



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

CARLOS ELIÉCER ESTUPIÑÁN LÓPEZ

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE SISTEMA DE ESPECTROSCOPIA DE
LENTE TÉRMICA COM FILTRO ESPACIAL DO TIPO ECLIPSE**

Recife

2020

CARLOS ELIÉCER ESTUPIÑÁN LÓPEZ

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE SISTEMA DE ESPECTROSCOPIA
DE LENTE TÉRMICA COM FILTRO ESPACIAL DO TIPO ECLIPSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Elétrica.

Área de concentração: Fotônica.

Orientador: Prof. Dr. Renato Evangelista de Araujo.

Recife

2020

Catálogo na fonte
Bibliotecária Margareth Malta, CRB-4 / 1198

- E82d Estupiñán López, Carlos Eliécer.
Desenvolvimento e avaliação de sistema de espectroscopia de lente térmica com filtro espacial do tipo eclipse / Carlos Eliécer Estupiñán López. - 2020.
112 folhas, il., gráfs., tabs.
- Orientador: Prof. Dr. Renato Evangelista de Araujo.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica, 2020.
Inclui Referências e Apêndices.
1. Engenharia Elétrica. 2. Espectroscopia de lente térmica. 3. Eficiência quântica. 4. Fluorescência. 5. Pontos quânticos. I. Araujo, Renato Evangelista de (Orientador). II. Título
- UFPE
- 621.3 CDD (22. ed.) BCTG/2021-20

CARLOS ELIECER ESTUPIÑAN LOPEZ

“DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE SISTEMA DE ESPECTROSCOPIA
DE LENTE TÉRMICA COM FILTRO ESPACIAL DO TIPO ECLIPSE”

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Elétrica.

Aprovada em: 10/02/2020

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Renato Evangelista de Araujo (Orientador e Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Joaquim Ferreira Martins Filho (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Emery Cleiton Cabral Correia Lins (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Beate Saegesser Santos (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Daniel Felinto Pires Barbosa (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho a Carlos Arturo Estupiñán Mendoza (in memoriam), meu pai.

A Adela López Cuyamón, minha mãe

A Adelina Cuyamón de López (in memoriam), minha avó.

E a Marina Mendoza (in memoriam), minha avó.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar força, saúde, vida e entendimento para compreender todos os fenômenos físicos estudados ao longo deste doutorado e da minha vida acadêmica. Também fico agradecido com ele de me proporcionar os melhores professores, time de trabalho, amigos e pessoas que estiveram e que ainda estão perto de mim.

Agradeço especialmente ao professor Renato E. de Araújo, por todos seus guiamentos, ensinamentos teóricos e práticos que me ajudaram a entrar neste mundo da engenharia e da física aplicada. À sua disposição para resolver dúvidas, discutir novas ideias e sua boa atenção em qualquer momento. Além disso agradeço a grande paciência, conselhos e compreensão que teve comigo durante todo este período do doutorado, entendendo e me ajudando a superar todos os problemas pessoais, econômicos, etc que tive ao longo desta tese. Professor Renato graças a sua grandeza como pessoa, pesquisador e profissional é que hoje estou finalizando meu doutorado e escrevendo estas palavras e este livro.

À professora Adriana Fontes por seus ensinamentos, ajudas, conselhos e me mostrar o fascinante mundo dos pontos quânticos aplicados na engenharia biomédica. Graças por estar também disponível sempre que precisei de tirar dúvidas e discutir muitas das ideias desta tese.

Ao meu amigo o professor Diego Rativa por seus conselhos, solução de dúvidas, discussão de ideias e me ajudar nos meus primeiros passos da minha vida como pesquisador em óptica aplicada, além de sempre me encorajar para finalizar o doutorado.

Ao meu amigo Christian Tolentino por todos seus conselhos, ensinamentos e ajuda com as técnicas ópticas e instrumentação. As boas discussões de inovações e de dúvidas. Também por sempre me encorajar a continuar e finalizar o doutorado.

Aos meus colegas e amigos do laboratório. Fábio, Wellington, Diógenes, Marcos, Livia Cordeiro, Ana Karla, Luciana, Paulo Cabral, Sandra, Sajid Farooq, Raphael Baltar, Aline, Cibelle, Diego Cesar, Arthur e Iasmin pelos estudos, pelas discussões das pesquisas e o bom ambiente de trabalho que fizeram a pesquisa ser muito agradável. Também a meu amigo e colega Túlio Pedrosa, por todas as discussões, ajuda e solução de dúvidas nas questões e detalhes na parte da engenharia deste trabalho.

Meu agradecimento aos meus amigos, Ramon Ramayo, Yurisan de Ramayo, Miguel Zorro, Hans, Cristiane, Juan piña, Esteban, Miguel Duran, Luis Arturo, Nicolas, Jose Barba, Alejandro, Wilmer, Ariday. por seus conselhos, me encorajar e dar forças para finalizar o doutorado.

Agradeço especialmente a meu pai, Carlos Arturo Estupiñán Mendoza, minha mãe Adela López Cuyamón, pela sua formação e todo o apoio incondicional, também agradeço a meu irmão Alex F. Estupiñán López, a todos eles por sempre estarem comigo nos momentos mais difíceis da

minha vida por seus conselhos, ensinamentos, suas orações, suas ajudas e sempre me encorajar a finalizar o objetivo de obter meu doutorado. A toda a família López e a família Estupiñán tios, tias, primos, primas por seus conselhos e orações.

A minha noiva, namorada, mulher, e amiga Aida Marelyn Avendaño Gallo por estar do meu lado me ajudando, apoiando e dando conselhos em todos os momentos difíceis e me encorajar sempre a terminar o doutorado.

Aos meus amigos e colegas da UNIFG André Xavier, Gilmar, Gilberto, Anna katarina, João, Genesis, Romulo, Fernanda, Deici, Renato Freire, Pierre Lucena, Jose Bertotti. E aos colegas da Faculdade Santa Maria por confiar em mim e poder trabalhar como professor do lado de vocês para poder me sustentar economicamente no Brasil.

Ao Brasil.

À CAPES, ao CNPq e ao departamento de pós-graduação em engenharia elétrica pelo apoio financeiro.

Aos professores do programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica por suas ótimas aulas, ensinamentos e guiamentos. Também a Andréa Tenório por toda sua atenção, colaboração e ajuda nas burocracias, processos e procedimentos no departamento de pós-graduação.

Aos professores das bancas de qualificação e doutorado por todas suas sugestões, correções, ensinamentos e guiamentos.

À todos(as) que contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho fosse finalizado.

MUCHÍSIMAS GRACIAS!!

RESUMO

Neste trabalho foi concebido, desenvolvido e avaliado um sistema de espectroscopia de lente térmica com detecção por eclipse, para determinar a eficiência quântica de materiais luminescentes. Agentes de contraste fluorescentes são explorados em diversas áreas da saúde, sendo usados na geração de imagens de microscopia celular e de tecidos, em diagnóstico por citometria e em biosensores ópticos. Na caracterização de materiais fluorescentes, a determinação da eficiência quântica de fluorescência é de grande importância. Para a obtenção da eficiência quântica de fluorescência de um material destaca-se a técnica de espectroscopia de lente térmica, que não depende do uso de amostra de referência e que apresenta boa sensibilidade para avaliação de amostras com baixa eficiência quântica ($< 80\%$). Esta técnica, que requer o uso de lasers com potência de excitação da ordem de $10,0\text{ mW}$, apresenta limitações na caracterização de amostras com baixa concentração de fluoróforos ($< 10^{-4}M$) (escrito de outra forma $< 10^{-4}M$). O novo sistema de espectroscopia de lente térmica baseado no uso de um filtro espacial do tipo Eclipse, apresentado nesse trabalho, supera essas limitações. Este novo sistema foi avaliado mensurando a eficiência quântica de Rodamina 6G, validando a técnica com a obtenção de valores reportados na literatura. Neste trabalho também é apresentada a caracterização da eficiência quântica dos Pontos Quânticos de Telureto de Cádmio (CdTe) em função das seguintes variáveis: concentração do fluoróforo; pH da amostra; potência de excitação (por um ou dois fótons) da suspensão. A introdução do filtro tipo eclipse no sistema de espectroscopia de lente térmica produziu um aumento de ≈ 14 vezes na sensibilidade do sinal de lente térmica de dois feixes no modo descasado, e um aumento na sensibilidade da relação sinal ruído de 300% no sistema de lente térmica com um feixe. Também neste trabalho se estabelece requisitos direcionando a construção de espectrômetro de lente térmica portátil, para uso por profissionais que não possuam um treinamento especializado em óptica.

Palavras-chave: Espectroscopia de lente térmica. Eficiência quântica. Fluorescência. Pontos quânticos.

ABSTRACT

In this work an eclipse detection thermal lens spectroscopy system was designed, developed and evaluated to determine the quantum efficiency of luminescent materials. Fluorescent contrast agents are applied in various health areas, used in tissue and cell microscopy imaging, cytometric diagnostics and optical biosensors. In the characterization of fluorescent materials, determination of quantum fluorescence efficiency is very important. In order to obtain the quantum fluorescence efficiency of a material, the thermal lens spectroscopy technique stands out, which does not depend on the use of reference samples and presents good sensitivity for evaluating samples with low quantum efficiency ($< 80\%$). This technique, requires the use of lasers with an excitation power of the order of 10.0 mW , has limitations in the characterization of samples with low concentration of fluorophores ($< 10^{-4}M$) (otherwise $< 10^{-4}M$). The new thermal lens spectroscopy system based on the use of an Eclipse type spatial filter introduced in this work, overcomes these limitations. This new system was evaluated measuring the quantum efficiency of Rhodamine 6G, validating the technique with values reported in the literature. This work also presents the quantum efficiency characterization of the cadmium telluride quantum dots (CdTe) as a function of the following variables: fluorophore concentration; pH of sample; excitation power (by one or two photons) of the suspension. The introduction of the eclipse-type filter into the thermal lens spectroscopy system produced an increase of ≈ 14 times in the sensitivity of the two-beam thermal lens signal in mismatched mode, and an increase in sensitivity of the signal-to-noise ratio of 300% in the single beam thermal lens system. Also in this work, requirements are set for the construction of a portable thermal lens spectrometer for use by professionals who do not have specialized optical training.

Keywords: Thermal lens spectroscopy. Quantum efficiency, Fluorescence. Quantum dots.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diagrama de Jablonski para a emissão por fosforescência	25
Figura 2 – Diagrama de Jablonski para a emissão por fluorescência	26
Figura 3 – (a) Estrutura química de moléculas fluorescentes. (b) fluorescência de cada Fluoróforo de (a)	28
Figura 4 – Ilustração de um nanocristal de semicondutor (QD) funcionalizado quimicamente para sua utilização como marcador	29
Figura 5 – Arranjo experimental da técnica relativa de caracterização da eficiência quântica, usando uma amostra de MgO como referência	32
Figura 6 – Gráfico da área do espectro de emissão em função da absorbância para Rodamina 101	38
Figura 7 – Diagrama das três configurações necessárias para ponderar a eficiência quântica. (a) Esfera vazia. (b) Amostra na esfera com o feixe incidindo sobre as paredes da esfera. (c) amostra na esfera com o feixe incidindo sobre a amostra	41
Figura 8 – (a) Espectro do laser incidindo na cubeta somente com água, (b) Espectro obtido com laser incidindo na parede da esfera e a cubeta com uma solução de QDs CdTe/CdS e, (c) Espectro obtido com o laser incidindo na amostra de QDs CdTe/CdS	42
Figura 9 – (a) curva azul: medida da linha de base (emissão do LED) medida sobre uma cubeta só com o solvente. Curva Vermelha: O espectro da amostra com a fotoluminescência e a redução na curva de emissão do LED devido à absorção da amostra. (b) Espectro da amostra menos o espectro da linha de base. (c) Esquema dos fatores de importância para as medições com a esfera integradora	43
Figura 10 – Esquema do arranjo experimental da técnica de esfera integradora usando um LED	44
Figura 11 – Esquema geométrico da posição do feixe no arranjo de LT com feixe único .	45
Figura 12 – Curvas do efeito de lente térmica, experimental (traço cinza), e ajuste teórico (linha rosa)	47
Figura 13 – Esquema geométrico da posição dos dois feixes no arranjo de LT de dois feixes no modo descasado	48
Figura 14 – (a) Feixe gaussiano, (b) feixe depois de passar pelo filtro espacial tipo eclipse	52
Figura 15 – Arranjo Experimental da técnica de varredura Z tipo eclipse	53
Figura 16 – Arranjo Experimental da técnica de varredura Z	53
Figura 17 – Técnica de varredura Z em uma amostra com $n_2 < 0$, mostrando a variação de transmissão pico vale	54

Figura 18 – Aumento da sensibilidade na detecção da variação da transmissão do feixe usando a técnica de eclipse comparada com a técnica convencional em função do tamanho do disco	55
Figura 19 – Esquema da detecção tipo eclipse	56
Figura 20 – Arranjo experimental do sistema de lente térmica de um feixe com eclipse .	57
Figura 21 – Sinal de LT para a Rh6G em uma solução de etanol com concentração de 10^{-6} , usando (a) Espectroscopia de lente térmica com um feixe e (b) Espectroscopia de lente térmica com um feixe no modo eclipse. Onde N e S indicam a amplitude do ruído e do sinal respectivamente	57
Figura 22 – Valores da eficiência quântica de fluorescência da Rh6G obtidos usando a técnica ELT-Eclipse, em função de (a) a potência de excitação e (b) a concentração molar	58
Figura 23 – Arranjo experimental da técnica de espectroscopia de lente térmica com dois feixes tipo eclipse (ELTD-Eclipse)	60
Figura 24 – Sinal normalizado da LT do laser de sonda de HeNe (632 nm) que passa por uma amostra com concentração de 2×10^{-5} M de Rh6G em etanol sendo excitada por um laser cw Nd:YAG (532 nm) com 9 mW de potência. Sinal obtida usando (a) a técnica de lente térmica com dois feixes (LTD) e (b) a técnica de lente térmica com dois feixes por eclipse (LTD-E). A imagem inserida em (b) é uma imagem do feixe de sonda antes e depois do filtro especial de frente de onda	60
Figura 25 – Eficiência quântica da diluição de rodamina Rh6G em etanol em função da potência de bombeio. Usando as técnicas (a) com e (b) sem o filtro especial tipo eclipse na espectroscopia de lente térmica com dois feixes	62
Figura 26 – Eficiência quântica das suspensões de Rh6G em etanol em função da concentração molar para diferentes potências de bombeio, usando a técnica de eclipse lente térmica com dois feixes	63
Figura 27 – Espectro de absorção (linha tracejada) e emissão (linha completa) da suspensão de QDs de CdTe, $\lambda_{\text{excitação}} = 532,0 \text{ nm}$	66
Figura 28 – Espectro de emissão de QDs de CdTe para os diferentes pHs, ajustados com AMS, $\lambda_{\text{excitação}} = 532,0 \text{ nm}$	67
Figura 29 – Sinal de LT (curva azul) e ajuste teórico (linha vermelha) para QDs de CdTe de pH = 10,3	67
Figura 30 – Eficiência quântica de fluorescência dos QDs para o pH ajustado usando AMS (estrelas) e HCl (pontos)	68
Figura 31 – Dependência da η de dois fótons em função (a) do pH e (b) do comprimento de onda de excitação (concentração de QDs fixada em $0,8 \mu\text{M}$)	70

Figura 32 – Eficiência quântica de dois fótons para diferentes concentrações de QDs. para o pH de suspensão fixo em 10,3 e o comprimento de onda de excitação de 980 nm	71
Figura 33 – Arranjo de espectroscopia de lente térmica, especificando dentro do retângulo os elementos principais do dispositivo	72
Figura 34 – Design externo e dimensões do espectrômetro de lente térmica	73
Figura 35 – Arranjo interno do espectrômetro de lente térmica	74
Figura 36 – Diagrama de blocos da eletrônica necessária para o funcionamento do espectrômetro de lente térmica	75
Figura 37 – Diagrama de blocos da interação entre os programas de controle e análise de dados do dispositivo	76
Figura 38 – Fluxograma do algoritmo de cálculo da eficiência quântica	77
Figura 39 – Interface gráfica do sistema de controle do laser	78
Figura 40 – Interface gráfica do sistema de controle do espectrômetro de lente térmica .	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Eficiência quântica de fluoróforos de referência.	36
Tabela 2	– Razões sinal/ruído para três diferentes razões dos diâmetros do feixe/filtro. Para a amostra de Rh6G com concentração de 10^{-6} M	58
Tabela 3	– Valor médio da eficiência quântica para diferentes concentrações de Rh6G. .	59
Tabela 4	– Razão S/R entre a técnica de lente térmica com dois feixes tipo eclipse (LTD-E) e a técnica convencional de lente térmica com dois feixes, para a amostra de Rh6G com concentração de 2×10^{-5} M.	61
Tabela 5	– Valor médio dos valores da eficiência quântica para diferentes concentrações de rodamina Rh6G obtida pelo método de LTD-E comparado com os valores reportados na literatura.	62
Tabela 6	– Eficiência quântica de fluorescência dos QDs de CdTe em solução com diferentes pHs, ajustados com o AMS e HCl. $\lambda_{\text{excitação}} = 532$ nm.	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
QDs	Quantum Dots
EQ	Eficiência Quântica
LOBI	Laboratório de Óptica Biomédica e imagens
ELT	Espectroscopia de lente térmica
AMS	Ácido Mercaptosuccinico
MgO	Óxido de Magnésio
LED	<i>Light-Emitting Diode</i>
LT	Lente térmica
ELT	Espectroscopia de lente térmica
ELT-Eclipse	Espectroscopia de lente térmica tipo eclipse
ELTD-Eclipse	Espectroscopia de lente térmica com dois feixes tipo eclipse
HeNe	Helio Neon
LTD	Lente térmica com dois feixes
LTD-E	Lente térmica com dois feixes tipo eclipse
Rh6G	Rodamina 6G
AMS	Ácido Mercaptosuccinico

LISTA DE SÍMBOLOS

S_0	Estado singleto 0
S_1	Estado singleto 1
T_1	Estado tripleto 1
ΔS	Variação do spin
E	Energia
E_{s0}	Energia do estado singleto 0
E_{s1}	Energia do estado singleto 1
ΔE	Variação de Energia
h	Constante de Planck
ν	Frequência do fóton emitido
I	Intensidade
I_0	Intensidade inicial
t	Tempo
k	Taxa constante
k_r	Taxa de decaimento radiativo
k_{nr}	Taxa de decaimento não radiativo
τ_r	Tempo de decaimento radiativo
τ_{nr}	Tempo de decaimento não radiativo
τ	Tempo de vida media total do estado
η	Eficiência quântica de fluorescência
n^o	Número
E_r	Número total de fótons dispersos por segundo pela referência
R	refletância
E_x	Número total de fótons emitidos por segundo pela amostra em estudo

T_{ex}	coeficiente de transmissão da cubeta para o comprimento de onda de excitação
Ω	Ângulo solido
N_x	Número de fótons por segundo que atingem a superfície do detector
T_{em}	Coeficiente de transmissão da cubeta para os comprimentos de onda dos fótons emitidos
n	Índice de refração do solvente para o comprimento de onda da emissão
$I(\phi)$	Intensidade da luz espalhada
ϕ	ângulo
D_r	Resposta do detector usando a referência
D_x	Resposta do detector para a amostra fluorescente
$I(\nu')$	Distribuição espectral atingindo o detector
$S(\nu')$	Sensibilidade relativa do detector
ν'	Energia
K	média de saída do detector para cada fóton
K_r	Média de saída do detector para a referência
K_x	Média de saída do detector para a amostra em análise
C'	Constante usada para converter a expressão á unidades absolutas
B	Fração de luz absorvida pela amostra
I_0	Intensidade do feixe incidente
α	Coeficiente de absorção
d	Caminho óptico
I_a	Intensidade da luz absorvida pela amostra
σ	Seção transversal de absorção da amostra
C	Concentração
OD	Densidade óptica
A	Absorbância

ϵ	Coeficiente de extinção molar
m	Coeficiente angular ou declividade de uma linha reta
ΔI_f	Variação da área da curva de fluorescência.
$\Delta A(\lambda)$	Variação da absorbância
m_r	Coeficiente angular para a referência
n_r	Índice de refração da referência
$I(\lambda)$	Intensidade em função do comprimento de onda
λ	Comprimento de onda
μ	Fração de luz laser dispersada pelas paredes da esfera integradora que é absorvida pela amostra
L_a	Integral da intensidade do laser na etapa <i>a</i> da técnica de esfera integradora
L_b	Integral da intensidade do laser na etapa <i>b</i> da técnica de esfera integradora
A'	Fração absorvida da luz incidente
L_c	Integral do laser na terceira etapa do experimento da técnica de esfera integradora
P_b	Integral da curva de intensidade da emissão na segunda etapa da técnica de esfera integradora
f	Fração do fluxo de fótons de entrada do LED que atinge a amostra
Z_0	Parâmetro confocal do feixe gaussiano ou comprimento Rayleigh
ω_0	Tamanho do feixe ou raio do feixe na cintura
Z	Posição da amostra
$\Delta T(r, t)$	Variação de temperatura no meio
tc	Tempo característico de difusão do calor
D	Difusividade térmica
ρ	Densidade volumétrica do solvente
C_P	Calor específico do solvente
κ	Condutividade térmica

θ	Deslocamento de fase térmico
ϕ	Eficiência quântica absoluta não-radiativa
dn/dT	Coefficiente termo-óptico
P_{abs}	Potência absorvida do feixe de excitação
P_{ex}	Potência de excitação do laser na amostra
$\langle \lambda_{em} \rangle$	Comprimento de onda media da emissão
λ_{em}	Comprimento de onda de emissão
$dN(\lambda_{em})$	Número de fótons emitido por segundo em um incremento do comprimento de onda centrado no comprimento de onda de emissão
ω_p	Cintura do feixe de sonda
ω_{ex}	Cintura do feixe de excitação
q	Número de fótons envolvidos no processo de absorção multifotônica
θ_q	Amplitude do deslocamento de fase térmico para o processo de absorção de q fótons
P	Potência media incidente
α_q	Fração da potência absorvida pela amostra
$ \Delta\phi $	Variação de fase do feixe
S	Transmitância do feixe
ω_{ai}	Cintura do feixe na posição da íris
r_a	Raio de abertura da íris
S_d	Transmitância usando o eclipse
ω_{ad}	Cintura do feixe na posição do disco
r_d	Raio do disco anteparo
$\Delta T_{pv}^{eclipse}$	Variação pico vale da transmitância na técnica de varredura z tipo eclipse
ΔT_{pv}^{conv}	Variação pico vale da transmitância na técnica de varredura z convencional
D_1	Detector 1
D_2	Detector 2

S	Sinal
N	Ruído
Te^{2-}	Telúrio reduzido
$Cd(ClO_4)^2$	Perclorato de Cadmio
(Te^0)	Telúrio metálico
$NaOH$	Hidróxido de sódio
HCl	Acido clorídrico
$CdTe$	Telureto de Cadmio
E_g	Energia de Gap
$CdSe$	Seleneto de cádmio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA: FUNDAMENTAÇÃO E TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO.	24
2.1	EMISSÃO DE LUZ	24
2.1.1	Fosforescência	24
2.1.2	Fluorescência	25
2.2	ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	26
2.3	EFICIÊNCIA QUÂNTICA	27
2.4	FLUORÓFOROS	28
2.4.1	Moléculas fluorescentes	28
2.4.2	Pontos quânticos	29
3	TÉCNICAS DE AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA QUÂNTICA	31
3.1	TÉCNICA RELATIVA DE AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA QUÂNTICA DE FLUORESCÊNCIA	31
3.1.1	Classe opticamente densa	34
3.1.2	Classe opticamente diluída	35
3.2	TÉCNICAS ABSOLUTAS DE AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA QUÂNTICA DE FLUORESCÊNCIA	39
3.2.1	Esfera integradora	39
3.2.1.1	Esfera integradora com laser	40
3.2.1.2	Esfera integradora com LED	42
3.2.2	Espectroscopia de lente térmica	44
3.2.2.1	Espectroscopia de lente térmica com um feixe	45
3.2.2.2	Espectroscopia de lente térmica com dois feixes no modo descasado	47
3.2.3	Espectroscopia de lente térmica com dois fótons	49
4	NOVO SISTEMA DE ESPECTROSCOPIA DE LENTE TÉRMICA COM FILTRO ESPACIAL TIPO ECLIPSE	52
4.1	FILTRO ESPACIAL	52
4.2	LENTE TÉRMICA POR ECLIPSE	55
4.2.1	Lente térmica por eclipse com um feixe	56
4.2.2	Lente térmica por eclipse com dois feixes	59
5	AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA QUÂNTICA DE PONTOS QUÂNTICOS	65
5.1	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	65

5.2	DEPENDÊNCIA DA EFICIÊNCIA QUÂNTICA COM O pH	66
5.3	EFICIÊNCIA QUÂNTICA PARA ABSORÇÃO DE DOIS FÓTONS	69
6	DISPOSITIVO DE ESPECTROSCOPIA DE LENTE TÉRMICA	72
6.1	ESPECTRÔMETRO DE LENTE TÉRMICA	72
6.1.1	Projeto: Espectrômetro de lente térmica	73
6.1.1.1	Eletrônica do espectrômetro de lente térmica	75
6.1.1.2	Software e programação para o espectrômetro de lente térmica	75
7	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	79
7.1	CONCLUSÕES	79
7.1.1	Resultados publicados ou apresentados em eventos	80
7.2	PERSPECTIVAS FUTURAS	81
	REFERÊNCIAS	83
	APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO NO OPTICS EXPRESS.	88
	APÊNDICE B – ARTIGO PUBLICADO NO JOURNAL OF LUMI- NESCENCE.	98
	APÊNDICE C – CAPÍTULO DE LIVRO.	103

1 INTRODUÇÃO

Diversos avanços na ciência e na tecnologia estão associados à capacidade de se obter imagens de alta qualidade. Especificamente na área da óptica biomédica, diferentes técnicas ópticas permitem a obtenção de imagens de sistemas biológicos. Desde a invenção do microscópio, no século XVI, verifica-se a busca pela melhoria de qualidade das imagens. Neste contexto, uma das formas de melhorar o contraste de imagens é com o uso de agentes de contrastes, como moléculas fluorescentes ou estruturas espalhadoras de radiação. Em particular, nanoestruturas de semicondutores, pontos quânticos (*quantum dots*) QDs, apresentam-se como importantes agentes de contraste. Estes marcadores fluorescentes também encontram aplicações em técnicas como citometria de fluxo, biossensoriamento e imunoensaios.

