: one for photoacoustic spectroscopy (PAS) and another for photoacoustic imaging (PAI), as well as their respective data acquisition programs in LABView. Then, in chapter 4, we present the results obtained with TiN nanoparticles. The results show a similarity between the optical spectrum and the photoacoustic absorption spectrum measured when using the developed system, presenting an absorption peak at 700 nm, which lays in the first biological window, which helps in a better imaging. Furthermore, with the aid of a 100 mm focal length lens, it was possible to perform a photoacoustic microscopy with a resolution of 50 μm and with excellent contrast. With this same resolution, results were obtained with excitation and acquisition of photoacoustic imaging with excellent contrast through biological tissue 1 mm thick from a beam of 700 nm and 1064 nm. The 1064 nm imaging showed a better contrast due to the absorption of two photon in the material, phenomenon that was proven through measurements of non-linearity of TiN at this specific wavelength using photoacoustics technique.

Keywords: photocacoustics; TiN nanoparticles; photoacoustic imaging.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Utilização de diferentes escalas para o imageamento fotoacústico	15
Figura 2 -	Princípio de funcionamento de um laser	16
Figura 3 -	Esquematização representando a emissão estimulada	17
Figura 4 -	Diagrama de níveis representando a absorção de um fóton (1PA).....	19
Figura 5 -	Diagrama de níveis representando a absorção de dois fótons (TPA)	20
Figura 6 -	Esquematização do processo de ressonância de plasmon de superfície	32
Figura 7 -	Exemplo de sinal fotoacústico obtido através de um osciloscópio para detectar falhas na superfície de materiais.	40
Figura 8 -	Resultado comparativo entre o primeiro imageamento fotoacústico e imageamentos convencionais.....	41
Figura 9 -	Montagem experimental do sistema de espectroscopia fotoacústica (PAS)	45
Figura 10 -	Interface do programa de aquisição desenvolvido em LABView para o sistema de espectroscopia fotoacústica (PAS).....	46
Figura 11 -	Espectro de absorção obtido através do programa de aquisição de PAS descrito acima para a Rodamina 6G	47
Figura 12 -	Gráfico do logaritmo do sinal fotoacústico da rodamina 6G e do pó de carvão em função do logaritmo da fluência óptica para comprovar a linearidade das amostras	48
Figura 13 -	Montagem experimental do sistema de imageamento fotoacústico (PAI)	50
Figura 14 -	Interface do programa de aquisição desenvolvido em LABView para o sistema de imageamento fotoacústico (PAI).....	51
Figura 15 -	Fluxograma representando o funcionamento do programa de aquisição desenvolvido em LABView para o sistema de imageamento fotoacústico (PAI)	52
Figura 16 -	(a) Figura real de 3 lâminas de grafite; (b) Imageamento realizado utilizando o programa desenvolvido, $\lambda = 532$ nm.....	53
Figura 17 -	Imageamento de um fio de cabelo humano; (a) Foto original; (b) Imagem ampliada; (c) Imageamento realizado, $\lambda = 532$ nm.....	54
Figura 18 -	À esquerda, imagem original de um QR Code e à direita o imageamento realizado com $\lambda = 532$ nm.....	54

Figura 19 -	(a) Sistema para síntese das nanopartículas de nitreto de titânio; (b) Distribuição contendo o tamanho de TiN Nps.....	56
Figura 20 -	Espectro de absorção da primeira amostra de nanopartículas de TiN	57
Figura 21 -	Espectro de absorção normalizado utilizando a espectroscopia fotoacústica (PAS) para a primeira amostra de TiN NPs.....	58
Figura 22 -	Comparação entre os espectros de absorção normalizados utilizando a espectroscopia fotoacústica e o espectrofotômetro.....	59
Figura 23 -	(a) Imagem das amostras (da esq. para dir.): TiN/Acetone NPs 100%, TiN/Acetone Nps 50%, acetona e água deionizada; (b) PAI do sistema, $\lambda = 700$ nm	60
Figura 24 -	(a) TiN NPs/Acetone em um eppendorf de 2 mL; (b) Imagem aproximada da região a ser escaneada; (c) PAI da amostra, $\lambda = 700$ nm	61
Figura 25 -	Espectro de absorção da segunda amostra de nanopartículas de TiN.....	62
Figura 26 -	PAI da segunda amostra de TiN NPs/Acetone utilizando diferentes comprimentos de onda; (a) 635 nm; (b) 532 nm.....	63
Figura 27 -	(a) Amostra de TiN NPs/Acetone a ser feito o imageamento; (b) PAI sem o tecido biológico; (c) PAI utilizando tecido biológico com 1mm de espessura. Medidas realizadas com $\lambda = 700$ nm.....	64
Figura 28 -	(a) Imagem real fornecendo o tamanho das nanopartículas, indicando um diâmetro de aproximadamente 100 nm; (b) espectro de absorção da terceira amostra de TiN NPs	66
Figura 29 -	PAI da terceira amostra de TiN NPs em diferentes comprimentos de onda: (a) 532 nm; (b) 725 nm; (c) 880 nm.....	67
Figura 30 -	Gráfico do logaritmo do sinal fotoacústico para diferentes comprimentos de onda em função do logaritmo da fluência óptica para verificar a absorção de dois fótons (TPA)	68
Figura 31 -	Gráfico do logaritmo do sinal fotoacústico em função do logaritmo da fluência óptica para $\lambda = 532$ nm a fim de verificar a absorção de dois fótons (TPA)	69
Figura 32 -	Gráfico do logaritmo do sinal fotoacústico em função do logaritmo da fluência óptica para $\lambda = 1064$ nm a fim de comprovar a absorção de dois fótons (TPA)	70
Figura 33 -	PAI da terceira amostra de TiN NPs com 1mm de tecido biológico	71

LISTA DE ABREVIACOES

1PA	Absorção de Um Fóton
C-BNPs	Nanoprtculas Baseadas em Carbono
CT	Tomografia Computadorizada
DOF	Profundidade de Foco
LNPs	Nanoprtculas Luminescentes
MNPs	Nanoprtculas Metálicas
NPs	Nanoprtculas
Nd	Neodímio
OCT	Tomografia ptica por Coerência
ONPs	Nanoprtculas Orgânicas
OPO	Oscilador ptico Paramétrico
PA	Sinal Fotoacústico
PAI	Imageamento Fotoacústico
PAM	Microscopia Fotoacústica
PAS	Espectroscopia Fotoacústica
PET	Tomografia por Emissão de Psitrn
QDs	<i>Quantum Dots</i>
RENPs	Nanocristais Dopados com Terra Rara
Rh	Rodamina
SPR	Ressonância de Plsmons de Superfície
TiN	Nitreto de Titânio
TPA	Absorção de Dois Fótons
YAG	<i>Yttrium Aluminium Garnet</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

h	Constante de Planck
ν	Frequência do Fóton
E_1	Energia do Estado Inicial
E_2	Energia do Estado Final
a	Coefficiente de Absorção
a_0	Coefficiente de Absorção Linear
b	Coefficiente de Absorção Não Linear
I	Intensidade do Feixe de Luz Incidente
V	Volume
P	Pressão
T	Temperatura
κ_T	Compressibilidade Isotérmica
β	Expansividade Térmica
\vec{r}	Vetor Posição
r_{th}	Tempo de Confinamento Térmico
r_s	Tempo de Confinamento de Pressão
d	Resolução Espacial
α_{th}	Difusividade Térmica
r_L	Duração do Pulso do Laser
E_a	Densidade de Energia Absorvida
ρ	Densidade de massa
C_V	Capacidade Térmica a Volume Constante
C_P	Capacidade Térmica a Pressão Constante
Γ	Parâmetro de Gruneisen
t	Tempo
\vec{u}	Vetor Velocidade do Fluido
ρ_0	Densidade de massa inicial
δ	Varição Infinitesimal da Densidade

p	Varição Infinitesimal da Pressão
r	Varição Infinitesimal da Temperatura
γ	Coefficiente de Compressão Adiabática
κ_s	Compressibilidade Adiabática
K	Condutividade Térmica
σ	Varição Infinitesimal da Entropia
$\epsilon(t)$	Energia Térmica por Unidade de Massa
$H(t)$	Energia Térmica
S	Entropia
\vec{F}	Força
$\vec{\mathfrak{F}}$	Tensor Fluxo de Momento
v_s	Velocidade do Som no Meio
N_{abs}	Número de Fótons Absorvidos
$E_L(\vec{r}, t)$	Densidade de Energia do Feixe
$\sigma^{(2)}$	Seção Transversal de Absorção de Dois Fótons
C	Concentração da Amostra
$S(\vec{r})$	Componente Espacial da Fluência do Laser
$E_L(t)$	Componente Temporal da Fluência do Laser
λ	Comprimento de Onda
n	Índice de Refração do Meio
$N.A.$	Abertura Numérica da Lente
Θ	Distância
σ_{ext}	Seção de Choque de Extinção
\vec{k}	Vetor de Onda
W_{ext}	Potência da Luz Extinta
W_{abs}	Potência de Luz Absorvida
W_{sca}	Potência de Luz Espalhada
σ_{abs}	Seção de Choque de Absorção
σ_{sca}	Seção de Choque de Espalhamento

$\Psi(x)$ e $\xi(x)$	Funções de Ricatti-Bessel
R	Raio da Nanopartícula Esférica
J_l	Função de Bessel de Primeira Ordem
Y_l	Função de Bessel de Segunda Ordem
σ_{geo}	Seção de Choque Geométrica
Q_{sca}	Eficiência para o Processo de Espalhamento
ϵ_i	Constante Dielétrica do Meio "i"

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1	FONTES DE LUZ E LASER.....	16
2.2	FENÔMENO DE ABSORÇÃO.....	18
2.3	GERAÇÃO E DETECÇÃO DO EFEITO FOTOACÚSTICO	20
2.3.1	Absorção de Dois Fótons (TPA) e a Fotoacústica.....	28
2.3.2	Nanopartículas como agentes de contraste biológico	31
2.4	RESSONÂNCIA DE PLASMONS DE SUPERFÍCIE.....	32
2.5	TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO FOTOACÚSTICA	37
2.5.1	Espectroscopia Fotoacústica (PAS)	37
2.5.2	Microscopia Fotoacústica (PAM).....	39
3	IMPLEMENTAÇÃO EXPERIMENTAL DE UM SISTEMA DE ESPECTROSCÓPIA FOTOACÚSTICA	43
3.1	MONTAGEM EXPERIMENTAL DO SISTEMA DE ESPECTROSCÓPIA FOTOACÚSTICA (PAS).....	43
3.2	PROGRAMA DE AQUISIÇÃO (PAS)	45
3.3	MONTAGEM EXPERIMENTAL DO SISTEMA DE IMAGEAMENTO FOTOACÚSTICO (PAI)	48
3.4	PROGRAMA DE AQUISIÇÃO (PAI)	50
4	RESULTADOS EXPERIMENTAIS COM NANOPARTÍCULAS DE TiN	55
4.1	SÍNTESE DAS AMOSTRAS	55
4.2	CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE TiN POR TÉCNICAS FOTOACÚSTICAS	57
4.2.1	Amostra #1	57
4.2.2	Amostra #2	61
4.2.3	Amostra #3	66
5	CONCLUSÃO	73
5.1	TRABALHOS FUTUROS	74
	REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO

Na área de biomedicina, é comum o uso de técnicas de imageamento para estudos morfológicos e para uma grande variedade de diagnósticos [1]. Algumas das técnicas mais empregadas são: a ressonância magnética, tomografia computadorizada (CT), tomografia por emissão de pósitron (PET), ultrassom e tomografia óptica por coerência (OCT). Entretanto, a aplicabilidade de cada uma delas é restrita, uma vez que todas apresentam certas desvantagens [2].

A ressonância magnética, além de muito cara, requer um tempo muito grande para realizar o imageamento. Já os exames de tomografia computadorizada e o PET *scan* fazem uso de radiação ionizante, que devido à possibilidade de provocar câncer [3], não devem ser usados com muita frequência [4]. Mesmo com essas considerações, seu uso é bastante amplo devido aos critérios de segurança utilizados.

As técnicas de imagem puramente ópticas, apesar de ainda não tão difundidas comercialmente, proporcionam uma imagem com excelente contraste, mas perdem bastante na resolução e sensibilidade por conta de efeitos como espalhamento [5], levando assim à uma baixa penetração, de aproximadamente 3 cm [6]. O espalhamento da luz por tecido biológico é no mínimo cem vezes maior que o espalhamento das ondas sonoras [7]. Já as técnicas acústicas, como o ultrassom, possuem uma penetração maior (aproximadamente 6 cm) e, apesar de possuírem uma melhor resolução e sensibilidade, já que o espalhamento acústico é muito menor, o contraste é muito menor, sendo incapaz de fornecer informações importantes, como composição química, absorção, metabolismo e mudanças fisiológicas [8].

Sendo assim, o ideal para um bom imageamento seria combinar o contraste que as técnicas puramente ópticas fornecem juntamente com a resolução e a sensibilidade da técnica de ultrassom, devido ao baixo espalhamento das ondas sonoras por tecidos biológicos. Isso é possível através do efeito fotoacústico [2], [6].

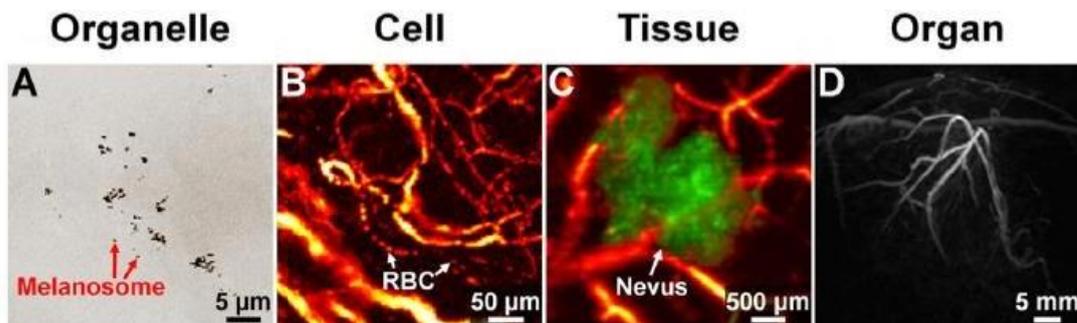
O efeito fotoacústico ocorre quando uma luz de intensidade modulada incide sobre um determinado material. A absorção periódica da luz faz com que o material provoque uma pequena oscilação na sua superfície, gerando assim uma onda sonora, comumente chamada de onda acústica ou fotoacústica [9].

Como o efeito fotoacústico depende exclusivamente da luz absorvida, os efeitos de espalhamento que ocorrem ao incidir na região desejada não interferem na medida. Além disso,

como o sinal produzido pela amostra é uma onda sonora, o efeito de espalhamento até a medição do sinal é muito menor quando comparado com uma medida óptica convencional [10]. O imageamento fotoacústico (PAI) é àquele que faz uso do efeito fotoacústico para a reprodução de imagens [10].

As técnicas de imageamento fotoacústico (PAI) possuem uma grande vantagem com relação às técnicas ópticas convencionais e com relação ao ultrassom. Além de fornecer uma boa resolução, sensibilidade e contraste, é uma técnica não invasiva, não ionizante e mais acessível. Ademais, é capaz de fornecer informações anatômicas, funcionais e a nível molecular [11], sendo possível a realização de angiogramas [12]–[14], detecção de tumores [6], visualização de órgãos [1] e até mesmo organelas [11], [15].

Figura 1 - Utilização de diferentes escalas para o imageamento fotoacústico



Fonte: L.V Wang e S. Hu (2012)

Por se tratar de um fenômeno que depende da absorção do material, é possível o estudo de materiais porosos, sólidos, gases e até mesmo opacos [16]. Através da fotoacústica, é possível também obter espectros de absorção de forma direta [17], estudar a morfologia da amostra [18] e determinar coeficientes de absorção não lineares dos materiais em estudo [19].

A não linearidade de alguns materiais se dá por conta de uma absorção que depende da intensidade de luz incidente [20]. Pelo fato do efeito fotoacústico depender da absorção da amostra, é possível verificar essa dependência simplesmente analisando o sinal medido, tornando-a uma ferramenta prática, rápida e simples para essas medidas [21].

As aplicações da fotoacústica são variadas, desde estudos de propriedades inerentes à amostra, como a não linearidade e a espectroscopia, até um imageamento com uma boa sensibilidade, resolução e um bom alcance de profundidade, fazendo dela uma ferramenta poderosa e o foco de estudo desse trabalho.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

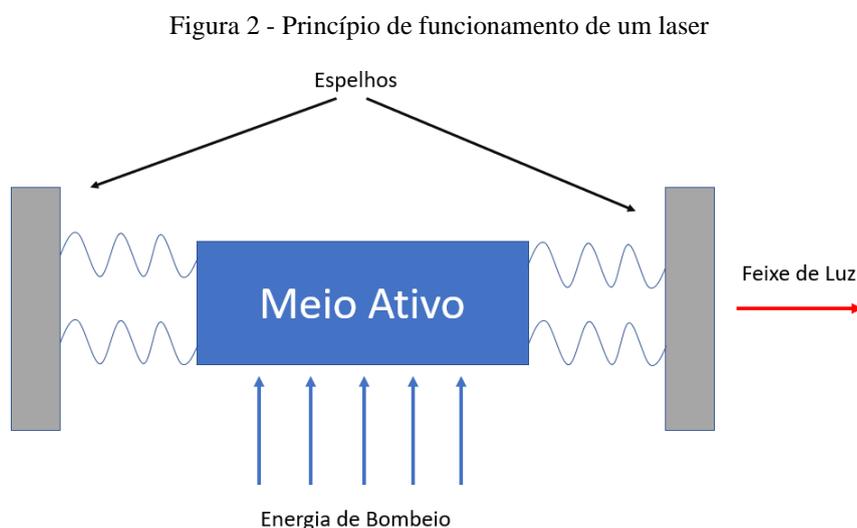
2.1 FONTES DE LUZ E LASER

Uma das maneiras através da qual se é possível estudar as propriedades de um determinado material é observando a sua interação com a luz. Para isso, fontes luminosas são necessárias. As lâmpadas de descarga merecem um certo destaque, pois antes do laser elas eram muito utilizadas em medidas ópticas [17].

As lâmpadas de descarga operam a partir de uma corrente elétrica que passa por um tubo contendo um gás ou uma mistura de gases. Existem lâmpadas de gases nobres (xenon, hélio etc.) e de outros elementos, como hidrogênio e mercúrio.

Já em 1955, Gordon, Zeiger e Townes mostraram ser possível amplificar um sinal de micro-ondas a partir de moléculas de amônia [22]. Eles demonstraram que isso era possível caso ocorresse uma inversão de população com as moléculas de amônia (a maior parte das moléculas estando em um excitado ao invés do estado fundamental) e se elas estivessem confinadas dentro de uma cavidade, gerando assim o primeiro maser (*microwave amplification by stimulated emission of radiation*).

Após três anos, Townes e Schawlow detalharam o funcionamento do maser e propuseram que esse efeito poderia ser estendido para o espectro visível e infravermelho [23]. A partir daí, em 1960, Maiman conseguiu construir o primeiro laser (*light amplification by stimulated emission of radiation*), um laser de rubi, operando em 694 nm [24].

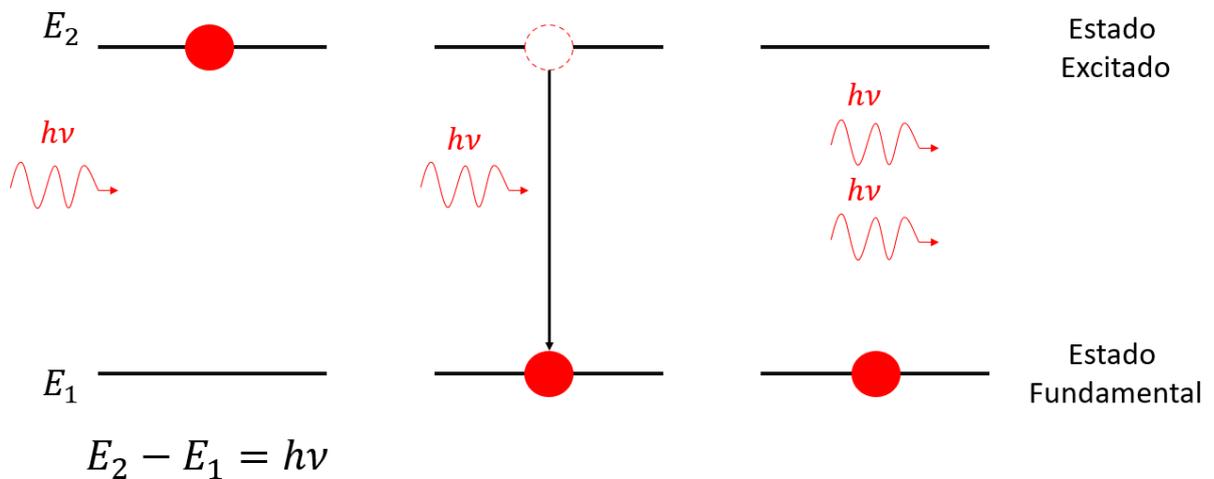


Fonte: O autor (2021)

Para o funcionamento de um laser, é necessário uma energia de bombeio, que pode vir de *flashlamps*, corrente elétrica, descarga gasosa ou até mesmo de outro laser. Esse bombeio serve para a inversão de população do meio ativo. A inversão de população faz com que a maior parte dos átomos estejam em um estado excitado. Esses átomos podem decair para o estado fundamental através de um processo chamado emissão estimulada.

A emissão estimulada é um processo no qual o átomo no estado excitado interage de modo ressonante com um fóton. Isto quer dizer que a energia do fóton incidente é igual à diferença de energia entre o estado excitado e o estado fundamental do átomo. Quando isso acontece, o átomo que antes estava no estado excitado decai para um estado de menor energia e, ao fazer isso, ele emite um fóton com as mesmas propriedades que o fóton incidente (frequência, fase e polarização).

Figura 3 - Esquematização representando a emissão estimulada



Fonte: O autor (2021)

A Fig. 3 acima representa o processo de emissão estimulada. Nela, um fóton com energia $h\nu$ irá interagir com um átomo do meio ativo (representado pelo círculo vermelho) que já se encontra no estado excitado devido à energia de bombeio. Perceba que a diferença de energia entre o estado excitado (E_2) e o estado fundamental (E_1) é igual a energia do fóton incidente ($E_2 - E_1 = h\nu$). Quando ocorre essa interação (figura central), o átomo volta para o estado fundamental e, durante esse processo, ele emite um fóton com energia $h\nu$, representado

na figura à direita. Como o fóton incidente em nenhum momento foi absorvido, o resultado desse fenômeno é um átomo no estado fundamental e dois fótons.

Esse meio ativo, ao ser colocado em uma cavidade óptica, que consiste em um conjunto de espelhos devidamente alinhados, permite com que esses fótons interajam com o meio ativo diversas vezes, funcionando como um sistema de realimentação, permitindo assim que mais fótons possam interagir com as moléculas do meio ativo e, conseqüentemente, amplificando o número de fótons produzidos.

Para permitir que parte do feixe escape da cavidade óptica, é necessário que um dos espelhos deva ser parcialmente refletor, possibilitando assim a transmissão de fótons com uma direção definida pelo eixo da cavidade. O resultado é então um feixe monocromático, colimado e coerente, características únicas em um laser.

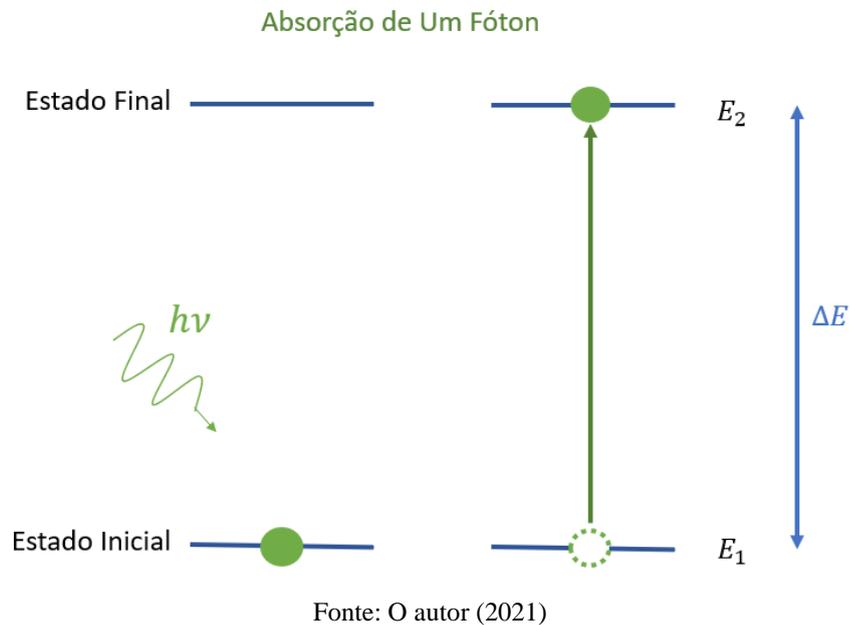
2.2 FENÔMENO DE ABSORÇÃO

A absorção da luz por um meio ocorre se a frequência óptica for ressonante com a frequência dos átomos do meio. A diferença de energia entre o estado excitado e o estado fundamental dos átomos (chamaremos de ΔE) precisa ser igual à energia do fóton emitido pela fonte luminosa, que é calculada através do produto entre a constante de Planck e a frequência do feixe de luz, ou seja:

$$E = h\nu \quad (2.1)$$

Caso $\Delta E = E$ e apenas um fóton seja absorvido, um elétron é ejetado para um estado excitado. Esse fenômeno é conhecido como absorção de um fóton (1PA), que é representado esquematicamente na figura abaixo.

Figura 4 - Diagrama de níveis representando a absorção de um fóton (1PA)



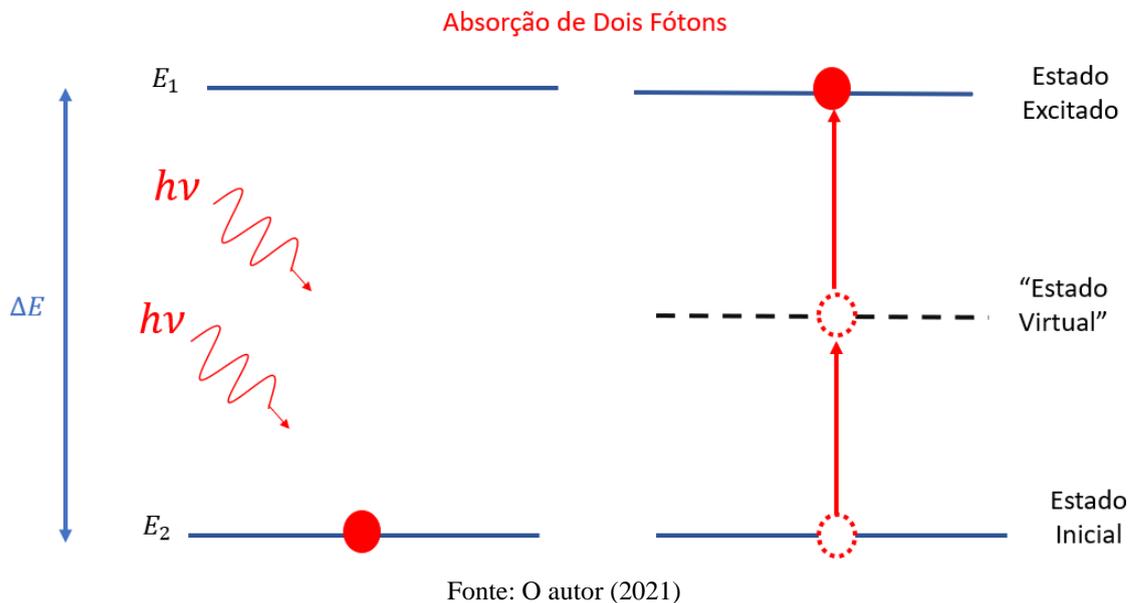
Com o desenvolvimento dos lasers foi possível estudar processos que dependem de uma fonte monocromática muito intensa [25], o que levou ao desenvolvimento da óptica não linear [26]. Foram os desenvolvimentos na óptica não linear que levaram a descrever o coeficiente de absorção, parâmetro que caracteriza a absorção dos materiais, de uma forma mais geral, dada por [20]:

$$a = a_0 + bI \quad (2.2)$$

com I representando a intensidade do feixe, enquanto a_0 e b são os coeficientes de absorção linear e não linear, respectivamente. Isso mostra que para materiais não lineares existe uma dependência com a intensidade do feixe, ou seja, para intensidades muito baixas, a amostra, mesmo sendo não linear, pode vir a ter uma absorção linear, mas à medida que a intensidade da luz que incide na amostra aumenta, efeitos não lineares começam a surgir.

O desenvolvimento do laser, portanto, foi fundamental para observar fenômenos não lineares devido à alta intensidade emitida. Por conta disso foi possível observar o fenômeno de absorção de dois fótons (TPA) [25], visto que esse é um fenômeno não linear. Esse fenômeno foi teorizado em 1930 [27] e descreve a possibilidade de, a partir de um feixe com intensidade suficientemente elevada, se realizar uma transição eletrônica de um estado de menor energia para um estado de maior energia através da absorção de dois fótons.

Figura 5 - Diagrama de níveis representando a absorção de dois fótons (TPA)



Como é necessária uma energia específica por fóton (ΔE) para que a absorção ocorra, é estritamente necessário que a soma das energias de cada fóton seja igual à diferença de energia entre o estado excitado e o estado fundamental. Isso não significa que precisam ser dois fótons iguais, mas que existe uma condição para a soma das frequências, precisando ser muito bem definidas [27], de tal forma que a soma das energias de cada fóton seja igual à diferença de energia entre o estado excitado e o estado fundamental. Além disso, por ser um fenômeno não linear, existe uma dependência direta com a intensidade do feixe, como colocado anteriormente.

2.3 GERAÇÃO E DETECÇÃO DO EFEITO FOTOACÚSTICO

Alexander Bell, em 1880, percebeu que era possível escutar um som proveniente de um sólido caso incidisse uma luz pulsada sobre esse material [28]. Na época, ele percebeu essa propriedade em materiais como o selênio, ouro, prata, platina, entre outros, propondo assim que era uma propriedade da matéria. Um ano depois, Tyndall [29] e Rontgen [30] notaram esse mesmo efeito para gases. Esse fenômeno ficou conhecido como efeito fotoacústico (ou efeito optoacústico). Apesar de inicialmente despertar grande interesse por parte dos cientistas, tal fenômeno ficou esquecido por um certo tempo devido à dificuldade de medição, uma vez que

o sistema de detecção era o ouvido. Apenas com o aperfeiçoamento dos microfones e de novas fontes de luz que os experimentos utilizando o efeito fotoacústico foram retomados. [31].

Em 1976, Rosencwaig e Gersho [9], inspirados pelo modelo de Parker [32], que propunha que a difusão térmica estaria envolvida no processo de geração do efeito fotoacústico, mostraram que a absorção periódica da luz (uma vez que a emissão da luz era pulsada) gera um fluxo periódico de calor em uma fina camada na interface entre a amostra e o meio, provocando um movimento oscilatório, que se propaga como uma onda acústica.

Assim, o efeito fotoacústico é gerado a partir de uma luz de intensidade modulada que, ao incidir na amostra, é absorvida, provoca um aumento na temperatura local, gerando assim uma variação na pressão local, que se propaga como uma onda fotoacústica. Tal onda é então detectada por um transdutor ou um microfone, que tem como função converter o sinal mecânico proveniente da onda acústica em um sinal elétrico, que será posteriormente analisado por algum aparelho de medida.

O aumento da temperatura local provoca também um aumento no volume da amostra, devido à dilatação térmica. Essa variação no volume da amostra depende tanto da temperatura quanto da pressão, logo:

$$V = V(T, P) \quad (2.3)$$

É possível então escrever uma variação infinitesimal no volume como sendo:

$$dV = \left(\frac{\partial V}{\partial P}\right)_T dP + \left(\frac{\partial V}{\partial T}\right)_P dT \quad (2.4)$$

Utilizando a definição da compressibilidade isotérmica (κ_T) e da expansividade térmica (β), definidos por:

$$\kappa_T \equiv -\frac{1}{V} \left(\frac{\partial V}{\partial P}\right)_T \quad \beta \equiv \frac{1}{V} \left(\frac{\partial V}{\partial T}\right)_P \quad (2.5)$$

tem-se que a variação do volume pode ser escrita por:

$$dV = -\kappa_T V dP + \beta V dT \quad (2.6)$$

$$\frac{dV}{V} = -\kappa_T dP + \beta dT \quad (2.7)$$

Como a mudança de temperatura e de pressão são locais, ou seja, depende explicitamente da posição, a equação é escrita por:

$$\frac{dV}{V} = -\kappa_T dP(\vec{r}) + \beta dT(\vec{r}) \quad (2.8)$$

Entretanto, existe uma condição na qual é possível considerar a variação do volume como sendo desprezível. Para isso, deve-se considerar dois tempos característicos: o tempo de confinamento térmico (r_{th}) e o tempo de confinamento de pressão (r_s), que são dados por:

$$r_{th} = \frac{d^2}{\alpha_{th}} \quad r_s = \frac{d}{v} \quad (2.9)$$

em que d é a resolução espacial, v é a velocidade do som no meio e α_{th} é difusividade térmica do meio.

Para a situação em que a duração do pulso do laser (t_L) for menor que o tempo de confinamento de pressão e o confinamento térmico, ou seja:

$$t_L < r_{th} \quad e \quad t_L < r_s \quad (2.10)$$

a excitação da luz termina antes do calor se difundir pelo meio e da onda acústica gerada se propagar para fora da região iluminada. Assim, caso tal condição seja satisfeita, resulta-se em:

$$dV = 0 \quad (2.11)$$

e, conseqüentemente,

$$\kappa_T dP(\vec{r}) = \beta dT(\vec{r}) \quad (2.12)$$

Sendo assim, a pressão inicial obtida após a absorção da luz pode ser escrita como:

$$P_0(\vec{r}) = \frac{\beta \Delta T(\vec{r})}{\kappa_T} \quad (2.13)$$

O aumento da temperatura local $\Delta T(\vec{r})$ depende da densidade de energia absorvida no ponto \vec{r} , que pode ser escrita por:

$$\Delta T(\vec{r}) = \frac{E_a(\vec{r})}{\rho C_V} \quad (2.14)$$

onde $E_a(\vec{r})$ é a densidade de energia absorvida no ponto \vec{r} (J/cm^3), ρ é a densidade da amostra (kg/cm^3) e C_V é a capacidade térmica a volume constante ($\text{J}/(\text{kg}^\circ\text{C})$).

Logo, substituindo a relação (2.14) na equação (2.13):

$$P_0(\vec{r}) = \frac{\beta}{\kappa_T} \left(\frac{E_a}{\rho C_V} \right) \quad (2.15)$$

$$P_0(\vec{r}) = \frac{\beta}{\kappa_T \rho C_V} E_a = \Gamma E_a(\vec{r}) \quad (2.16)$$

onde Γ é o parâmetro de Grüneisen (adimensional).

É possível perceber que a variação da pressão local, responsável por originar a onda fotoacústica, é proporcional apenas à absorção do material. Dessa forma, efeitos como espalhamento, difração e refração, que influenciam nas medidas ópticas, não interferem no sinal fotoacústico.

Entretanto, essa variação na pressão que dá origem ao efeito fotoacústico deve ocorrer de forma pulsada. Para mostrar essa condição, partimos da equação da continuidade para um fluxo de massa:

$$\frac{\partial \rho(\vec{r}, t)}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho(\vec{r}, t) \vec{u}) = 0 \quad (2.17)$$

De agora em diante, para não carregar a notação, iremos omitir as dependências das grandezas. Ao introduzir novas grandezas, iremos explicitar sua dependência, mas em seguida omitiremos novamente. Considerando a densidade inicial como sendo ρ_0 , uma variação infinitesimal na densidade da amostra é escrita como sendo $\rho = \rho_0 + \delta$, com δ sendo uma variação infinitesimal da densidade. Dessa forma, teremos que:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = \frac{\partial \delta}{\partial t} \quad e \quad d\rho = \delta \quad (2.18)$$

Escrevendo a densidade como sendo uma função da pressão e da temperatura, uma mudança infinitesimal (δ) pode ser escrita como:

$$d\rho = \delta = \left(\frac{\partial \rho}{\partial P} \right)_T p + \left(\frac{\partial \rho}{\partial T} \right)_P r \quad (2.19)$$

onde p e r são variações infinitesimais na pressão e temperatura, respectivamente. Para fluidos ideais, essa equação pode ser reescrita da seguinte forma [33]:

$$\delta = \gamma \rho \kappa_s \left(p - \frac{\beta}{\kappa_T} r \right) \quad (2.20)$$

com γ sendo o coeficiente de compressão adiabática. A partir de (2.18), vemos que a derivada temporal que aparece nas equações (2.17) pode ser escrita como sendo uma derivada temporal em δ que, o que faz com que a equação (2.18) possa ser escrita por:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = \frac{\partial \delta}{\partial t} = \gamma \rho \kappa_s \frac{\partial}{\partial t} (p - \alpha r) \quad (2.21)$$

onde fizemos $\alpha = \beta/\kappa_T$. Pela equação de difusão térmica com uma fonte de calor, podemos escrever que, para um fluido invíscido, ou seja, sem viscosidade:

$$T \frac{\partial \sigma}{\partial t} = K \nabla^2 r + \epsilon(t) \quad (2.22)$$

onde K é a condutividade térmica, σ é um aumento infinitesimal na entropia e a função $\epsilon(t)$ é energia térmica introduzida ao sistema por unidade de massa, ou seja:

$$\epsilon(t) = \frac{H(t)}{\rho} \quad (2.23)$$

com $H(t)$ definido como a energia térmica. Uma vez que σ é uma entropia infinitesimal (dS), sendo ela função da pressão e temperatura, podemos escrever, portanto:

$$\sigma = \left(\frac{\partial S}{\partial P} \right)_T p + \left(\frac{\partial S}{\partial T} \right)_P r \quad (2.24)$$

que podemos escrever como:

$$\sigma = \frac{C_P}{T} \left(r - \frac{\gamma - 1}{\alpha \gamma} p \right) \quad (2.25)$$

Manipulando os termos:

$$\frac{T\sigma}{C_P} \alpha \gamma = \gamma(\alpha r - p) + p \quad (2.26)$$

$$\frac{p}{\gamma} - \frac{\alpha}{C_P} T\sigma = (p - \alpha r) \quad (2.27)$$

que é exatamente o termo que precisa ser derivado na equação (2.21). Dessa forma, a partir da equação (2.27), teremos:

$$\frac{\partial}{\partial t}(p - \alpha r) = \frac{\partial}{\partial t} \left(\frac{p}{\gamma} - \frac{\alpha}{C_P} T \sigma \right) \quad (2.28)$$

$$\frac{\partial}{\partial t}(p - \alpha r) = \frac{1}{\gamma} \frac{\partial p}{\partial t} - \frac{\alpha}{C_P} \left(T \frac{\partial \sigma}{\partial t} \right) \quad (2.29)$$

O termo entre parênteses do lado direito da equação acima é dado pela equação (2.22) e, considerando que não há condução térmica [33], sobra apenas a contribuição externa $\epsilon(t)$, ou seja:

$$\frac{\partial}{\partial t}(p - \alpha r) = \frac{1}{\gamma} \frac{\partial p}{\partial t} - \frac{\alpha}{C_P} \epsilon \quad (2.30)$$

Assim, a equação da continuidade pode ser escrita por:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \vec{u}) = 0 \quad (2.31)$$

$$\frac{\partial \delta}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \vec{u}) = 0 \quad (2.32)$$

$$\gamma \rho \kappa_s \left(\frac{1}{\gamma} \frac{\partial p}{\partial t} - \frac{\alpha}{C_P} \epsilon \right) + \nabla \cdot (\rho \vec{u}) = 0 \quad (2.33)$$

Ao derivar a equação (2.33) com relação ao tempo, ficaremos com:

$$\rho \kappa_s \frac{\partial^2 p}{\partial t^2} - \frac{\alpha \gamma \rho \kappa_s}{C_P} \frac{\partial \epsilon}{\partial t} + \nabla \cdot \left(\frac{\partial}{\partial t} \rho \vec{u} \right) = 0 \quad (2.34)$$

A equação da continuidade para o momento nos fornece [33]:

$$\frac{\partial}{\partial t} \rho \vec{u} = \vec{F} - \nabla p - \nabla \cdot (\vec{\mathfrak{S}}) \quad (2.35)$$

onde \vec{F} é a força agindo em um determinado volume e $\vec{\mathfrak{S}}$ é o tensor fluxo de momento. Considerando fluidos ideais, é possível fazer as seguintes aproximações:

$$\begin{aligned}
\kappa_s &= \frac{1}{\gamma p} \left(\frac{\partial \rho}{\partial P} \right)_T = \frac{1}{\gamma P} \\
\beta &= -\frac{1}{\rho} \left(\frac{\partial \rho}{\partial T} \right)_P = -\frac{1}{T} \\
\alpha &= \frac{\beta}{\kappa_T} = \left(\frac{\partial P}{\partial T} \right)_V = \frac{P}{T}
\end{aligned} \tag{2.36}$$

Assim, ao substituir a equação (2.35) e as relações em (2.36) na equação (2.34), ficaremos com:

$$\rho \kappa \frac{\partial^2 p}{\partial t^2} - \frac{\rho}{C_p T} \frac{\partial \epsilon}{\partial t} + \nabla \cdot (\vec{F} - \nabla p - \nabla \cdot (\vec{S})) = 0 \tag{2.37}$$

Para o caso em que não há um movimento abrupto do fluido, é possível, em uma boa aproximação [33], considerar que o divergente da força como sendo nulo e assim ficaremos com:

$$\rho \kappa_s \frac{\partial^2 p}{\partial t^2} - \frac{1}{C_p T} \frac{\partial(\rho \epsilon)}{\partial t} - \nabla^2 p = 0 \tag{2.38}$$

$$\left(\nabla^2 - \frac{1}{v_s^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \right) p = -\frac{\beta}{C_p} \frac{\partial H}{\partial t} \tag{2.39}$$

onde $v_s = 1/\sqrt{\rho \kappa_s}$ é a velocidade do som no meio.

O lado esquerdo da equação (2.39) é uma equação de onda que tem o termo do lado direito como fonte. Isso quer dizer que para gerar a onda acústica, é necessário um fluxo de energia térmica dependente do tempo. Assim, o efeito fotoacústico só ocorre em situações na qual há uma variação temporal do feixe que incide sobre a amostra, como é o caso de feixes pulsados [10].

O fato da onda fotoacústica emitida depender somente da absorção do material, como mostra a equação (2.16), e se propagar como uma onda sonora permite que o efeito fotoacústico

seja usado em diversas aplicações que exijam conhecer a absorção do material. É possível, assim, estudar a absorção de dois fótons (TPA) [34] e obter espectros de absorção mais facilmente [35], além de permitir a utilização de diversos materiais com diversas características como amostra [36].

Por se tratar de uma onda acústica gerada a partir de uma variação de pressão, alguns equipamentos são capazes de realizar a medição. As primeiras medidas do efeito fotoacústico foram realizadas através de microfones de eletreto [32], [37]. Outra forma de se realizar a medição da onda fotoacústica é através de cristais piezoelétricos [19], [38], que quando submetidos à uma pressão, geram um campo elétrico que pode ser medido como uma tensão. Além disso, hoje em dia são utilizados também transdutores ultrassônicos [39], sendo alguns deles de imersão, permitindo ser colocados dentro da água e ter um melhor acoplamento acústico [40].

2.3.1 Absorção de Dois Fótons (TPA) e a Fotoacústica

O fenômeno de absorção de dois fótons foi proposto em 1930 por Maria Goppert-Mayer [27]. Ela propôs que existia uma probabilidade não nula de dois fótons, cuja soma de suas frequências fosse igual à frequência de excitação do átomo, levasse o átomo para um estado excitado. Somente com a ajuda de lasers que esse fenômeno conseguiu ser observado [25].

A absorção de dois fótons, representada pela Fig. 5, é um fenômeno não linear e não é necessário que as frequências dos dois fótons sejam iguais, basta que a soma delas seja igual à frequência de excitação [27].

A geração do fenômeno de absorção de dois fótons (TPA), por ser um processo de segunda ordem, depende de diversos fatores. O número de fótons absorvidos no processo, N_{abs} , por unidade de volume é função do quadrado da densidade de energia, $E_L(\vec{r}, t)$, da seção de choque do processo de absorção de dois fótons, $\sigma^{(2)}$, e da concentração do absorvedor, $C(\vec{r})$ [21]. Assim, o número de átomos excitados em uma determinada região iluminada por um laser será dado através da integração sobre o volume delimitado pelo feixe do laser, ou seja:

$$N_{abs} = \int_V dV \sigma^{(2)} C(\vec{r}, t) E_L^2(\vec{r}, t) \quad (2.40)$$

É importante destacar que a concentração e a densidade de energia que incide sobre a amostra depende da posição, uma vez que a concentração pode variar de ponto a ponto, e do tempo, pois podem ocorrer processos como o de fotoembranquecimento, onde ocorre a perda de fluorescência. Esse fenômeno consiste na destruição de fluoróforos (componente molecular que faz com que a molécula seja fluorescente) através da exposição de luz, alterando as propriedades químicas da molécula, inclusive a sua absorção [41], [42]. Assim, uma molécula que antes absorvia um ou mais fótons, após sofrer o fotoembranquecimento, não irá mais absorver a radiação incidente. Portanto, a ocorrência desse fenômeno leva à diminuição do número de moléculas que efetivamente participam da absorção de fótons, ou seja, a concentração $C(\vec{r}, t)$ diminui com o tempo. Então, considerando o caso em que o fotoembranquecimento não ocorra e que a amostra seja homogênea, a concentração não dependerá da posição e do tempo, sendo simplesmente uma constante C , que pode sair da integral.