Os pontos quânticos possuem vantagens em relação aos agentes tradicionais de diagnóstico e marcação celular (moléculas fluorescentes e corantes) como: (1) permitem a utilização de um único laser para excitar a luminescência das nanopartículas, que podem emitir em diferentes regiões do espectro; (2) o efeito de fotodegradação da luminescência é aproximadamente 100 vezes menor nos QDs do que nos corantes orgânicos, permitindo assim que as amostras sejam expostas à luz por um período longo de tempo mantendo-as com maior intensidade de luminescência; (3) No uso de QDs o material biológico a ser analisado não necessita fixação, podendo ser marcado em cultura. Além disso, os QDs são eletrodensos, permitindo localização sub-celular das nanopartículas por microscopia eletrônica de transmissão [1, 2, 3, 4].

Ao se tratar de agentes de contraste fluorescentes, é de grande importância a caracterização das propriedades ópticas destas nanoestruturas, para assim explorar da melhor forma todo o seu potencial. Neste contexto, pode-se quantificar a capacidade de fluoróforos emitirem radiação (fluorescência), pela eficiência quântica de fluorescência. A eficiência quântica ou rendimento quântico de fluorescência, η , é definida como a razão entre os fótons absorvidos que foram convertidos em luminescência com respeito ao total de fótons absorvidos, ou seja, $\eta = (N^o \text{ de fótons emitidos}) / (N^o \text{ de fótons absorvidos})$.

As técnicas de caracterização da eficiência quântica de fluorescência, podem ser divididas em duas classes: (1) técnicas absolutas de quantificação e (2) métodos relativos de caracterização. Dentre as técnicas relativas de caracterização, a mais usada explora fluoróforos de referência com eficiência quântica conhecida, usando um espectrofluorímetro para obter os espectros de emissão da referência e da amostra a ser caracterizada e assim efetuar quantitativamente uma comparação com o fim de obter o valor de η [5]. As técnicas absolutas diferem no fato de que não precisam de um material de referência com eficiência quântica já determinada. Estas técnicas absolutas reduzem-se ao uso de esfera integradora e de espectroscopia de lente térmica. Em particular, a espectroscopia de lente térmica, é baseada na análise da absorção da energia de um

feixe laser incidente na amostra. Esta absorção acarreta aquecimento local na amostra, o que produz variações na frente de onda do feixe. Estas variações estão relacionadas com a potência absorvida, fato que permite a obtenção de forma absoluta, da eficiência quântica do material em estudo.

Assim, esta tese tem como objetivo principal o desenvolvimento e avaliação de um novo sistema de espectroscopia de lente térmica com filtro espacial do tipo eclipse, esse sistema será aplicado na caracterização da eficiência quântica de materiais luminescentes. Consequentemente, o resultado desta tese poderá contribuir na avaliação e desenvolvimento de materiais luminescentes os quais podem ser aplicados para entender o comportamento e a dinâmica das moléculas em tecidos marcados, além da sua aplicação na obtenção de diagnósticos e tratamentos não invasivos.

Para conseguir esse fim, são necessárias as seguintes fases: (1) Pesquisar e implementar as técnicas de medição da eficiência quântica de fluorescência; (2) Avaliar e implementar a técnica de espectroscopia de lente térmica explorando o filtro espacial, para otimização da sensibilidade da técnica; (3) Avaliar a eficiência quântica de diferentes marcadores fluorescentes explorando a técnica de espectroscopia de lente térmica; e (4) Projetar um dispositivo de espectroscopia de lente térmica portátil, para a caracterização de materiais fluorescentes.

Esta tese apresenta ao leitor, no segundo capítulo, uma introdução à espectroscopia de fluorescência, inserindo os conceitos e diferentes processos de emissão da luz. Além disso, serão abordados neste capítulo alguns dos diferentes materiais fluorescentes existentes.

O terceiro capítulo mostra uma revisão das diferentes técnicas de avaliação da eficiência quântica de fluorescência existentes e aplicadas nesta pesquisa.

No quarto capítulo desta tese mostra-se os pormenores de um resultado importante desta, que é o desenvolvimento do novo sistema de espectroscopia de lente térmica com filtro espacial tipo eclipse. Esta modificação da técnica de lente térmica aumenta a sensibilidade do método, permitindo a caracterização de amostras com concentrações menores que $10^{-4}M$. O sistema desenvolvido foi aplicado na caracterização de Rodamina 6G e de QDs para caracterizar QDs de Telureto de cádmio (CdTe).

Outro resultado desta tese é apresentado no quinto capítulo, avaliando a dependência da eficiência quântica com o pH da suspensão de QDs. O controle do pH de suspensões de QDs é essencial nas aplicações biomédicas, porque é necessário que estes marcadores estejam com pH neutro, para não danificar o sistema biológico no qual será aplicado. Além disso é mostrado em detalhes como manter e otimizar a eficiência quântica do fluoróforo com pH neutro.

Com a experiência obtida trabalhando com as técnicas de medição de eficiência quântica, é apresentado, no sexto capítulo, o projeto de um espectroscópio de lente térmica portátil e de fácil uso, para a caracterização de materiais fluorescentes. Este sistema poderá auxiliar a pesquisadores e técnicos na avaliação e desenvolvimento de novos materiais fluorescentes.

Finalmente no sétimo capítulo são apresentadas as conclusões e perspectivas futuras, destacando sucintamente os resultados obtidos na pesquisa e otimizações que podem ser aplicadas ao dispositivo de espectroscopia de lente térmica.

2 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA: FUNDAMENTAÇÃO E TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO.

O termo espectroscopia óptica refere-se a toda técnica que trata da interação de materiais com as diferentes componentes do espectro eletromagnético. Mas para o desenvolvimento desta tese, é de interesse a parte visível do espectro eletromagnético, dos 400 nm (ou 750 THz) até 750 nm (ou 400 THz) [6]. Esse intervalo do espectro é facilmente detectado por nossos olhos, devido a isto, essa parte do espectro eletromagnético recebe o nome de luz visível, como é frequentemente chamado. Existem dois tipos de fontes de luz: (1) fontes primárias que emitem luz própria e (2) as fontes secundárias ou corpos iluminados que difundem a luz de uma fonte primária.

O presente capítulo é dedicado às fontes primárias de luz, mais especificamente às que geram luz pelo processo de emissão por fluorescência. Neste capítulo será apresentado o princípio da espectroscopia de fluorescência que é aplicada para a caracterização ótica de materiais fluorescentes. Também será definido um parâmetro para quantificar a eficiência da emissão desses materiais. Além disto serão mencionados alguns dos diferentes sistemas moleculares e de partículas que possuem o mecanismo de emissão de luz por fluorescência.

2.1 EMISSÃO DE LUZ

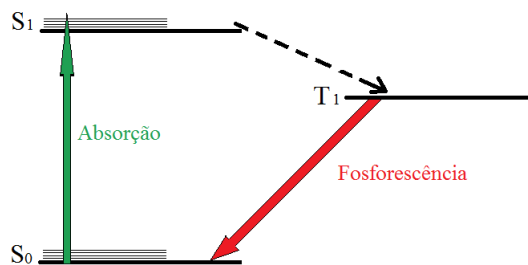
A emissão de luz ou luminescência de qualquer sistema físico acontece a nível quântico, quando na matéria os elétrons desta experimentam uma transição eletrônica entre seus níveis de energia. Este tipo de mudança na energia acontece quando os elétrons passam de um estado excitado ou de maior energia para um nível de menor energia (estado fundamental). Essa passagem do elétron do nível excitado para o fundamental, acarreta que tal diferença de energia entre os níveis deverá ser liberada pelo elétron por processos não radiativos e/ou decaimentos de emissão em forma de radiação, esse último processo é chamado de decaimento radiativo.

O decaimento radiativo pode ser realizado mediante diferentes processos de relaxação, com isto a luminescência é formalmente dividida em duas classes, Fosforescência e Fluorescência, a diferença entre esses dois processos é o tipo de estado excitado no qual o sistema está no início do decaimento radiativo. Nas seguintes seções são expostos os detalhes desses dois mecanismos de relaxação.

2.1.1 Fosforescência

A luminescência por fosforescência é devida ao decaimento radiativo desde um estado excitado triplete (T_1) para o nível fundamental (singleto S_0).

Figura 1 – Diagrama de Jablonski para a emissão por fosforescência



Fonte: O Autor (2020).

A Figura (1) mostra pelo diagrama de Jablonski o esquema desta transição. Essa transição tem uma probabilidade muito pequena de ocorrer (probabilidade reduzida por um fator de 10^{-6}), isto implica que o elétron estará no estado excitado durante uma fração considerável do segundo, com taxas de emissão da ordem de 10^3 até 1 s^{-1} . Isto faz com que o tempo de vida da fosforescência seja alto, tipicamente de milissegundos a segundos [7, 8].

A razão da probabilidade da transição tripleto $\rightarrow$ singlete ser tão pequena é a variação do spin do elétron, ΔS , entre os níveis excitado e fundamental ser um, $\Delta S = 1$, fato que viola a regra de seleção do spin. Apesar disto é conhecido que a função de onda do estado tripleto T_1 contém alguma mistura dos estados singlete, principalmente do S_1 , o que permite o decaimento radiativo por fosforescência [9].

2.1.2 Fluorescência

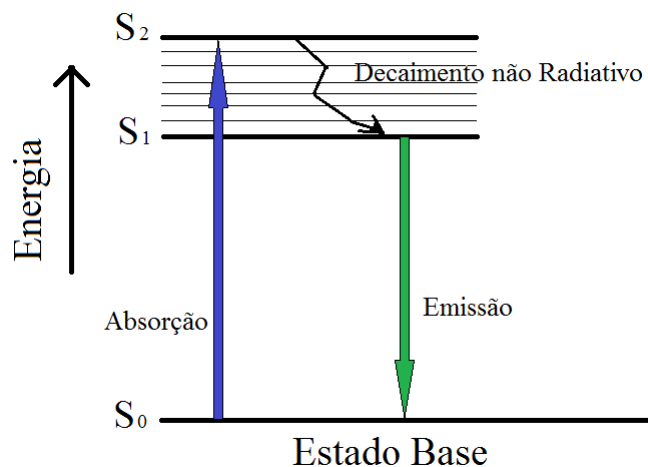
O processo de emissão por fluorescência é devido à transição do estado excitado singlete para o nível fundamental. É conhecido da mecânica quântica que esta transição satisfaz a regra de seleção $\Delta S = 0$, sendo uma transição permitida com taxas de emissão da ordem de 10^8 s^{-1} . Isto acarreta que o tempo de vida média da fluorescência seja próximo a 10 ns [7, 8, 9], sendo menor que o tempo de vida da emissão por fosforescência.

Na figura 2 pode-se observar as transições energéticas entre o nível de excitação singlete S_1 e o nível base S_0 , sendo a diferença de energia entre estes dois níveis igual à energia do fóton emitido, ou seja:

$$E_{S_1} - E_{S_0} = \Delta E = h\nu, \quad (2.1)$$

onde h é a constante de Planck ($h = 6,626 \times 10^{-34} \text{ J.s}$) e ν a frequência do fóton produzido na emissão [10]. A expressão da equação (2.1) indica que a energia deste sistema físico esta quantizada. Esse fato faz ser possível medir ou calcular a frequência de luz emitida pelo sistema. Para atingir o objetivo desta tese, é necessário conhecer mais sobre a espectroscopia de fluorescência, é por isso que a próxima seção será dedicada a essa espectroscopia.

Figura 2 – Diagrama de Jablonski para a emissão por fluorescência



Fonte: O Autor (2020).

2.2 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

A espectroscopia de fluorescência também chamada espectrofluorometria ou simplesmente Fluorometria, é uma técnica usada para estudar a emissão de luz pelo sistema atômico ou molecular.

Em espectroscopia de fluorescência a luz emitida no processo de fluorescência é coletada num espectrômetro. Esse dispositivo separa e exibe a luz coletada em cada um dos comprimentos de onda que a compõem, produzindo assim o chamado espectro de fluorescência que mostra a curva da emissão de fluorescência. Como explicado anteriormente, o processo de fluorescência depende da luz absorvida pelo material. Por causa disto pode-se dizer que esse espectro também dá informação sobre a absorção que produz a fluorescência. É por isto que para obter um material cuja absorção produza a maior fluorescência, com respeito a sua energia, é importante conhecer o espectro de absorção do material, e o tempo de vida médio do estado excitado do fluoróforo que mostra com boa sensibilidade as interações do fluoróforo com seu ambiente e moléculas próximas [7, 11, 12].

Define-se o tempo de vida médio de fluorescência, como o tempo característico em que um átomo ou molécula permanecem em seu estado excitado antes de retornar ao estado fundamental [12, 10]. O tempo de vida médio da fluorescência pode ser representado pelo tempo do decaimento da intensidade da fluorescência, que pode ser expressado como um simples decaimento exponencial [10],

$$I = I_0 e^{-kt}, \quad (2.2)$$

I_0 é a intensidade inicial da fluorescência em $t = 0$, e k é uma taxa constante na qual estão inclusas as taxas dos decaimentos radiativo e não radiativo, k_r e k_{nr} , respectivamente. Estas taxas

podem ser escritas em termos do tempo de decaimento radiativo τ_r , e do tempo de decaimento não radiativo τ_{nr} , assim:

$$k = k_r + k_{nr} = \frac{1}{\tau_r} + \frac{1}{\tau_{nr}} = \frac{1}{\tau}, \quad (2.3)$$

então, substituindo a equação (2.3) na equação (2.2) obtem-se,

$$I = I_0 e^{-t/\tau}. \quad (2.4)$$

Esse tempo de vida total τ , pode ser obtido experimentalmente conhecendo o espectro de fluorescência do sistema estudado e ajustando esse espectro a uma exponencial teórica simples decrescente (Eq. (2.4)) [10].

Sabendo que o tempo de vida radiativo, τ_r , é inversamente proporcional à força de oscilador do momento de dipolo da transição envolvida no processo [10], é possível conhecer a taxa de decaimento radiativo. A partir destes dados é possível obter informação importante sobre as propriedades quânticas do material fluorescente.

Um parâmetro importante que tem relação com o tempo de vida médio do nível excitado e as taxas de relaxação do material é a eficiência quântica da fluorescência, a qual será o eixo central de estudo ao longo desta tese.

2.3 EFICIÊNCIA QUÂNTICA

A eficiência quântica também nomeada de rendimento quântico, η , é a razão do número de fótons emitidos pelo número de fótons absorvidos, tal como foi definida na introdução deste trabalho, que matematicamente pode-se escrever como:

$$\eta = \frac{n^\circ \text{ de fótons emitidos}}{n^\circ \text{ de fótons absorvidos}}. \quad (2.5)$$

A expressão (2.5) pode ser rescrita usando as taxas de relaxação e os tempos de vida da equação (2.3), assim

$$\eta = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} = \frac{\tau_{nr}}{\tau_{nr} + \tau_r}. \quad (2.6)$$

Além disto verifica-se que na ausência de decaimento não radiativo a eficiência quântica é 1. Quando isto acontece podemos concluir que o decaimento de elétrons do nível excitado é devido só a processos radiativos.

Atualmente é possível ter moléculas (fluoróforos) com eficiências quânticas próximas a um, como Fluoresceína, Rodamina, etc.

Materiais fluorescentes são de grande aplicação no campo da engenharia biomédica, sendo usados como marcadores biológicos de diagnóstico [10]. Devido a isso é de grande importância conhecer e caracterizar o rendimento quântico dos fluoróforos.

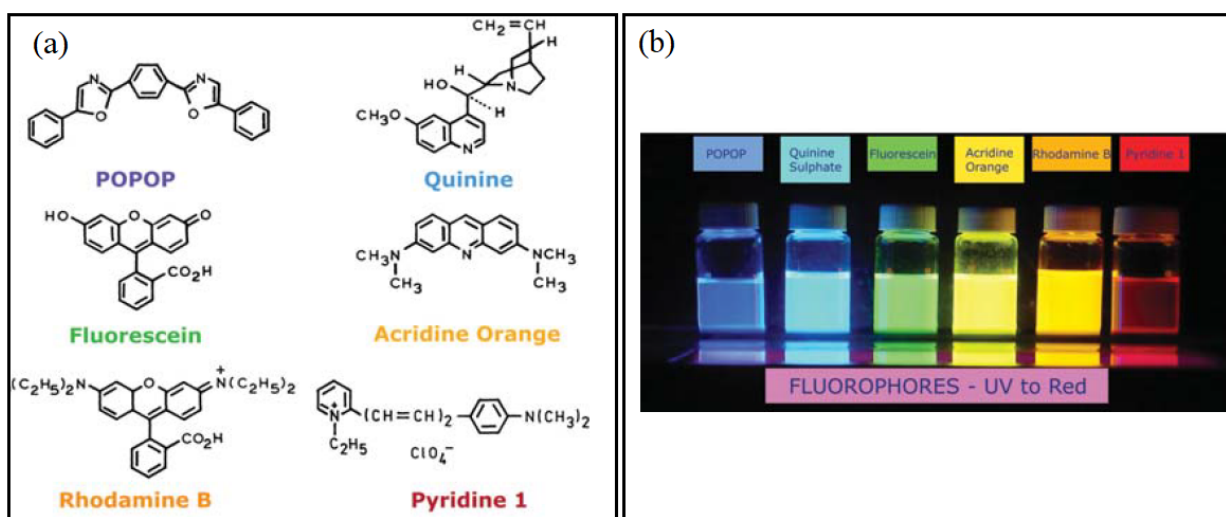
2.4 FLUORÓFOROS

Atualmente existem vários tipos de fluoróforos, os quais podem ser classificados em dois grupos; macromoléculas e nanopartículas fluorescentes [7].

2.4.1 Moléculas fluorescentes

Em vários casos a fluorescência acontece em moléculas aromáticas, como as que são apresentadas na figura 3.

Figura 3 – (a) Estrutura química de moléculas fluorescentes. (b) fluorescência de cada Fluoróforo de (a)



Fonte: Adaptado de [7].

Um exemplo de molécula fluorescente é a quinina, que é um fluoróforo frequentemente encontrado na natureza e está presente na água tônica. Esta substância quando é exposta à luz do sol mostra um fraco brilho azul na superfície do recipiente onde for depositada [7]. No caso da água tônica o brilho é devido ao fato da quinina ser excitada pela luz ultravioleta do sol, induzindo o processo de fluorescência, e emitindo uma luz azul de comprimento de onda próximo dos 450 nm [7]. Além deste existem muitos tipos de fluoróforos de grande importância em função das suas aplicações específicas na engenharia ou na ciência.

A Fluoresceína e a Rodamina são outras duas moléculas que emitem uma luz de cor verde e vermelho-laranja respectivamente. Estas macromoléculas são interessantes porque apresentam eficiências quânticas elevadas, acima de 90 e 80 % respectivamente, dependendo do comprimento

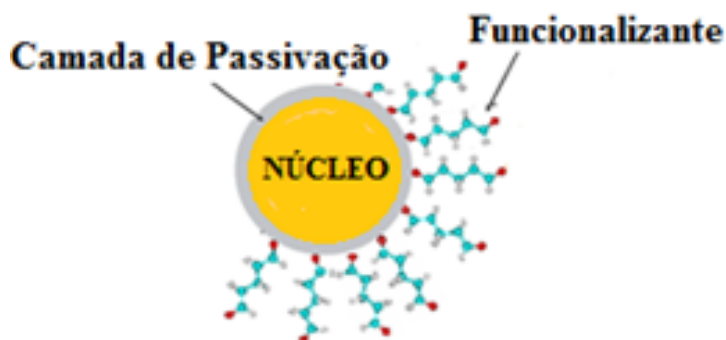
de onda de excitação usado sobre cada molécula [13], e são exploradas como marcadores biológicos em microscopia, citometria de fluxo e em ensaios de imunofluorescência.

2.4.2 Pontos quânticos

Os pontos quânticos ou *Quantum Dots* (QDs) são nanopartículas de escala nanométrica com diâmetros na ordem de 1 a 10 nm. Estes são constituídos de poucas centenas a poucos milhares de átomos, exibindo propriedades ópticas que são diferentes quando comparadas as dos mesmos cristais em escala macroscópica [2, 14]. QDs vêm cada vez mais sendo utilizados para aplicações biológicas. Isso ocorre devido ao fato dos mesmos apresentarem consideráveis vantagens em relação aos marcadores convencionais (principalmente aos corantes orgânicos mencionados na seção anterior) para marcação celular e diagnóstico, tal como foi especificado na introdução desta tese [14, 1, 4].

Os QDs são nanoestruturas complexas compostas de várias camadas como é mostrado na figura 4, onde o núcleo da nanopartícula (NP) determina sua emissão, a camada de passivação determina a intensidade da emissão e a fotoestabilidade, e em alguns casos, existe uma camada orgânica funcionalizante mais externa que determina a sua estabilidade química e o grau de funcionalidade em relação à marcação do sistema biológico de interesse.

Figura 4 – Ilustração de um nanocristal de semiconductor (QD) funcionalizado quimicamente para sua utilização como marcador



Fonte: Adaptado de [15].

Dentro do contexto desta tese serão usados pontos quânticos sem a camada funcionalizante. Com o fim de caracterizar e avaliar as propriedades ópticas desses nanocristais, no próximo capítulo serão descritas detalhadamente algumas das técnicas mais importantes para a obtenção da eficiência quântica da fluorescência.

3 TÉCNICAS DE AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA QUÂNTICA

O capítulo anterior, dedicado à espectroscopia de fluorescência, mostrou que a emissão da luz pode ser causada pelos processos de fluorescência e fosforescência. A fluorescência tem grandes aplicações na engenharia biomédica, como em análises genéticas, sequenciamento de DNA, diagnóstico médico, além das aplicações já mencionadas na introdução desta tese, etc [7]. Por causa dessas aplicações é importante caracterizar os fluoróforos, com a identificação de espectros de fluorescência e a quantificação da eficiência quântica (η).

Ao longo de décadas, cientistas tem gerado uma grande variedade de estudos experimentais e teóricos que determinam a eficiência quântica de diferentes materiais fluorescentes. Essas pesquisas também apresentam várias técnicas para caracterizar a eficiência quântica, sendo que cada uma dessas apresentam vantagens e desvantagens.

Este capítulo pretende mostrar ao leitor quais são as técnicas experimentais mais usadas na atualidade, expondo os detalhes das técnicas e discutindo as condições necessárias destas para avaliar a eficiência quântica de fluoróforos, tais como pontos quânticos em suspensões.

Atualmente é possível classificar as técnicas de avaliação da eficiência quântica em dois grupos: (1) técnicas relativas e (2) técnicas absolutas. Essas duas técnicas serão apresentadas nas seções seguintes.

3.1 TÉCNICA RELATIVA DE AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA QUÂNTICA DE FLUORESCÊNCIA

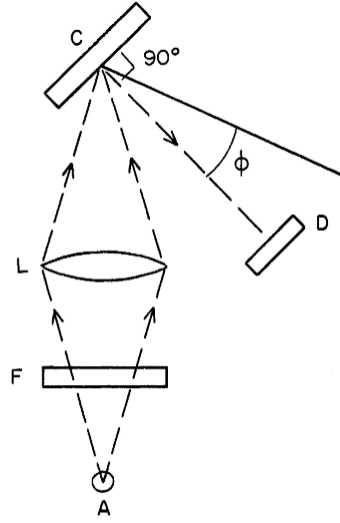
Esta técnica é denominada relativa devido a que o resultado obtido ao aplicar este método é relativo a uma amostra referência, essa amostra referência tem parâmetros e propriedade bem definidas e conhecidas.

A técnica relativa de caracterização da eficiência quântica tem seus fundamentos no trabalho publicado em 1924 por Vavilov [16]. No trabalho de Vavilov é usado o óxido de magnésio como material de referência. Com o fim de explicar em forma mais didática a técnica proposta por Vavilov para a obtenção de η , é apresentado o arranjo experimental da figura (5) [17, 18].

Na figura (5) a fonte de luz A é originada de uma lampada de arco de mercúrio. A luz que vem de A é monocromatizada pelo filtro F, e focalizada pela lente L sobre uma pequena área da superfície C. Na área iluminada da superfície C é posicionada uma cubeta com o material fluorescente, ou uma placa revestida com uma camada de óxido de magnésio (MgO), sendo esta a amostra de referência. O detector D é posicionado perpendicular à superfície frontal da cubeta.

Para analisar a teoria que modela a técnica de Vavilov mostrada na figura (5) e obter

Figura 5 – Arranjo experimental da técnica relativa de caracterização da eficiência quântica, usando uma amostra de MgO como referência



Fonte: Adaptado de [19].

uma expressão para a eficiência quântica, é considerado que a área excitada em C, tem uma intensidade I . Quando é usado o material de referência em C, o número total de fótons espalhados por segundo, E_r , é dado por

$$E_r = IR, \quad (3.1)$$

onde R é a refletância da placa de MgO para o comprimento de onda de excitação. Quando é substituído o MgO pela cubeta com a amostra fluorescente, a emissão E_x , pode ser descrita por:

$$E_x = IT_{ex}\eta, \quad (3.2)$$

sendo T_{ex} o coeficiente de transmissão da cubeta para o comprimento de onda de excitação, e η é a eficiência quântica da amostra fluorescente.

Ao considerar a emissão da amostra como uma fonte pontual, isotrópica, pode-se dizer que a intensidade da luz emitida na cubeta pela amostra é $E_x/4\pi$. Assumindo que a luz vai atingir o detector D, que o detector é pequeno e possui um ângulo sólido de detecção Ω , na posição do detector, com incidência normal da luz, obtém-se

$$N_x = \frac{T_{em}\Omega E_x}{4\pi n^2}, \quad (3.3)$$

onde T_{em} é o coeficiente de transmissão da cubeta para os comprimentos de onda dos fótons emitidos e, n , é o índice de refração do solvente para o comprimento de onda da emissão. A equação (3.3), fornece o número de fótons por segundo, N_x , que atingem a superfície do detector.

É possível ainda obter o número de fótons do espalhamento da superfície de MgO no detector em termos de quantidades mensuráveis. Assumindo que o dispersor se comporta como um refletor difuso ideal, pode-se usar a lei de Lambert para escrever a intensidade da luz espalhada $I(\phi)$, em função do ângulo ϕ com respeito à normal da superfície C [19]. Assim:

$$\begin{aligned} I(\phi) &= I_0 \cos(\phi) \quad (0 \leq \phi \leq \pi/2) \\ I(\phi) &= 0 \quad (\pi/2 \leq \phi \leq \pi). \end{aligned} \quad (3.4)$$

Integrando a intensidade sobre o espaço de uma esfera unitária, é obtido o número total de fótons por segundo espalhados pela superfície de MgO, tal como

$$E_r = \int_0^{2\pi} d\theta \int_0^{\pi/2} (I_0 \cos \phi) \sin \phi d\phi = \pi I_0. \quad (3.5)$$

Considerando que o detector que possui um ângulo solido pequeno e normal à superfície, obtem-se

$$N_r = \Omega I_0 = \frac{\Omega E_r}{\pi}. \quad (3.6)$$

A equação (3.6) fornece o número de fótons por segundo que atingem o detector.

Como a sensibilidade da maioria dos detectores depende do comprimento de onda, a resposta obtida do detector será a média da distribuição espectral da luz que o atinge. Então as respostas do detector, usando a referência D_r e a amostra fluorescente em análise D_x , são dadas por:

$$D_r = C' K_r \Omega E_r / \pi; \quad K_r = \frac{\int S(\nu') I_r(\nu') d\nu'}{\int I_r(\nu') d\nu'}, \quad (3.7)$$

$$D_x = C' K_x \Omega E_x T_{em} / 4\pi n^2; \quad K_x = \frac{\int S(\nu') I_x(\nu') d\nu'}{\int I_x(\nu') d\nu'}, \quad (3.8)$$

onde $I(\nu')$ é a distribuição espectral atingindo o detector, $S(\nu')$ é a sensibilidade relativa do detector para a radiação com energia ν' , K é a média do detector para cada fóton e C' é uma constante usada para converter a expressão a unidades absolutas.

Finalmente, combinando as equações (3.1), (3.2), (3.7) e (3.8) é obtida a expressão que quantifica a eficiência quântica de fluorescência

$$\eta = \left(\frac{K_r}{K_x} \right) \left(\frac{D_x}{D_r} \right) \left(\frac{R}{T_{ex} T_{em}} \right) n^2. \quad (3.9)$$

Na atualidade a técnica relativa que permite mensurar a eficiência quântica de um fluoróforo usa uma variação da técnica original de Vavilov, substituindo o material dispersor por um fluoróforo com eficiência quântica conhecida. Ao usar este fluoróforo de referência, as amostras podem ser classificadas como opticamente densas e opticamente diluídas. Na primeira, a maior parte da luz é absorvida quase que pontualmente, enquanto que, na segunda classe, a maior parte do feixe de excitação surge (é transmitida) não atenuada. Em concentrações intermediárias, as medições dos dois tipos se sobrepõem e com as correções adequadas produzem os mesmos resultados. As expressões usadas para a avaliação da eficiência quântica nesses dois tipos de medições serão especificadas nas seguintes seções.

3.1.1 Classe opticamente densa

Substituindo o material dispersor por uma cubeta com a solução opticamente densa de um fluoróforo como referência, e usando as expressões (3.7-3.9), obtém-se

$$\eta_x = \eta_r \left(\frac{K_r}{K_x} \right) \left(\frac{D_x}{D_r} \right) \left(\frac{n_x^2}{n_r^2} \right). \quad (3.10)$$

A equação (3.10) dá a eficiência quântica de um material fluorescente do tipo opticamente denso. Esta equação é aplicável quando [19]:

- A luz absorvida produz uma fonte pontual no material de referência e na amostra a ser caracterizada. Isto quer dizer que o detector vai observar o volume total luminescente.
- Os efeitos de reflexão e transmissão são iguais para as duas amostras.
- O índice de refração da referência e do material em estudo é assumido constante para toda a banda de emissão destes materiais.

Além disso, este método está restrito a soluções que podem ser excitadas com o mesmo comprimento de onda, e devem ser conhecidos os espectros de emissão das amostras e a sensibilidade do detector [19].

Para evitar integrações numéricas, o detector pode ser trocado por um contador quântico. Usando o contador quântico apropriado, $K_r/K_x = 1$, reescreve-se a equação (3.10) como:

$$\eta_x = \eta_r \left(\frac{D_x}{D_r} \right) \left(\frac{n_x^2}{n_r^2} \right). \quad (3.11)$$

Atualmente o contador quântico é substituído por um espectrômetro para detectar a emissão das amostras, desta forma as respostas do detector, D_r e D_x , na equação (3.10) podem ser calculadas integrando as áreas do espectro de emissão da referência e da amostra que será caracterizada, respectivamente.

3.1.2 Classe opticamente diluída

A caracterização da eficiência quântica de fluoróforos do tipo opticamente diluídos é a mais comumente utilizada, na avaliação desta classe de amostras é substituído o detector usado por Vavilov por um espectrofluorímetro. Além disto, quando comparada esta técnica com suas técnicas antecessoras, o uso da técnica relativa para amostras opticamente diluídas oferece uma boa performance devido à alta qualidade dos espectrofluorímetros oferecidos no mercado atual.

Para obter a expressão da eficiência quântica deste tipo de amostras, é usado o fato destas amostras obedecerem a lei de Beer. Lei que trata do comportamento da intensidade transmitida após a luz interagir com a amostra, mostrando que a radiação absorvida ou transmitida por uma determinada solução depende da concentração do soluto e da espessura da solução. Pode-se reescrever a Lei de Beer como:

$$I_0 B = I_0 (1 - 10^{-\alpha d}), \quad (3.12)$$

onde B é a fração de luz absorvida pela amostra, I_0 é a intensidade do feixe incidente, α é o coeficiente de absorção da amostra, e d é o caminho óptico. Em primeira aproximação, usando a expansão em série de potências do exponencial da equação (3.12), tem-se que B é dado por:

$$B = 1 - [1 - 2,303\alpha d + (2,303\alpha d)^2 / 2 + \dots] \approx 2,303\alpha d. \quad (3.13)$$

Se a intensidade de luminescência para a referência e a amostra em análise é proporcional a $I_0 B$, podem ser usadas as expressões de Vavilov e o desenvolvimento de Drushel, Parker e seus colaboradores [20, 21]. Obtendo assim a expressão para a eficiência quântica

$$\eta_x = \eta_r \left(\frac{B_r}{B_x} \right) \left(\frac{I(\lambda_r)}{I(\lambda_x)} \right) \left(\frac{n_x^2}{n_r^2} \right) \left(\frac{D_x}{D_r} \right), \quad (3.14)$$

onde $I(\lambda)$ é a intensidade da luz de excitação para o comprimento de onda λ , n é o índice de refração da solução para a luminescência. Substituindo a equação (3.13) na equação (3.14), é obtida a expressão (3.15), que é a equação mais usada por pesquisadores que aplicam esta técnica com a ajuda de espectrofluorímetros [22]. Assim a eficiência quântica, η_x , de uma amostra é dada por:

$$\eta_x = \eta_r \left(\frac{A_r(\lambda_r)}{A_x(\lambda_x)} \right) \left(\frac{I(\lambda_r)}{I(\lambda_x)} \right) \left(\frac{n_x^2}{n_r^2} \right) \left(\frac{D_x}{D_r} \right). \quad (3.15)$$

Na equação (3.15) $A(\lambda)$ é definido como a absorbância da amostra para o comprimento de onda da luz de excitação. Note que o subíndice r é usado para indicar os parâmetros do material de referência, e o subíndice x , é para indicar os parâmetros do material a ser caracterizado.

Para aplicar as equações (3.14), (3.15) na avaliação da eficiência quântica, devem ser levadas em consideração as seguintes suposições sobre a referência e a amostra que está sendo caracterizada:

- A intensidade da luminescência é proporcional a uma fração da luz absorvida.
- Todos os fatores geométricos são idênticos.
- Os feixes de excitação são monocromáticos.
- As perdas por reflexão são iguais para as duas amostras
- Os efeitos de reabsorção e reemissão são desprezíveis.
- Toda a luz saindo da cubeta é isotrópica.

A pesquisa apresentada nesta tese avalia a técnica relativa para a classe opticamente diluída, por ser esta a mais aplicada na atualidade. A tabela 1 lista alguns dos materiais usados como referência. Esta tabela, além de informar a eficiência quântica, indica o comprimento de onda de excitação λ_{exc} , o qual corresponde ao comprimento de onda absorvido por estas referências [7].

Tabela 1 – Eficiência quântica de fluoróforos de referência.

Composto	Solvente	λ_{exc} (nm)	°C	η (%)
Sulfato de quinina	0.1M H_2SO_4	350	22	57,7
		366	-	$53 \pm 2,3$
Fluoresceína	0.1M NaOH	496	22	$95 \pm 3,0$
Triptofano	Água	280	-	$13 \pm 1,0$
Tirosina	Água	275	23	$14 \pm 1,0$
Fenilalanina	Água	260	23	24
Fenol	Água	275	23	$14 \pm 1,0$
Rodamina 6G	Etanol	488	-	94
Rodamina 101	Etanol	450-465	25	100

Fonte: adaptado de [7]

Então, usando algum dos fluoróforos de referência da tabela 1 e mediante o uso de espectrofluorímetros calibrados, pode-se obter a eficiência quântica relativa, segundo como foi mostrado por J. N. Demas e G. A. Crosby, a partir da equação (3.15) conhecendo a eficiência quântica de uma amostra de referência (η_r) [19].

A expressão (3.15) ainda pode ser mais simplificada, com o fim de facilitar sua aplicação na caracterização experimental da eficiência quântica, usando as seguintes fatos:

1. A equação (3.12) pode ser reescrita como:

$$I_a = I_0 (1 - e^{-\sigma C d}), \quad (3.16)$$

onde I_a é a intensidade da luz absorvida pela amostra, σ é a seção transversal de absorção da amostra, C é a concentração molar do fluoróforo e o produto $\sigma C d$ é chamado de densidade óptica (OD). A densidade óptica é proporcional à Absorbância da amostra, que é dada por:

$$A = OD \log_{10} e \quad \text{ou} \quad A = \epsilon C d, \quad (3.17)$$

onde ϵ é o coeficiente de extinção molar. Usando a expansão em series de Taylor do termo exponencial na equação (3.16), obtém-se:

$$I_a = I_0 (1 - [1 - \sigma C d + (\sigma C d)^2/2 + \dots]). \quad (3.18)$$

Sendo I_f a intensidade de fluorescência emitida pela amostra, ela pode ser escrita na forma:

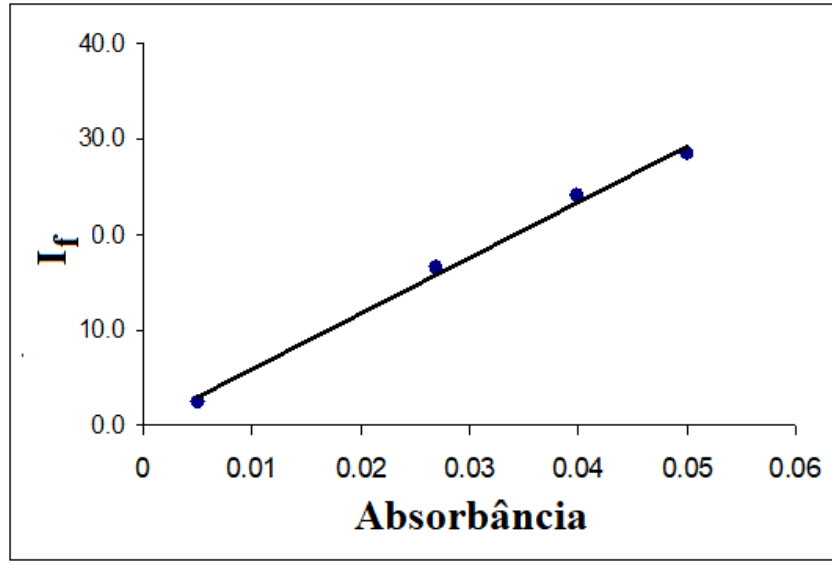
$$I_f = \eta I_a. \quad (3.19)$$

É possível combinar as equações (3.18) e (3.19), e encontrar uma expressão que mostra uma relação linear entre a intensidade da emissão e a concentração do fluoróforo para a classe opticamente diluída. Assim, assumindo que a densidade óptica do material é menor que 0,1, tem-se:

$$I_f = \eta I_0 (\sigma C d). \quad (3.20)$$

2. Como a intensidade da fluorescência e a concentração mostram ter uma dependência linear, dependência que também ocorre com respeito à absorbância da amostra, é possível usar várias concentrações para criar um gráfico de I_f vs C , posicionando no eixo vertical os valores da intensidade de fluorescência, e no eixo horizontal as concentrações respectivas para cada uma das intensidades, tal como é apresentado na Figura (6).

Figura 6 – Gráfico da área do espectro de emissão em função da absorbância para Rodamina 101



Fonte: Adaptado de [15].

Usando os pontos da figura (6) é obtido o coeficiente angular ou declividade da reta m , dado por:

$$m = \frac{\Delta I_f(\lambda)}{\Delta A(\lambda)} \approx \frac{I_f(\lambda)}{A(\lambda)}. \quad (3.21)$$

Lembrando que na equação (3.15) o termo $D = I_f$ e combinando as equações (3.15) e (3.21), usando o fato que a intensidade de excitação $I(\lambda)$ é a mesma para as duas amostras, pode-se reescrever a equação (3.15), como:

$$\eta = \eta_r \frac{m}{m_r} \left(\frac{n}{n_r} \right)^2, \quad (3.22)$$

sendo m_r o coeficiente angular obtido da curva para a referência, e m é o coeficiente angular da amostra analisada.

Para aplicar este método, que usa a aproximação de um comportamento linear da emissão com respeito a concentração e a absorbância, a densidade óptica deve ter um valor pequeno, já que um valor de $OD = 0,2$, na equação (3.20) introduz um erro de aproximadamente 10% nos resultados, quando comparados com a equação (3.16) sem aproximação. Este resultado sugere que a referência e a amostra a ser caracterizada tenham absorbâncias menores a 0,1 para o comprimento de onda de excitação. Outra alternativa, é usar um comprimento de onda de excitação de 10 até 50 nm menor que o comprimento de onda da máxima absorção, reduzindo desse jeito a absorbância da amostra.

Experimentalmente a medida da eficiência quântica relativa é realizada seguindo o seguinte procedimento:

1. Preparar várias soluções da amostra de referência com absorbâncias menores que 0,1 (no comprimento de onda que será utilizado na excitação da luminescência desses materiais).
2. Obter o mesmo número de amostras com o fluoróforo a ser analisado, com absorbância menor que 0,1 no comprimento de onda de excitação.
3. Determinar os valores de absorbância para as soluções no comprimento de onda de excitação.
4. Usando um espectrofluorímetro, obter os espectros de emissão (utilizando o mesmo comprimento de onda de excitação).
5. A partir dos espectros de emissão obter as áreas por baixo da curva e traçar um gráfico das áreas em função das absorbâncias, como mostra a Figura (6).
6. Gerar o gráfico do item anterior para a referência e para a amostra em estudo, e obter o coeficiente angular ou declividade m da linha reta gerada pelos pontos do gráfico.
7. Substituir os valores obtidos nos itens anteriores na equação (3.22).

Experimentalmente, para garantir que as medições estão na região linear, deve-se verificar que as amostras criadas satisfaçam que o gráfico da área das curvas dos espectros de emissão em função das suas respectivas absorbâncias seja linear. Isso é importante com o fim de confirmar que não existem efeitos de reabsorção nem de densidade óptica que interfiram nas medições.

3.2 TÉCNICAS ABSOLUTAS DE AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA QUÂNTICA DE FLUORESCÊNCIA

As técnicas absolutas para a avaliação da eficiência quântica têm como grande vantagem sobre as técnicas relativas, a não necessidade do uso de uma amostra de referência. Assim estas técnicas oferecem uma maior autonomia para a pesquisa de diferentes tipos de sistemas fluorescentes. Nesta seção são abordadas as técnicas absolutas da esfera integradora e da espectroscopia de lente térmica.

3.2.1 Esfera integradora

Esta técnica é usada de preferência para os seguintes tipos de amostras [23]:

- Amostras com altos índices de refração.
- Amostras que apresentam espalhamento.

- Amostras que apresentam dificuldades na determinação angular da emissão, refletividade e absorbância.
- Amostras as quais o espectro de emissão não se sobrepõe com o espectro da luz de excitação.

A técnica da esfera integradora usa como elemento principal para sua aplicação uma esfera oca com paredes internas revestidas de um material de reflexão de forma difusa, tipicamente sulfato de bário (ver Figura 7). Quando uma fonte fluorescente é inserida na esfera integradora ideal, a radiação da luz é redistribuída isotropicamente no interior da esfera.

3.2.1.1 Esfera integradora com laser

A quantificação da eficiência quântica de um fluoróforo mediante a esfera integradora, excitando a amostra com um laser, é realizada em três etapas:

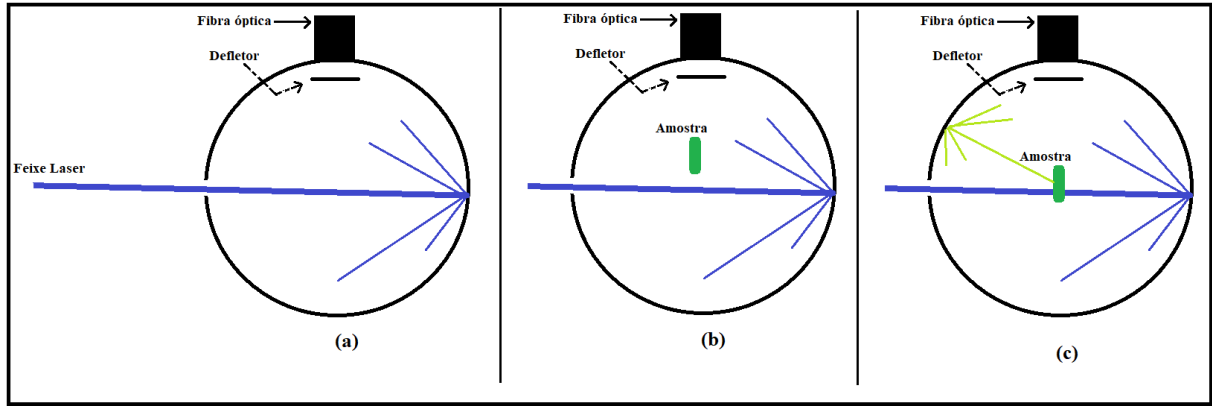
1. Com a esfera vazia e o laser incidindo no interior desta, é detectada somente a luz do laser no espectrômetro, Figura 7 (a).
2. A amostra é posicionada no interior da esfera e o laser é dirigido à parede da esfera, Figura 7 (b). Neste caso a curva detectada pelo espectrômetro vem da luz difusa que foi espalhada pelas paredes da esfera e incide sobre a superfície total da amostra. Isso ajuda a prever qualquer reabsorção do material que esta sendo caracterizado.
3. Finalmente na terceira configuração experimental, o laser incide sobre a amostra no interior da esfera, Figura 7 (c), orientando a amostra de jeito que a reflexão do laser com a superfície da amostra seja dirigida ao interior da esfera e não volte pelo orifício de entrada.

Depois de realizar estas etapas é possível obter uma expressão para mensurar a eficiência quântica. Sendo que o produto do comprimento de onda, λ , vezes a intensidade, $I(\lambda)$, é proporcional ao número de fótons em um intervalo específico de comprimentos de onda [23], pode-se definir:

$$L = \int_{\text{excitação}} \lambda I(\lambda) d\lambda; \quad P = \int_{\text{emissão}} \lambda I(\lambda) d\lambda. \quad (3.23)$$

Na equação (3.23) L é interpretado como a área do espectro do laser, proporcional à quantidade de luz de excitação (primeira etapa); e P é a área por baixo da curva da fluorescência, a qual é proporcional à luz emitida pela amostra.

Figura 7 – Diagrama das três configurações necessárias para ponderar a eficiência quântica. (a) Esfera vazia. (b) Amostra na esfera com o feixe incidindo sobre as paredes da esfera. (c) amostra na esfera com o feixe incidindo sobre a amostra



Fonte: O Autor (2020).

Na segunda etapa da técnica mostrada na Figura 7 (b), uma fração μ da luz do laser é dispersada pelas paredes da esfera e é absorvida pela amostra, este fato é descrito por:

$$L_b = L_a (1 - \mu), \quad (3.24)$$

onde L_a , L_b são interpretados como as integrais das intensidades do laser nos experimentos a e b, respectivamente.