Separando a parte temporal e espacial da densidade de energia:

$$E_L(\vec{r}, t) = S(\vec{r})E_L(t) \quad (2.41)$$

Assim, ao substituir na equação (2.40), teremos:

$$N_{abs} = E_L^2(t)C\sigma^{(2)} \int_V dV S^2(\vec{r}) \quad (2.42)$$

Para a situação na qual a espessura da amostra é maior que a profundidade de foco (*depth of focus - DOF*), a integral acima é dada por [43]:

$$\int_V dV S^2(\vec{r}) \approx \frac{8n\lambda^3}{\pi^3(N.A)^4} = S^2 \quad (2.43)$$

E assim, ao substituir em (2.17), teremos que o número de átomos excitados será dado por:

$$N_{abs} = E_L^2(t) C \sigma^{(2)} S^2 \quad (2.44)$$

Uma vez que o número de fótons absorvidos pela amostra está diretamente relacionado com a energia absorvida pelo material e, conseqüentemente, com o sinal fotoacústico, encontra-se uma relação de proporcionalidade entre o sinal fotoacústico e a densidade de energia de forma quadrática, ou seja:

$$P_0(\vec{r}) \propto E_L^2 \quad (2.45)$$

Isso significa que, em um processo de absorção de dois fótons (TPA), o sinal fotoacústico medido é proporcional ao quadrado da densidade de energia [34]. Assim, para determinar se a amostra é ou não linear, é conveniente plotar um gráfico do logaritmo do sinal fotoacústico em função do logaritmo da densidade de energia [19], [44]. Ao fazer isso, vemos que, quando a absorção de dois fótons é a contribuição dominante:

$$\ln(PA) \propto 2 \ln E_L \quad (2.46)$$

Isso significa que, ao plotar esse gráfico e fazer o ajuste linear, se houver a absorção de dois fótons no processo, o coeficiente angular do ajuste deve ser próximo ou igual a 2. Por conta disso, a fotoacústica se torna uma excelente ferramenta para verificar se o processo é não linear [44].

A fotoacústica é uma ferramenta poderosa para determinar a absorção não linear por parte das amostras a partir dessa relação entre o sinal fotoacústico e a densidade de energia [34], como mostrado anteriormente. É comum determinar a não linearidade a partir da fluorescência emitida pelo decaimento do átomo do estado excitado para o estado de menor energia [25], comparando-a com a que frequência da luz incidente. A relação de proporcionalidade em (2.44) simplifica muito as medidas, por ser bastante simples e fácil de executar [19], [44], [45].

Um tipo de material não linear com propriedades e aplicações interessantes são as nanopartículas plasmônicas [46]. Com o devido formato e dimensões, essas nanopartículas possuem uma banda de absorção bem definida, devido a um fenômeno chamado de ressonância de plasmons de superfície (SPR) [47].

Recentemente começou-se a estudar a utilização de nanopartículas plasmônicas (como nanopartículas de ouro) como alternativa para detecção de tumores devido à maior fotoestabilidade e absorção, quando comparados aos contrastes usuais. Esse pico de absorção normalmente se encontra dentro da primeira janela biológica (região em que os tecidos são menos absorvedores), que se encontra no infravermelho próximo (700 nm – 1000 nm). Isso implica em uma melhor resolução da imagem, uma vez que as regiões que não concentram as nanopartículas irão gerar um sinal muito abaixo do que a região que as contém, proporcionando um maior contraste de imagem [48], [49].

2.3.2 Nanopartículas como agentes de contraste biológico

A utilização de nanopartículas (NPs) como agentes de contrastes ópticos representou um grande avanço para as técnicas de imageamento. Os agentes de contrastes que fazem uso da luminescência, por exemplo, possuem uma baixa foto-estabilidade e operam normalmente entre 400 nm e 700 nm. Para medidas de tecidos biológicos, isso representa uma limitação enorme, já que se faz necessário o uso de um comprimento de onda maior a fim da luz atingir regiões mais profundas do tecido [50].

Por conta disso, houve a necessidade de se desenvolver um novo material que operasse na região da primeira janela biológica (700 nm – 1000 nm) e, ao mesmo tempo, não apresentasse toxicidade para o organismo. Essa motivação, que começou na década de 90 e apresentou contribuições significantes a partir dos anos 2000, permitiu o desenvolvimento de nanopartículas luminescentes (LNPs) como novos agentes de contrastes. Tipicamente, essas nanopartículas são sólidos com formas e tamanhos variados, mas na escala de nanômetros (1nm até 100nm).

Quando comparadas com os agentes de contrastes tradicionais, as nanopartículas luminescentes, além de apresentarem uma maior compatibilidade com fluidos biológicos, o que permite uma melhor circulação na corrente sanguínea [51], possuem uma alta mobilidade intracelular, sendo possível monitorar, em tempo real, suas trajetórias, permitindo assim o estudo da dinâmica intracelular [50]. Um estudo utilizando nanodiamantes fluorescentes mostra essa característica [52]. Ademais, as LNPs possuem uma melhor eficiência quanto a aderência em células [53], o que gera uma melhor resolução, já que o brilho e o contraste das imagens são

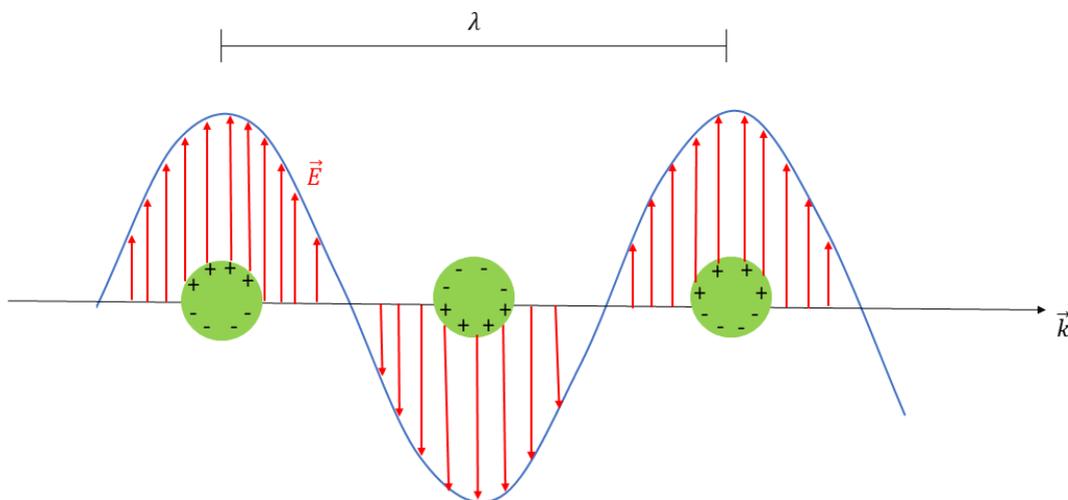
determinados pela quantidade de nanopartículas que aderem às células [50]. Essa característica depende fortemente do formato e do tamanho das nanopartículas [54].

As LNPs possuem cinco classes diferentes: as nanopartículas metálicas (MNPs), os nanocristais semicondutores ou *quantum dots* (QDs), as nanopartículas orgânicas (ONPs), nanocristais dopados com terra rara (RENPs) e nanopartículas baseadas em carbono (C-BNPs) [50]. Dentre elas, as nanopartículas metálicas (MNPs) merecem destaque, por conta de características singulares que permite uma alta aplicabilidade em técnicas de imageamento. Uma dessas características é o efeito de ressonância de plasmons de superfície, que acentua os efeitos de absorção e espalhamento [47], [50], [55], [56].

2.4 RESSONÂNCIA DE PLASMONS DE SUPERFÍCIE

O efeito de ressonância de plasmons de superfície se dá em materiais que possuem elétrons livres, como é o caso de metais. A situação na qual o feixe incidente possui um comprimento de onda maior que as dimensões da amostra, os elétrons livres na superfície do material oscilam juntamente com o campo elétrico da luz incidente, mudando constantemente a polarização das nanopartículas. Essa oscilação eletrônica, juntamente com a do campo elétrico, proporciona um aumento nos efeitos de absorção e espalhamento por parte do material [50], [56].

Figura 6 - Esquemática do processo de ressonância de plasmon de superfície.



Fonte: O autor (2021)

Esse fenômeno foi primeiramente teorizado em 1908, por Gustav Mie [57]. Na situação, ele considerou uma onda plana eletromagnética interagindo com uma esfera condutora homogênea e isotrópica. O cálculo é demonstrado resolvendo as equações de Maxwell em coordenadas esféricas e utilizando condições de contorno apropriadas. Uma das maneiras utilizadas para resolver esse problema é através do método de ondas parciais, escrevendo os campos em uma representação em série [57], [58], encontra-se um resultado para a seção de choque de extinção (σ_{ext}):

$$\sigma_{ext} = \frac{2\pi}{|\vec{k}|^2} \sum_{l=1}^{\infty} (2l+1) \text{Re}\{a_l + b_l\} \quad (2.48)$$

onde \vec{k} representa o vetor de onda (que depende da constante dielétrica do meio no qual a amostra está inserida), enquanto a_l e b_l são coeficientes complexos, escritos em função das funções esféricas de Bessel de primeira e segunda ordem. Além disso, dependem não somente das propriedades da partícula, como tamanho, forma e índice de refração, mas também da ordem da expansão em série que é feita, designada pelo índice l .

A seção de choque de extinção é definida pela razão entre a potência da luz extinta, que por sua vez depende tanto da absorção quanto do espalhamento, pela intensidade de luz incidente. Assim:

$$\sigma_{ext} = \frac{W_{ext}}{I} = \frac{(W_{abs} + W_{sca})}{I_{inc}} = \sigma_{abs} + \sigma_{sca} \quad (2.49)$$

que depende agora das seções de choque de absorção (σ_{abs}) e espalhamento (σ_{sca}) [58].

A partir da teoria desenvolvida por Mie, é possível expressar a seção de choque de espalhamento por [58]:

$$\sigma_{sca} = \frac{2\pi}{|\vec{k}|^2} \sum_{l=1}^{\infty} (2l+1) (|a_l|^2 + |b_l|^2) \quad (2.50)$$

com os coeficientes a_l e b_l sendo os mesmos que aparecem na seção de choque de extinção e são escritos por:

$$\begin{aligned} a_l &= \frac{m\psi_l(mx)\psi'_l(x) - \psi'_l(mx)\psi_l(x)}{m\psi_l(mx)\xi'_l(x) - \psi'_l(mx)\xi_l(x)} \\ b_l &= \frac{\psi_l(mx)\psi'_l(x) - m\psi'_l(mx)\psi_l(x)}{\psi_l(mx)\xi'_l(x) - m\psi'_l(mx)\xi_l(x)} \end{aligned} \quad (2.51)$$

onde o apóstrofo representa a derivada espacial em x , onde $x = |\vec{k}|R$, com R sendo o raio da partícula, e m é a razão entre a parte imaginária do índice de refração da partícula dividido pela parte real do índice de refração do meio. Além disso, as funções $\psi(x)$ e $\xi(x)$ são as funções de Riccati-Bessel cilíndricas, escritas por:

$$\begin{aligned} \psi(x) &= \sqrt{\frac{\pi x}{2}} J_{l+2/2}(x) \\ \xi(x) &= \sqrt{\frac{\pi x}{2}} [J_{l+2/2}(x) + iY_{l+2/2}(x)] \end{aligned} \quad (2.52)$$

com $J_n(x)$ e $Y_n(x)$ sendo as funções de Bessel de primeira e segunda ordem, respectivamente.

Sendo assim, para obter as seções de choque de absorção e espalhamento, é necessário calcular os termos a partir das funções de Bessel acima. Define-se uma eficiência (portanto, adimensional), como sendo a razão entre a seção de choque especificada pela seção de choque geométrica (σ_{geo}), ou seja:

$$Q_{sca} = \frac{\sigma_{sca}}{\sigma_{geo}} \quad (2.53)$$

Para o caso de uma esfera, que foi abordado por Mie [57], a seção de choque geométrica é dada por $\sigma_{geo} = \pi R^2$. Dessa forma:

$$Q_{sca} = \frac{2\pi}{\pi(|\vec{k}|R)} \sum_{l=1}^{\infty} (2l+1)(|a_l|^2 + |b_l|^2) \quad (2.54)$$

$$Q_{sca} = \frac{2}{x^2} \sum_{l=1}^{\infty} (2l+1)(|a_l|^2 + |b_l|^2) \quad (2.55)$$

Considerando apenas o primeiro termo da eficiência de espalhamento, ou seja, considerando $l = 1$, teremos então que [59]:

$$\begin{aligned} a_1 &= -i \frac{2x^3 y^2 - 1}{3y^2 + 2} + O(x^5) \\ b_1 &= -i \frac{x^5}{45} (y^2 - 1) + O(x^7) \end{aligned} \quad (2.56)$$

com y definido por:

$$y = \sqrt{\frac{\epsilon_p}{\epsilon_m}} \quad (2.57)$$

onde ϵ representa a constante dielétrica e os subíndices p e m referenciam à partícula e ao meio, respectivamente.

Tomando o limite em que a amostra é muito menor que o comprimento de onda da luz incidente, ou seja, $R \ll \lambda$, como $x = |\vec{k}|R$, é evidente que nesse limite $x \ll 1$, uma vez que, por definição:

$$|\vec{k}| = \frac{2\pi}{\lambda} \quad (2.58)$$

Portanto, ao calcular a eficiência de espalhamento para essa situação, vemos que o resultado obtido será dado por:

$$Q_{sca} = \frac{2}{x^2} \left[3 \left(\frac{4x^6}{9} \left| \frac{y^2 - 1}{y^2 + 2} \right| \right) + O(x^{10}) \right] = \frac{8}{3} x^4 \left| \frac{y^2 - 1}{y^2 + 2} \right| \quad (2.59)$$

E, uma vez que $x \ll 1$, esse resultado tende a 0. Isso quer dizer que, na situação em que ocorre a ressonância de plasmons de superfície, a eficiência de espalhamento vai a 0. Sendo assim, a contribuição majoritária para a seção de choque de extinção se dá a partir da seção de choque de absorção ($\sigma_{ext} \cong \sigma_{abs}$).

Observa-se também que o resultado se relaciona com a constante dielétrica do meio e da nanopartícula, representada por y . O campo elétrico externo induz uma polarização nas nanopartículas que é função da razão entre as constantes dielétricas, resultado esse que lembra o caso de um campo elétrico uniforme incidindo em uma esfera de constante dielétrica ϵ [60].

Esse resultado proporciona uma condição muito vantajosa para a fotoacústica, uma vez que a seção de choque de absorção das nanopartículas que irão majoritariamente ser responsável pela banda de ressonância plasmônica e, como o efeito fotoacústico ocorre exclusivamente devido à absorção, haverá um sinal fotoacústico maior quando incidir um feixe pulsado emitindo no comprimento de onda em que se encontra o pico da ressonância de plasmons de superfície.

Vale ressaltar que, para uma maior eficiência, as nanopartículas precisam ter dimensões muito pequenas. À medida que se aumenta o tamanho delas, o termo de espalhamento que foi desprezado por conta da relação (2.59) irá possuir uma contribuição significativa [48], atenuando os efeitos de absorção e, conseqüentemente, uma diminuição no sinal fotoacústico.

O uso de nanopartículas metálicas como agentes de contrastes ópticos se dá por conta dessa característica. Algumas técnicas de imageamento óptico operam com luz visível ou infravermelho e como o comprimento dessas regiões possuem uma ordem de centenas de nanômetros, as nanopartículas que possuem elétrons livres, e conseqüentemente capazes de gerar o efeito de ressonância de plasmons de superfície, também chamadas de nanopartículas plasmônicas, podem ser usadas como agentes de contrastes.

A maioria dos trabalhos envolvendo MNPs foram realizados utilizando nanopartículas de ouro, devido a facilidade quanto ao seu processo de síntese e escolha de parâmetros fundamentais, como tamanho e forma [46], [61], [62].

Dentre as nanopartículas metálicas, o nitreto de titânio (TiN) apresenta resultados promissores, pois possui um baixo custo de produção e uma banda de ressonância dentro da janela biológica, ou seja, o pico de absorção é justamente na região em que os tecidos biológicos

não absorvem. Ademais, ao injetá-las na corrente sanguínea, as nanopartículas de nitreto de titânio (TiN NPs) migram para o local onde se encontra um tumor e não apresenta toxicidade [63].

2.5 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO FOTOACÚSTICA

2.5.1 Espectroscopia Fotoacústica (PAS)

De uma forma bastante ampla, a espectroscopia é o estudo da interação da radiação com a matéria [16]. No caso da espectroscopia óptica, estuda-se as propriedades dos através da interação destes com a radiação eletromagnética no domínio óptico [16]. As técnicas de espectroscopia óptica convencionais, em sua grande maioria, podem ser agrupadas em duas categorias: em uma, as propriedades da matéria são definidas a partir dos fótons transmitidos pela amostra, enquanto na outra, essas informações serão obtidas a partir dos fótons espalhados ou refletidos [16]. Nesses dois métodos, para se obter o espectro de absorção, relaciona-se o sinal luminoso antes de incidir na amostra com o sinal após interagir com o material.

Esses métodos são ferramentas bastante úteis e vem sendo utilizados há séculos, mas apresentam certas limitações, pois dependem do tipo de amostra. Para materiais com baixa absorção, a luz transmitida não chega a ser atenuada, o que não gera uma diferença de sinais significativa. Para se obter o espectro, relaciona-se o sinal emitido com o transmitido e, como não há muita diferença entre eles devido à baixa absorção, o resultado fica comprometido [17]. Além disso, amostras como pós, sólidos amorfos e tecidos, por exemplo, apresentam um alto poder espalhador, o que interfere bastante na medida da absorção óptica [16]. Para materiais opacos, cujo sinal é composto por uma combinação da reflexão especular, difusividade e transmissão, a análise do resultado acaba sendo extremamente complicada [16].

A espectroscopia fotoacústica, desenvolvida na década de 70, permite contornar esses problemas que as técnicas convencionais apresentam. Apesar da energia incidente ser proveniente de fótons, assim como nas duas modalidades citadas anteriormente, ela utiliza a energia absorvida pelo meio como base para estudar a amostra, através do efeito fotoacústico [35].

Dessa forma, uma luz pulsada atinge o material que se deseja estudar, fazendo com que ele produza ondas fotoacústicas que serão captadas por um detector. Como o sinal emitido é diretamente proporcional à absorção (ver equação 2.14), é possível analisar a absorção do material para diferentes comprimentos de onda, gerando assim um espectro de absorção.

As primeiras medidas de espectroscopia fotoacústica foram realizadas usando lâmpadas que emitem em uma vasta região do espectro eletromagnético. O feixe então atravessava um monocromador, equipamento capaz de ajustar o comprimento de onda, e depois passava por um modulador de feixe (*chopper*) a fim de tornar a radiação pulsada [16], [35], [64], que incidia em uma célula fotoacústica contendo um microfone para detectar a onda acústica [37]. O microfone convertia o sinal mecânico em elétrico, que seria posteriormente reproduzido por algum analisador de sinal, como um osciloscópio.

Com o advento do laser, surgiu uma nova fonte para realizar tais medidas e tornou o uso do monocromador desnecessário, uma vez que o laser emite em um comprimento de onda bem específico [23]. Para lasers que operam em modo contínuo (CW) ainda é necessário o uso do *chopper* [16], [37], [39]. Entretanto, existem laser que operam no modo pulsado, podendo assim descartar o uso do *chopper* [19].

O espectro é gerado quando se relaciona o sinal fotoacústico da amostra para cada comprimento de onda específico. Entretanto, é necessário tomar providões para remover qualquer contribuição indesejada do sistema [64]. Para isso, normaliza-se o sinal fotoacústico fazendo a razão do sinal medido e uma referência, que pode ser a potência da luz incidente [37] ou então um espectro, utilizando a mesma fonte, de um material bastante absorvedor, como pó de carvão [35].

A partir desse espectro normalizado é possível aplicar todos os métodos comumente utilizados em espectros ópticos contínuos, sendo assim possível extrair o coeficiente de absorção e obter a energia de gap, seja pelo método da derivada ou pelo método linear [31], [32], [39], [65], [66].

Alguns estudos que fazem uso dessa técnica se tornam bastante interessantes devido à sua aplicabilidade. Em 1971, a partir da espectroscopia fotoacústica, Kreuzer e Patel [37] foram capazes de detectar a presença de óxido nítrico, em uma concentração de 0,01 ppm, em uma célula fotoacústica com menos de 1 cm³, simulando um estudo para verificar a poluição atmosférica.

Além disso, muitos trabalhos foram desenvolvidos na área de biomedicina. Em 1973, Rosencwaig [67] obteve um espectro fotoacústico de proteínas, da hemoglobina e do sangue. O mesmo autor, em 1977, obteve o espectro fotoacústico da córnea de um rato *in vivo*, podendo detectar mudanças químicas na estrutura ocular [68]. Na década de 90, foram medidas propriedades ópticas de tecido *in vivo* [69], o que permitiu um maior estudo e avanço na área.

2.5.2 Microscopia Fotoacústica (PAM)

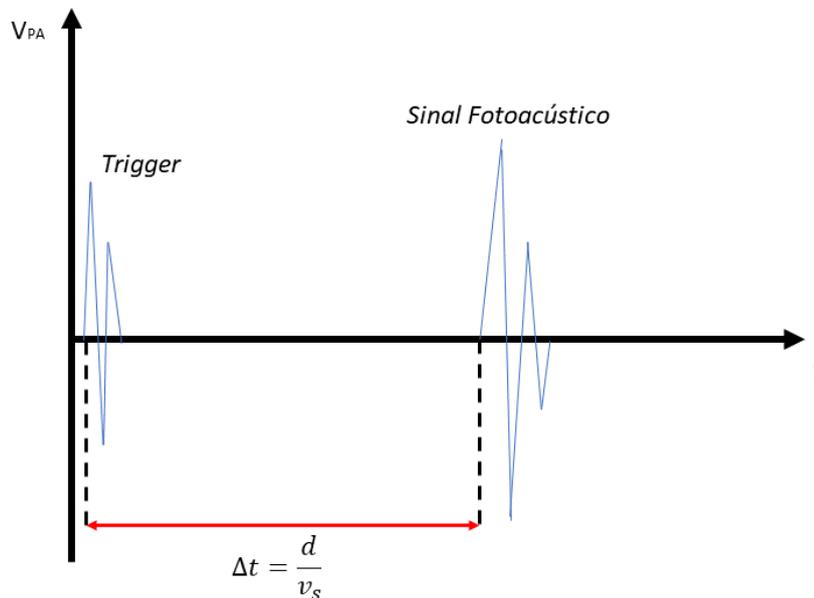
Por conta de sua alta sensibilidade [17], [70], é possível, inclusive, através do efeito fotoacústico, detectar falhas em filmes finos danificados por laser [71]. A capacidade de detectar inomogeneidades nas superfícies de materiais a partir da fotoacústica ocorreu no final da década de 70 [72], [73]. O estudo da morfologia dessas amostras em escala microscópica, através do efeito fotoacústico, passou a ser um valioso objeto de estudo devido à alta sensibilidade e o fator não destrutivo da técnica [72]. Assim, a fim de reproduzir a imagem da superfície do material estudado [72], [74], surgiu a microscopia fotoacústica (PAM), dando origem ao desenvolvimento das técnicas de imageamento fotoacústico (PAI).