Na terceira etapa da técnica apresentada na Figura 7 (c), uma fração, A' , da luz incidente é absorvida pela amostra, e a fração $(1 - A')$ é refletida ou transmitida. E L_c é interpretado como a integral do pico laser na terceira etapa do experimento. Assim pode-se escrever L_c como:

$$L_c = L_a (1 - A') (1 - \mu). \quad (3.25)$$

Combinando as equações (3.24) e (3.25) é obtido o coeficiente de absorção A' ,

$$A' = \left(1 - \frac{L_c}{L_b}\right). \quad (3.26)$$

Note-se também que na segunda etapa, (b), o sinal detectado é composto pela dispersão do laser mais a luz emitida após a absorção da dispersão do laser. Então o número de fótons que atingem o detector é dado por $L_b + P_b$. E na terceira etapa da técnica (c), uma fração da luz incidente é refletida pela amostra, outra transmitida e uma fração A' é absorvida. Então a contribuição da dispersão laser medida pelo espectrômetro é dada por:

$$(1 - A') (L_b + P_b). \quad (3.27)$$

Considerando também que a luz emitida devido à absorção do laser, $\eta L_a A$, também contribui para a medição do espectro na terceira etapa (c) da técnica. Então a intensidade total no espectro dessa etapa (c) é descrita por:

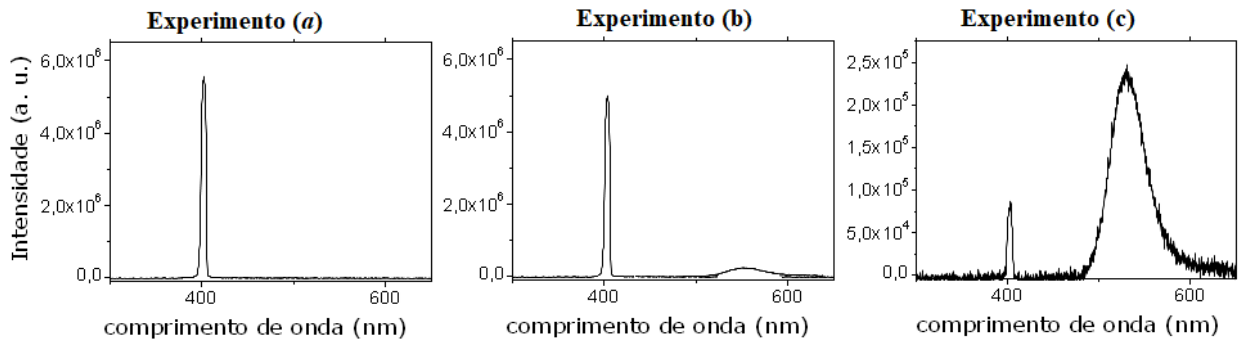
$$(L_c + P_c) = (1 - A') (L_b + P_b) + \eta L_a A'. \quad (3.28)$$

Substituindo a equação (3.26) na equação (3.28), é obtida a expressão para a eficiência quântica da amostra, que é dada por:

$$\eta = \frac{P_c - (1 - A') P_b}{L_a A'}. \quad (3.29)$$

Como exemplo, podem-se observar na Figura (8) os espectros obtidos ao aplicar esta técnica, a uma solução de QDs de CdTe/CdS-AMP, a qual registrou uma eficiência quântica $\eta \approx 3,5\%$ [15].

Figura 8 – (a) Espectro do laser incidindo na cubeta somente com água, (b) Espectro obtido com laser incidindo na parede da esfera e a cubeta com uma solução de QDs CdTe/CdS e, (c) Espectro obtido com o laser incidindo na amostra de QDs CdTe/CdS



Fonte: Adaptada de [15].

Encerrando esta seção, é importante ressaltar que a principal suposição deste modelo, é que as dispersões das diferentes partes da esfera contribuem igualmente para a medição dos espectros. Na técnica da esfera integradora também pode ser usado, como fonte de excitação, um diodo LED, como será mostrado na seção seguinte.

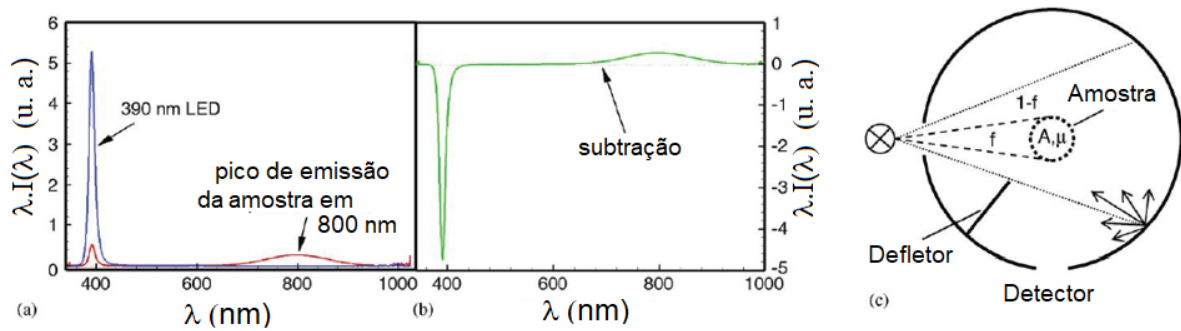
3.2.1.2 Esfera integradora com LED

Uma outra forma de avaliar a eficiência quântica de fluorescência, usando a esfera integradora, é mediante o uso de um LED como fonte de excitação.

Quando é usado um LED como fonte de excitação, é aplicado o método de L. Mangolini e seus colaboradores [24], sendo este método bem similar ao exposto anteriormente. Para apresentar esta técnica, a Figura (9) ilustra os procedimentos necessários para mensurar a eficiência quântica, seguindo os seguintes passos:

1. Medir a intensidade espectral do LED, introduzindo numa cubeta o solvente usado, tal e como é apresentado na curva azul da Figura 9 (a), onde esta medição exibe o pico de emissão em 390 nm do LED azul.
2. Introduzir a cubeta com a diluição contendo o material fluorescente na esfera integradora. Neste caso o espectro (Linha vermelha) mostra uma redução no pico em 390 nm devido à absorção do fluoróforo, e um pico alargado posicionado aproximadamente em 800 nm referente à luminescência da amostra (ver Figura 9).
3. Subtrair a intensidade espectral do item (1) com a intensidade espectral obtida no item (2). Com isso é obtido o espectro que apresenta o pico da absorção e a banda de emissão do fluoróforo, tal como é apresentado na curva verde da Figura 9 (b).

Figura 9 – (a) curva azul: medida da linha de base (emissão do LED) medida sobre uma cubeta só com o solvente. Curva Vermelha: O espectro da amostra com a fotoluminescência e a redução na curva de emissão do LED devido à absorção da amostra. (b) Espectro da amostra menos o espectro da linha de base. (c) Esquema dos fatores de importância para as medições com a esfera integradora



Fonte: Adaptada de [24].

Teoricamente, é introduzida uma pequena variação comparando com as equações desenvolvidas para a esfera integradora usando um laser. Já que somente uma fração f do fluxo de fótons de entrada do LED atinge a amostra, enquanto que $(1 - f)$ se perde e é dispersa pelas paredes da esfera. Além disso, dos fótons que interagem com a amostra uma fração A' é absorvida e a fração $(1 - A')$ é refletida ou transmitida. Supondo também que dos fótons que sofrem um ou vários eventos de espalhamento, finalmente uma fração μ é absorvida, enquanto que $(1 - \mu)$ sai da esfera de outra forma, é possível escrever as equações:

$$L_s = f(1 - A)L_b + (1 - f)(1 - \mu)L_b, \quad (3.30)$$

e

$$P_s = \eta f A L_b + \eta (1 - f) \mu L_b. \quad (3.31)$$

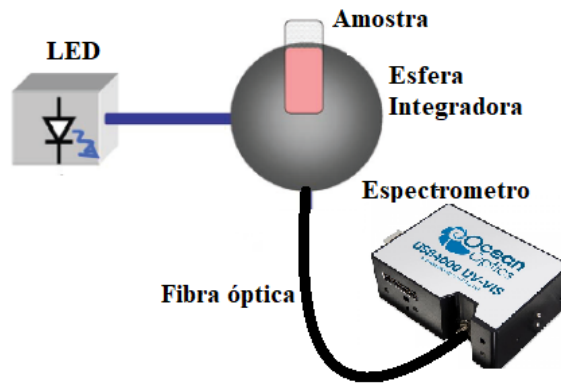
Assumindo que não há sinal de fluorescência na medida da linha de base, $P_b = 0$, tem-se

$$\frac{P_s - P_b}{-(L_s - L_b)} = \eta, \quad (3.32)$$

e como todas as considerações geométricas são inclusas na medida da linha de base L_b , é possível a partir da equação (3.32) encontrar a expressão para a eficiência quântica usando um LED como fonte de excitação da amostra [24]

Experimentalmente, usa-se um arranjo semelhante ao apresentado na Figura (10). Neste arranjo a radiação do diodo LED pode ser introduzida na esfera integradora por meio de uma fibra óptica [24]. Outra forma de incidir a radiação do LED é introduzindo o diodo LED em uma das portas de entrada da esfera integradora. A radiação que está dentro da esfera é coletada por um espectrômetro.

Figura 10 – Esquema do arranjo experimental da técnica de esfera integradora usando um LED



Fonte: O Autor (2020).

Continuando com a análise das técnicas de caracterização da eficiência quântica, na seção a seguir será discutida a técnica de espectroscopia de lente térmica aplicada na avaliação da eficiência quântica.

3.2.2 Espectroscopia de lente térmica

A espectroscopia de lente térmica (ELT) é uma técnica de caracterização que explora o efeito de lente térmica (LT). Este é um fenômeno transiente que surge quando a absorção da luz incidente na amostra produz um aquecimento localizado, modificando a densidade da amostra em função da temperatura no local da incidência do laser, e assim alterando seu índice de refração. Isso implica que, o índice de refração n da amostra depende da temperatura, fato que matematicamente pode ser descrito por:

$$n(T) = n_0 + \left(\frac{dn}{dT} \right) \Delta T, \quad (3.33)$$

onde $\frac{dn}{dT}$ é o coeficiente termo-óptico do solvente e ΔT é a variação da temperatura. Com o aumento da temperatura local o índice de refração muda, e induz um efeito tipo lente óptica na amostra [25, 26]. Desta forma a medição do sinal da LT é em essência uma determinação calorimétrica de gradientes de temperatura induzidos pela absorção da luz [26, 27].

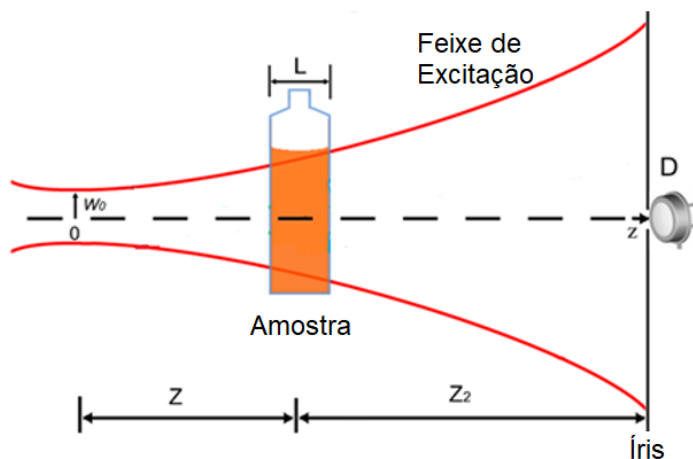
Experimentalmente, o aumento de temperatura local é gerado usando um laser de feixe gaussiano, (*continuum wave*) cw, ou pulsado, focalizado na amostra.

Para produzir a lente térmica existem vários tipos de arranjos experimentais conhecidos, os mais usados na atualidade são: lente térmica com um feixe, e lente térmica de dois feixes nos modos casado e descasado. Nas próximas seções serão discutidos os pormenores das técnicas de um feixe e de dois feixes no modo casado, já que foram as técnicas aplicadas para desenvolver esta pesquisa.

3.2.2.1 Espectroscopia de lente térmica com um feixe

Na técnica de ELT com um feixe, como seu nome indica somente precisa-se do uso de um único feixe laser interagindo com a amostra, tal como é mostrado na Figura (11).

Figura 11 – Esquema geométrico da posição do feixe no arranjo de LT com feixe único



Fonte: O Autor (2020).

A evolução espacial e temporal da variação de temperatura no meio $\Delta T(r, t)$, pode ser descrita pela equação de transferência de calor [27, 28]. Essa variação de temperatura produz um efeito tipo lente (lente térmica), e quando o feixe se propaga pela amostra sua frente de onda muda. Essa mudança na frente de onda é modelada usando a teoria de propagação de feixe gaussiano e difração de Fresnel. Daí, obtém-se o modelo teórico mais consistente do efeito da lente térmica, desenvolvido por Sheldon e seus colaboradores [28], o qual descreve a intensidade

no detector após a criação da lente térmica na amostra, assim:

$$I(t) = I_0 \left\{ 1 - \frac{\theta}{2} \tan^{-1} \left(\frac{2V}{[9 + V^2] \left(\frac{t_c}{2t} \right) + 3 + V^2} \right) \right\}^2, \quad (3.34)$$

onde I_0 é a intensidade do feixe para $t = 0$, e V é dado por:

$$V = \frac{Z}{Z_0}, \quad Z_0 = \frac{\pi \omega_0^2}{\lambda}. \quad (3.35)$$

Na equação (3.35) Z_0 é o parâmetro confocal do feixe gaussiano, também chamado de comprimento Rayleigh, ω_0 é o raio do feixe na cintura. Considerando também a posição onde ocorre a cintura do feixe, como sendo a origem ($z = 0$) da coordenada z , Z é a posição da amostra, tal e como é apresentado na figura 11; t_c é o tempo característico de difusão do calor $t_c = \omega_0/4D$, e $D = \kappa/\rho C_P$ é a difusividade térmica, ρ é a densidade volumétrica, C_P é o calor específico da amostra e κ é a condutividade térmica. θ é o deslocamento de fase térmico, e sua amplitude é dada por [28]:

$$\theta = -\frac{\phi P_{abs}}{\kappa \lambda} \frac{dn}{dT}. \quad (3.36)$$

Na equação (3.36), ϕ é a fração da energia absorvida transformada em energia térmica, ou eficiência quântica absoluta não-radiativa; λ o comprimento de onda do laser, dn/dT é o coeficiente termo-óptico, e P_{abs} a potência absorvida do feixe de excitação, dada por $P_{abs} = P_{ex}(1 - e^{-\alpha L})$, com α sendo o coeficiente de absorção linear óptico no comprimento de onda de excitação (λ) e L o caminho óptico na amostra. Para materiais não fluorescentes $\phi = 1$ e em materiais fluorescentes $\phi < 1$. O valor específico de ϕ pode ser obtido por

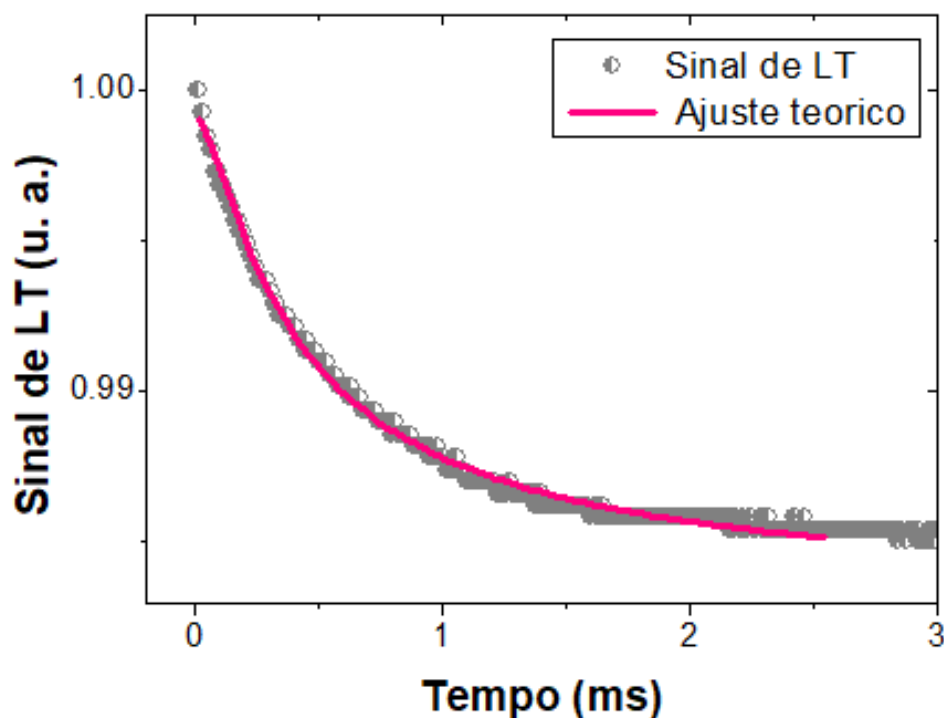
$$\phi = 1 - \eta \frac{\lambda}{\langle \lambda_{em} \rangle}, \quad (3.37)$$

onde, $\langle \lambda_{em} \rangle = \int \lambda_{em} dN(\lambda_{em}) / \int dN(\lambda_{em})$ é o comprimento de onda médio da emissão e $dN(\lambda_{em})$ é o número de fótons emitido por segundo em um incremento do comprimento de onda centrado em λ_{em} . Definindo $\Theta \equiv -\theta/P_{abs}$ e $\Theta_0 = (dn/dT)/k\lambda$, e usando as equações (3.35) a (3.37), é obtida a expressão da eficiência quântica de fluorescência dada por (3.38) [27]

$$\eta = \left(1 - \frac{\Theta}{\Theta_0} \right) \frac{\langle \lambda_{em} \rangle}{\lambda}. \quad (3.38)$$

A partir da equação (3.38) pode-se obter o valor da eficiência quântica do material em estudo. A Figura 12, apresenta uma curva típica do sinal de LT. Ajustando a equação (3.34) à curva experimental de LT, obtem-se o valor de θ . Usando as equações (3.36 e 3.37) é obtida a eficiência quântica absoluta de materiais fluorescentes e sem espalhamento.

Figura 12 – Curvas do efeito de lente térmica, experimental (traço cinza), e ajuste teórico (linha rosa)

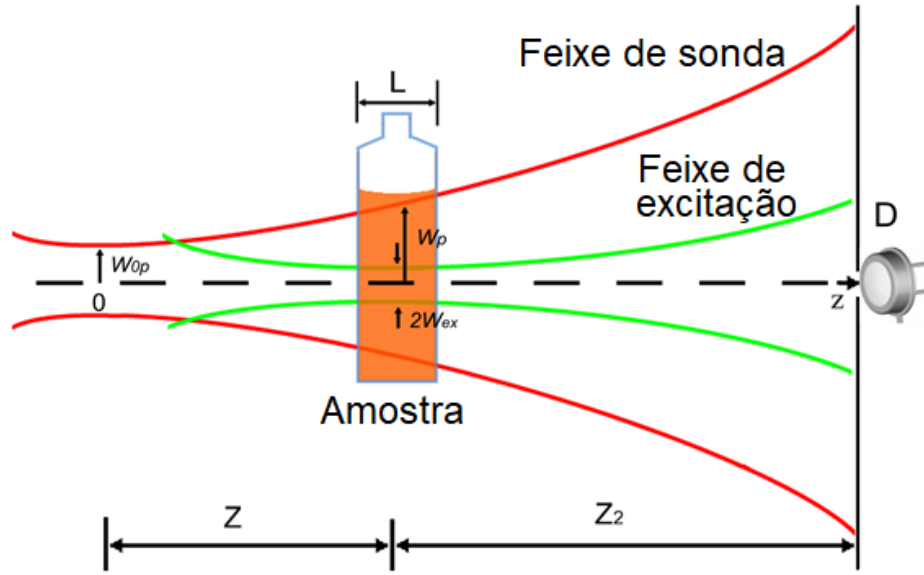


Fonte: O Autor (2020).

3.2.2.2 Espectroscopia de lente térmica com dois feixes no modo descasado

Na espectroscopia de lente térmica com dois feixes (LTD) são necessários dois lasers interagindo com a amostra. Neste caso um primeiro laser, o de maior potência é usado para gerar o efeito de lente térmica na amostra. Este laser também é chamado de feixe de bombeio ou de excitação. O segundo laser de menor potência será o encarregado de sondar o efeito de lente térmica que foi criado pelo primeiro laser. Esse laser é comumente chamado na literatura de feixe de prova ou sonda. Com esses conceitos mais claros, é possível compreender facilmente o esquema geométrico da posição dos feixes de excitação e sonda que atuam na amostra, que são apresentados na Figura 13.

Figura 13 – Esquema geométrico da posição dos dois feixes no arranjo de LT de dois feixes no modo descasado



Fonte: O Autor (2020).

O modelo teórico na configuração de dois feixes, excitação e sonda, foi desenvolvido por Shen e colaboradores [29]. Este modelo é consistente com o modelo para a configuração de feixe único, inicialmente desenvolvido por Sheldon e colaboradores [28]. Seguindo o processo usado por Shen, tem-se que a expressão analítica para a intensidade transmitida do feixe de sonda no detector no modo descasado após o feixe passar pela LT é dada por [29]:

$$I(t) = I_0 \left\{ 1 - \frac{\theta}{2} \tan^{-1} \left(\frac{2mV}{[(1+2m)^2 + V^2] \left(\frac{t_c}{2t}\right) + 1 + 2m + V^2} \right) \right\}^2, \quad (3.39)$$

onde I_0 é a intensidade do feixe de prova para $t = 0$, $m = (\omega_p/\omega_{ex})^2$, ω_p e ω_{ex} são as cinturas dos feixes de sonda e de excitação respectivamente. E V é dado por:

$$V = \frac{Z}{Z_{0p}} + \left(\frac{Z_{0p}}{Z_2} \right) \left[1 + \left(\frac{Z}{Z_{0p}} \right)^2 \right], \quad (3.40)$$

considerando a posição da cintura do feixe de excitação como a origem da coordenada z , Z e Z_2 são as posições da amostra e do detector, respectivamente, tal como é apresentado na figura 13. Z_{0p} é o comprimento Rayleigh do feixe de sonda, e a amplitude de θ é similar à apresentada na equação (3.36) e dada por [28, 29]:

$$\theta = -\frac{\phi P_{abs}}{\kappa \lambda_p} \frac{dn}{dT}. \quad (3.41)$$

Com λ_p sendo o comprimento de onda do laser de sonda. Além disso as expressões para as eficiências quânticas não radiativa e de fluorescência podem ser dadas pelas equações (3.37) e (3.38) respectivamente.

3.2.3 Espectroscopia de lente térmica com dois fótons

A emissão de luz por fluorescência também pode ser gerada pela absorção de dois fótons. Devido a isso é importante avaliar a eficiência quântica da fluorescência devido a absorção de dois fótons. Para isto pode ser utilizada a espectroscopia de lente térmica com absorção de dois fótons.

Com o fim de criar o efeito de absorção de dois fótons, focaliza-se um laser de alta potência de pico, criando um ponto de alta intensidade na amostra. Essas condições aumentam a probabilidade de ter um processo multifotônico eficiente.

Para obter um modelo teórico do efeito de lente térmica com dois fótons, Mauro Falconiere usou como base o trabalho de Sheldon e seus colaboradores [28]. A partir disso foi desenvolvido o modelo teórico do efeito termo-óptico com absorção multifotônica [30]. Dito modelo mostra o comportamento temporal da intensidade normalizada do feixe transmitido através da amostra ao atingir o detector, dado por:

$$\frac{I(V, t)}{I_0(V, t)} = 1 + \frac{\theta_q}{q} \frac{1}{(1 + V^2)^{q-1}} \tan^{-1} \left(\frac{2qV}{[(2q + 1) + V^2] \frac{t_c}{2qt} + 2q + 1 + V^2} \right). \quad (3.42)$$

Na equação (3.42), q é o número de fótons envolvidos no processo de absorção multifotônica, $V = Z/Z_0$, Z_0 é o comprimento Rayleigh e também é considerado o ponto focal do feixe de excitação como a origem do eixo z ($Z = 0$).

Além disso o termo θ_q , é chamado de amplitude do deslocamento de fase térmico para o processo de absorção de q fótons, dado por:

$$\theta_q = \phi \frac{q\alpha_q L P^q}{\lambda_q \kappa (\pi\omega^2)^{q-1}} \frac{dn}{dT}, \quad (3.43)$$

onde λ_q é o comprimento de onda de excitação do feixe, L é a espessura da amostra, P é a potência média incidente, e α_q é a fração da potência absorvida pela amostra, dada por:

$$\alpha_q = qN_A C \left(\frac{hc}{\lambda_q} \right)^{q-1} \sigma_q. \quad (3.44)$$

Na equação (3.44), N_A é o número de Avogadro, C é a concentração da amostra, c é a velocidade da luz na suspensão e σ_q é a seção transversal de choque de absorção de q -fótons.

Note que, na equação (3.43) para materiais não fluorescentes $\phi = 1$ e para materiais fluorescentes $\phi < 1$, estando relacionado com a eficiência quântica de fluorescência por

$$\phi = 1 - \eta \frac{\lambda_q}{q \langle \lambda_{em} \rangle_q}, \quad (3.45)$$

onde $\langle \lambda_{em} \rangle_q$ é o comprimento de onda médio de emissão, a fração $1/q$ é considerada devido a que são absorvidos q -fótons para emitir um fóton.

Devido a que nesta pesquisa é explorada a espectroscopia de lente térmica com absorção de dois fótons, pode-se re-escrever as equações (3.42 - 3.45) usando $q = 2$, assim:

$$\frac{I(V, t)}{I_0(V, t)} = 1 + \frac{\theta_2}{2} \frac{1}{(1 + V^2)} \tan^{-1} \left(\frac{4V}{[5 + V^2] \frac{t_c}{4t} + 5 + V^2} \right), \quad (3.46)$$

$$\theta_2 = \phi \frac{2\alpha_2 L P^2}{\lambda_2 \kappa (\pi \omega^2)} \frac{dn}{dT}, \quad (3.47)$$

$$\alpha_2 = 2N_A C \left(\frac{hc}{\lambda_2} \right) \sigma_2, \quad (3.48)$$

$$\phi = 1 - \eta \frac{\lambda_2}{2 \langle \lambda_{em} \rangle_2}. \quad (3.49)$$

Para obter a eficiência quântica usando a equação (3.49) é necessário obter o valor de ϕ na equação (3.47), mas ϕ depende da seção transversal de choque de absorção de dois fótons [ver equação (3.48)]. Mas obter o valor de σ_2 pode ser laborioso e precisa da aplicação de outras técnicas. Então para solucionar este problema é dada uma solução empírica com base no exposto por Sheldon, Shen e A Cruz nas suas pesquisas para espectroscopia de lente térmica com um fóton [28, 29, 31], a partir disso a equação (3.47) pode ser escrita assim,

$$\theta_2 = \phi \frac{2P_{abs}}{\lambda_2 \kappa} \frac{dn}{dT}, \quad (3.50)$$

sendo o termo P_{abs} a energia do laser absorvida por segundo pela amostra. Comparando a equação (3.50) com a equação (3.47) é obtida a seguinte expressão para a potência absorvida pela amostra

$$P_{abs} = \alpha_2 L \frac{P^2}{\lambda_2 \kappa} \phi \frac{dn}{dT}. \quad (3.51)$$

Assim, tendo-se a potência absorvida obtida experimentalmente, pode-se determinar a eficiência quântica de dois fótons.

Neste capítulo foram explicadas detalhadamente as técnicas mais usadas na avaliação da eficiência quântica de fluoróforos. Além disto é proposta uma nova forma de obter a eficiência

quântica de dois fótons, diferente a proposta na literatura [28], [29], [30]. Com a nova formulação apresentada neste capítulo não é necessário ter o valor da seção transversal de choque de absorção de dois fótons do soluto para obter a eficiência quântica de dois fótons. Também visando aprimorar a técnica de espectroscopia de lente térmica o seguinte capítulo será dedicado a expor um novo sistema de espectroscopia de lente térmica. Este novo método mostra uma melhora na relação sinal-ruído, fato que vai permitir o aumento na sensibilidade da técnica de espectroscopia de lente térmica.

4 NOVO SISTEMA DE ESPECTROSCOPIA DE LENTE TÉRMICA COM FILTRO ESPACIAL TIPO ECLIPSE

No capítulo 3, a espectroscopia de lente térmica foi apresentada. Esta é uma técnica atraente para a medição da eficiência quântica de materiais com baixa luminescência ($\eta < 80\%$), isto acontece porque é necessário que uma porcentagem da luz incidente seja transformada em calor para criar o efeito de lente térmica. Para materiais com alta eficiência quântica, uma pequena parte da energia absorvida é convertida em calor, limitando a detecção do sinal de ELT que pode ser encoberto pelo ruído elétrico. O uso da técnica de ELT também não é atraente para amostras com baixa concentração de fluoróforos ($< 10^{-4}M$) ou para o uso de baixa potência ($P < 8,0mW$).

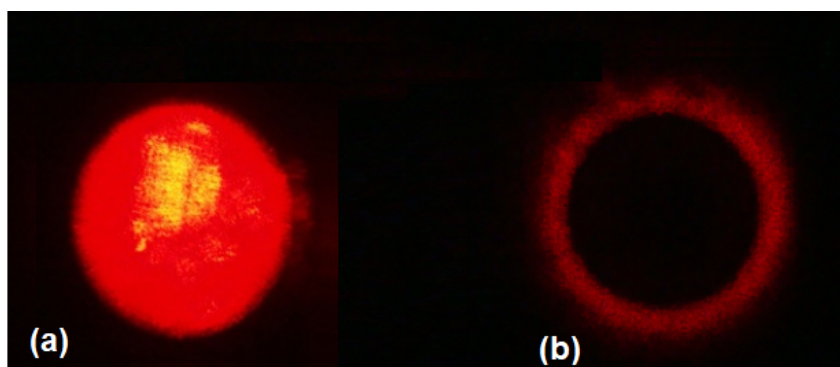
Neste capítulo 4 é demonstrado e explorado o uso de um filtro espacial tipo eclipse para otimizar a ELT, possibilitando um aumento na sensibilidade da técnica. Além disso são apresentados os resultados obtidos ao aplicar esta nova técnica (ELT por eclipse) na caracterização de pontos quânticos.

4.1 FILTRO ESPACIAL

Os filtros espaciais ou máscaras são “obstáculos” usados para permitir a passagem de certa região de um feixe de luz. Geralmente, filtros espaciais são usados para corrigir aberrações em um laser, aberrações que impedem que o feixe seja gaussiano [32].

Na otimização da sensibilidade da espectroscopia de lente térmica, aqui é proposto o uso de um filtro espacial que bloqueia a parte central do feixe permitindo a passagem de luz pelas bordas de um disco. A luz que vem das bordas é focalizada por uma lente no detector. A Figura 14 apresenta a imagem de um feixe gaussiano antes (a) e após (b) o uso do filtro espacial. Como a imagem obtida após o filtro é similar à de um eclipse solar, este tipo de máscara recebe o nome de filtro tipo eclipse.

Figura 14 – (a) Feixe gaussiano, (b) feixe depois de passar pelo filtro espacial tipo eclipse

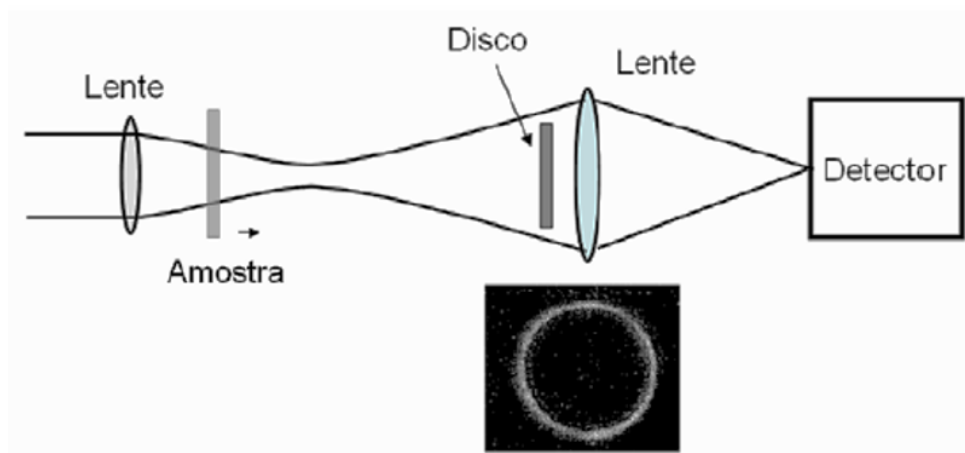


Fonte: O Autor (2020).

Ao serem coletadas as partes mais externas do feixe gaussiano, aumenta-se a detecção das variações de fase do feixe, comparado com a detecção da variação de fase quando é coletada a parte central do feixe gaussiano após o efeito da lente térmica. O aumento na sensibilidade com um filtro tipo eclipse foi estudado primeiramente por Slaby [33, 34]. Bloisi e seus colaboradores [35] observaram melhoras na razão sinal/ruído da difração do feixe após o eclipse, para as técnicas de espectroscopia de lente térmica e de modulação de fase transversa através de um filme não linear.

Esse tipo de filtro também foi introduzido na técnica de Varredura Z (*Z-Scan*), dando origem à técnica de Eclipse *Z-Scan* (ver Figura 15) [36, 37]. Nessa técnica o filtro espacial aumenta a sensibilidade nas medições do índice de refração não-linear. Foi obtida uma sensibilidade para a identificação de distorção da frente de onda de $\lambda/300$ para uma razão sinal/ruído = 1 [37].

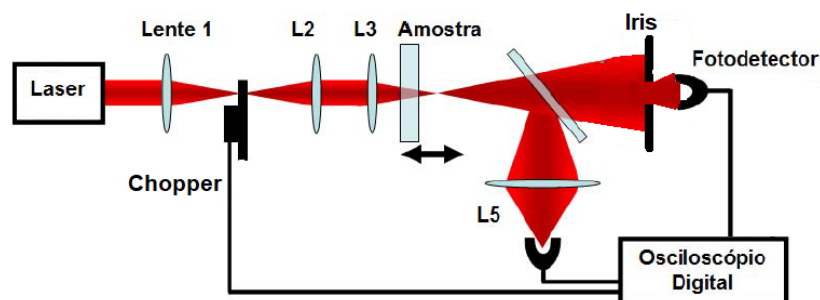
Figura 15 – Arranjo Experimental da técnica de varredura Z tipo eclipse



Fonte: Adaptada de [38].

A técnica de varredura *Z* explora um arranjo experimental equivalente ao da espectroscopia de lente térmica com e sem eclipse (ver Figuras 15 e 16).

Figura 16 – Arranjo Experimental da técnica de varredura Z

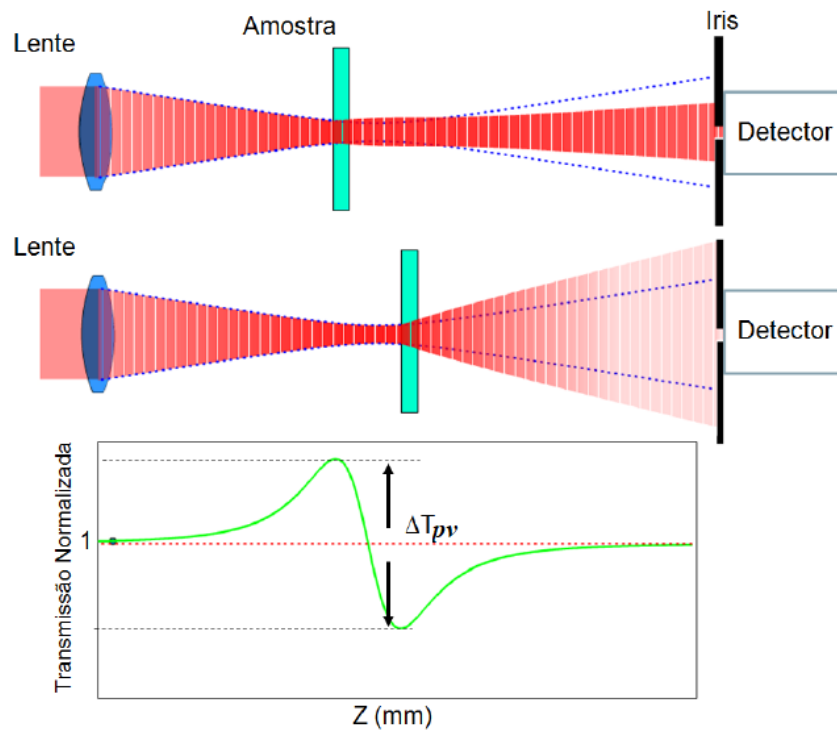


Fonte: Adaptada de [38].

Nesta técnica a amostra é deslocada ao longo do eixo focal da lente que focaliza o feixe na amostra (direção Z). A Figura 17 mostra parte do arranjo experimental e o sinal detectado no fotodetector que explora a transmissão do feixe através da amostra, o sinal detectado é a energia transmitida em função da posição da amostra.

Devido a intensidade da luz ser maior nas proximidades do foco onde a amostra está se deslocando. Essa alta intensidade aumenta a contribuição do termo não-linear da amostra, alterando a propagação, modificando a fase do feixe propagante. Essa modificação de fase está associada a uma alteração do perfil espacial do feixe, que é exibida na detecção, ver Figura 17.

Figura 17 – Técnica de varredura Z em uma amostra com $n_2 < 0$, mostrando a variação de transmissão pico vale



Fonte: Adaptada de [38].

A descrição matemática da propagação de um feixe gaussiano focalizado em um meio não-linear foi inicialmente proposta por Gordon, Chenming Hu e seus colaboradores [27, 25]. Além disto pode-se usar a expressão empírica de Xia e seus colaboradores para descrever a variação da luz transmitida pela amostra para o experimento de varredura Z com e sem filtro do tipo eclipse. Nessa teoria é analisada a variação de transmissão pico vale na varredura ΔT_{pv} . Para isso a técnica de varredura Z usa dois detectores D_1 e D_2 que coletam a intensidade da variação da transmissão do feixe após ele interagir com a amostra em função da posição Z da amostra [36], para todas as posições Z .

Essa análise é feita com o fim de obter uma noção do aumento da sensibilidade obtido ao usar o filtro tipo eclipse, nas medições de variação da luz transmitida pela amostra. As expressões

para o caso sem e com eclipse são [37, 38]:

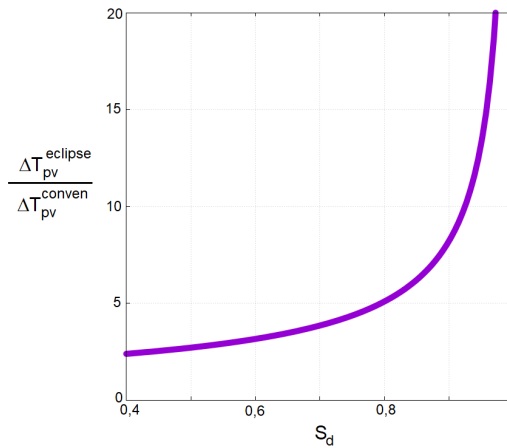
$$\Delta T_{pv} \approx 0,406 (1 - S)^{0,25} |\Delta\phi| \quad \text{detecção íris sem eclipse,} \quad (4.1)$$

$$\Delta T_{pv} \approx 0,68 (1 - S_d)^{-0,44} |\Delta\phi| \quad \text{detecção com eclipse,} \quad (4.2)$$

onde $|\Delta\phi|$ é a variação de fase do feixe, S é a transmitância do feixe dada por: $S = 1 - \exp(-2r_a^2/\omega_{ai}^2)$, sendo ω_{ai} a cintura do feixe na posição da íris, e r_a o raio de abertura da íris [36].

Na equação (4.2), S_d é a transmitância usando o eclipse, dada por: $S_d = 1 - \exp(-2r_d^2/\omega_{ad}^2)$, onde ω_{ad} é a cintura do feixe na posição do disco, e r_d é o raio do disco anteparo. Com isto, pode-se notar que quando $S_d \rightarrow 1$ (disco maior, $0,995 \leq S_d \leq 0,98$) a sensibilidade da técnica de varredura Z aumenta significativamente [37]. A Figura 18 exibe o comportamento das variações da transmissão do feixe $\Delta T_{pv}^{eclipse}/T_{pv}^{conv}$ com respeito à transmitância S_d , mudando o tamanho do disco.

Figura 18 – Aumento da sensibilidade na detecção da variação da transmissão do feixe usando a técnica de eclipse comparada com a técnica convencional em função do tamanho do disco

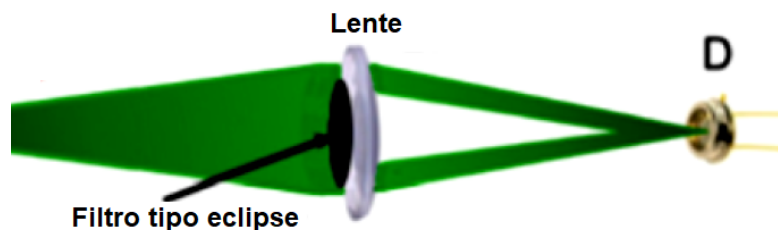


Fonte: O Autor (2020).

4.2 LENTE TÉRMICA POR ECLIPSE

Neste trabalho é concebido um novo método de espectroscopia de lente térmica, chamado espectroscopia de lente térmica por eclipse (ELT-Eclipse), aumentando a sensibilidade na obtenção do sinal de efeito térmico. Nesta nova técnica é adicionado o modo de detecção tipo eclipse, ou seja, é usada a máscara tipo eclipse, mencionada na seção anterior. Na técnica de ELT-Eclipse, a luz que ultrapassa o filtro espacial é coletada usando uma lente convergente, detectando assim a intensidade das laterais do feixe gaussiano, como é esquematizado na Figura 19.

Figura 19 – Esquema da detecção tipo eclipse



Fonte: O Autor (2020).

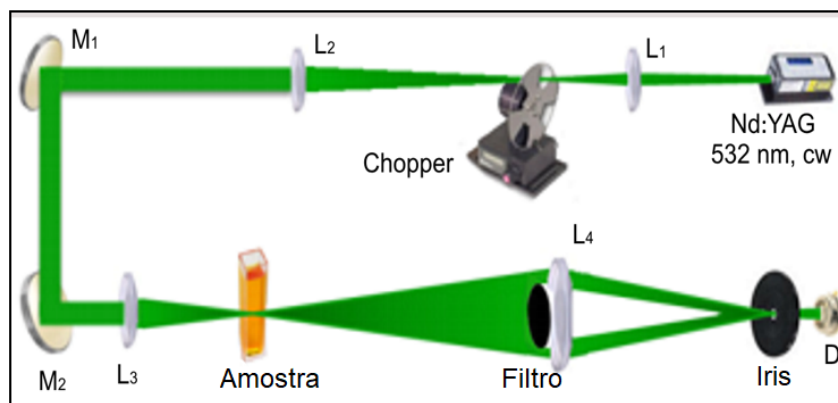
Ao analisar um feixe gaussiano, as variações em intensidade podem ser melhor identificadas nas bordas do feixe, comparadas com as variações de intensidade que podem ter o centro do feixe [34, 35, 36, 37]. Devido a isto, a sensibilidade da técnica de LT para identificar variações de intensidade será maior se a detecção tipo eclipse for explorada.

Para avaliar este novo sistema, foram feitas medições de eficiência quântica da fluorescência na Rodamina 6G, Rh6G, diluídas em etanol e foi registrada a razão sinal/ruído (S/R) das curvas de LT detectadas, como será mostrado nas próximas seções.

4.2.1 Lente térmica por eclipse com um feixe

Foi construído um sistema de lente térmica explorando um filtro espacial (modo eclipse de detecção). O arranjo experimental do sistema de lente térmica com um feixe é mostrado na Figura 20. Nele é indicado o uso de um laser cw Nd:YAG (Compass 215M-20; Coherent, Inc.) de 532 nm de comprimento de onda de emissão. As amostras fluorescentes usadas foram diluições de etanol com Rodamina 6G (Rh6G) com concentrações de 10^{-3} até 10^{-7} M. As amostras foram introduzidas em uma cubeta de quartzo com 1 mm de espessura (caminho óptico), d. A pureza da Rodamina 6G utilizada foi de 99% e a do etanol de 99,8%, sendo os dois da Sigma Aldrich Co. O espectro de absorção foi obtido em um espectrofotômetro UV-Vis modelo *Evolution 600BB* (Thermo Scientific Inc). O espectro de emissão foi obtido usando um espectrômetro modelo *HR400* da *Ocean Optics Inc*. No arranjo experimental da ELT uma lente esféricas com distancia focal $f = 10$ cm foi utilizada para focar o feixe de luz na amostra. A cintura do feixe foi $\omega \approx 15\mu m$. Também foi usado um chopper para controlar o tempo de exposição do laser sobre a amostra (duty cycle = 0.05, frequência de rotação: 200 Hz).

Figura 20 – Arranjo experimental do sistema de lente térmica de um feixe com eclipse



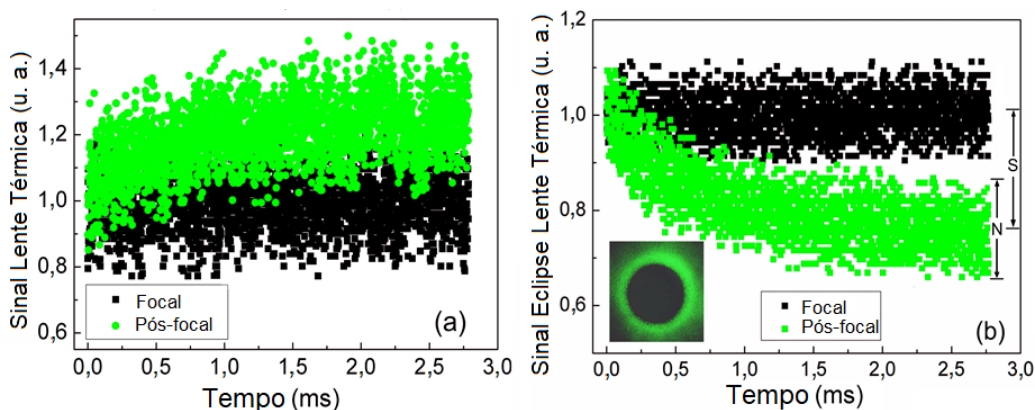
Fonte: O Autor (2020).

Para a detecção tipo eclipse, foi usado um disco de 2,0 cm de diâmetro, e uma lente convergente de aproximadamente 7,0 cm de diâmetro posicionada depois do filtro espacial. Essa lente coleta e direciona a luz ao fotodetector, permitindo a detecção da parte externa do feixe transmitido após sofrer o efeito de LT. O fotodetector usado foi um fotodiodo de silício modelo BPW21R com o pico da resposta espectral em 565 nm.

O sistema de LT e o uso do filtro espacial foram avaliados obtendo o valor da eficiência quântica para a Rodamina 6G e medindo a razão sinal/ruído (S/N) para a técnica de espectroscopia de lente térmica (com e sem filtro espacial).

A Figura 21 mostra o sinal da lente térmica, quando a amostra está nas posições focal e pós-focal, para a amostra com concentração de 10^{-6} M de Rh6G. Pode-se observar uma boa diferença entre os sinais obtidos nas duas técnicas [com eclipse - Figura 21(a); Sem eclipse Figura 21(b)]. Para fazer este estudo, o osciloscópio para a captura do sinal de lente térmica foi usado sem a opção de médias do sinal detectado.

Figura 21 – Sinal de LT para a Rh6G em uma solução de etanol com concentração de 10^{-6} , usando (a) Espectroscopia de lente térmica com um feixe e (b) Espectroscopia de lente térmica com um feixe no modo eclipse. Onde N e S indicam a amplitude do ruído e do sinal respectivamente



Fonte: O Autor (2020).

A curva mostrada na Figura 21 (b) está invertida em relação à figura da curva 21 (a) devido ao uso da lente convergente, L_4 , no sistema de LT-Eclipse. A potência óptica de excitação do laser quando atinge a amostra era de 8 mW. Pelas figuras 21(a) e 21(b) pode-se notar uma diferença e otimização da razão S/N quando é usado o novo método de espectroscopia de lente térmica com eclipse.

A razão S/N foi avaliada no regime estacionário para $t = 2,5$ ms. A razão S/R foi medida para várias posições da máscara (diferentes valores das razões dos diâmetros do feixe/filtro), como é apresentando na tabela 2. Aqui é mostrada uma melhora de aproximadamente 300% da nova técnica sobre a técnica usual.

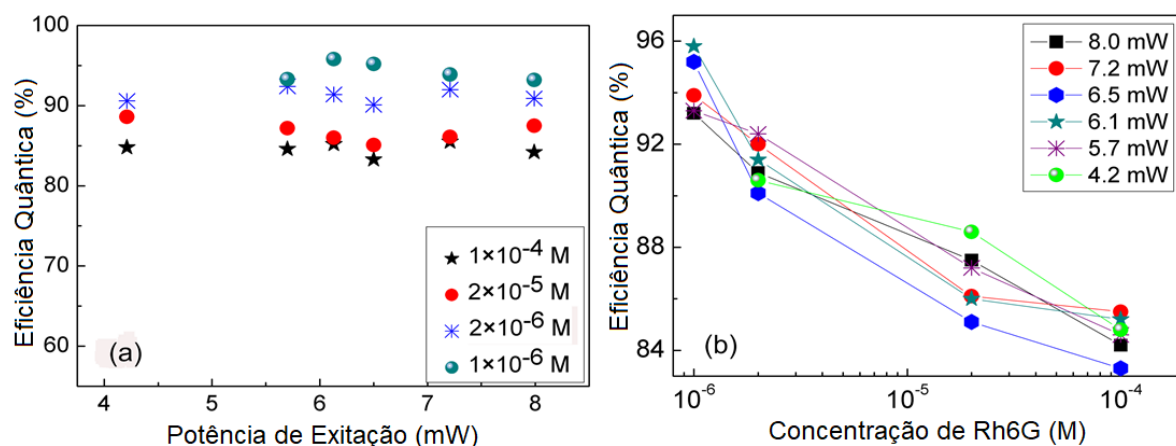
Tabela 2 – Razões sinal/ruído para três diferentes razões dos diâmetros do feixe/filtro. Para a amostra de Rh6G com concentração de 10^{-6} M

Feixe/filtro (Razão dos diâmetros)	sinal/ruído (ELT-Eclipse)	sinal/ruído (ELT-com um feixe)	sinal/ruído (ELT- Eclipse/LT)
1,5	1,38		2,32
1,54	1,74	0,59	2,93
1,56	1,47		2,48

Fonte: O Autor (2020).