A dependência direta entre o sinal fotoacústico e a absorção do material faz com que as dimensões do feixe que incide na amostra determinem o tamanho da região na qual as informações do material serão obtidas, como mostrado na equação 2.14, onde foi mostrado uma dependência local com relação ao sinal gerado [75]. Assim, ao incidir um feixe de luz com dimensões micrométricas, a absorção da luz ocorrerá através de uma região da amostra com essas dimensões, permitindo um maior detalhamento do material, que é o princípio por trás da microscopia fotoacústica (PAM).

A redução do tamanho do feixe para escalas micrométricas foi introduzido por von Gutfeld e Melcher [73], para determinar falhas em materiais. A diminuição do diâmetro do feixe era feita a partir de uma lente objetiva para focalizá-lo e a amostra era colocada próximo ao foco. Para detectar as falhas na superfície do material, é necessário incidir o feixe em outras regiões da amostra, fazendo um processo de varredura. Para cada região iluminada, um sinal fotoacústico é gerado e comparado com o sinal das outras regiões, processo esse que inicialmente foi realizado de forma manual [73]. As diferenças entre os sinais de cada região, seja pela amplitude ou pelo tempo decorrido até a produção do sinal, era um indício de uma falha no material.

Nesse mesmo trabalho, os autores mostraram que o primeiro pico, em $t = 0$, servia como referência para o tempo no qual a onda fotoacústica viajava até incidir no detector.

Figura 7 - Exemplo de sinal fotoacústico obtido através de um osciloscópio para detectar falhas na superfície de materiais.



Fonte: O autor (2021)

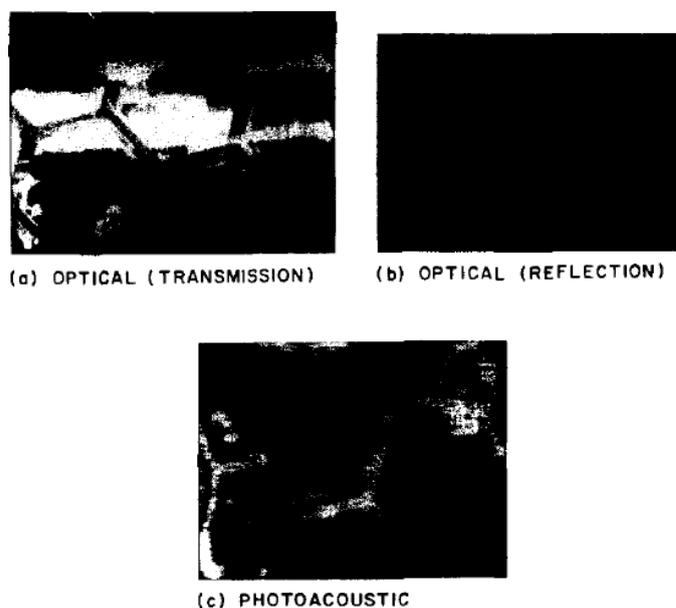
A partir do tempo fornecido pelo sinal e da velocidade do som no meio, era possível estimar as distâncias entre certas regiões e a profundidade dos danos formados na superfície a partir da relação:

$$\Theta = v_s t \quad (2.47)$$

onde Θ é a distância, v_s é a velocidade do som no meio em questão e t o tempo medido. Assim, foi possível estimar que o material que estavam estudando (lâmina de alumínio) possuíam buracos com 0,04 cm de diâmetro e 0,04 cm de profundidade [73].

Os resultados fascinantes levaram, em 1978, à primeira reprodução de imagem a partir do efeito fotoacústico [74].

Figura 8 - Resultado comparativo entre o primeiro imageamento fotoacústico e imageamentos convencionais



Fonte: H. K. Wickramasinghe, R. C. Bray, V. Jipson, C. F. Quate e J. R. Salcedo (1978)

A partir de um feixe com $\lambda = 1,06 \mu\text{m}$ foi possível verificar um padrão hexagonal em uma amostra de cromo e de papel alumínio, mostrando então uma nova forma de microscopia, futuramente chamada de microscopia fotoacústica (PAM).

Além das falhas apresentadas na superfície das amostras, foi mostrado que, dependendo do comprimento de onda da luz incidente, era possível atingir regiões mais profundas do material e assim obter informações subsuperficiais [72]. A mudança na amplitude e na fase do sinal permitia diferenciar falhas de outros componentes que poderiam estar presentes na amostra, a partir do coeficiente de absorção [72]. Foi possível então comprovar, além de mostrar propriedades do material que não são detectáveis visualmente com o auxílio de um microscópio, que a microscopia fotoacústica era capaz de caracterizar superfícies e subsuperfícies de amostras de forma não destrutiva [72].

Essa utilidade despertou o interesse de muitos pesquisadores, que começaram a realizar experimentos de PAM e a aperfeiçoar o método, sendo capaz de atingir uma profundidade de centenas de micrômetros [18], [70], [72], [76]. Por conta dessas características, não tardou até sugerirem aplicações na área médica. Essa proposta veio em 1979 [77], onde foi mostrado que a microscopia fotoacústica era mais compatível do que a técnica de microscopia ultrassônica utilizada na época.

As aplicações da microscopia fotoacústica na biomedicina são variadas. Os primeiros estudos foram feitos para determinar atividades de peroxidase em tecido biológico [78] e para determinar componentes biológicos presentes nos tecidos [79]. A técnica foi sendo aperfeiçoada ao ponto de poder determinar a saturação de oxigênio no sangue [80], além de angiografias, histografia e aplicações em dermatologia [81].

As técnicas de imageamento que exploram o efeito fotoacústica apresentam certas vantagens quando comparadas a técnicas convencionais, como o ultrassom e a tomografia óptica por coerência (OCT). Além de ser uma técnica não-invasiva, em tecidos biológicos o espalhamento da onda eletromagnética é aproximadamente cem vezes maior que o da onda acústica, o que permite obter uma melhor resolução.

3 IMPLEMENTAÇÃO EXPERIMENTAL DE UM SISTEMA DE ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA

Esse capítulo foi destinado para apresentar a montagem experimental e o funcionamento dos programas de aquisição para a espectroscopia e microscopia fotoacústica, desenvolvidos pelo Dr. Avishek Das (Laboratório de Fotônica e Biofotônica). A fim de ter uma melhor compreensão do funcionamento dos programas, entender o funcionamento do software LABView e para facilitar a operacionalização, houve o acompanhamento do desenvolvimento dos programas.

Na seção 3.1 aborda-se a montagem experimental do sistema de espectroscopia fotoacústica (PAS) com os materiais que foram utilizados, seguido, na seção 3.2, do programa de aquisição desenvolvido para a espectroscopia fotoacústica. A seção 3.3 traz a montagem experimental para o imageamento fotoacústico, enquanto na seção 3.4 o respectivo programa de aquisição é descrito.

3.1 MONTAGEM EXPERIMENTAL DO SISTEMA DE ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA (PAS)

O sistema experimental implementado está mostrado na Fig. 9. A fonte de luz utilizada na implementação do sistema de PAS foi um OPO (*Optical Parametric Oscillator*, VIBRANT 355 LD) que, a partir da excitação com o terceiro harmônico de um laser de Nd:YAG emitindo em 355 nm, consegue varrer de 410 nm até 2,4 μm . Tal fonte possui uma taxa de repetição de 10 Hz e uma duração de pulso de aproximadamente 5 ns.

Por se tratar de uma espectroscopia, a mudança do comprimento de onda é fundamental. Por conta disso, o OPO era conectado ao computador e, através da interface OPOTEK, é possível selecionar o comprimento de onda da fonte. Mas, como mostraremos em seguida, essa função será realizada pelo programa desenvolvido em LABView.

Para fazer o feixe incidir na amostra, foi necessário um conjunto de espelhos protegidos em prata THORLABS PF10-03-P01 devidamente alinhados. De acordo com o fabricante, esses espelhos possuem uma reflectância acima de 97,5% para comprimentos de onda entre 450 nm e 2 μm , ou seja, dentro da região em que os experimentos foram executados.

A fim de variar a densidade de energia do feixe para detectar propriedades não lineares do material, dois polarizadores (THORLABS PRM1-27 e THORLABS GT10-C), um deles acoplado a um *stage* de rotação motorizado THORLABS PRM1Z8 de alta precisão, foram dispostos ao longo do caminho óptico.

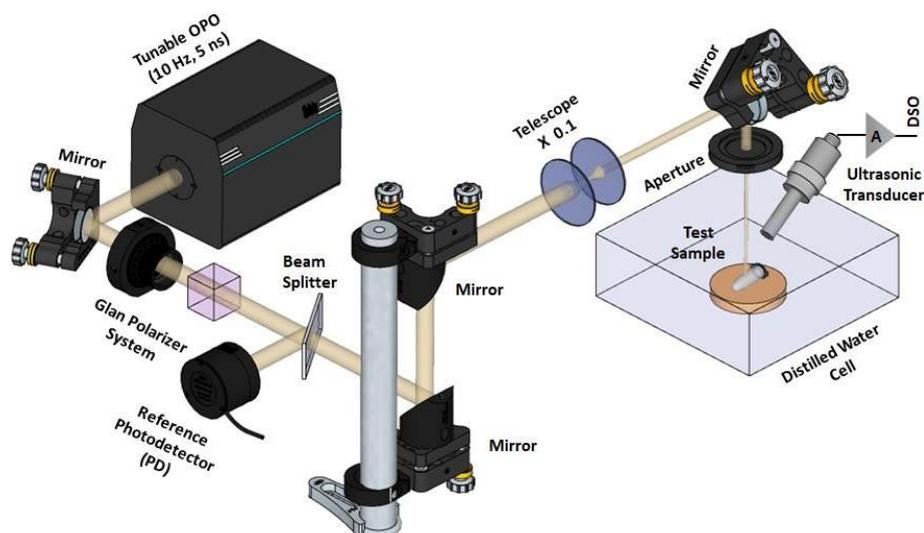
Em seguida, o feixe incidia em um divisor de feixes para que parte da radiação fosse para um fotodetector THORLABS PDA100A, adequada para comprimentos de onda entre 350 nm e 1,1 μm . A radiação detectada pelo fotodetector serve como *trigger*, o que permite determinar não só o momento no qual a luz incide na amostra, mas também a sua intensidade.

A outra parte da radiação atravessava duas lentes devidamente alinhadas a fim de diminuir o diâmetro do feixe, que originalmente tinha aproximadamente 1 cm. Desejando-se atingir 2 mm, foram usadas duas lentes plano convexas, uma com distância focal de 250 mm e outra de 50 mm, separadas por uma distância de 30 cm uma da outra.

Após a diminuição do diâmetro do feixe, a luz incidia sobre a amostra, que se encontrava em um recipiente plástico contendo água destilada. O uso da água destilada se dá pelo fato de ter um acoplamento acústico maior que o do ar, ou seja, a onda acústica se propaga melhor na água que no ar, fornecendo um sinal maior e de melhor qualidade. O sinal era captado por um transdutor ultrasônico de imersão OLYMPUS V312-N-SU, com frequência de 10 MHz.

O sinal elétrico convertido pelo transdutor passava por dois amplificadores MINICIRCUITS ZFL-500-LN-BNC, cujo ganho nominal de cada um era de 19,4 V. Posteriormente, o sinal era digitalizado por um osciloscópio TEKTRONIX 3032B. O sinal da câmera era digitalizado no canal 2 (CH2), enquanto o proveniente dos amplificadores ia para o canal 1 (CH1). A divisão entre o valor da amplitude do sinal lido pelo CH1, vindo do transdutor, pela amplitude do *trigger*, obtido no CH2, fornece uma amplitude normalizada

Figura 9 - Montagem experimental do sistema de espectroscopia fotoacústica (PAS)



Fonte: O autor (2021)

Assim, para cada comprimento de onda selecionado, uma amplitude normalizada era relacionada. É importante ressaltar que a absorção do material depende diretamente da densidade de energia do feixe, que pode variar para diferentes comprimentos de onda.

É comum usar um espectro de referência para a normalização do espectro com o intuito de minimizar contribuições espúrias que a montagem experimental possa introduzir na medida. Por isso, é necessário obter o espectro de um material bastante absorvedor, como pó de carvão. Ao dividir o espectro da amostra pelo espectro de referência, o resultado é o espectro normalizado da amostra.

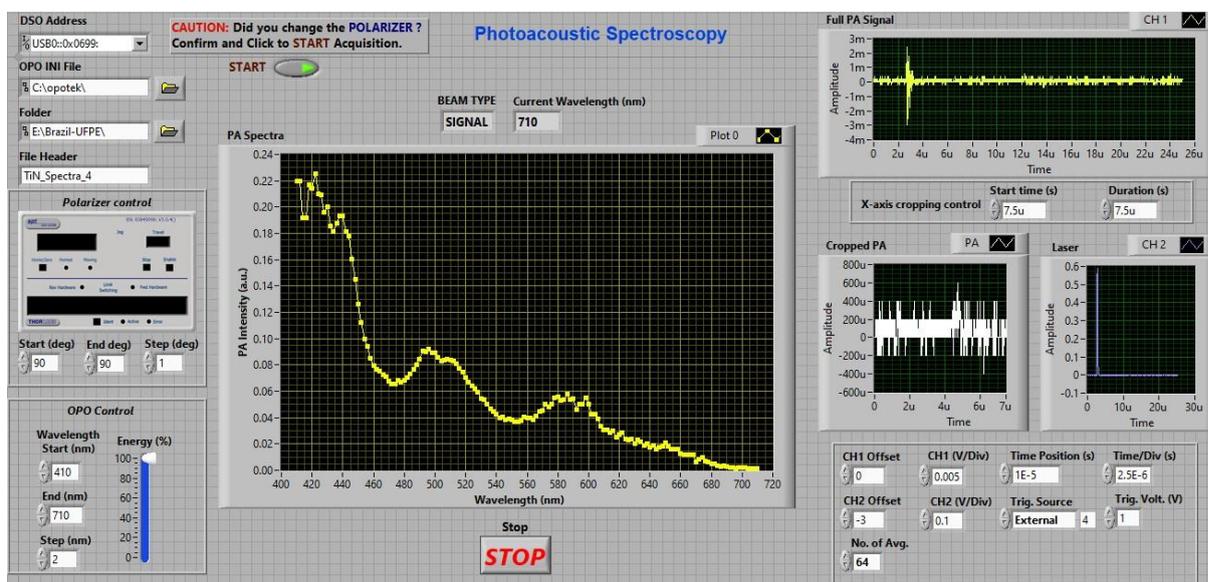
Essas medidas podem ser feitas manualmente, variando o comprimento de onda e registrando as amplitudes do *trigger* e do sinal fotoacústico. Para facilitar o trabalho e garantir resultados mais precisos, a seleção do comprimento de onda, o controle do ângulo do polarizador e a aquisição dos dados foram automatizados a partir de um programa desenvolvido em LABView.

3.2 PROGRAMA DE AQUISIÇÃO (PAS)

O programa de aquisição desenvolvido em LABView (ver Fig. 10) permite escolher a pasta (*Folder*) e o nome do arquivo (*File Header*). É possível selecionar o comprimento de onda inicial e final (*Wavelength Start/End*), além da diferença entre comprimentos de onda

consecutivos (*Wavelength Step*), determinando assim a faixa espectral e a quantidade de medidas que serão realizadas.

Figura 10 - Interface do programa de aquisição desenvolvido em LABView para o sistema de espectroscopia fotoacústica (PAS)



Fonte: O autor (2021)

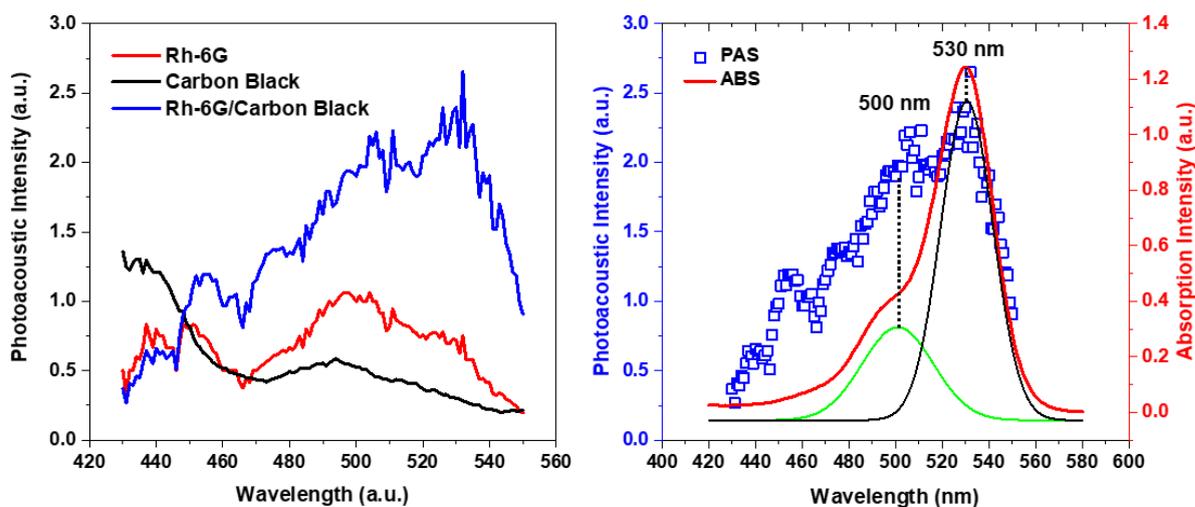
Para ajustar a densidade de energia através do polarizador THORLABS PRM1-27, pode-se escolher o ângulo do polarizador. Caso se deseje realizar outras medidas para densidades de energias diferentes, é possível escolher um ângulo inicial e final e, ao final de cada espectro, o polarizador é ajustado automaticamente de acordo com as informações que foram pré-estabelecidas (*Polarizer control Step*) pelo operador para a medição de um novo espectro, sem precisar reiniciar o programa.

Assim, para cada comprimento de onda, o osciloscópio fornece a amplitude do sinal fotoacústico e, em tempo real, plota-se um gráfico do comprimento de onda em função desse sinal. Quando a medida é encerrada, o resultado é o espectro de absorção da amostra com a amplitude normalizada pela amplitude do *trigger*. Caso sejam feitas medidas consecutivas para densidades de energia diferentes, o polarizador era ajustado, retorna-se ao comprimento de onda final e um novo espectro é obtido e assim sucessivamente, até chegar ao ângulo final, onde a medida é devidamente encerrada.

A fim de verificar o funcionamento do programa de aquisição, foi realizada uma medida de teste (ver Fig. 11). Nessa situação, a rodamina 6G foi usada como amostra, enquanto o pó

de carvão serviu como referência para normalização do espectro. Logo, após a medida do espectro de absorção da rodamina através do programa desenvolvido, dividiu-se pelo espectro obtido para o pó de carvão, conforme colocado. Os resultados são mostrados abaixo, juntamente com o espectro de absorção medido em um espectrofotômetro (FluoroMax, HORIBA) para fins comparativos.

Figura 11 - Espectro de absorção obtido através do programa de aquisição de PAS descrito acima para a Rodamina 6G



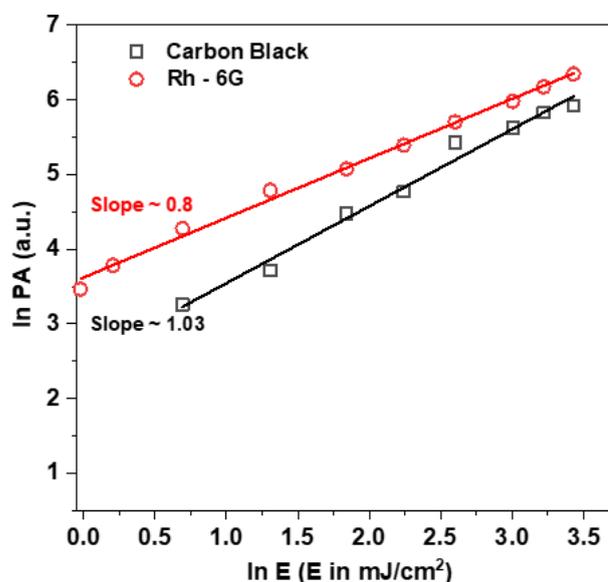
Fonte: O autor (2021)

Nota-se que os picos de absorção coincidem nas duas técnicas, especialmente quando fazemos a deconvolução do espectro contínuo (em vermelho). O resultado (gráficos verde e preto) apontam para um pico de absorção em 500 nm e em 530 nm, resultado esse semelhante ao que foi encontrado na espectroscopia fotoacústica usando o programa de aquisição desenvolvido em LABView.

Além disso, outra medida foi realizada, dessa vez para verificar a existência de propriedades não lineares (absorção de dois fótons) da rodamina 6G e para o pó de carvão, que serviu como referência para os espectros de absorção. Para essa medida, variou-se o ângulo do polarizador entre 45° e 90°. Conseqüentemente, a densidade de energia também variava e seus valores foram anotados. Para cada densidade de energia, verificava-se a amplitude do sinal fotoacústico. Por fim, plotou-se um gráfico que relaciona o logaritmo do sinal fotoacústico em função do logaritmo da fluência óptica do feixe incidente. A partir desse gráfico é possível

determinar se a amostra apresenta propriedades não lineares ou não, como mostrado na Fig. 12 abaixo.

Figura 12 - Gráfico do logaritmo do sinal fotoacústico da rodamina 6G e do pó de carvão em função do logaritmo da fluência óptica para comprovar a linearidade das amostras



Fonte: O autor (2021)

Uma vez que o coeficiente angular das retas ajustadas aos pontos experimentais é próximo de 1, comprovamos que, para as intensidades do laser usadas nesta medida, o sinal fotoacústico depende linearmente da densidade de energia do feixe, tanto para a rodamina quanto para o pó de carvão, conforme seria esperado [44].

Com a montagem experimental e o programa de aquisição do sistema de espectroscopia fotoacústica (PAS) operando de forma adequada, deu-se continuidade ao trabalho desenvolvendo o sistema de imageamento fotoacústico.

3.3 MONTAGEM EXPERIMENTAL DO SISTEMA DE IMAGEAMENTO FOTOACÚSTICO (PAI)

O sistema de imageamento fotoacústico (PAI) é muito semelhante ao que foi feito para a espectroscopia fotoacústica (PAS). A fonte, os espelhos, o divisor de feixe, a câmera, a vasilha plástica, o transdutor, o osciloscópio e os amplificadores continuaram fazendo parte da bancada experimental para a implementação do sistema de imageamento fotoacústico.