Além do estudo da razão sinal/ruído, foi avaliada a dependência da eficiência quântica em função da potência do laser de excitação para as técnicas de lente térmica com e sem eclipse. Observou-se que os resultados da medição de η foram iguais para as duas técnicas. Como o novo sistema apresenta maior sensibilidade, serão mostrados aqui apenas os resultados obtidos usando a nova técnica ELT-Eclipse, ver Figura 22.

Figura 22 – Valores da eficiência quântica de fluorescência da Rh6G obtidos usando a técnica ELT-Eclipse, em função de (a) a potência de excitação e (b) a concentração molar



Fonte: O Autor (2020).

Analisando os dados apresentados na Figura 22(a), pode-se notar que não há mudanças significantes na eficiência quântica com respeito a intensidade do laser de excitação. Para este estudo foram usadas potências de 4,2 mW até 8,0 mW, não foi possível usar potências menores a 4,2 mW porque o sinal de LT não era detectável. Além disso a dependência da eficiência η com respeito à concentração do fluoróforo, pode ser observada na Figura 22 (b).

Na Tabela 3 são exibidos os valores médios da eficiência quântica ($\langle\eta\rangle$) obtidos para potências entre 4,2 mW e 8,0 mW. Também na Tabela 3 são comparados estes valores com os valores já existentes na literatura que usaram diferentes técnicas de avaliação da eficiência quântica.

Tabela 3 – Valor médio da eficiência quântica para diferentes concentrações de Rh6G.

Concentração de Rh6G (M)	$\langle\eta\rangle$ (%)	
	ETL-Eclipse (%)	Outros autores (método, solvente)
1×10^{-4}	84	77 (LT, metanol) [39], 89,5 (esfera integradora, etanol) [40]
2×10^{-5}	87	87,5 (esfera integradora, etanol) [41]
2×10^{-6}	91	88 (etanol, esfera integradora) [40]
1×10^{-6}	93	91 (esfera integradora, etanol) [41]

Fonte: O Autor (2020).

Analisando esta tabela pode-se notar também que a eficiência quântica diminui com o aumento da concentração do fluoróforo. Pela Tabela 3 e Figura 22, nota-se uma queda de aproximadamente 10% no valor obtido para eficiência quântica da Rh6G, quando sua concentração aumenta de 10^{-6} M ($\eta \approx 94\%$) para 10^{-4} M ($\eta \approx 84\%$). É possível associar esta diminuição na eficiência quântica à reabsorção da luz emitida pelos monômeros fluorescentes tipo-J, e pelos dímeros não fluorescentes tipo-H [42, 43, 44]. Além disso, considerando a constante de dimerização para a Rh6G em etanol ($K_d = 0,22$) [43], pode-se estimar que a concentração de dímeros na amostra de maior concentração (1×10^{-4} M) foi de $Cd = 2,2 \times 10^{-9}$ M. Assim, conclui-se que a queda na eficiência quântica pode ser principalmente atribuída aos processos de reabsorção dos monômeros, os quais são uma consequência da superposição dos espectros de absorção e emissão da Rh6G, como foi discutido nas referências [45, 46].

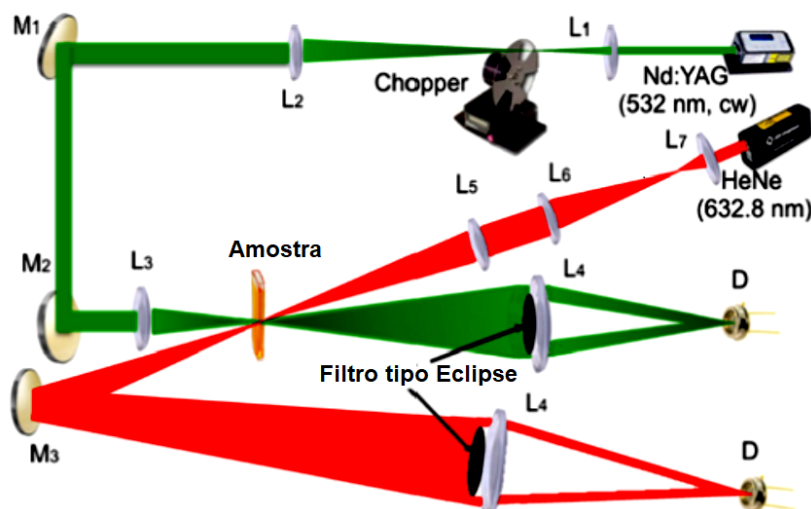
4.2.2 Lente térmica por eclipse com dois feixes

Como mencionado no capítulo 3, o uso de dois feixes laser na técnica de espectroscopia de lente térmica possibilita maior sensibilidade quando comparado com o sistema de ELT com um feixe. Nessa seção é avaliado o uso de um filtro espacial tipo eclipse no sistema de lente térmica de dois feixes.

O arranjo experimental desta técnica é apresentado na Figura 23. Para esta técnica, além da montagem do sistema de lente térmica com um feixe, onde é usado um laser cw de 532 nm

como feixe de bombeio, é utilizado um laser cw de HeNe com comprimento de onda 632,8 nm, que passa pelo telescópio formado pelas lentes L_7 , de comprimento focal $f_7 = 3,5$ cm e por L_6 com foco $f_6 = 10,0$ cm. O laser de HeNe (feixe sonda) é focalizado na amostra pela lente L_5 com comprimento focal $f_5 = 10,0$ cm para examinar o efeito de lente térmica criado pelo laser de 532 nm.

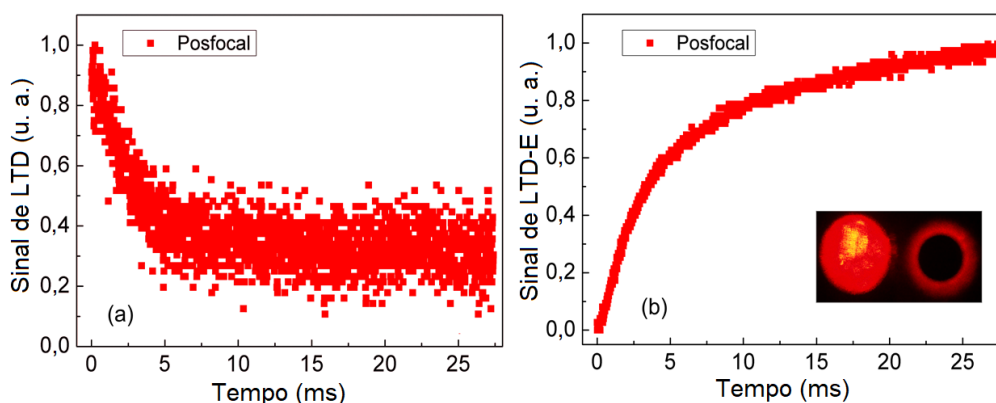
Figura 23 – Arranjo experimental da técnica de espectroscopia de lente térmica com dois feixes tipo eclipse (ELTD-Eclipse)



Fonte: O Autor (2020).

Os sinais normalizados da posição pós-focal usando a técnica usual de espectroscopia de lente térmica com dois feixes, e lente térmica eclipse com dois feixes (LTD-E) são mostrados nas Figuras 24 (a) e 24 (b), respectivamente, também é bom esclarecer que os sinais mostrados foram adquiridos sem usar médias no osciloscópio.

Figura 24 – Sinal normalizado da LT do laser de sonda de HeNe (632 nm) que passa por uma amostra com concentração de 2×10^{-5} M de Rh6G em etanol sendo excitada por um laser cw Nd:YAG (532 nm) com 9 mW de potência. Sinal obtida usando (a) a técnica de lente térmica com dois feixes (LTD) e (b) a técnica de lente térmica com dois feixes por eclipse (LTD-E). A imagem inserida em (b) é uma imagem do feixe de sonda antes e depois do filtro especial de frente de onda



Fonte: O Autor (2020).

Observando a Figura 24(a) e (b) pode-se notar um grande aumento no sinal de lente térmica quando é usada a técnica de eclipse. Calculando a razão sinal ruído S/R para os dois sistemas e comparando-os, é obtido que a razão S/R aumenta 14 vezes quando é usada a técnica eclipse e uma potência de excitação de 9,0 mW.

Aqui foi realizado um estudo da razão sinal ruído mudando a potência de excitação e o diâmetro do filtro espacial para a Rodamina Rh6G com concentração de 2×10^{-5} M. Na tabela 4 são apresentados estes resultados, para a melhor relação entre o diâmetro do feixe e o diâmetro do filtro. Também pode-se notar que a razão S/R diminui de 14,1 a 11,9 quando a potência do laser de bombeio aumenta de 9,0 mW ($7,2 \text{ W/cm}^2$) a 11 mW ($8,8 \text{ W/cm}^2$).

Tabela 4 – Razão S/R entre a técnica de lente térmica com dois feixes tipo eclipse (LTD-E) e a técnica convencional de lente térmica com dois feixes, para a amostra de Rh6G com concentração de 2×10^{-5} M.

Feixe/filtro (Razão entre os diâmetros)	Potência de Excitação (mW)	S/R		
		LTD-E	LTD	LTD-E/LTD
1,54	11,1	23,5	2	11,9
	9	27,3	1,9	14,1
	7,1	16,3	1,7	9,8
	6	15	1,5	10,2
	4,2	6	1,9	3,2
	3,4	5,4	1,6	3,4
	2,7	4,1	1,1	3,8

Fonte: O Autor (2020).

Também foi avaliada a dependência da eficiência quântica da Rodamina Rh6G com a concentração usando esta nova técnica. Foi obtido o valor médio da eficiência quântica η para diferentes concentrações do corante. Esse resultado é apresentado na Tabela 5. Pode-se notar que os valores de η diminuem com o aumento da concentração. Além disto, são comparados os resultados obtidos neste trabalho, com os resultados reportados na literatura por outros pesquisadores.

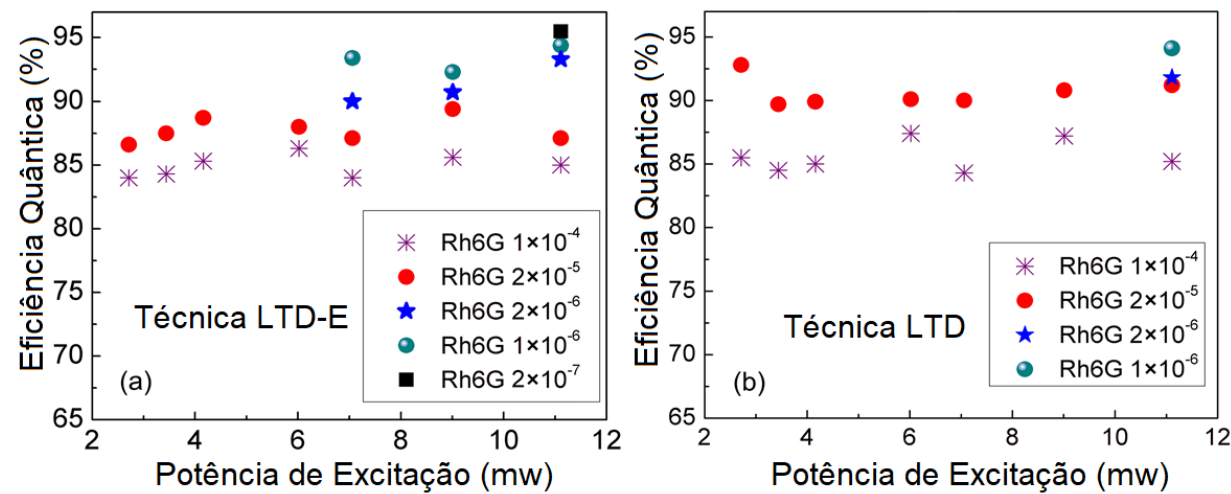
Tabela 5 – Valor médio dos valores da eficiência quântica para diferentes concentrações de rodamina Rh6G obtida pelo método de LTD-E comparado com os valores reportados na literatura.

Concentração Rh6G (M)	< η > (%)	
	LTD-E	Outros autores (método, solvente)
1×10^{-4}	84	77 (LT, metanol) [39], 89,5 (esfera integradora, etanol) [40]
2×10^{-5}	87	87,5 (esfera integradora, etanol) [41]
2×10^{-6}	91	88 (esfera integradora, etanol) [40]
1×10^{-6}	93	91 (esfera integradora, etanol) [41]
2×10^{-7}	96	93 (fluorescência, etanol) [47], 95 (fluorescência, etanol) [45]

Fonte: O Autor (2020).

Nas Figuras 25(a) e 25(b) são mostrados os valores de η para a Rodamina em função da potência do feixe de bombeio, obtidos com e sem filtro espacial, respectivamente.

Figura 25 – Eficiência quântica da diluição de rodamina Rh6G em etanol em função da potência de bombeio. Usando as técnicas (a) com e (b) sem o filtro espacial tipo eclipse na espectroscopia de lente térmica com dois feixes



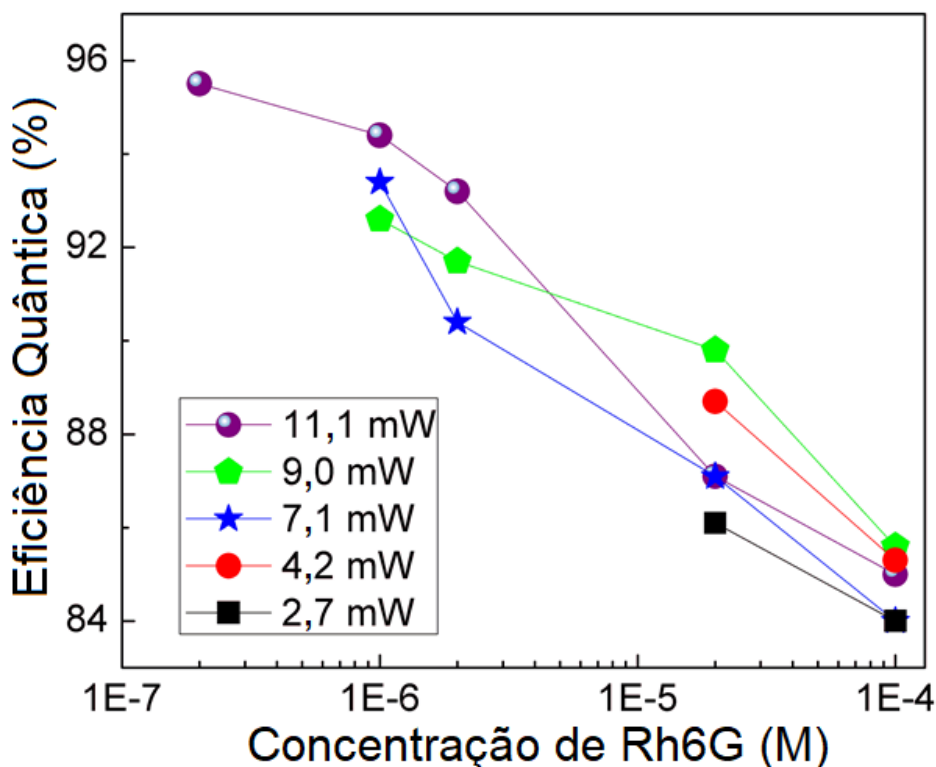
Fonte: O Autor (2020).

É importante notar que a presença do filtro espacial possibilita mensurar a eficiência quântica η de amostras com baixa concentração de fluoróforos, tais como a amostra de 2×10^{-7} M. Quando não é usado o eclipse, não é possível medir η para concentrações menores que 10^{-6} M. Além disto a comparação entre os valores de η , para concentrações próximas a 10^{-5} M, nas Figura 25 (a) e Figura 25 (b), mostra a grande sensibilidade da nova técnica de eclipse lente térmica com dois feixes, comparada com a técnica usual de dois feixes, permitindo mensurar a eficiência quântica de amostras com concentrações menores que 1×10^{-6} M. Além disso, a técnica de dois feixes permite usar um laser de excitação com menor potência (2,7 mW). Isso quando comparado com a potência usada nas técnicas de LT com um feixe e lente térmica com

um feixe tipo eclipse, que foi de 4,2 mW.

Além disto, foi analisado o comportamento da eficiência quântica em função da concentração da diluição de Rh6G. A Figura 26 apresenta uma queda da eficiência quântica com o aumento da concentração do fluoróforo, confirmando o fato obtido na técnica de eclipse lente térmica com um feixe, da figura 22 (b).

Figura 26 – Eficiência quântica das suspensões de Rh6G em etanol em função da concentração molar para diferentes potências de bombeio, usando a técnica de eclipse lente térmica com dois feixes



Fonte: O Autor (2020).

Nesta pesquisa, a intensidade máxima do laser de excitação usado foi de $11 \times 10^6 \text{ W/m}^2$, próxima ao valor de ($\approx 10^6 \text{ W/m}^2$) de saturação óptica da maioria dos laser de corantes [48, 49, 50]. Com essa intensidade pode ser garantido que o efeito detectado é térmico. Com isso é possível dizer que não há presença da saturação óptica, essa saturação produz uma dependência não linear do sinal de lente térmica com a potência de bombeio, limitando a sensibilidade dos efeitos fototérmicos. Assim para garantir isto é necessário que toda a energia térmica use os canais de relaxação não radiativos para o solvente.

A presença de ruído no sinal de lente térmica pode vir de várias fontes tais como: (1) o ruído da eletrônica de detecção, (2) o ruído devido as flutuações de intensidade do feixe e (3) o ruído originado dos movimentos convectivos. Se o ruído eletrônico for grande, o limite de detecção do sinal de lente térmica vai ser reduzido, e os erros experimentais podem chegar a ser consideráveis. Por isto, é mostrado na Tabela 4 que a razão S/R nas medições da eficiência

quântica absoluta da Rodamina Rh6G pode ser melhorada em aproximadamente 1400%, quando é usado o novo método de detecção tipo eclipse.

Concluindo, a nova técnica de obtenção do sinal de lente térmica mostra uma maior sensibilidade comparada com as técnicas atuais da literatura. O uso de filtros espaciais leva a uma melhor sensibilidade na detecção, e a possibilidade de caracterizar amostras fluorescentes com concentrações baixas. Além de permitir usar lasers de baixa potência.

5 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA QUÂNTICA DE PONTOS QUÂNTICOS

Os pontos quânticos ou *quantum dots* (QDs) fluorescentes de semicondutores, na atualidade, vem sendo usados nas ciências biológicas, permitindo desde a identificação de estruturas biológicas (células e tecidos) até o entendimento de processos dinâmicos em células. Nesse contexto, pode-se mencionar o uso de QDs em aplicações como: (1) geração de imagens de microscopia de células vivas, tecidos e pequenos animais; (2) testes de fluoroimunoensaios por citometria de fluxo; e (3) biosensores ópticos. Essas aplicações são exemplos que mostram como estes marcadores fluorescentes são importantes para compreender mecanismos biológicos [7, 10, 13, 2, 14].

Para a aplicação destas partículas em células vivas e tecidos, faz-se necessário o controle/ajuste do pH da solução coloidal de QDs. Essa mudança pode levar a perda da eficiência de fluorescência dessas nanopartículas.

Assim, este capítulo apresenta uma avaliação das características de emissão de QDs de CdTe sintetizados em meio aquoso, em função de diferentes pHs, usando a técnica desenvolvida de espectroscopia de lente térmica de feixe único por eclipse.

5.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Os pontos quânticos de CdTe foram sintetizados pelo grupo de pesquisa liderado pelas professoras Adriana Fontes e Beate dos Santos do departamento de Biofísica e Radiobiologia e do departamento de Farmácia da UFPE, com adaptações do método desenvolvido por Andrade e seus colaboradores [51]. As nanoestruturas foram produzidas adicionando telúrio reduzido Te^{2-} em uma solução contendo $Cd(ClO_4)_2$ (Perclorato de Cádmio) com pH alcalino maior que 10 e na presença do estabilizante Ácido Mercaptosuccinico (AMS), com proporção molar de 5:1:6,2 Cd:Te:AMS. Todos os reagentes utilizados foram da Sigma Aldrich. A solução aquosa de Te^{2-} foi preparada a partir do telúrio metálico (Te^0), e com pH alto, utilizando 100 μL de NaOH 2M e sob atmosfera inerte de nitrogênio. A reação procedeu por 5 horas em atmosfera inerte, em constante agitação e aquecido a 80° C . Após essa etapa, a suspensão foi diluída 1:6 (QD:Água-v:v), com pH final 10,3 e absorbância menor que 0,1 no comprimento de onda de 532 nm. A preparação da solução de QDs não faz parte das atividades desta tese.

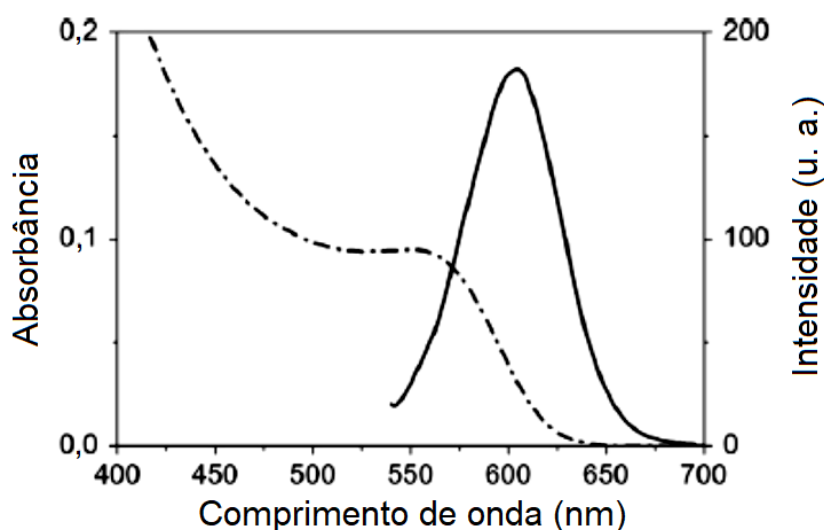
O ajuste dos pHs foi realizado de duas formas: (1) com uma solução aquosa de agente estabilizante AMS a 4,9% (m/v), obtendo amostras com pHs: 9,8; 9,1; 8,4; 7,3; 6,2 e 5,3; e (2) com HCl a 1M, e obtendo QDs com pHs: 9,1; 8,4 e 8,0. Todas as amostras tiveram a mesma concentração de QDs ($8,45 \times 10^{-7}$ M), e partículas com diâmetro de 3,1 nm.

5.2 DEPENDÊNCIA DA EFICIÊNCIA QUÂNTICA COM O pH

Para analisar a dependência da eficiência quântica com o pH dos coloides de QDs estudados foi usada técnica de eclipse lente térmica com um feixe no modo eclipse.

A Figura 27 mostra os espectros de absorção da suspensão de QDs de CdTe para o pH original de 10,3. A figura apresenta um pico de absorção próximo dos 552 nm e de emissão próximo dos 610 nm, indicando um diâmetro médio de aproximadamente 3nm para as nanopartículas [52, 53]. Além disso usando a equação de Lambert Beer e o coeficiente de extinção proposto por Yu e seus colaboradores [54] foi estimada a concentração dos QDs em $4,8 \mu\text{mol/L}$, para a suspensão original. Finalmente, para obter uma concentração de $0,8 \mu\text{mol/L}$, foi feita uma diluição da suspensão original em água 1:6 (v/v), sendo essa a concentração usada para esta pesquisa.

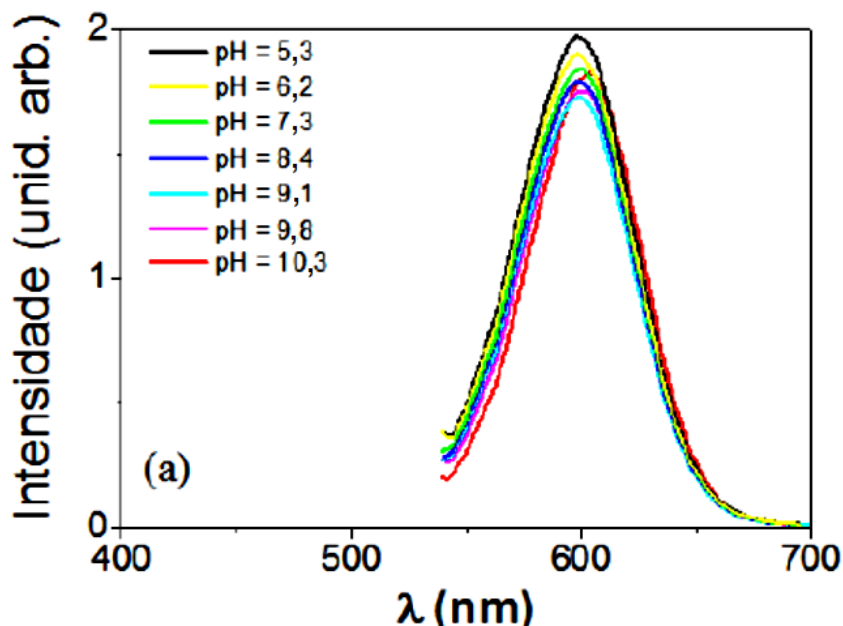
Figura 27 – Espectro de absorção (linha tracejada) e emissão (linha completa) da suspensão de QDs de CdTe, $\lambda_{\text{excitação}} = 532,0 \text{ nm}$



Fonte: O Autor (2020).