No caso da espectroscopia, é necessário variar o comprimento de onda da luz incidente, o que não ocorre no imageamento. Além disso, na espectroscopia, o tamanho do feixe que incide na amostra não possui um papel fundamental, uma vez que analisaremos apenas a absorção do material. Na verdade, nessa situação, um feixe maior acaba proporcionando melhores resultados, pois quanto maior o feixe, maior a energia que será absorvida e, conseqüentemente, maior o sinal fotoacústico.

Já para o imageamento, o diâmetro do feixe é um parâmetro de importância fundamental. Ao se varrer uma região, quanto menor o tamanho do feixe, maior será a quantidade de pontos analisados e, assim, melhor a resolução.

Em algumas medidas, a amostra foi colocada em um tubo capilar (PRECISION GLASS LINE) com 1 mm de espessura. Para essa situação, era necessário diminuir o tamanho do feixe, por isso foi adicionada mais uma lente ao sistema, com distância focal de 100 mm, para focalizar o feixe, colocada imediatamente antes da radiação incidir sobre a amostra. É possível estimar o diâmetro do feixe na região do foco da lente a partir da relação [82]:

$$\omega_f = \omega_0 \frac{1}{h} \frac{\frac{f}{z_0}}{\sqrt{1 + \left(\frac{f}{z_0}\right)^2}} \quad (2.60)$$

onde f é a distância focal da lente e ω_0 e ω_f representam a metade do diâmetro do feixe antes de incidir na lente e no foco dela, respectivamente. O parâmetro z_0 é chamado de comprimento de Rayleigh que, considerando o índice de refração do ar n como sendo 1, é escrito por:

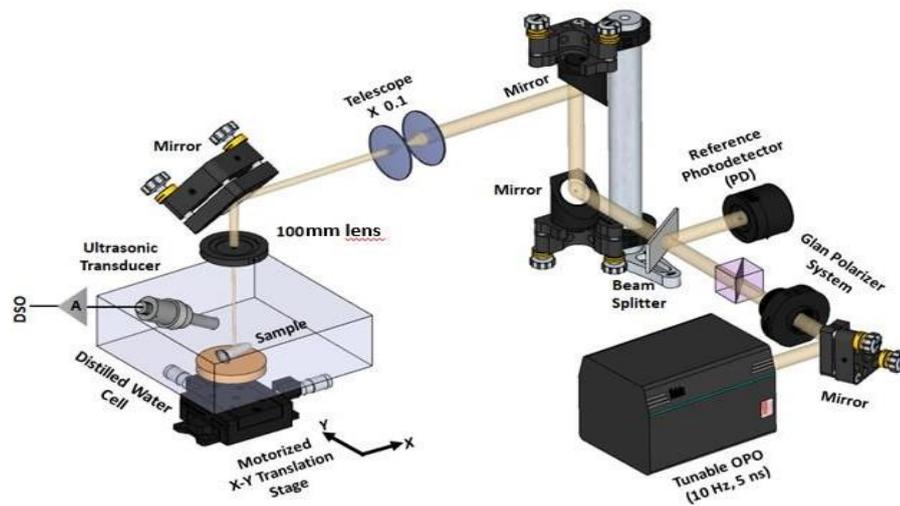
$$z_0 = \frac{\pi \omega_0^2}{\lambda} \quad (2.61)$$

Ao considerar um feixe gaussiano emitindo em 880 nm e as condições impostas pelo sistema (uma lente com distância focal de 100 mm e um feixe incidente de aproximadamente 2 mm de diâmetro), estima-se que o diâmetro do feixe na região próxima ao foco da lente é de aproximadamente $(56 \pm 6,7)$ μm . Com o auxílio de uma câmera CMOS THORLABS DCC1545M, o diâmetro do feixe foi determinado experimentalmente, atingindo

aproximadamente $50\ \mu\text{m}$ de diâmetro, estando coerente com o que foi calculado pela relação 2.60.

Além disso, para mover a amostra e fazer com que a luz incidisse em pontos diferentes dela, utilizou-se dois transladores THORLABS MTS50-Z8 dispostos perpendicularmente um ao outro, que permitiam o movimento de uma placa de acrílico que sustentava a vasilha plástica contendo água destilada e a amostra submersa. Assim, com o diâmetro do feixe reduzido e dois transladores capazes de mover o sistema recipiente-amostra, a montagem do sistema de imageamento estava pronta, como representado na Fig. 13.

Figura 13 - Montagem experimental do sistema de imageamento fotoacústico (PAI)



Fonte: O autor (2021)

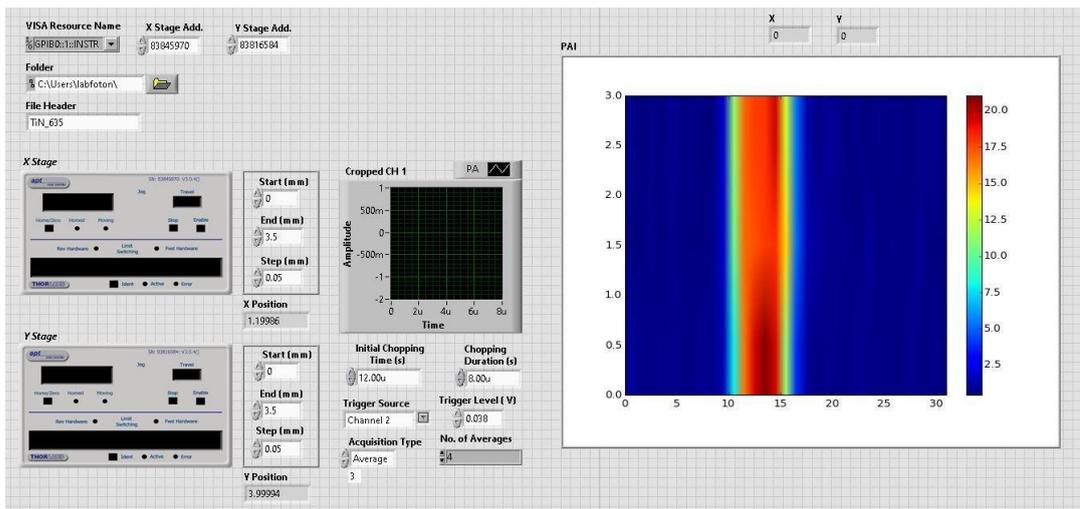
Apesar da montagem experimental estar completa, era necessário um sistema capaz de não só fazer as medições necessárias, mas também controlar os transladores de forma precisa. Para isso, foi desenvolvido um outro programa de aquisição LABView capaz realizar essas tarefas.

3.4 PROGRAMA DE AQUISIÇÃO (PAI)

Na Fig. 14 mostramos o programa desenvolvido em LABView, que permite escolher a pasta (*Folder*) e o nome do arquivo que se deseja (*File Header*) para cada medida. Como é necessário mover a amostra para realizar o imageamento, utiliza-se dois transladores

THORLABS MTS50-Z8 (*X Stage & Y Stage*), cuja resolução é de $0,05 \mu\text{m}$, perpendiculares entre si para mover o sistema recipiente-amostra. O *X Stage* desloca o sistema na direção vertical, enquanto o *Y Stage* permite o movimento na direção horizontal.

Figura 14 - Interface do programa de aquisição desenvolvido em LABView para o sistema de imageamento fotoacústico (PAI)



Fonte: O autor (2021)

A partir daí é possível escolher a coordenada inicial e final (a partir do *Start e End*) para cada uma das direções, assim como o tamanho do passo que se deseja dar (*Step*) em cada uma delas. É importante que o valor do passo seja igual ao tamanho do feixe que incide na amostra, evitando que uma mesma região seja iluminada mais de uma vez para diferentes pontos, gerando assim um resultado errôneo.

Ao conectar cada um dos transladores à um controlador THORLABS TDC001 ligado ao computador através de um cabo USB, o programa desenvolvido controla os movimentos de cada translador. Logo, determinando as posições inicial e final, juntamente com o tamanho do passo, é possível varrer uma região bem definida.

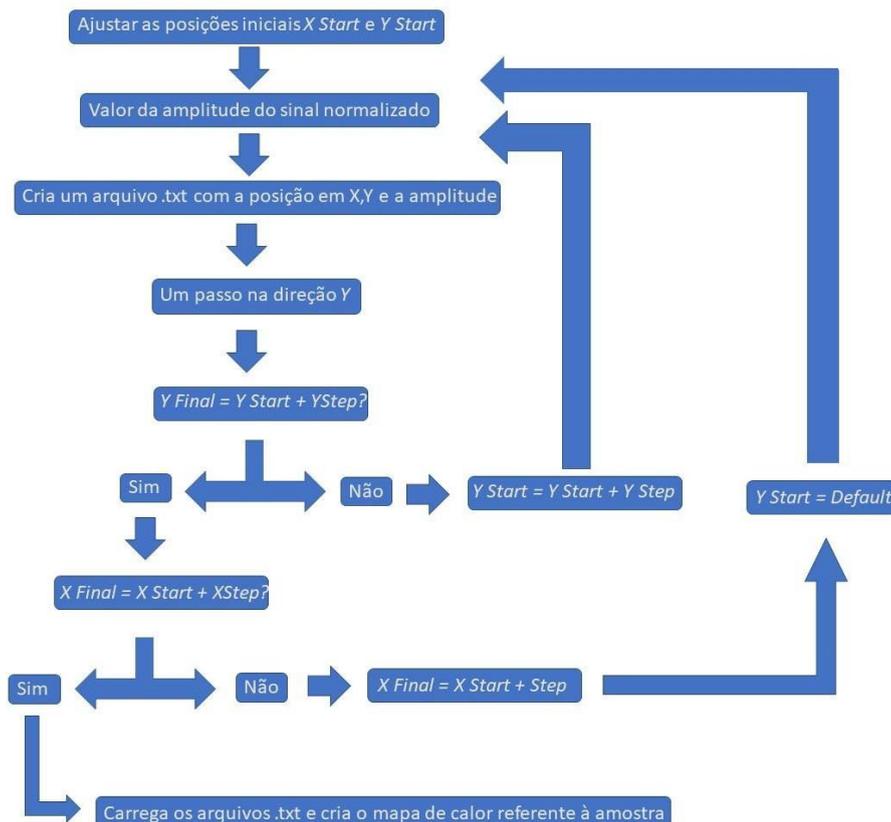
O programa opera mantendo, inicialmente, o eixo vertical (referente ao eixo *X*) fixo, enquanto os passos na horizontal (de tamanho *Y Step*) vão sendo realizados. Para cada posição (*X Position, Y Position*) o osciloscópio envia, através de um cabo USB conectado ao computador, o valor da amplitude do sinal fotoacústico já normalizado.

Ao final de cada passo, as informações, como o valor da posição ($X Position$, $Y Position$) e o valor da amplitude do sinal fotoacústico normalizado, são salvas em um arquivo na extensão *text* (.txt). Depois disso, mais um passo é dado e o mesmo procedimento é realizado.

Após cada passo, o programa confere se a posição atual ($Y Position$) do translador horizontal coincide com o $Y Final$ definido inicialmente. Em caso positivo, o translador horizontal volta para a posição de origem ($Y Start$) e acrescenta-se um passo ($X Step$) na direção vertical e assim sucessivamente, até atingir a coordenada final pré-estabelecida.

Quando atinge a última coordenada ($X Final$, $Y Final$), o programa carrega os dados salvos para cada posição e plota um mapa de calor com a escala, mostrando assim as regiões que possuem maior absorção.

Figura 15 - Fluxograma representando o funcionamento do programa de aquisição desenvolvido em LABView para o sistema de imageamento fotoacústico (PAI)

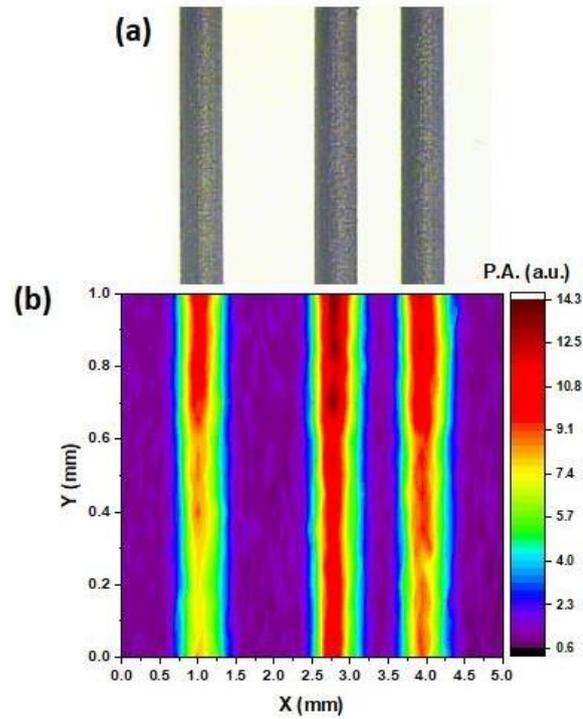


Fonte: O autor (2021)

Antes de realizar o imageamento das nanopartículas de TiN, alguns testes foram realizados para verificar o funcionamento do sistema. Na Fig. 16 foi feito o imageamento de

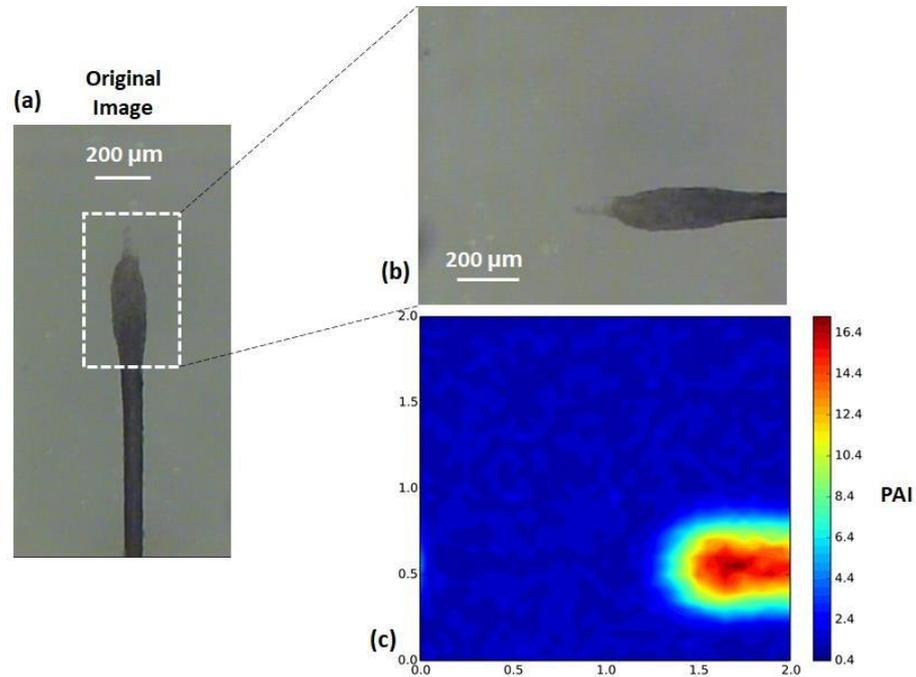
três lâminas de grafite, na Fig. 17 foi utilizado um fio de cabelo humano como amostra e, por fim, na Fig. 18 foi realizado o imageamento fotoacústico de um QR code. Todos esses resultados foram obtidas utilizando o programa acima descrito.

Figura 16 - (a) Figura real de 3 lâminas de grafite; (b) Imageamento realizado utilizando o programa desenvolvido, $\lambda = 532$ nm



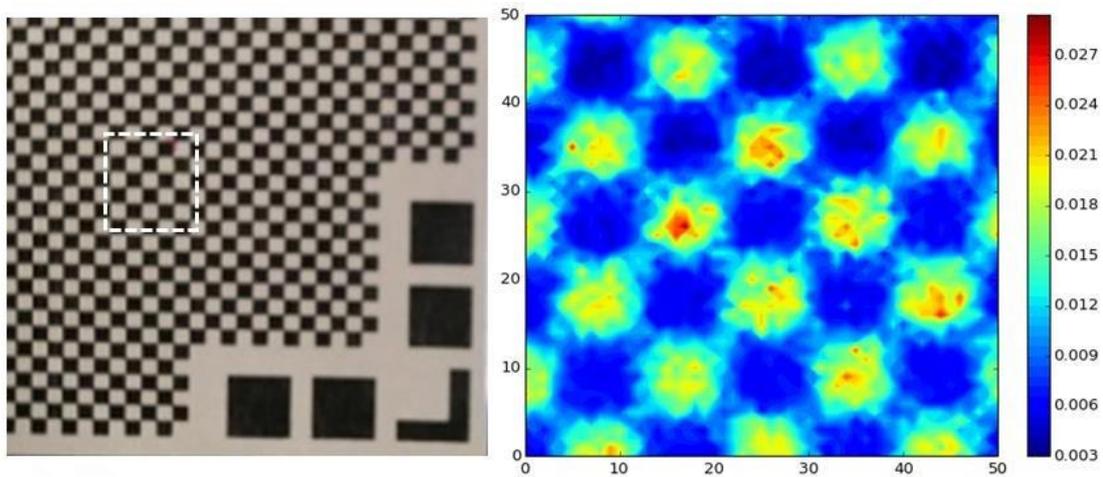
Fonte: O autor (2021)

Figura 17 - Imageamento de um fio de cabelo humano; (a) Foto original; (b) Imagem ampliada; (c) Imageamento realizado, $\lambda = 532 \text{ nm}$



Fonte: O autor (2021)

Figura 18 - À esquerda, imagem original de um QR Code e à direita o imageamento realizado com $\lambda = 532 \text{ nm}$



Fonte: O autor (2021)

Nos exemplos mostrados acima, é possível perceber, a partir da escala que acompanha o imageamento, que a diferença na absorção de cada região permite mapear perfeitamente a amostra. Nessas situações, por serem medidas de teste, não se importou muito com o tamanho do passo e do feixe.

4 RESULTADOS EXPERIMENTAIS COM NANOPARTÍCULAS DE TiN

Ao longo do desenvolvimento do trabalho, estudamos a resposta fotoacústica de 3 amostras diferentes de nanopartículas de nitreto de titânio (TiN NPs). Todas elas foram sintetizadas da mesma forma, sob as mesmas condições. Primeiro abordaremos como foi o processo de fabricação, semelhante nas situações, mudando apenas a amostra. Apesar do processo de fabricação ser o mesmo, houve uma certa diferença quanto às características e propriedades das nanopartículas, que será comentada ao longo do texto.

Dessa forma, a seção 4.1 irá descrever o processo da síntese das amostras e as características para cada uma delas. A seção 4.2, apresentará os resultados para cada uma das três amostras de nanopartículas de nitreto de titânio (TiN NPs). Essa seção foi dividida em três subseções, uma para cada amostra, para uma melhor organização.

4.1 SÍNTESE DAS AMOSTRAS

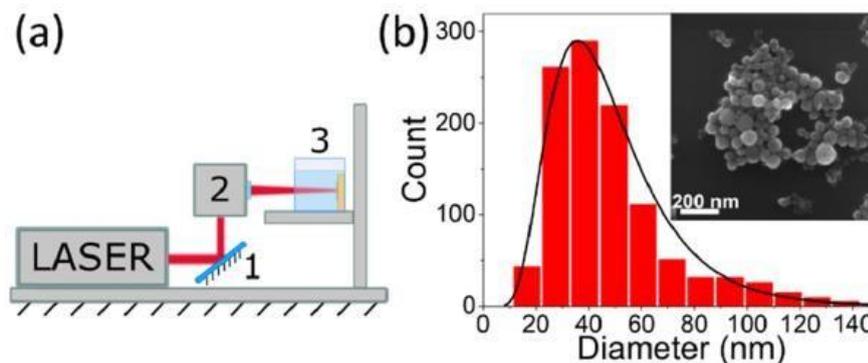
As amostras de nanopartículas de nitreto de titânio (TiN NPs) foram obtidas em colaboração com Dr. Andrei Kabashin, Dr. Andrei Pastukhov e Dr. Anton Popov, MEPHI, Rússia. Elas foram sintetizadas a partir da técnica de ablação por laser, processo no qual há a remoção do material de uma superfície sólida por irradiação através do feixe de um laser. Para isso, fez-se uso de um laser de femtosegundo Yb:KGW (TETA 10, AVESTA, Moscou, Rússia) com comprimento de onda de 1030 nm, taxa de repetição de 10 kHz e uma duração de pulso de 270 fs [83].

A amostra de TiN (GoodFellow) com 99,5% de pureza foi colocada verticalmente em uma cubeta contendo água deionizada ou acetona (Sigma Aldrich). O feixe incidia em uma lente com 100 mm de foco para diminuir seu diâmetro, que antes era de aproximadamente 3 mm. Assim, ocorria a remoção de nanopartículas de TiN, que passaram a ficar permeando um dos líquidos em questão (dependendo do solvente). Uma esquematização do sistema de síntese das nanopartículas é mostrado na Fig. 19 (a). O fato de usar dois solventes diferentes (água deionizada e acetona) gerou, no caso, duas amostras [84].

Para evitar a remoção do material em um mesmo ponto, fez-se uso de um scanner de galvanômetro, permitindo assim alterar a direção de incidência do feixe, incidindo em outras

regiões do alvo (TiN). Nesse processo, que durou cerca de 20 minutos, a energia do pulso era de 100 μJ e, ao final, a concentração da amostra era de 50 $\mu\text{g/mL}$ [84].

Figura 19 - (a) Sistema para síntese das nanopartículas de nitreto de titânio; (b) Distribuição contendo o tamanho de TiN Nps

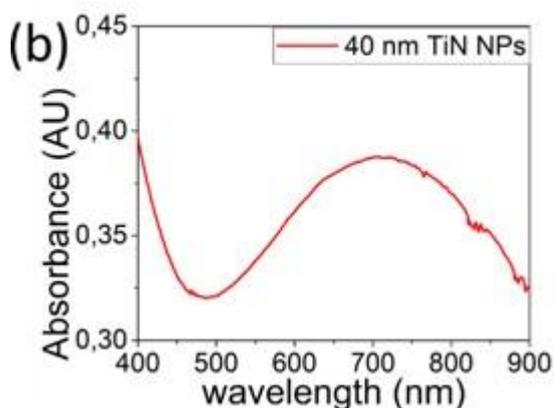


Fonte: M. E. Maldonado, A. Das, A. S. L. Gomes, A. A. Popov, S. M. Klimentov e A. V. Kabashin (2020)

As características químicas e estruturais das nanopartículas foram medidas a partir de um microscópio eletrônico de varredura (MEV) (MAIA 3, Tescan), juntamente com um sistema de espectroscopia por dispersão em energia (X-act, Oxford Instruments). Os resultados obtidos pelo MEV confirmaram a formação de nanopartículas esféricas. A partir de uma análise estatística foi possível estabelecer uma distribuição para o tamanho das nanopartículas geradas, que possuíam um valor mais recorrente em torno de 40 nm de diâmetro [84], como mostrado na Fig. 19 (b).

O espectro de absorção das nanopartículas tendo a acetona como solvente foi medido através de um espectrofotômetro UV-Vis-NIR (Fluoromax, HORIBA) e é apresentado na Fig. 20. A partir dele observa-se duas regiões de grande absorção: uma delas, na região do ultravioleta (UV), a absorção se dá por conta de transições interbandas, enquanto a outra, na região em torno de 700 nm, ocorre por conta da ressonância de plasmons de superfícies [84].

Figura 20 - Espectro de absorção da primeira amostra de nanopartículas de TiN



Fonte: M. E. Maldonado, A. Das, A. S. L. Gomes, A. A. Popov, S. M. Klimentov e A. V. Kabashin (2020)

4.2 CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE TiN POR TÉCNICAS FOTOACÚSTICAS

4.2.1 Amostra #1

Um dos fatores que influenciam a qualidade do imageamento é o contraste que a imagem apresenta, que está relacionado com a sua visibilidade. Assim, a incidência do feixe de luz na região de maior absorção do material é de fundamental importância, visto que quanto maior a absorção, maior o sinal fotoacústico, destacando assim as regiões de maior absorção. Logo, deve-se verificar o pico de absorção a partir do seu espectro a fim de obter um imageamento com um bom contraste. A partir desse espectro, mostrado na Fig. 20, já é possível escolher o melhor comprimento de onda que permitiria um melhor imageamento, que seria em torno de 700 nm. Mesmo assim, aproveitou-se a oportunidade para utilizar o sistema de espectroscopia fotoacústica desenvolvido e comparar os resultados medidos pelas duas técnicas. Para esse fim, foi necessário montar um sistema no laboratório para tal finalidade, mostrado previamente.

Pelo fato de já possuir o espectro de absorção para as nanopartículas em acetona, como é mostrado na Fig. 20, optou-se pelo estudo dessa amostra especificamente. A primeira observação importante é a presença de uma região com um pico de absorção em torno de 700 nm, devido à ressonância de plasmons de superfície. Esse resultado servirá como referência para o resultado que será obtido no espectro fotoacústico.

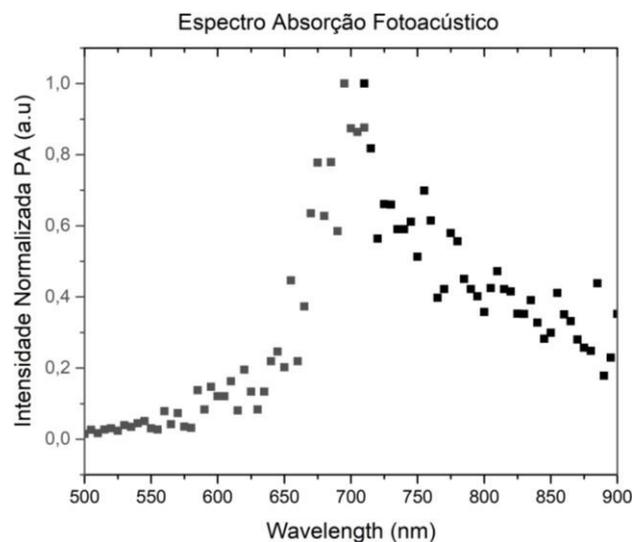
Assim, para confirmar o comprimento de onda no qual a amostra é mais absorvedora e realizar uma medida comparativa com o que foi obtido no espectrofotômetro, foi realizado o espectro fotoacústico da mesma a partir do sistema que foi montado no laboratório.

Como o objetivo do trabalho é utilizar as nanopartículas como agente de contraste biológico, é fundamental obter uma região absorvedora dentro da janela biológica (700 nm – 1000 nm), uma vez que os tecidos biológicos não são muito absorvedores nessa região. Além disso, operar em uma frequência mais baixa permite que a luz atinja regiões mais profundas, como mencionado anteriormente.

Levando em consideração a ideia de usar as nanopartículas de TiN para aplicações de imageamento, optamos por caracterizar estas amostras no intervalo compreendido entre 500 nm e 900 nm. Além de estar dentro da janela de transparência biológica, esse intervalo coincide com a banda de ressonância plasmônica.

Para realizar a medida, a amostra foi colocada em um eppendorf de 200 μ L e selada com cola quente, evitando o vazamento da amostra. Então, utilizando fita dupla face, colou-se o eppendorf em uma lâmina de vidro para microscopia. Por fim, colocou-se a lâmina com o eppendorf contendo a amostra no fundo de uma vasilha de plástico contendo água destilada, permitindo um maior acomplamento acústico. Em seguida, com o auxílio do programa de aquisições que foi detalhado no capítulo anterior, obteve-se o seguinte resultado para o espectro fotoacústico, apresentado na Fig. 21:

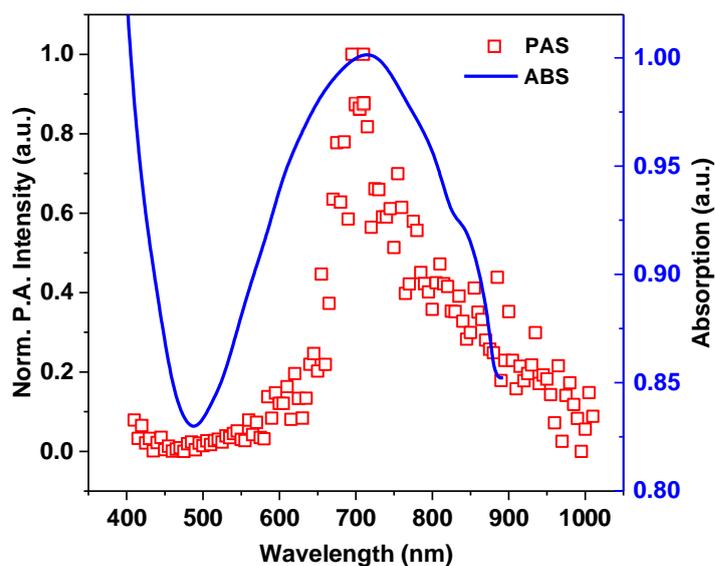
Figura 21 - Espectro de absorção normalizado utilizando a espectroscopia fotoacústica (PAS) para a primeira amostra de TiN NPs



Fonte: O autor (2021)

Percebe-se que o espectro fotoacústico fornece como resultado um pico de absorção em aproximadamente 700 nm, mesmo resultado obtido pelo espectrofotômetro. Para visualizar melhor o comportamento de ambos os gráficos, os dois resultados foram normalizados e plotados em um único gráfico, mostrado abaixo na Fig. 22.

Figura 22 - Comparação entre os espectros de absorção normalizados utilizando a espectroscopia fotoacústica e o espectrofotômetro



Fonte: O autor (2021)

O resultado medido está em acordo com o que foi obtido logo após a síntese da amostra, quando utilizou-se um espectrofotômetro (FluoroMax, HORIBA). Portanto, vemos que os dois resultados, além de semelhantes, apontam um pico de absorção na faixa de 700 nm, mostrando que a espectroscopia fotoacústica, além de um método altamente confiável e eficaz, visto que a técnica fornece diretamente a absorção do material, sem precisar de futuras análises, é uma alternativa bastante viável para medidas de espectros de absorção.

Em posse do espectro de absorção, foram realizadas as medidas de imageamento. Antes de qualquer medida ser feita, era verificada a densidade de energia utilizando um medidor de potência (Nova II, OPHIR). O valor obtido era então comparado com o máximo permitido pela ANSI (*American National Standard for Safe Use of Lasers*) [85].

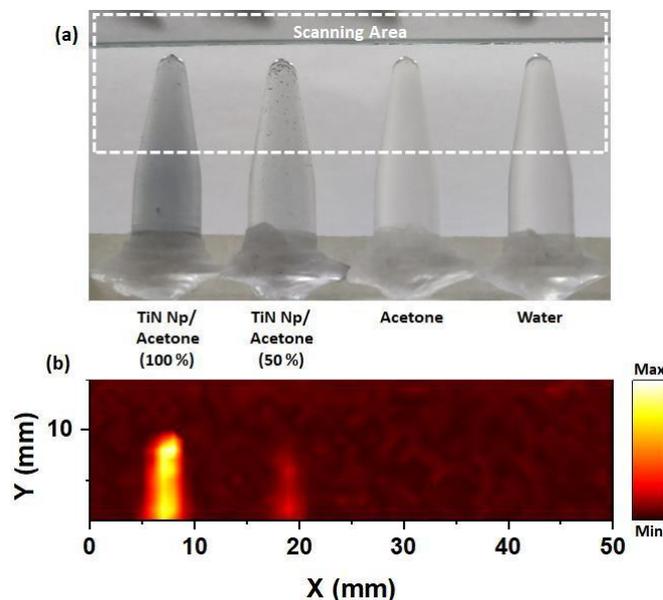
O primeiro imageamento ocorreu de forma comparativa. Foram utilizados quatro eppendorfs de 200 μL no experimento, conforme mostra a Fig. 23. Os dois à esquerda contém

as nanopartículas de nitreto de titânio em acetona, mas em concentrações diferentes, enquanto os outros dois à direita contém apenas solventes (acetona e água deionizada). A fluência óptica usada para essa medida foi de 6 mJ/cm^2 e o diâmetro do feixe era de $500 \mu\text{m}$ após passar por uma abertura mecânica. Por conta disso, o tamanho do passo do translador escolhido foi de $0,5 \text{ mm}$.

Nesse ponto, vale ressaltar que, em 700 nm (comprimento de onda utilizado na medida), o máximo de exposição à radiação permitida para tecidos biológicos, de acordo com a *American National Standard for Safe Use of Lasers* [85], é de 20 mJ/cm^2 , o que significa que se operou com um valor muito abaixo do permitido.

Esse valor bem abaixo se deu devido ao fato da fonte utilizada no sistema (OPO VIBRANT 355 LD) apresentava problemas na emissão. O feixe de luz proveniente da fonte era emitido com uma potência extremamente baixa. Em todos os experimentos subsequentes, calibrrou-se os espelhos dentro do OPO para obter uma potência maior, mas sempre com um resultado muito abaixo do máximo permitido.

Figura 23 - (a) Imagem das amostras (da esq. para dir.): TiN/Acetone NPs 100%, TiN/Acetone Nps 50%, acetona e água deionizada; (b) PAI do sistema, $\lambda = 700 \text{ nm}$



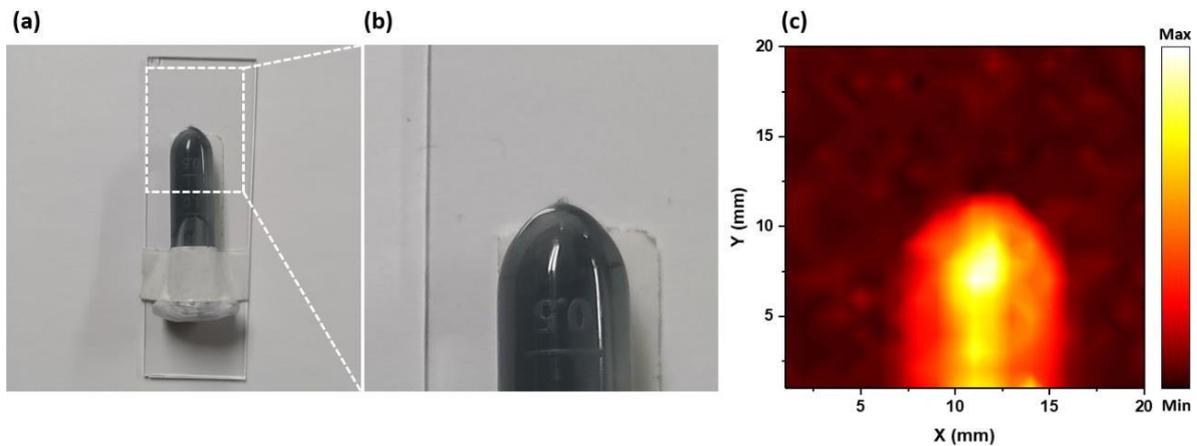
Fonte: O autor (2021)

Apesar da baixa fluência, o resultado obtido está de acordo com o esperado, uma vez que a solução contendo maior quantidade de nanopartículas possui uma maior absorção e, conseqüentemente, um maior sinal fotoacústico, quando comparado à solução com menor

concentração. Além disso, pelo fato de os solventes não serem absorvedores nesse comprimento de onda específico, não há sinal proveniente dos seus respectivos eppendorfs.

Depois, foi realizado o imageamento contendo apenas a solução contendo as nanopartículas de TiN. Nessa medida foi utilizado um eppendorf de 2 mL e a mesma fluência óptica foi utilizada para essa situação (6 mJ/cm^2). O resultado obtido é mostrado na Fig. 24.

Figura 24 - (a) TiN NPs/Acetone em um eppendorf de 2 mL; (b) Imagem aproximada da região a ser escaneada; (c) PAI da amostra, $\lambda = 700 \text{ nm}$



Fonte: O autor (2021)

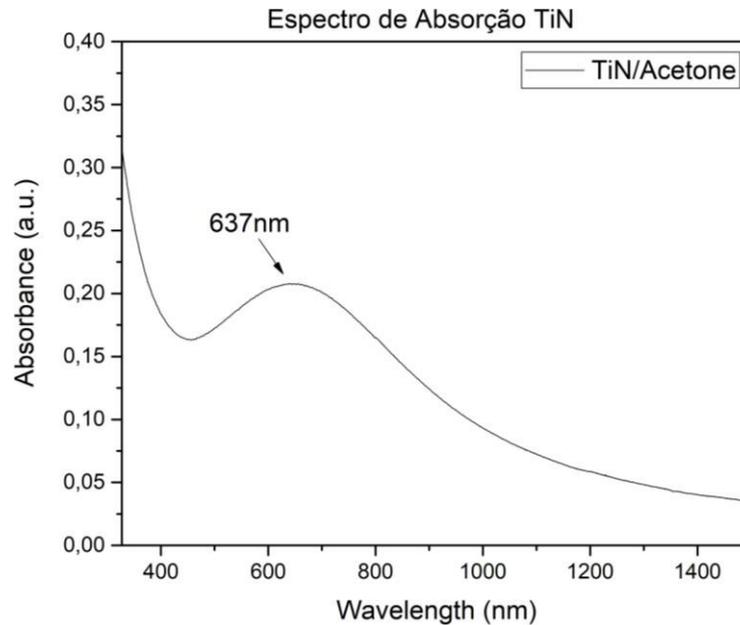
Apesar dos bons resultados, a amostra possui uma baixa absorção (aproximadamente 0,4) e veio em pequena quantidade. Por ter sido usada em outros experimentos (em odontologia e OPAZ (*Open Z-Scan and Photoacoustic Z-Scan*)[84] sobrou apenas uma quantidade muito pequena, impossibilitando futuras medidas. Por conta disso, uma nova amostra foi sintetizada da mesma forma que a anterior, mas com dimensões diferentes.

4.2.2 Amostra #2

A nova amostra, que tinha somente a acetona como solvente, apresentou um diâmetro de aproximadamente 48 nm, estimado após a síntese. Dessa vez, o espectro de absorção da amostra não foi medido após a síntese, sendo necessário realizar tal medida assim que ela chegou ao laboratório. Para essa nova amostra, os mesmos procedimentos foram realizados, sendo necessário, primeiramente, obter o espectro de absorção. Para isso, foi utilizado um

espectrofotômetro UV-VIS (Cary 5000, Agilent Technologies), que cobre a faixa espectral de 175 nm a 3,3 μm . O resultado obtido é mostrado na Fig. 25 abaixo.

Figura 25 - Espectro de absorção da segunda amostra de nanopartículas de TiN



Fonte: O autor (2021)

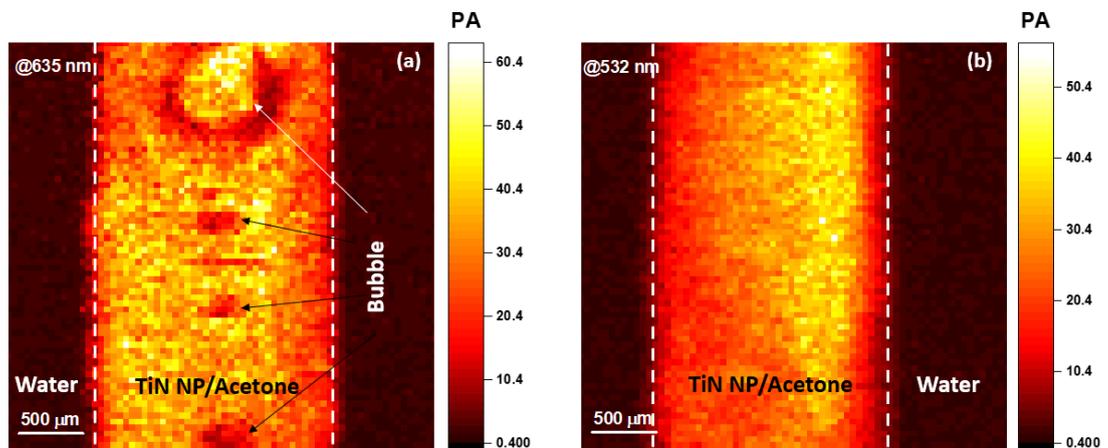
A partir do espectro mostrado na Fig. 25, nota-se um pico de absorção em torno de 635 nm, comprovando um pico de absorção diferente do que foi observado para a primeira amostra. Sendo assim, o imageamento a ser realizado foi feito com 635 nm. Com o auxílio de uma lente para focalizar o feixe, foi possível diminuir o diâmetro do feixe de 500 μm , quando se utilizava a abertura mecânica, para aproximadamente 50 μm . Isso significa que a resolução espacial correta é de 0,05 mm, definindo, portanto, o tamanho de cada passo do translador. O passo do translador igual ao do diâmetro do feixe assegura que não ocorre nenhuma superposição de sinais, ou seja, uma mesma região da amostra ser iluminada mais de uma vez.

Além de operar no comprimento de onda de maior absorção, foi realizado também o imageamento usando 532 nm, para medidas comparativas. Para isso, foi necessário emitir um feixe com a mesma densidade de energia para os dois comprimentos de onda. Assim, ao perceber que em 635 nm a fluência máxima obtida era de 0,16 mJ/cm^2 , reduziu-se a intensidade da luz incidente em 532nm com o auxílio de dois polarizadores, como mostrado na Fig. 13. É esperado que, pelo fato de ocorrer uma maior absorção em 635 nm, como observado no

espectro, a amplitude do sinal fotoacústico para esse comprimento de onda específico seja maior que o sinal fotoacústico para 532 nm.

A amostra foi, portanto, colocada em um tubo capilar (PRECISION GLASS LINE) para realizar o imageamento. Sendo assim, adicionou-se ao sistema uma lente de distância focal de 100 mm, reduzindo o diâmetro do feixe para 50 μm , como colocado anteriormente. O resultado do imageamento é mostrado na Fig. 26.

Figura 26 - PAI da segunda amostra de TiN NPs/Acetone utilizando diferentes comprimentos de onda; (a) 635 nm; (b) 532 nm



Fonte: O autor (2021)

As duas imagens possuem uma resolução excelente, ressaltando nitidamente a região que compreende a amostra. Um ponto importante a se destacar é a criação de bolhas dentro da amostra. Isso ocorreu pelo fato de o foco do feixe estar sobre a amostra, o que levou à um aquecimento, criando assim as bolhas vistas na figura acima.

Observa-se que, a partir da escala que acompanha o imageamento, ocorre uma maior absorção, apesar de mínima, quando o pulso emitido está em 635 nm, como era esperado. A diferença entre os valores máximos das duas imagens, por menor que seja, ocorre pelo fato da absorção das nanopartículas de TiN ocorrer predominantemente em 635 nm, o que gera um sinal fotoacústico com uma maior amplitude, enquanto para 532 nm a amplitude será menor. Essa diferença não é tão significativa (em 635 nm a absorção é de 0,16 a.u., enquanto para 532 nm é de 0,14 a.u.) por não haver uma grande diferença na absorção do material ao variar de um comprimento de onda para outro, como é observado no espectro obtido (Fig. 25). Entretanto, vemos que existe sim uma ligeira diferença e que o resultado apresentado é coerente com a teoria.

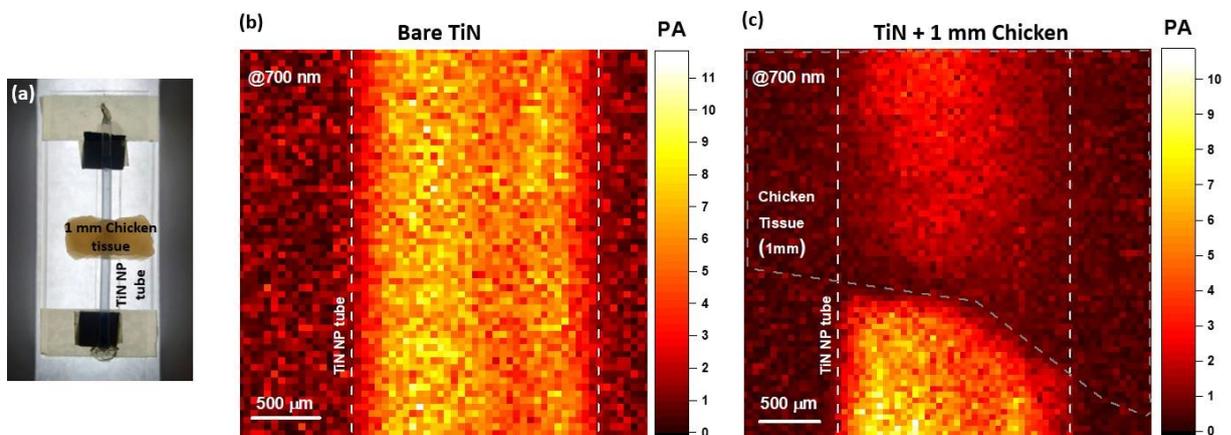
Essa diferença acarreta também em uma melhor resolução, visto que a diferença entre a região em que não absorve para a região mais absorvedora é maior, levando assim a uma imagem mais “limpa”, apesar das bolhas criadas.

Após verificar a dependência com o comprimento de onda, foi realizado o imageamento utilizando tecido biológico. Nessa situação, um pedaço de peito de frango com 1 mm de espessura foi usado, colocado sob a amostra. Sendo assim, o feixe de luz, antes de incidir na amostra, passa pelo tecido biológico, como esquematizado na Fig. 27 (a).

Apesar do pico de absorção da amostra ocorrer em 635 nm, esse comprimento de onda não se encontra dentro da primeira janela biológica (700 nm – 1000 nm). Isso significa que para esse comprimento de onda, o tecido biológico absorve parte da radiação. Sendo assim, como o feixe possuía uma potência extremamente baixa pelo fato de a fonte de luz apresentar problemas técnicos, como comentado anteriormente, toda a radiação acabava sendo absorvida pelo tecido, não apresentando assim qualquer sinal fotoacústico proveniente da amostra no comprimento de onda de 635 nm quando o tecido biológico era colocado acima da mesma.

Por isso, operou-se com o comprimento de onda de 700 nm devido ao fato de se encontrar dentro da janela biológica. Pelo espectro de absorção apresentado na Fig. 25, apesar do pico de absorção ser em 635 nm, em 700 nm a amostra ainda apresenta uma certa absorção. Apesar do feixe vir com uma potência ainda mais baixa, afetando bastante a resolução do imageamento, foi possível obter um sinal fotoacústico mínimo o suficiente para o que foi proposto. Por isso, preferiu-se usar um comprimento de onda maior, que tem maior capacidade de penetração, mesmo que a intensidade fosse ainda mais baixa.