A mudança de pH da suspensão de QDs produz uma variação da emissão das nanoestruturas, levando a alterações na intensidade da radiação eletromagnética emitida, porém não modifica o perfil espectral da fluorescência. Este fato pode ser observado na Figura 28 que mostra a variação da emissão usando AMS para mudar o pH das amostras.

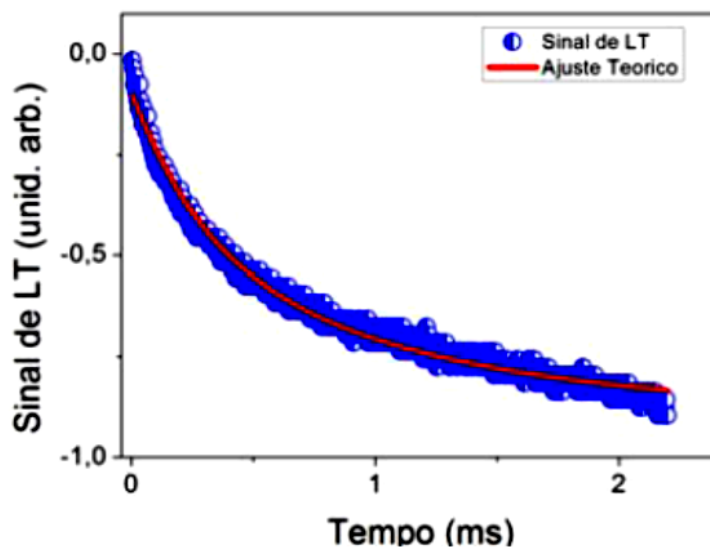
Figura 28 – Espectro de emissão de QDs de CdTe para os diferentes pHs, ajustados com AMS, $\lambda_{\text{excitação}} = 532,0$ nm



Fonte: O Autor (2020).

A Figura 28 exibe as mudanças no espectro de emissão dos coloides com diferentes pHs. Essas mudanças indicam que a eficiência quântica deve mudar com respeito às variações de pH das amostras. Isso foi verificado com a medição da eficiência quântica das soluções, explorando a técnica de lente térmica por eclipse. A Figura 29 apresenta o sinal de lente térmica da amostra com pH de 10,3 junto com seu respectivo ajuste teórico.

Figura 29 – Sinal de LT (curva azul) e ajuste teórico (linha vermelha) para QDs de CdTe de pH = 10,3

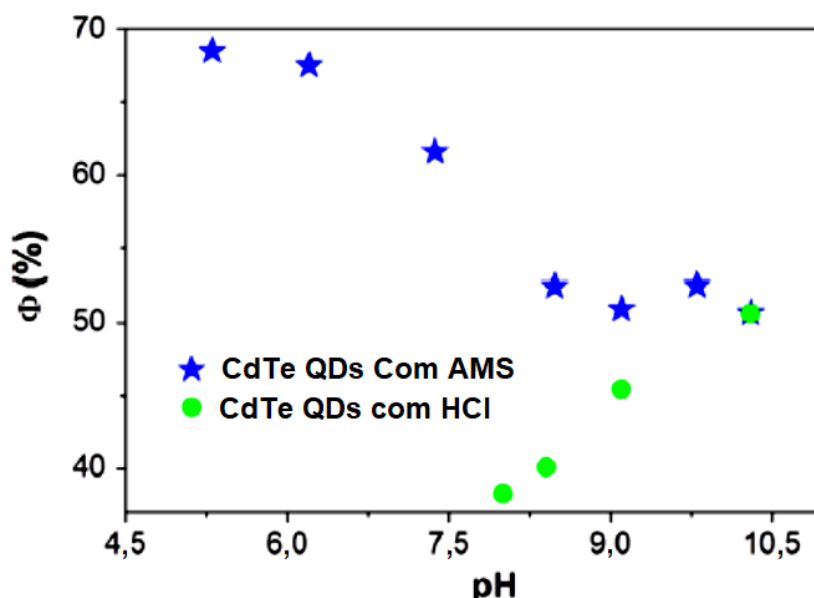


Fonte: O Autor (2020).

Pela técnica de Lente Térmica por Eclipse, foram obtidos os valores de eficiência quântica

para cada amostra (diferentes valores de pH e diferentes ácidos). Esses valores são registrados na Figura 30 e na Tabela 6.

Figura 30 – Eficiência quântica de fluorescência dos QDs para o pH ajustado usando AMS (estrelas) e HCl (pontos)



Fonte: O Autor (2020).

Tabela 6 – Eficiência quântica de fluorescência dos QDs de CdTe em solução com diferentes pHs, ajustados com o AMS e HCl. $\lambda_{\text{excitação}} = 532 \text{ nm}$.

pH	5,3	6,2	7,3	7,9	8,4	9,1	9,8	10,3
$\langle \eta \rangle (\%) \text{AMS}$	68,49	67,5	61,58	–	52,44	50,93	52,5	50,65
$\langle \eta \rangle (\%) \text{HCl}$	–	–	–	38,26	40,1	45,45	–	50,65

Fonte: O Autor (2020).

Na figura 30, é possível notar que as suspensões com o pH modificado pela adição de AMS têm sua eficiência quântica η com valores maiores que 50%. Também é possível perceber, que a redução do pH com AMS é acompanhada do aumento do valor da eficiência quântica.

Com a modificação do pH das suspensões por adição do HCl, verificou-se que a eficiência quântica decresce com a diminuição do pH, resultado similar ao obtido por Pilla e colaboradores [31]. Com o uso de HCl, não foi possível determinar os valores da eficiência quântica em suspensões com pHs menores que 8,0 devido à instabilidade das amostras, que apresentaram separação de fase em menos de um dia após a síntese das mesmas. O comportamento da queda da eficiência quântica, observado na figura 30 com o uso de HCl, é atribuído ao fato do ácido provavelmente remover ou degradar a camada de passivação dos QDs, e consequentemente expor defeitos de superfície e diminuir a eficiência da recombinação excitônica elétron-buraco. No caso do uso do AMS, acredita-se que a camada de passivação é aprimorada, pois o AMS participa ativamente da formação desta camada, por meio da associação dos grupos tióis junto à superfície dos nanocristais, minimizando defeitos relacionados à vacância de Te.

Pode-se concluir que para aplicações biológicas, onde é necessário o uso de pH neutro (próximo ao fisiológico) em torno de 7,0, deve ser utilizado o AMS para o ajuste de pH das suspensões de QDs. Pois, além das amostras se manterem estáveis sem precipitação, apresentam uma maior eficiência quântica, até mesmo quando comparadas com as amostras tendo o pH original de síntese (10,3).

5.3 EFICIÊNCIA QUÂNTICA PARA ABSORÇÃO DE DOIS FÓTONS

A avaliação da eficiência quântica dos QDs na absorção de dois fótons, mediante o método de espectroscopia de lente térmica com eclipse, precisa para criar o efeito de absorção de dois fótons, um laser pulsado focalizado na amostra fluorescente. Nesta pesquisa foi usado um laser de femtossegundos de Ti: Safira (120 fs, 80 MHz), com comprimentos de onda sintonizáveis de 680 até 1080 nm. Uma lente de 10 cm de distância focal foi usada para focalizar o feixe do laser na amostra. A intensidade da luz na amostra foi de aproximadamente $15,5 \text{ kW/cm}^2$. Um *chopper* mecânico, em 110 Hz e *duty cycle* de 0,05 também foi usado para modular o feixe laser. E a amostra de pontos quânticos foi confinada em uma cubeta com 1 mm de caminho óptico. A luz transmitida foi coletada por um fotodiodo conectado a um osciloscópio digital [55].

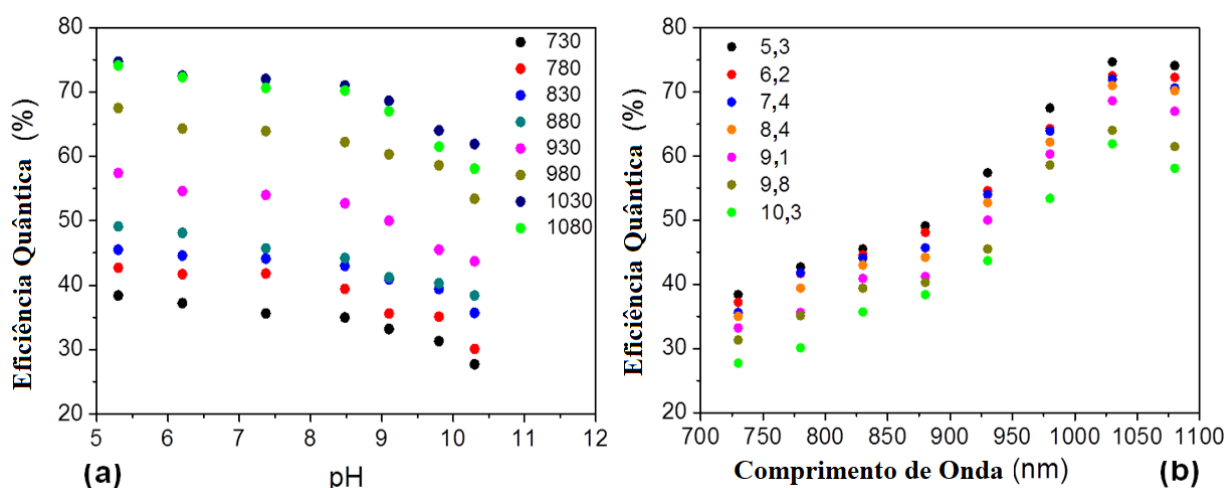
Para analisar a dependência da eficiência quântica com respeito à excitação não linear, a excitação com dois fótons foi feita para os seguintes comprimentos de onda: 730, 780, 830, 880, 930, 980, 1030 e 1080 nm.

As figuras 31 (a) e (b) apresentam a dependência de η em função do pH para vários comprimentos de onda de excitação em duas formas complementares. O valor da eficiência quântica dos QDs de CdTe, excitados com dois fótons, aumenta quando o pH da suspensão foi reduzido de 10,3 (o pH original de síntese) para 5,3. Além disso é bom comentar que todos os valores da Figura 31 têm desvio padrão menor que 4%. Observando a Figura 31 (b), o máximo valor de η para os QDs de CdTe acontece no $pH = 5,3$ e a eficiência quântica de dois fótons aumenta em 25% quando diminui o pH da suspensão. Esse fato é devido à otimização da camada de passivação promovida pelo agente funcionalizante/estabilizante (AMS), como aconteceu previamente na experiência de excitação com um fóton [56]. Esta melhoria pode ser explicada pelo seguinte fator: a camada de passivação dos QDs aumenta quando a suspensão de QDs de CdTe começa a ser ácida. Em consequência, os locais de armadilha na superfície do CdTe são reduzidos e a eficiência quântica da fluorescência melhora [57]. Por esse motivo, o pH da suspensão influencia na propriedade de emissão dos QDs para excitação por um ou dois fótons. Dependendo da síntese empregada e da natureza do agente estabilizador, o ajuste do pH é uma questão importante para ser considerada [58, 59, 60].

A Figura 31 (a) mostra que a eficiência quântica de dois fótons decresce quando o comprimento de onda de excitação é mudando de 1080 até 730 nm. Como a Energia de Gap (E_g) dos QDs de CdTe é de 2,2 eV, o uso de luz infravermelha (730 - 1080 nm) pode levar

a transições envolvendo estados de energia a partir dos níveis $1S_e - 1S_h$ (baixa energia) até os níveis $1P_e - 1P_h$ [61]. O menor valor para η acontece quando as amostras são excitada com o comprimento de onda de 730 nm [ver Figura 31 (a)]. A energia de dois fótons que corresponde a este comprimento de onda é maior comparada com as transições de menor energia. Consequentemente, a alta energia da absorção de dois fótons leva a uma diminuição no tempo de relaxamento de portadores de carga. Portanto, a taxa de recombinação radiativa elétron-buraco diminui, reduzindo o valor de η para os QDs. Deste modo, para atingir um maior valor de eficiência quântica linear ou não-linear, devem ser aplicadas excitações com comprimentos de onda maiores.

Figura 31 – Dependência da η de dois fotons em função (a) do pH e (b) do comprimento de onda de excitação (concentração de QDs fixada em $0,8 \mu M$)



Fonte: O Autor (2020).

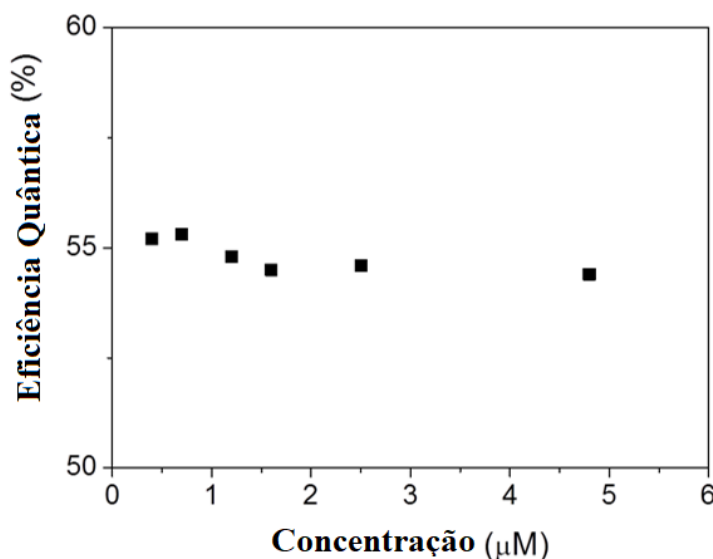
O resultado, da dependência da eficiência quântica de dois fótons dos QDs de CdTe com respeito ao comprimento de onda de excitação segue um comportamento similar ao descrito por Hoy e seus colaboradores, que pesquisaram a excitação de um fóton dos QDs de CdSe na região visível do espectro [62]. Eles mostraram que a absorção da energia de fótons acima de E_g poderia levar o elétron a acessar estados de armadilhas não emissivas, levando à recombinação não radiativa dos elétron-buraco e diminuindo a eficiência quântica da fluorescência [62]. Nesse contexto, quando os estados excitados acima de E_g são acessados, a redução da eficiência quântica linear pode ser consequência de (1) a existência, além do limiar determinado de energia, de um estado não radiativo quase contínuo mais alto que compete e aumenta o tempo de relaxação dos portadores de carga para os estados de menor energia e, subsequentemente, levando a uma recombinação não radiativa elétron-buraco, e/ou (2) a transferência dos portadores de carga transmitidos para os agentes estabilizantes dos QDs.

A eficiência quântica denota uma propriedade intrínseca da nanopartícula luminescente, independente da concentração de pontos quânticos da suspensão que esta sendo caracterizada. Não obstante, para altas concentrações, podem existir processos, como efeitos de reabsorção

e densidade óptica, que podem acabar reduzindo a emissão da suspensão de pontos quânticos, conduzindo a um erro na determinação dos valores da eficiência quântica dos QDs.

A Figura 32 exibe a eficiência quântica de dois fótons em função da concentração, quando as amostras são excitadas no comprimento de onda de 980 nm, mantendo o pH = 10,3 constante. Essa figura não mostra mudanças significantes nos valores da eficiência quântica, ao mudar a concentração de QDs de 0,4 até 4,8 μM . Esse resultado é diferente do obtido com o processo de excitação com um fóton, devido a que os processos de absorção multifotônica estão restritos a um volume pequeno, assim a influência dos processos de reabsorção podem ser desprezíveis na determinação da eficiência quântica dos pontos quânticos.

Figura 32 – Eficiência quântica de dois fótons para diferentes concentrações de QDs, para o pH de suspensão fixo em 10,3 e o comprimento de onda de excitação de 980 nm



Fonte: O Autor (2020).

No entanto, devido ao equilíbrio dos ligantes de adsorção/dessorção e passivação, a diluição também pode influenciar nos valores da eficiência quântica. Com a diluição, se a camada de passivação é lábil, a dessorção de ligantes da superfície dos QDs pode induzir uma cobertura superficial incompleta, levando ao surgimento de mais armadilhas superficiais, as quais extinguiriam a recombinação radiativa do elétron-buraco [63]. Mas para o caso apresentado nesta tese, a diluição não muda os valores da eficiência quântica de dois fótons. Isto mostra que os pontos quânticos usados são bem passivados. Assim, a avaliação da eficiência quântica em função da concentração de QDs também pode prover informação sobre os processo de passivação e ajudar a otimizar a quantidade de agentes estabilizantes aplicados à síntese do nanocristal.

6 DISPOSITIVO DE ESPECTROSCOPIA DE LENTE TÉRMICA

Avaliar a eficiência quântica dos fluoróforos orgânicos e QDs fluorescentes, vem sendo de grande importância devido a ampla aplicabilidade que estes materiais tem em diferentes áreas da ciência e da tecnologia. No entanto, as técnicas de medição da eficiência quântica vêm sendo exploradas somente em laboratórios especializados, por pessoal altamente qualificado em óptica, limitando a avaliação de novos fluoróforos.

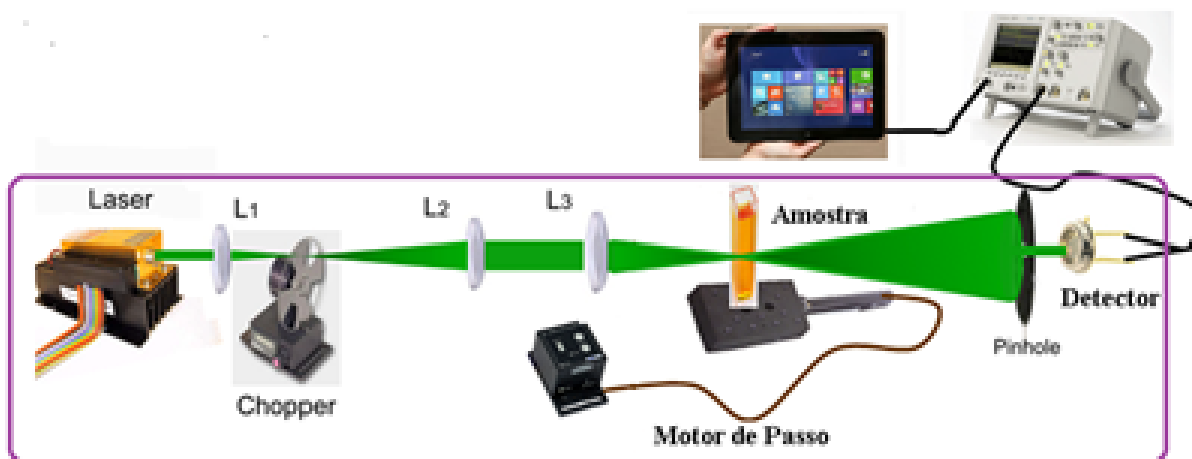
Neste capítulo é apresentado um projeto (em andamento) de um espectrômetro de lente térmica que pode ser manipulado por profissionais que não precisam ter um amplo conhecimento de engenharia, física e óptica.

Com a experiência adquirida com o desenvolvimento das técnicas de lente térmica no laboratório, foi construído o projeto de um espectrômetro de lente térmica portátil e de fácil uso.

6.1 ESPECTRÔMETRO DE LENTE TÉRMICA

O dispositivo para espectroscopia de lente térmica projetado nesta pesquisa é baseado no sistema de lente térmica com um feixe, como descrito no capítulo 3. A Figura 33, serve para esquematizar e apresentar quais são os elementos necessários para a execução da técnica, sendo estes os principais componentes do espectrômetro proposto.

Figura 33 – Arranjo de espectroscopia de lente térmica, especificando dentro do retângulo os elementos principais do dispositivo



Fonte: O Autor (2020).

Graças a eletrônica atual é possível utilizar os conversores analógico/digital do Arduino Nano para aquisição dos dados que vem do fotodetector. As informações são transmitidas serialmente para o computador, onde são plotadas no LabView. Usar o Arduino Nano ajuda a diminuir o tamanho e custo de criação e operação do dispositivo.

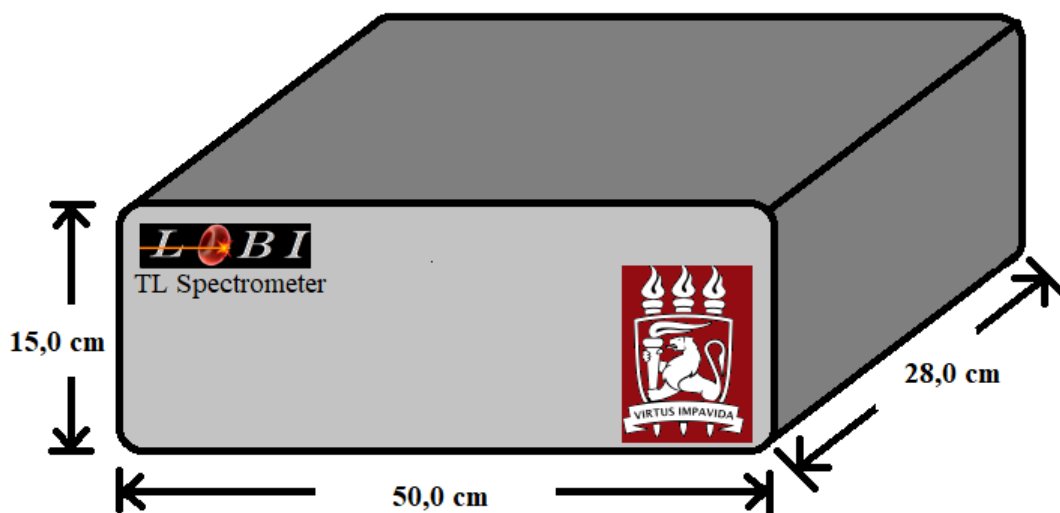
Para efetuar este projeto foram abordados os seguintes aspectos a ser solucionados:

- Fonte de alimentação do sistema.
- Comunicação serial Labview-Arduino.
- Controle do chopper.
- Deslocamento da amostra.
- Detecção tipo eclipse.
- Fotodetector para detecção do sinal, sistema de aquisição dos dados.
- Algoritmo para efetuar o cálculo da eficiência quântica.

6.1.1 Projeto: Espectrômetro de lente térmica

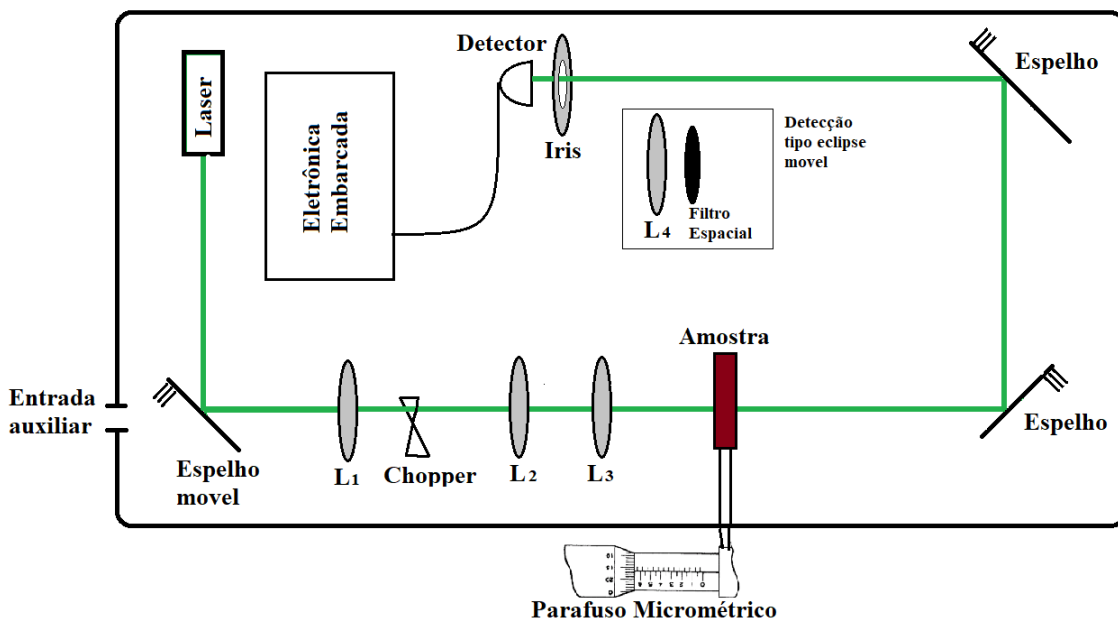
Em perspectiva, o espectrômetro a ser construído tem as dimensões e os componentes apresentados nas Figuras 34 e 35, respectivamente.