Figura 27 - (a) Amostra de TiN NPs/Acetone a ser feito o imageamento; (b) PAI sem o tecido biológico; (c) PAI utilizando tecido biológico com 1mm de espessura. Medidas realizadas com $\lambda = 700$ nm



Fonte: O autor (2021)

Nota-se que mesmo com o tecido biológico em cima da amostra existe um sinal fotoacústico proveniente das nanopartículas de TiN, mas com uma intensidade menor, visto que uma quantidade menor de luz chega à amostra para ser absorvida.

É possível notar também uma diminuição considerável no sinal fotoacústico quando comparado com o resultado obtido para 635 nm. Isso se dá por conta de uma menor absorção da amostra nesse comprimento de onda, resultando em um sinal fotoacústico de menor intensidade, como esperado.

Vale ressaltar que, de acordo com a *American National Standard for Safe Use of Lasers* [85], para experimentos envolvendo tecido biológico nos comprimentos de onda utilizados e com a duração do pulso de 5 ns, a fluência óptica máxima permitida é de aproximadamente 20 mJ/cm². Sendo assim, o experimento foi realizado com uma densidade de energia bem abaixo do limiar. Com um feixe mais intenso, é possível obter melhores resultados, com uma melhor resolução, utilizando até mesmo camadas mais espessas de tecido.

Em todas as medidas realizadas, tentou-se otimizar ao máximo os resultados, visando obter uma densidade de energia mais próxima do máximo permitido. Entretanto, a fonte de luz utilizada (OPO VIBRANT 355 LD) não funcionava corretamente, o que interferiu diretamente nos resultados. Nas situações descritas, operou-se com a maior potência gerada pela fonte, mesmo ela apresentando problemas técnicos. Ao final dessas medidas, uma nova amostra de TiN NPs foi sintetizada e enviada ao laboratório.

É importante destacar que é possível obter valores de penetração de aproximadamente 3 mm sem a necessidade de agentes de contraste biológico [86], mas com uma fluência óptica de aproximadamente 6 mJ/cm² [87], maior do que a que foi obtida no experimento realizado (aproximadamente 0,16 mJ/cm²), o que nos leva a crer que é possível o uso de camadas mais espessas de tecido biológico, contanto que a fonte seja capaz de fornecer uma densidade maior de energia.

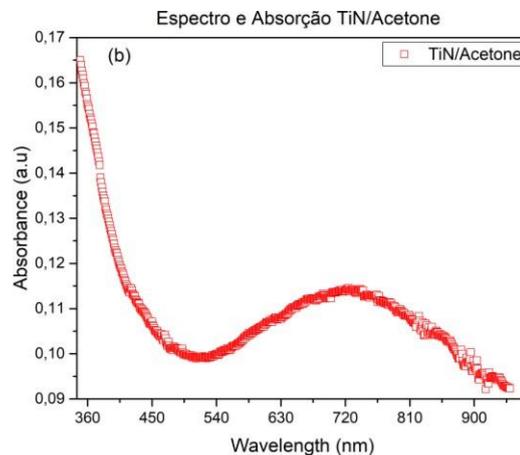
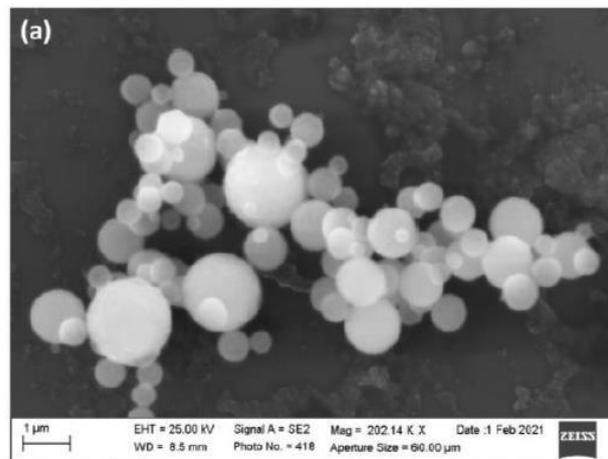
Ao considerar o uso de agentes de contrastes que possuam pico de absorção no infravermelho próximo, ou seja, dentro da primeira janela biológica, é possível atingir regiões mais profundas do tecido biológico [88]. A indocianina verde (ICG), por exemplo, possui um pico de absorção por volta de 800 nm [89], permitindo uma penetração de até 3 cm [14], [89], um aumento considerável quando comparado com os valores obtidos sem a sua utilização.

4.2.3 Amostra #3

Para essa nova amostra de TiN NPs, as suas dimensões não foram informadas pelo fabricante. A fim de determinar o tamanho das nanopartículas de TiN, foi realizada uma medida de microscopia eletrônica de varredura (GeminiSEM, ZEISS). Para realizar tal medida, a amostra foi colocada em um substrato de silício (Si) devidamente esterilizado e constatou-se que o formato das nanopartículas era esférico e o diâmetro variava em torno de 100 nm a 1,5 μm .

Além dessa medida, pelo fato de ser uma nova amostra, um novo espectro de absorção foi medido a partir do espectrofotômetro usado nas medidas anteriores (FluoroMax, HORIBA), determinando um pico de absorção em torno de 725 nm. Os resultados obtidos são mostrados abaixo na Fig. 28.

Figura 28 - (a) Imagem real fornecendo o tamanho das nanopartículas, indicando um diâmetro de aproximadamente 100 nm; (b) espectro de absorção da terceira amostra de TiN NPs

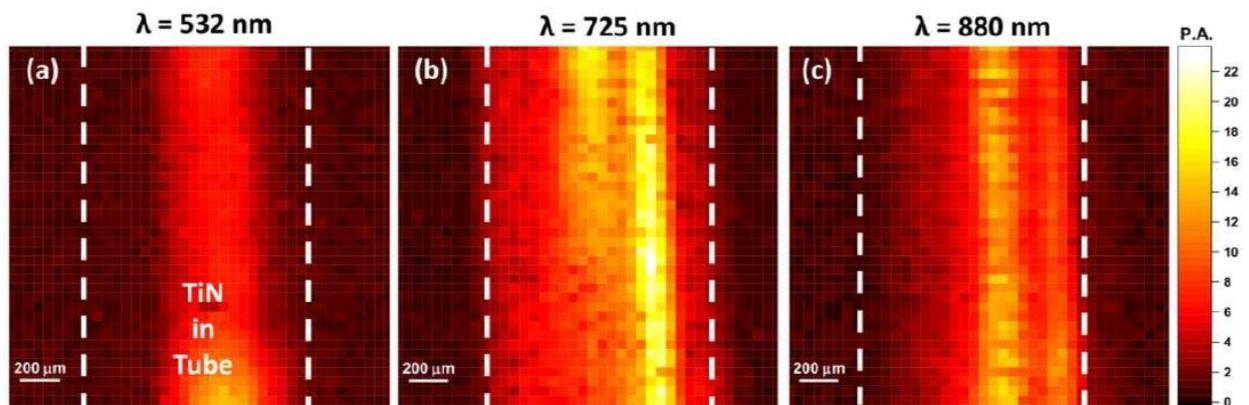


Fonte: O autor (2021)

Assim como nas amostras anteriores, ocorre uma baixa absorção, fato esse que pode ocorrer devido ao tamanho das nanopartículas, como é possível perceber na imagem acima (Fig. 28(a)). O fato de o tamanho da amostra variar entre 100 nm e 1,5 μ m implica em não ser possível mais negligenciar o termo da seção de choque de espalhamento, conforme colocado na equação (2.59). Por conta disso, o termo de extinção para a ressonância de plasmons de superfície possui agora duas contribuições, atribuídas à absorção e ao espalhamento da amostra. À medida que as dimensões do material aumentam, a seção de choque de extinção passa a ter um termo de contribuição do espalhamento, o que diminui a contribuição devido à absorção e, conseqüentemente, gerando um sinal fotoacústico de menor intensidade.

Após a espectroscopia, foi realizado o imageamento da amostra, colocada em um tubo capilar (PRECISION GLASS LINE) propriamente selado. Para efeitos de comparação, utilizou-se diferentes comprimentos de onda (532 nm, 725 nm e 880 nm) para essa medida. O resultado é mostrado na Fig. 29.

Figura 29 - PAI da terceira amostra de TiN NPs em diferentes comprimentos de onda: (a) 532 nm; (b) 725 nm; (c) 880 nm



Fonte: O autor (2021)

Como era de se esperar, para 725 nm, pelo fato de ter uma maior absorção para esse comprimento de onda, existe uma melhor resolução, além de uma maior amplitude de sinal fotoacústico, conforme a escala colocada ao lado.

Em seguida, decidiu-se verificar a absorção não linear por parte do material, foi realizado uma medida na qual relaciona-se a amplitude do sinal fotoacústico, que está diretamente relacionada à absorção do material, e a densidade de energia que incidia na amostra.

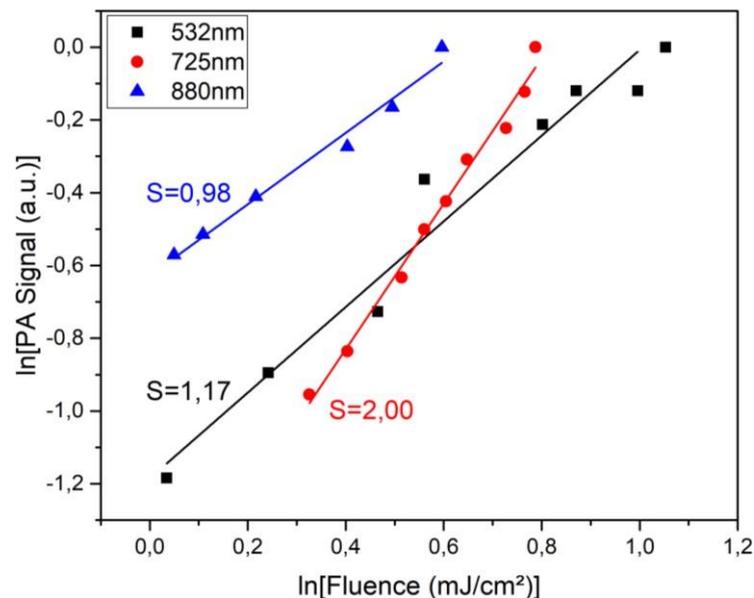
A amplitude do sinal fotoacústico (PA) tem uma relação de proporcionalidade com a densidade de energia (E) expressa por [90]:

$$PA \propto E^n \quad (2.62)$$

O expoente n será o responsável por determinar a não linearidade da absorção do material. Caso n seja igual a 1, a absorção do material é linear, como no caso da Rodamina 6G, mostrado previamente (ver Fig. 12). Assim, ao plotar um gráfico do logaritmo da amplitude do sinal fotoacústico em função do logaritmo da densidade de energia, a inclinação da reta, a partir de um ajuste linear, fornecerá o valor absoluto de n .

Portanto, uma medida foi realizada mantendo o comprimento de onda constante e variando a densidade de energia que incidia na amostra. Para essa medida, os três comprimentos de onda usados anteriormente para o imageamento foram selecionados, obtendo o resultado descrito abaixo na Fig. 30.

Figura 30 - Gráfico do logaritmo do sinal fotoacústico para diferentes comprimentos de onda em função do logaritmo da fluência óptica para verificar a absorção de dois fótons (TPA)



Fonte: O autor (2021)

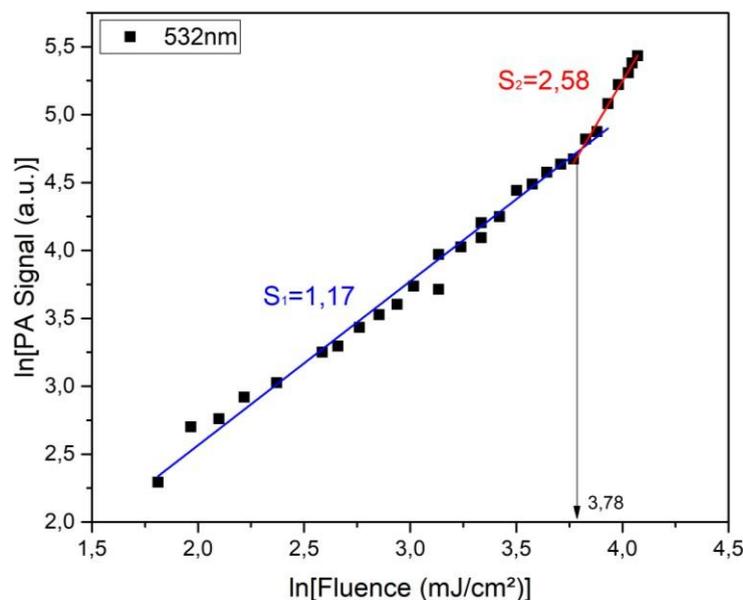
Primeiramente, vale ressaltar que a normalização do sinal fotoacústico foi feita dividindo os valores dos sinais fotoacústicos obtidos em cada comprimento de onda pelo de maior amplitude, a fim de que os três gráficos coubessem em uma mesma figura. Esse método foi

realizado pelo fato de que não estamos interessados na amplitude do sinal, e sim no comportamento do ajuste.

Para o comprimento de onda ajustado em 725 nm, o resultado fornecido pela melhor reta é uma inclinação de 2, o que demonstra a absorção de dois fótons por parte da amostra, caracterizando uma absorção não linear, enquanto para os outros comprimentos de onda o resultado é próximo de 1. Este resultado não significa que a amostra tem uma absorção linear, e sim que para essas densidades de energia, ela absorve apenas um fóton. Como colocado na equação (2.42), o número de fótons absorvidos é proporcional ao quadrado da densidade de energia, o que significa que para uma densidade de energia baixa, o fenômeno de absorção de dois fótons (TPA) se torna mais difícil. Além disso, o fato da baixa absorção da amostra em 532 nm e 880 nm, como mostra a Fig. 21(b), corrobora com esse resultado. Já em 725 nm, por conta de uma maior absorção nesse comprimento de onda, mesmo com uma densidade de energia baixa, é possível verificar a ocorrência da absorção de dois fótons, o que comprova a não linearidade das nanopartículas de nitreto de titânio.

Para atingir valores maiores de energia (pelo menos para 532 nm), a mesma medida foi realizada usando um laser Q-switched Nd:YAG (Continuum Surelite SL II-10) emitindo em 532 nm e 1064 nm. As medidas feitas em 532 nm podem ser usadas para comparar o resultado obtido na Fig. 30. O resultado é mostrado na Fig. 31.

Figura 31 - Gráfico do logaritmo do sinal fotoacústico em função do logaritmo da fluência óptica para $\lambda = 532\text{nm}$ a fim de verificar a absorção de dois fótons (TPA)

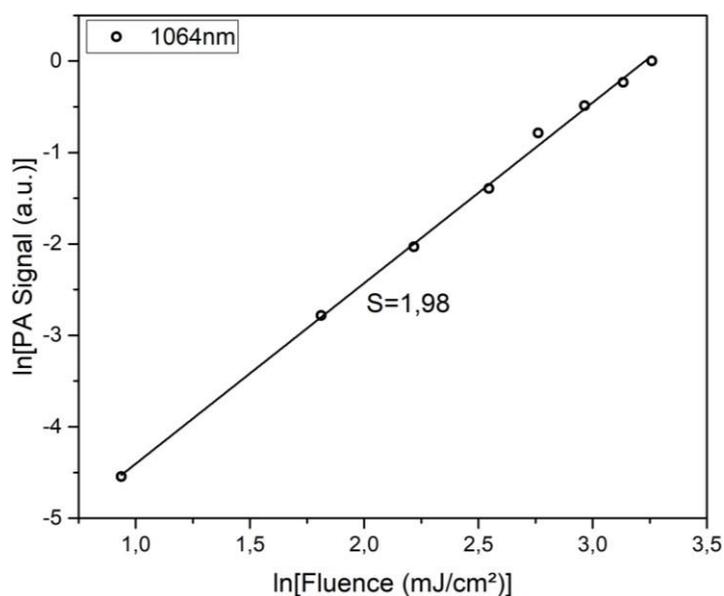


Fonte: O autor (2021)

É interessante observar que a inclinação da reta para baixas densidades de energia é exatamente igual ao que foi obtido usando o OPO. Entretanto, a utilização do laser permitiu atingir densidades de energia maiores, podendo validar a não linearidade na absorção da amostra. Isso quer dizer que, como o fenômeno depende do quadrado da densidade de energia, não se tinha atingido uma energia mínima para que tal fenômeno ocorresse.

Como representado na Fig. 5, para que ocorrer a absorção de dois fótons, é necessário que a soma das frequências dos dois fótons incidentes seja igual à frequência necessária para uma transição eletrônica [27]. Como mostrado anteriormente, em 532 nm, para densidades de energias menores que 43 mJ/cm², um fóton é absorvido, ou seja, a frequência do fóton nesse comprimento de onda já é responsável por uma transição eletrônica. Isso quer dizer que, em 1064 nm, onde temos metade da frequência de 532 nm, deve-se presumir a absorção de dois fótons, uma vez que o dobro da frequência nesse comprimento de onda é igual a frequência em 532 nm, onde já ocorre a absorção de um fóton. Como o laser utilizado é capaz de emitir também em 1064 nm, o mesmo procedimento foi realizado para esse comprimento de onda, cujo resultado é mostrado abaixo na Fig. 32.

Figura 32 - Gráfico do logaritmo do sinal fotoacústico em função do logaritmo da fluência óptica para $\lambda = 1064\text{nm}$ a fim de comprovar a absorção de dois fótons (TPA)



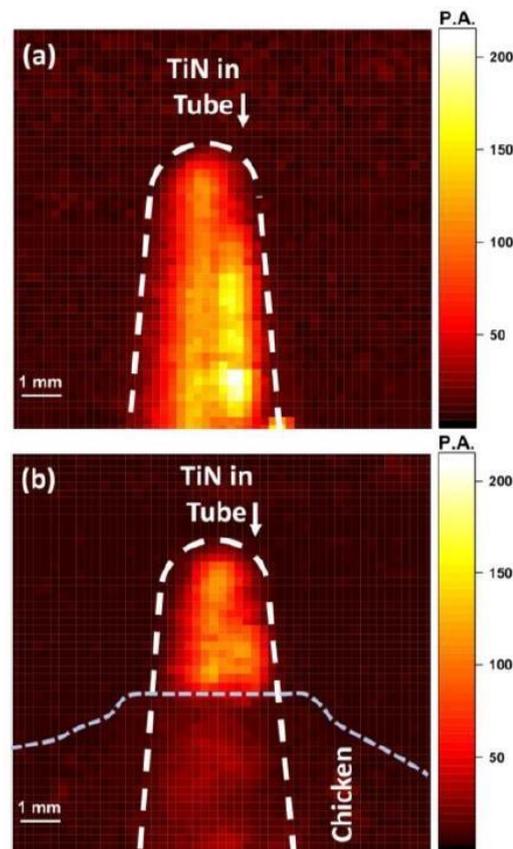
Fonte: O autor (2021)

Como é possível observar, em 1064 nm a inclinação da reta é igual a 2, o que comprova a não linearidade da amostra e a absorção de dois fótons. Sabendo que um comprimento de

onda maior possui uma maior penetração e que a não linearidade da amostra implica na absorção de dois fótons, é possível atingir uma maior profundidade em tecido biológico e ainda assim garantir uma boa absorção por parte da amostra. Por conta disso, foi realizado o imageamento utilizando o mesmo laser descrito acima, ajustado em 1064 nm. Infelizmente o resultado obtido para o espectro de absorção, mostrado na Fig. 28 (b), não permite estimar se a amostra irá ou não produzir um sinal significativo para ser detectado. Entretanto, em 1064 nm se tem uma maior penetração no tecido biológico, devido à baixa frequência e, por conta do fenômeno de TPA, é possível que haja uma absorção considerável por parte do material.

Além disso, é possível atingir densidades de energia maiores do que era obtido com o OPO usado nas duas primeiras amostras para o mesmo comprimento de onda. O imageamento foi feito com 1 mm de tecido biológico de frango, como realizado previamente. A amostra foi colocada em um eppendorf de 200 μ L. O resultado do imageamento é mostrado abaixo.

Figura 33 - PAI da terceira amostra de TiN NPs com 1mm de tecido biológico



Fonte: O autor (2021)

Como é possível notar, para 1064 nm existe uma absorção considerável por parte da amostra, como é mostrado na Fig. 33 (a). O espectro medido Fig. 28 (b) não apresenta o valor da absorção em 1064 nm por conta do equipamento utilizado (espectrofotômetro FluoroMax, HORIBA) não varrer essa região. Entretanto, como foi possível notar na Fig. 32, ocorre a absorção de dois fótons (TPA) por parte da amostra nesse comprimento de onda, o que faz com que, mesmo que a absorção seja baixa nesse comprimento de onda (não sabemos exatamente), existe uma parcela considerável de radiação absorvida.

Outro fator que contribui para o resultado acima é o uso de um comprimento de onda maior, o que permite uma maior penetração, sendo possível alcançar regiões mais profundas, mesmo com o tecido biológico acima da amostra. O sinal obtido proveniente da região que se encontra abaixo do tecido biológico se dá por conta da alta penetração em 1064 nm e devido ao fenômeno de absorção de dois fótons (TPA) para as nanopartículas de TiN (TiN NPs) é que se é possível obter um sinal significativo para essa região.

Além disso, observa-se que a resolução do imageamento é excelente. É possível notar claramente a delimitação da região que contém a amostra, mesmo com o tecido biológico, o que comprova a qualidade da microscopia realizada.

5 CONCLUSÃO

O efeito fotoacústico permite uma variedade muito grande de aplicações. O fato de se poder estudar propriedades ópticas de materiais sólidos, líquidos e gasosos a torna uma ferramenta extremamente poderosa.

Os resultados apresentados mostram a eficiência dos programas desenvolvidos em LABView, que poderão ser aperfeiçoados para diminuir o tempo de aquisição. Apesar disso, apresentaram perfeito funcionamento e geraram resultados coerentes com o que se era esperado, além reduzir o erro humano em cada medida que pudesse ser realizada manualmente. Esses programas poderão ser usados futuramente para novas medidas com novos materiais.

Além disso, foi mostrado que a montagem experimental da microscopia fotoacústica (PAM) que foi desenvolvida no laboratório, operando com uma resolução de 50 μm , apresenta bons resultados. As nanopartículas utilizadas, quando comparados com os contrastes usuais, as nanopartículas apresentam baixa toxicidade [48] e uma região de maior absorção em maiores comprimentos de onda e, principalmente, fora da janela biológica [84], [91], sendo possível sendo possível realizar o imageamento fotoacústico em 532 nm, 635 nm, 700 nm, 880 nm e em 1064 nm.

Pela condição proporcionada pelo imageamento na região da primeira janela biológica, foi possível realizar a microscopia fotoacústica utilizando tecido biológico com 1 mm de espessura operando em 700 nm e 1064 nm. Vale ressaltar a importância da microscopia em 1064 nm, visto que ela só foi possível devido a absorção de dois fótons pelo material.

Além disso, mostramos que a fotoacústica também é bastante eficaz e prática para verificar a absorção de dois fótons (TPA) por um material através de um gráfico relacionando o logaritmo do sinal fotoacústico e o logaritmo das fluências ópticas. A partir desse gráfico foi possível mostrar a absorção não linear por parte das nanopartículas de nitreto de titânio (TiN).

Espera-se que possamos melhorar a qualidade das imagens fotoacústicas, que já são boas, quando operarmos com uma fluência razoável, o que não foi possível por conta do mal funcionamento do OPO. As medidas foram realizadas operando com uma fluência óptica muito abaixo do que se é permitido. Estudos mostram que se é possível utilizar camadas mais espessas de tecido biológico [89], mas para isso é necessário uma fluência óptica maior do que a utilizada nas medidas apresentadas.

5.1 TRABALHOS FUTUROS

Os resultados promissores para as nanopartículas de TiN permitem tentar encontrar outros materiais com características semelhantes para serem estudados. Um outro material com propriedades semelhantes ao TiN e que também foi estudado durante esse período foi nitreto de zircônio (ZrN). Entretanto, devido à uma baixa absorção, os resultados não foram satisfatórios. Novas amostras de nanopartículas de nitreto de zircônio (ZrN NPs) estão sendo sintetizadas serão disponibilizadas para estudo. Em posse dessa nova amostra, serão realizadas as mesmas medidas que foram feitas para TiN NPs.

Além disso, estuda-se a possibilidade de utilizar outras fontes de luz, como é o caso de LEDs (*light-emitting diode*). Apesar de não ser uma fonte perfeitamente monocromática, como é o caso dos LASERS, os LEDs possuem uma banda espectral bastante estreita, o que é bem útil para o imageamento. Além disso, por serem uma fonte com baixo custo operacional, é consideravelmente eficiente e econômica, visto que opera com uma tensão muito baixa.

REFERÊNCIAS

- [1] K. H. Song and L. V. Wang, “Deep reflection-mode photoacoustic imaging of internal organs,” *Photons Plus Ultrasound Imaging Sens. 2008 Ninth Conf. Biomed. Thermoacoustics, Optoacoustics, Acousto-optics*, vol. 6856, no. February 2008, p. 68561W, 2008, doi: 10.1117/12.761389.
- [2] P. K. Upputuri and M. Pramanik, “Photoacoustic imaging in the second near-infrared window: a review,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 24, no. 04, p. 1, 2019, doi: 10.1117/1.jbo.24.4.040901.
- [3] K. Nishizawa, T. Maruyama, M. Takayama, M. Okada, J. Hachiya, and Y. Furuya, “Determinations of organ doses and effective dose equivalents from computed tomographic examination,” *Br. J. Radiol.*, vol. 64, no. 757, pp. 20–28, 1991, doi: 10.1259/0007-1285-64-757-20.
- [4] D. J. Brenner and E. J. Hall, “Computed Tomography - An Increasing Source of Radiation Exposure,” *New Engl. J. Medicine*, vol. 357, no. 22, p. 656, 2007, doi: 10.1111/j.1526-4610.2008.01071.x.
- [5] K. H. Song and L. V. Wang, “Deep reflection-mode photoacoustic imaging of biological tissue,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 12, no. 6, p. 060503, 2007, doi: 10.1117/1.2818045.
- [6] A. A. Oraevsky *et al.*, “Optoacoustic imaging of blood for visualization and diagnostics of breast cancer,” *Biomed. Optoacoustics III*, vol. 4618, no. May 2016, pp. 81–94, 2002, doi: 10.1117/12.469851.
- [7] L. V. Wang, “Multiscale Photoacoustic microscopy and computed tomography,” *Natl. Institute Heal.*, vol. 29, no. 3, pp. 1–7, 2009, doi: 10.1038/nphoton.2009.157.Multiscale.
- [8] A. Greco *et al.*, “Ultrasound biomicroscopy in small animal research: Applications in molecular and preclinical imaging,” *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2012, 2012, doi: 10.1155/2012/519238.
- [9] A. Rosencwaig and A. Gersho, “Theory of the photoacoustic effect with solids,” *J. Appl. Phys.*, vol. 47, no. 1, pp. 64–69, 1976, doi: 10.1063/1.322296.
- [10] L. V. Wang, “Tutorial on Photoacoustic microscopy and computed tomography,” *Biomed. Opt. BIOMED 2008*, vol. 14, no. 1, pp. 171–179, 2008, doi: 10.1364/biomed.2008.bma1.
- [11] L. V. Wang and S. Hu, “Photoacoustic tomography: In Vivo Imaging from Organelles

- to Organs,” *Natl. Insitute Heal.*, vol. 335, no. 60745, pp. 1458–1462, 2012, doi: 10.1126/science.1216210.Photoacoustic.
- [12] X. Wang, G. Ku, M. A. Wegiel, D. J. Bornhop, G. Stoica, and L. V. Wang, “Noninvasive photoacoustic angiography of animal brains in vivo with near-infrared light and an optical contrast agent,” *Opt. Lett.*, vol. 29, no. 7, p. 730, 2004, doi: 10.1364/ol.29.000730.
- [13] C. G. A. Hoelen, F. F. M. de Mul, R. Pongers, and A. Dekker, “Three-dimensional photoacoustic imaging of blood vessels in tissue,” *Opt. Lett.*, vol. 23, no. 8, p. 648, 1998, doi: 10.1364/ol.23.000648.
- [14] G. Ku, X. Wang, X. Xie, G. Stoica, and L. V. Wang, “Imaging of tumor angiogenesis in rat brains in vivo by photoacoustic tomography,” *Appl. Opt.*, vol. 44, no. 5, pp. 770–775, 2005, doi: 10.1364/AO.44.000770.
- [15] E. M. Strohm, M. J. Moore, and M. C. Kolios, “High resolution ultrasound and photoacoustic imaging of single cells,” *Photoacoustics*, vol. 4, no. 1, pp. 36–42, 2016, doi: 10.1016/j.pacs.2016.01.001.
- [16] A. Rosencwaig, “Photoacoustic spectroscopy,” *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, vol. 9, no. 31–54, 1980.
- [17] A. Rosencwaig, “Photoacoustic Spectroscopy,” in *Advances in Electronics and Electron Physics*, vol. 46, 1978, pp. 207–311.
- [18] Y. H. Wong, R. L. Thomas, and J. J. Pouch, “Subsurface structures of solids by scanning photoacoustic microscopy,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 35, no. 5, pp. 368–369, 1979, doi: 10.1063/1.91153.
- [19] Y. Bae, J. J. Song, and Y. B. Kim, “Photoacoustic detection of nanosecond-pulse-induced optical absorption in solids,” *Appl. Opt.*, vol. 21, no. 1, p. 35, 1982, doi: 10.1364/ao.21.000035.
- [20] R. W. BOYD, *Nonlinear Optics*. 1992.
- [21] B. E. Urban, J. Yi, V. Yakovlev, and H. F. Zhang, “Investigating femtosecond-laser-induced two-photon photoacoustic generation,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 19, no. 8, p. 085001, 2014, doi: 10.1117/1.jbo.19.8.085001.
- [22] J. P. Gordon, H. J. Zeiger, and C. H. Townes, “The maser-new type of microwave amplifier, frequency standard, and spectrometer,” *Phys. Rev.*, vol. 99, no. 4, pp. 1264–1274, 1955, doi: 10.1103/PhysRev.99.1264.
- [23] A. L. Schawlow and C. H. Townes, “Infrared and optical masers,” *Phys. Rev.*, vol. 112,

- no. 6, pp. 1940–1949, 1958, doi: 10.1103/PhysRev.112.1940.
- [24] T. H. MAIMAN, “Stimulated Optical Radiation in Ruby,” *Nature*, 1960.
- [25] W. Kaiser and C. G. B. Garrett, “Two-photon excitation in CaF₂: Eu²⁺,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 7, no. 6, pp. 229–231, 1961, doi: 10.1103/PhysRevLett.7.229.
- [26] P. A. Franken, A. E. Hill, C. W. Peters, and G. Weinreich, “Generation of optical harmonics,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 7, no. 4, pp. 118–119, 1961, doi: 10.1103/PhysRevLett.7.118.
- [27] M. Göppert-Mayer, “Elementary processes with two quantum transitions,” *Ann. der Phys.*, vol. 18, no. 7–8, pp. 466–479, 2009, doi: 10.1002/andp.200910358.
- [28] A. G. Bell, “XXXIV.-On,” *Am. J. Sci.*, vol. XX, no. 118, pp. 305–324, 1880.
- [29] J. TYNDALL, “Action of an Intermittent Beam 307,” *R. Soc.*, vol. 31, no. 206–211, pp. 307–316, 1881.
- [30] W. C. Röntgen, “Ueber Töne, welche durch intermittirende Bestrahlung eines Gases entstehen,” *Ann. Phys.*, vol. 248, no. 1, pp. 155–159, 1881, doi: 10.1002/andp.18812480114.
- [31] M. V. C. MEIRA, “Análise espectroscópica de óxidos semicondutores usando a técnica fotoacústica,” 2013.
- [32] J. G. Parker, “Optical Absorption in Glass: Investigation Using an Acoustic Technique,” *Appl. Opt.*, vol. 12, no. 12, p. 2974, 1973, doi: 10.1364/ao.12.002974.
- [33] P. M. Morse, K. U. Ingard, and F. B. Stumpf, *Theoretical Acoustics*, vol. 1, no. 0. 1968.
- [34] C. K. N. PATEL and A. C. Tam, “Pulsed optoacoustic spectroscopy of condensed matter,” *Rev. Mod. Phys.*, vol. 53, no. 3, pp. 517–553, 1981, doi: 10.1016/0003-2697(81)90052-X.
- [35] A. Rosencwaig, “Photoacoustic spectroscopy of solids,” *Opt. Commun.*, vol. 7, no. 4, pp. 305–308, 1973, doi: 10.1063/1.3069155.
- [36] A. Rosencwaig, “Photoacoustic spectroscopy,” *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, vol. 9, pp. 31–54, 1980, doi: 10.1146/annurev.bb.09.060180.000335.
- [37] L. B. Kreuzer and C. K. N. PATEL, “Nitric Oxide AirPollution: Detection by Optoacoustic Spectroscopy,” *Science (80-.)*, vol. 173, pp. 45–47, 1971.
- [38] D. A. BERLINCOURT, D. R. CURRAN, and H. JAFFE, *Piezoelectric and Piezomagnetic Materials and Their Function in Transducers*. ACADEMIC PRESS INC., 1964.

- [39] A. Hordvik and H. Schlossberg, "Photoacoustic technique for determining optical absorption coefficients in solids," *Appl. Opt.*, vol. 16, no. 1, p. 101, 1977, doi: 10.1364/ao.16.000101.
- [40] M. Xu and L. V. Wang, "Photoacoustic imaging in biomedicine," *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 77, no. 4, 2006, doi: 10.1063/1.2195024.
- [41] G. H. Patterson and D. W. Piston, "Photobleaching in Two-Photon Excitation Microscopy," *Biophys. J.*, vol. 78, no. April, pp. 2159–2162, 2000, [Online]. Available: papers3://publication/uuid/B5F1F23B-1E00-49C3-BF6E-FB2D7A4D912E.
- [42] C. Eggeling, J. Widengren, R. Rigler, and C. A. M. Seidel, "Photobleaching of Fluorescent Dyes under Conditions Used for Single-Molecule Detection: Evidence of Two-Step Photolysis," *Anal. Chem.*, vol. 70, no. 13, pp. 2651–2659, 1998, doi: 10.1021/ac980027p.
- [43] C. Xu and W. W. Webb, "Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm," *J. Opt. Soc. Am. B*, vol. 13, no. 3, p. 481, 1996, doi: 10.1364/josab.13.000481.
- [44] C. P. G. VALLABHAN, V. P. N. NAMPOORI, R. PHILIP, and P. SATHY, "OBSERVATION OF TWO-PHOTON ABSORPTION IN RHODAMINE 6G USING PHOTOACOUSTIC TECHNIQUE," *Opt. Commun.*, vol. 74, no. 5, pp. 313–317, 1990.
- [45] S. N. Thakur, D. Guo, T. Kundu, and L. Goodman, "Two-photon photoacoustic spectroscopy of acetone 3p Rydberg states," *Chem. Phys. Lett.*, vol. 199, no. 3–4, pp. 335–340, 1992, doi: 10.1016/0009-2614(92)80128-X.
- [46] E. C. Dreaden, A. M. Alkilany, X. Huang, C. J. Murphy, and M. A. El-Sayed, "The golden age: gol nanoparticles for biomedicine," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 176, 2012, doi: 10.1039/c1cs15237h.The.
- [47] J. Olson, S. Dominguez-Medina, A. Hoggard, L.-Y. Wang, W.-S. Chang, and S. Link, "Optical Characterization of Single Plasmonic Nanoparticles," *Chem. Soc. Rev.*, 2015, doi: 10.1039/c4cs00131a.Optical.
- [48] D. J. de Aberasturi, A. B. Serrano-Montes, and L. M. Liz-Marzán, "Modern Applications of Plasmonic Nanoparticles: From Energy to Health," *Adv. Opt. Mater.*, vol. 3, no. 5, pp. 602–617, 2015, doi: 10.1002/adom.201500053.
- [49] P. D. Howes, S. Rana, and M. M. Stevens, "Europe PMC Funders Group Plasmonic nanomaterials for biodiagnostics," vol. 43, no. 11, pp. 3835–3853, 2017, doi:

- 10.1039/c3cs60346f.Plasmonic.
- [50] D. Jaque, C. Richard, B. Viana, K. Soga, X. Liu, and J. García Solé, “Inorganic nanoparticles for optical bioimaging,” *Adv. Opt. Photonics*, vol. 8, no. 1, p. 1, 2016, doi: 10.1364/aop.8.000001.
- [51] B. Mishra, B. B. Patel, and S. Tiwari, “Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery,” *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 6, no. 1, pp. 9–24, 2010, doi: 10.1016/j.nano.2009.04.008.
- [52] Y. R. Chang *et al.*, “Mass production and dynamic imaging of fluorescent nanodiamonds,” *Nat. Nanotechnol.*, vol. 3, no. 5, pp. 284–288, 2008, doi: 10.1038/nano.2008.99.
- [53] B. Devika Chithrani, A. A. Ghazani, and W. C. W. Chan, “Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells,” *Am. Chem. Soc.*, 2006, [Online]. Available: <http://pubs.acs.org>.
- [54] M. Grzelczak, J. Pérez-Juste, P. Mulvaney, and L. M. Liz-Marzán, “Shape control in gold nanoparticle synthesis,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 37, no. 9, pp. 1783–1791, 2008, doi: 10.1039/b711490g.
- [55] S. Eustis and M. A. El-Sayed, “Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 35, no. 3, pp. 209–217, 2006, doi: 10.1039/b514191e.
- [56] P. K. Jain, K. S. Lee, I. H. El-sayed, and M. A. El-sayed, “Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size, Shape, and Composition: Applications in Biological Imaging and Biomedicine,” *J. Phys. Chemistry B*, vol. 110, pp. 7238–7248, 2006.
- [57] G. Mie, “Beitraege zur Optik trueber Medien, speziell kolloidaler Metalloesungen,” *Analen der Physik*, vol. 4, no. 25, pp. 377–445, 1908.
- [58] U. Kreibig and M. Vollmer, *Optical Properties of Metal Clusters*. 1995.
- [59] M. K. Pereira, “Ressonância de Plasmon de Superfície Localizado e Espalhamento Raman em Soluções Coloidais de Ouro,” 2009.
- [60] J. D. Jackson, “Classical Electrodynamics,” *John wiley & sons*. p. 641, 1998.
- [61] E. Boisselier and D. Astruc, “Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations,

- imaging, diagnostics, therapies and toxicity,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 38, no. 6, pp. 1759–1782, 2009, doi: 10.1039/b806051g.
- [62] C. J. Murphy *et al.*, “Gold Nanoparticles in Biology: Beyond Toxicity to Cellular Imaging,” *Acc. Chem. Res.*, vol. 41, no. 12, 2008.
- [63] W. He, K. Ai, C. Jiang, Y. Li, X. Song, and L. Lu, “Plasmonic titanium nitride nanoparticles for in vivo photoacoustic tomography imaging and photothermal cancer therapy,” *Biomaterials*, vol. 132, pp. 37–47, 2017, doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.04.007.
- [64] A. Rosencwaig, “Photoacoustic spectroscopy of solids,” *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 48, pp. 1133–1137, 1977, doi: 10.1063/1.1135213.
- [65] C. K. N. Patel and A. C. Tam, “Optoacoustic spectroscopy of liquids,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 34, no. 7, pp. 467–470, 1979, doi: 10.1063/1.90837.
- [66] A. Rosencwaig and J. B. Willis, “Photoacoustic absorption measurements of optical materials and thin films,” *J. Appl. Phys.*, vol. 51, no. 4361, 1980, doi: 10.1063/1.328297.
- [67] A. Rosencwaig, “Photoacoustic Spectroscopy of Biological Materials,” *Science (80-.)*, vol. 181, pp. 657–658, 1973, doi: 10.1111/j.1751-1097.1981.tb09074.x.
- [68] A. Rosencwaig, “A PHOTOACOUSTIC STUDY OF NEWBORN RAT STRATUM CORNEUM,” *Biochem. Biophys. Acta*, vol. 493, pp. 10–23, 1977.
- [69] A. A. Oraevsky, S. L. Jacques, and F. K. Tittel, “Measurement of tissue optical properties by time-resolved detection of laser-induced transient stress,” *Appl. Opt.*, vol. 36, no. 1, p. 402, 1997, doi: 10.1364/ao.36.000402.
- [70] G. Busse and A. Rosencwaig, “Subsurface imaging with photoacoustics,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 36, no. 10, pp. 815–816, 1980, doi: 10.1063/1.91327.
- [71] A. Rosencwaig and J. B. Willis, “Photoacoustic study of laser damage in thin films,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 36, no. 8, pp. 667–669, 1980, doi: 10.1063/1.91618.
- [72] Y. H. Wong, R. L. Thomas, and G. F. Hawkins, “Surface and subsurface structure of solids by laser photoacoustic spectroscopy,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 32, no. 9, pp. 538–539, 1978, doi: 10.1063/1.90120.
- [73] R. J. Von Gutfeld and R. L. Melcher, “20-MHz acoustic waves from pulsed thermoelastic expansions of constrained surfaces,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 30, no. 6, pp. 257–259, 1977, doi: 10.1063/1.89375.
- [74] H. K. Wickramasinghe, R. C. Bray, V. Jipson, C. F. Quate, and J. R. Salcedo,

- “Photoacoustics on a microscopic scale,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 33, no. 11, pp. 923–925, 1978, doi: 10.1063/1.90219.
- [75] A. Rosencwaig, “Thermal wave microscopy with photoacoustics,” *J. Appl. Phys.*, vol. 51, no. 4, pp. 2210–2211, 1980, doi: 10.1063/1.327924.
- [76] G. Busse, “Optoacoustic phase angle measurement for probing a metal,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 35, no. 10, pp. 759–760, 1979, doi: 10.1063/1.90960.
- [77] M. LUUKKALA and A. PANTTINEN, “Photoacoustic Microscope,” *Electron. Lett.*, vol. 15, no. 11, pp. 325–326, 1979.
- [78] K. WADA, T. MSAUJIMA, H. YOSHIDA, and H. IMAI, “PHOTOACOUSTIC MICROSCOPY FOR THE ANALYSIS OF PEROXIDASE ACTIVITY IN A BIOLOGICAL TISSUE,” *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 34, pp. 1834–1836, 1986, [Online]. Available: <http://www.mendeley.com/research/geology-volcanic-history-eruptive-style-yakedake-volcano-group-central-japan/>.
- [79] K. WADA, T. MASUJIMA, H. YOSHIDA, T. MURAKAMI, N. YATA, and H. IMAI, “Application of Photoacoustic Microscopy to Analysis of Biological Components in Tissue Sections,” *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 34, pp. 1688–1693, 1986, [Online]. Available: <http://www.mendeley.com/research/geology-volcanic-history-eruptive-style-yakedake-volcano-group-central-japan/>.
- [80] C. Zhang, K. Maslov, and L. V. Wang, “Subwavelength-resolution photoacoustic microscopy for label-free detection of optical absorption in vivo,” *Photons Plus Ultrasound Imaging Sens. 2011*, vol. 7899, p. 78990L, 2011, doi: 10.1117/12.873225.
- [81] S. Jeon, J. Kim, D. Lee, J. W. Baik, and C. Kim, “Review on practical photoacoustic microscopy,” *Photoacoustics*, vol. 15, no. July, p. 100141, 2019, doi: 10.1016/j.pacs.2019.100141.
- [82] A. YARIV, *Quantum Electronics*, Third Edit. WILEY, 1987.
- [83] A. A. Popov *et al.*, “Laser- synthesized TiN nanoparticles as promising plasmonic alternative for biomedical applications,” *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–11, 2019, doi: 10.1038/s41598-018-37519-1.
- [84] M. E. Maldonado, A. Das, A. S. L. Gomes, A. A. Popov, S. M. Klimentov, and A. V. Kabashin, “Nonlinear photoacoustic response of suspensions of laser-synthesized plasmonic titanium nitride nanoparticles,” *Opt. Lett.*, vol. 45, no. 24, p. 6695, 2020, doi: 10.1364/ol.404304.

- [85] LIA, *American National Standard for Safe Use of Lasers*, vol. ANSI Z136. 2007.
- [86] A. B. E. Attia *et al.*, “A review of clinical photoacoustic imaging: Current and future trends,” *Photoacoustics*, vol. 16, no. May, p. 100144, 2019, doi: 10.1016/j.pacs.2019.100144.
- [87] H. F. Zhang, K. Maslov, G. Stoica, and L. V. Wang, “Functional photoacoustic microscopy for high-resolution and noninvasive in vivo imaging,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 24, no. 7, pp. 848–851, 2006, doi: 10.1038/nbt1220.
- [88] A. B. E. Attia *et al.*, “A review of clinical photoacoustic imaging: Current and future trends,” *Photoacoustics*, vol. 16, no. November, p. 100144, 2019, doi: 10.1016/j.pacs.2019.100144.
- [89] G. Ku and L. V. Wang, “Deeply penetrating photoacoustic tomography in biological tissues enhanced with an optical contrast agent,” *Opt. Lett.*, vol. 30, no. 5, p. 507, 2005, doi: 10.1364/ol.30.000507.
- [90] A. Rosencwaig and J. B. Willis, “Photoacoustic study of laser damage in thin films,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 36, pp. 667–669, 1980, doi: 10.1063/1.91618.
- [91] E. Popova-Kuznetsova *et al.*, “Laser-ablative synthesis of isotope-enriched samarium oxide nanoparticles for nuclear nanomedicine,” *Nanomaterials*, vol. 10, no. 69, 2020, doi: 10.3390/nano10010069.