Figura 34 – Design externo e dimensões do espectrômetro de lente térmica



Fonte: O Autor (2020).

Figura 35 – Arranjo interno do espectrômetro de lente térmica



Fonte: O Autor (2020).

Então, o espectrômetro de lente térmica vem equipado com:

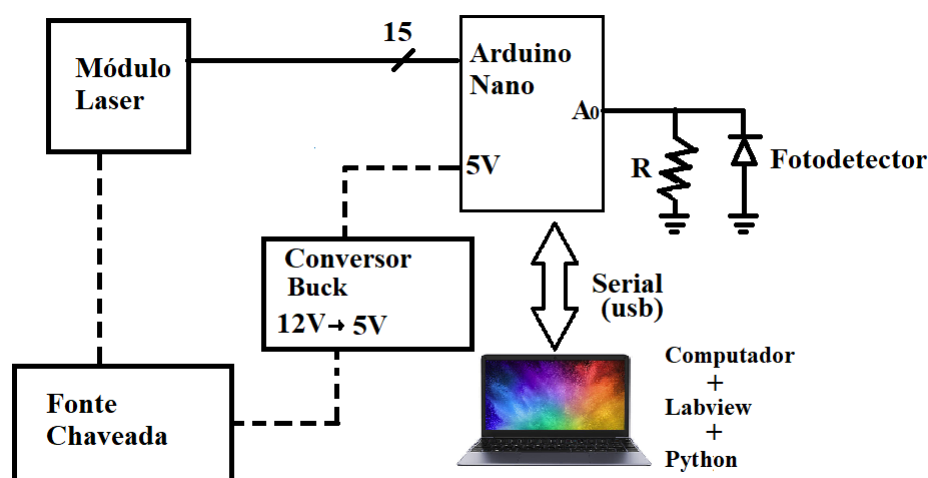
- Um laser cw como fonte de excitação principal, o comprimento de onda de excitação irá depender dos materiais que o adquirente for pesquisar, o que implicará ao usuário informar o comprimento de onda antes da aquisição do dispositivo.
- Lentes acromáticas convergentes L_1 e L_2 que serão usadas como telescópio para aumentar e colimar o diâmetro do feixe, com distâncias focais de 3,5 e 7,0 cm, respectivamente.
- Um chopper ou sistema alternativo, cuja função é bloquear a luz durante alguns milissegundos para criar o efeito transiente da lente térmica, este elemento deve estar fixado no foco da lente L_1 .
- Uma lente acromática e convergente L_3 para focalizar o feixe na amostra a ser caracterizada, com distância focal de 10 cm.
- Um translador com porta amostra, que se deslocará desde a posição préfocal até a posição pósfocal da lente L_3 .
- Uma íris para coletar a parte central do feixe transmitido pela amostra.
- O sistema de aumento de sensibilidade, caso seja necessário, será dado pela detecção tipo eclipse. Para isto é necessário um bloqueador tipo disco de 2,0 cm de diâmetro e uma lente convergente com distância focal de 10 cm.
- Um detector de semiconductor sensível ao espectro do laser cw.

- Um sistema de eletrônica embarcada, que será descrito com maiores detalhes na próxima seção.

6.1.1.1 Eletrônica do espectrômetro de lente térmica

A eletrônica de funcionamento, do sistema de controle e a aquisição de dados do dispositivo, é apresentada no diagrama de blocos da Figura 36.

Figura 36 – Diagrama de blocos da eletrônica necessária para o funcionamento do espectrômetro de lente térmica



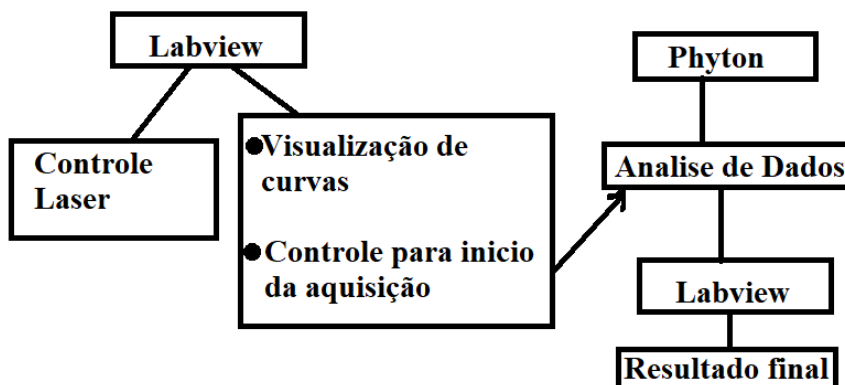
Fonte: O Autor (2020).

O controle e a aquisição dos dados são realizados por um Arduino Nano. Com esse elemento é possível adquirir o sinal do fotodetector de semicondutor, tarefa que para o sistema de lente térmica em estágio de laboratório é feita pelo osciloscópio. Por sua vez o Arduino também pode controlar a potência do laser embutido no espectrômetro.

6.1.1.2 Software e programação para o espectrômetro de lente térmica

Para apresentar de forma mais clara, o sistema de controle e análise de dados necessários para o funcionamento do espectrômetro de lente térmica, a Figura 37 mostra o diagrama de blocos da interação entre os programas de controle e análise de dados do dispositivo.

Figura 37 – Diagrama de blocos da interação entre os programas de controle e análise de dados do dispositivo



Fonte: O Autor (2020).

No Labview será controlada a ativação e potência do laser, além disso serão mostradas as curvas de lente térmica para cada posição da amostra, tendo um controle para a aquisição dos dados do sinal de lente térmica escolhido pelo usuário. Os dados desse sinal de LT serão repassados para o Python, encarregado da análise da informação e cálculo da eficiência quântica. Finalmente o resultado é enviado ao Labview que irá apresentar o resultado na tela do computador (ver Figura 37).

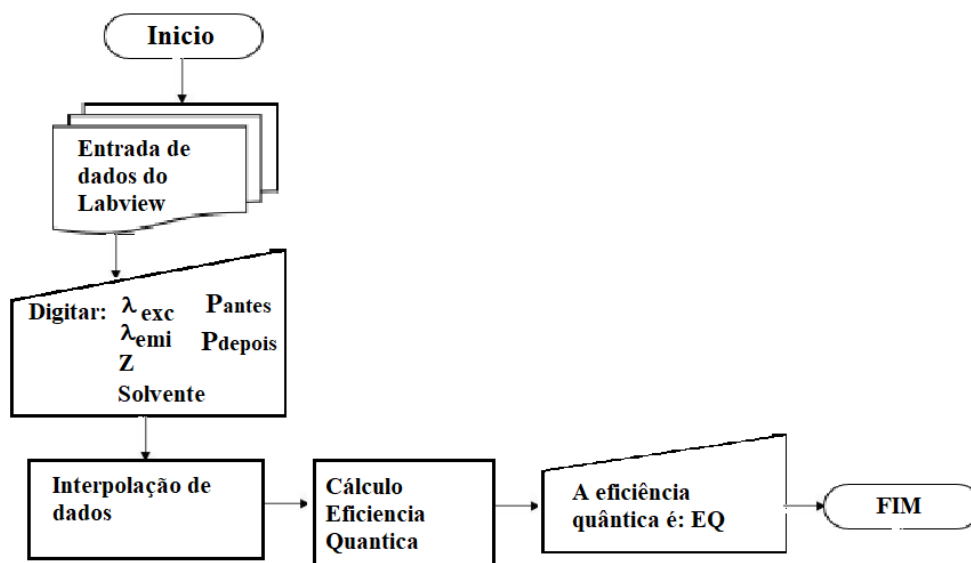
Em síntese o sistema de controle e operação deve apresentar os seguintes processos:

1. Ativação e controle de potência do laser.
2. Apresentar na tela do computador o sinal do efeito de lente térmica.
3. Controle para a aquisição do sinal de lente térmica escolhido pelo usuário a partir da observação na tela do computador.
4. Conversão dos dados do efeito de lente térmica, transformando estes de analógicos em digitais para serem salvos e posteriormente efetuar os cálculos necessários.
5. Apresentar o ajuste da curva teórica (gráfico) e o resultado da eficiência quântica da amostra que esta sendo caracterizada.

Para resolver cada um dos itens mencionados anteriormente, o Arduino será a interface eletrônica para comunicar com o laser e para a transformação dos dados de analógicos para digitais. O controle do laser e a interface gráfica usada para observar as curvas de lente térmica serão dadas pelo Labview, a análise dos resultados será realizada em Python.

O algoritmo para a análise dos dados é baseado no fluxograma apresentado na Figura 38.

Figura 38 – Fluxograma do algoritmo de cálculo da eficiência quântica



Fonte: O Autor (2020).

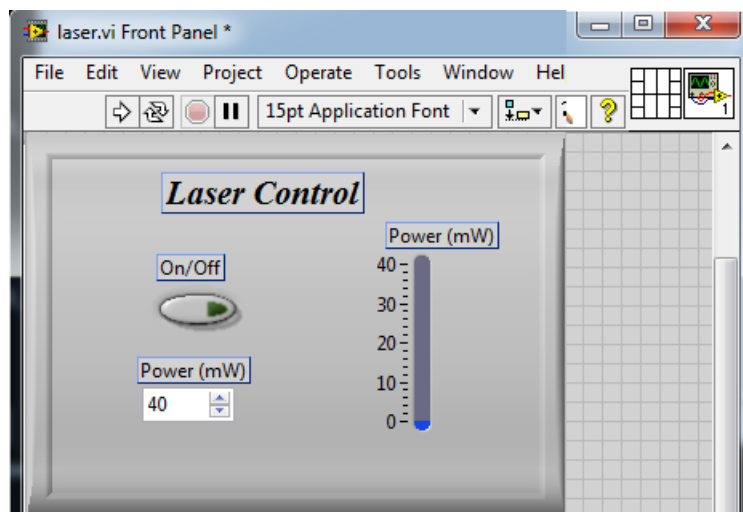
O software irá solicitar ao usuário os seguintes dados de entrada:

- Comprimento de onda de excitação (λ_{exc}).
- Comprimento de onda médio de emissão ($\langle \lambda_{em} \rangle$).
- Posição prefocal ou pósfocal da amostra (Z).
- Indicar o solvente da amostra, já que o sistema tem uma base de dados com os parâmetros dos solventes.
- Potências antes e depois da amostra.

Depois de ingressar esses dados, o usuário irá deslocar a amostra até a posição desejada para ele adquirir os dados da curva de lente térmica, essa posição será monitorada pelo usuário na tela do seu computador pessoal. Com todos esses dados é possível ao algoritmo (em Python) efetuar o cálculo requerido.

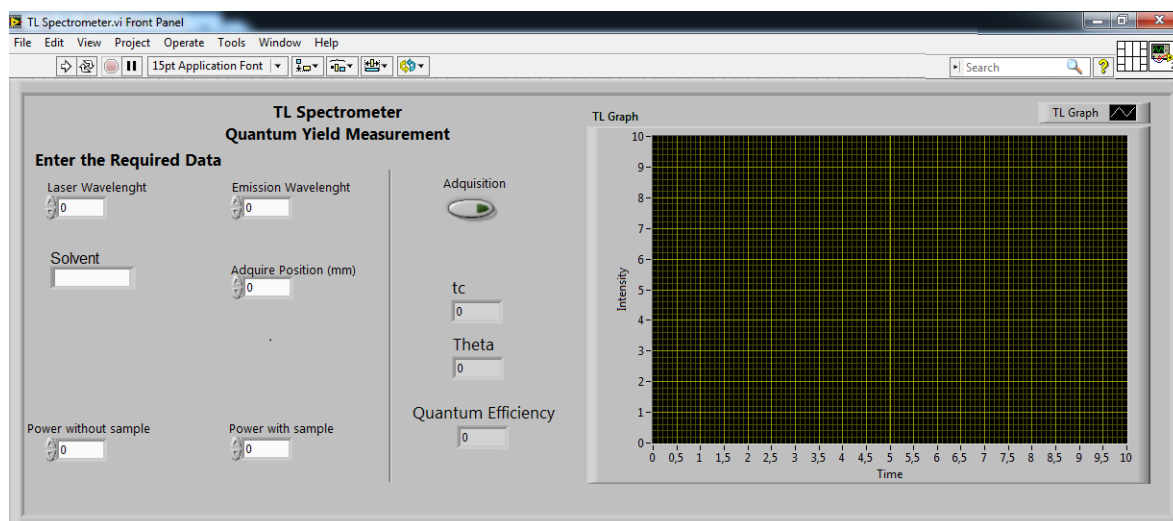
Inicialmente, serão necessárias duas interfaces gráficas no Labview, com seus respectivos programas de controle. Essas interfaces gráficas com as quais o usuário vai interagir são uma para o controle do laser e a outra para a entrada de dados, monitoramento e resultado da medição do espectrômetro de lente térmica, estas interfaces são exibidas nas Figuras 39 e 40.

Figura 39 – Interface gráfica do sistema de controle do laser



Fonte: O Autor (2020).

Figura 40 – Interface gráfica do sistema de controle do espectrômetro de lente térmica



Fonte: O Autor (2020).

A construção do protótipo do dispositivo encontra-se em andamento no Laboratório de Óptica Biomédica e Imagens (LOBI), e sua execução está sendo realizada com uma equipe de alunos (Doutorado, Mestrado e iniciação), já tendo sido desenvolvido o controle de potência do laser via Arduino, captura de sinal de fotodetector por Arduino, controle de rotação de Chopper mecânico pelo Arduino e algoritmo Python para análise automática do sinal de lente térmica.

7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Nesta tese foi apresentada uma revisão das diferentes técnicas de avaliação da eficiência quântica, fato que permitiu observar que algumas destas técnicas podem ser usadas para obter o comportamento da eficiência quântica em função da concentração, pH da amostra, comprimento de onda de excitação, e absorção de um e dois fótons. Além disto, a técnica de eclipse lente térmica permite explorar outros parâmetros, tais como: gradiente de temperatura, eficiência não radiativa, propriedades térmicas e ópticas do solvente e/ou do soluto, etc. Esses parâmetros e características dos materiais são de grande importância para sua aplicação na ciência e na tecnologia. Nas seguintes seções serão apresentados, respectivamente, um pequeno resumo dos resultados mais relevantes desta pesquisa e as perspectivas futuras que podem ser atingidas usando esta pesquisa como uma base para o desenvolvimento de novos projetos.

7.1 CONCLUSÕES

O objetivo principal deste trabalho foi desenvolver ou aprimorar um sistema de caracterização da eficiência quântica da fluorescência de materiais fluoróforos. Referente a isso, foi realizada uma otimização na sensibilidade da técnica de espectroscopia de lente térmica, que deu origem ao novo método *the eclipsing thermal lens spectroscopy* [55], o qual esta no anexo A e foi publicado no jornal *Optics Express*. Esta nova técnica apresenta maior sensibilidade na razão sinal-ruído (S/R). Esta otimização possibilita a medição da eficiência quântica para: (1) concentrações baixas de fluoróforo, (2) amostras com $\eta > 90 \%$, e (3) permite usar potências baixas de excitação.

O aumento na sensibilidade foi atingido usando um filtro espacial de frente de onda, tipo eclipse, que bloqueia a parte central do feixe e só permite a detecção das bordas. O aumento na sensibilidade da razão S/R é devido ao fato que as mudanças no perfil do feixe são mais perceptíveis nas bordas do feixe, comparadas com as do centro do feixe [37, 64]. Isto proporcionou um aumento de ≈ 14 vezes (1400%) na sensibilidade do sinal de LT de dois feixes no modo descasado. No sistema de lente térmica com um feixe, obteve-se um aumento na sensibilidade da relação sinal ruído de 300%, se comparada com a técnica usual de lente térmica com feixe único.

Com a experiência obtida desta pesquisa, em técnicas de espectroscopia de lente térmica, foi redigido um capítulo para o livro *Quantum Dots: Applications in Biology*, da Springer. O capítulo publicado apresenta o protocolo, para a obtenção do rendimento quântico usando espectroscopia de lente térmica com um feixe, explicado em detalhe no anexo C.

Outro resultado interessante, foi o resultado obtido ao avaliar a eficiência quântica de QDs de CdTe usando a técnica de ELT-Eclipse, para diferentes pHs de suspensão aquosa dos

QDs, utilizando dois agentes de modificação do pH. Para modificar o pH foram usados como agentes o ácido mercaptosuccínico (AMS) e o ácido clorídrico (HCl). Desta investigação foi concluído que deve ser utilizado o agente de passivação (neste caso o AMS) para o ajuste de pH das suspensões de QDs. Esse trabalho foi publicado no *Journal of Luminescence*, mostrando parâmetros uteis para a aplicação destas nanoestruturas na biomedicina [56]. Os detalhes desse trabalho são mostrados no anexo B.

A espectroscopia de lente térmica com eclipse também foi usada para mensurar a eficiência quântica dos pontos quânticos de CdTe com excitação por dois fótons. A técnica se mostrou altamente sensível, permitindo provar a influência do pH, concentração e comprimento de onda de excitação no valor da eficiência quântica de dois fótons. Foi determinada a eficiência quântica de dois fótons com diferentes comprimentos de onda de excitação para suspensões de pontos quânticos variando seu pH (ajustando o pH com agentes estabilizantes). Foram obtidas mudanças significantes nos resultados de η com dois fótons, de 27 até 75%. Além disso os resultados apresentados nesta pesquisa mostram que a eficiência quântica de dois fótons em função da concentração não muda, isto indica que a síntese usada tem uma boa camada de passivação. Com isto, é mostrado que não apenas a análise espectral, mas também as avaliações quantitativas dos parâmetros ópticos dos QDs, como a eficiência quântica, são fundamentais para desenvolver novos nanomateriais sintéticos, e aprimorar estratégias de funcionalização, aproveitando todo o potencial desses promissores nanocristais fluorescentes.

Finalmente, um outro resultado interessante desta pesquisa é o projeto em perspectiva da criação de um espectrômetro de lente térmica (protótipo). Ressalta-se que não existe no mercado atual dispositivo semelhante. Este dispositivo contribuirá para que a avaliação e caracterização de materiais fluorescentes seja realizada por profissionais que não possuam um conhecimento especializado em física, óptica e engenharia.

7.1.1 Resultados publicados ou apresentados em eventos

Em síntese, com esta pesquisa se conseguiram as seguintes produções científicas:

► Artigos publicados em revistas científicas:

1. *Eclipsing thermal lens spectroscopy for fluorescence quantum yield measurement*, *Opt. Express* 21, 18592-18601 (2013).
2. *A pH dependence study of CdTe quantum dots fluorescence quantum yields using eclipsing thermal lens spectroscopy*, *Journal of Luminescence* 174, 17-21, Junho 2016.

► Capítulo de livro:

1. *Quantum Dots: Applications in Biology* da Springer Protocols, Humana Press, New York, NY. Capítulo intitulado, *Quantum Dots Fluorescence Quantum Yield Measured by Thermal Lens Spectroscopy*, 93-101, 18, Julho 2014.

► Prêmio:

1. O poster intitulado, Caracterização óptica de marcadores fluorescentes de CdTe para geração de imagens: um estudo da dependência da eficiência quântica com o pH. Recebeu o prêmio como trabalho destaque no *IX Simpósio de lasers e suas aplicações*, evento produzido pela, *optical society of america* (OSA). Recife, 26 de setembro de 2014.

► Trabalhos apresentados em eventos:

1. Poster do trabalho *Improving Single-beam Thermal Lens Spectroscopy by wavefront spatial filtering*, apresentado no *Spie photonics West 2013. San Francisco CA (USA)*, fevereiro 2013.
2. Artigo e apresentação oral do trabalho, Avaliação da Eficiência Quântica da Fluorescência de Quantum Dots de CdTe para Diagnóstico: um estudo em função do pH usando espectroscopia de lente térmica, apresentados no XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica em 2014. Uberlândia, outubro 2014.
3. Apresentação de poster do trabalho, Caracterização óptica de marcadores fluorescentes de CdTe para geração de imagens: um estudo da dependência da eficiência quântica com o pH. No IX simpósio de lasers e suas aplicações. Recife, setembro 2014

7.2 PERSPECTIVAS FUTURAS

As perspectivas futuras que tem como base a pesquisa apresentada neste texto, serão divididas em duas classes: (1) as que atualmente estão sendo iniciadas e serão continuadas, e (2) as que podem ser desenvolvidas em um futuro próximo. Na primeira classe temos:

- Confirmação do método empírico para a obtenção da EQ de dois fótons sem precisar da seção transversal de choque do material. Aguardando reparo do laser de femtossegundos do LOBI.
- Finalizar junto ao grupo de estudantes de Doutorado, Mestrado e iniciação, o protótipo do espectrômetro de lente térmica portátil projetado nesta pesquisa.

Parte 2:

- Mensurar e avaliar as propriedades térmicas, tais como o gradiente de temperatura, em nanopartículas interagindo com um feixe laser.
- Futuras modificações no dispositivo de ELT que permitirão mensurar alguns parâmetros importantes para a caracterização de diferentes amostras, tais como: (1) variação da temperatura quando a amostra é excitada com um certo comprimento de onda; (2) valor da eficiência quântica não radiativa; (3) avaliação de não linearidades ópticas usando a técnica de varredura Z.

REFERÊNCIAS

- 1 SUKHANOVA, A.; NABIEV, I. Fluorescent nanocrystal quantum dots as medical diagnostic tools. OSA, p. 429 – 447., Apr 1982. Citado 2 vezes nas páginas 21 e 29.
- 2 SANTOS, B. S.; FARIAS, P. M.; FONTES, A. Semiconductor quantum dots for biological applications. In: _____. *Handbook of Self Assembled Semiconductor Nanostructures for Novel Devices in Photonics and Electronics*. Amsterdam: Elsevier. cap. 26, p. 773–798. Citado 3 vezes nas páginas 21, 29 e 65.
- 3 MICHALET, X. et al. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science*, v. 307, n. January, p. 538–544, 2005. Citado na página 21.
- 4 MEDINTZ, I. L. et al. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nature materials*, v. 4, p. 435–446, 07 2005. Citado 2 vezes nas páginas 21 e 29.
- 5 DHAMI, S. et al. Phthalocyanine fluorescence at high concentration: Dimers or reabsorption effect?. *Photochem. Photobiol.*, v. 61, n. 4, p. 341–346, 1995. Citado na página 21.
- 6 HALLIDAY, D.; RESNICK, R.; WALKER, J. *Fundamentos de Física - Óptica e Física Moderna*. 10. ed. Rio de Janeiro: Gen LTC. Citado na página 24.
- 7 LAKOWICZ, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3. ed. Singapore: Springer US, 2006. Citado 6 vezes nas páginas 25, 26, 28, 31, 36 e 65.
- 8 EISBERG, R.; RESNICK, R. *Física Quântica. Átomos, Moléculas, Sólidos, Núcleos e Partículas*. 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier. Citado na página 25.
- 9 WEISSBLUTH, M. *Atoms and Molecules*. London: Academic Press. Citado na página 25.
- 10 PRASAD, P. N. *Introduction to biophotonics*. United States of America: Wiley-Interscience, 2003. Citado 5 vezes nas páginas 25, 26, 27, 28 e 65.
- 11 SUHLING, K.; FRENCH, M. W.; PHILLIPS, D. Time-resolved fluorescence microscopy. *Photochem. Photobiol. Sci*, p. 13–22, 2005. Citado na página 26.
- 12 JAIN, A.; BLUM, C.; SUBRAMANIAM, V. *Fluorescence Lifetime Spectroscopy and Imaging of Visible Fluorescent Proteins*. First edition. Hungary: Elsevier, 2009. 147–176 p. Citado na página 26.
- 13 MAGDE, D.; ROJAS, G. E.; SEYBOLD, P. G. Solvent dependence of the fluorescence lifetimes of xanthene dyes. *Photochemistry and Photobiology*, v. 70, n. 5, p. 737–744, 1999. Citado 2 vezes nas páginas 29 e 65.
- 14 MICHALET, X.; BENTOLILA, L. A.; WEISS, S. Molecular imaging: Physics and bioapplications of quantum dots. In: _____. *Advances in Medical Physics: 2008*. Wisconsin: Medical Physics Publishing. cap. 8, p. 111–127. Citado 2 vezes nas páginas 29 e 65.
- 15 JARDIM, D. dos S. Relatório de Iniciação Científica, *Relatório Final de Atividades do Aluno de Iniciação Científica (IC) PIBIC/UFPE/CNPq*. Citado 3 vezes nas páginas 29, 38 e 42.

- 16 VAVILOV, S. The fluorescence efficiency of dye solutions. *Z. Phys*, v. 22, p. 266–272, 1924. Citado na página 31.
- 17 MELHUISE, W. The measurement of absolute quantum efficiencies of fluorescence. *New Zealand J. Sci. Technol*, v. 37, p. 142, 1955. Citado na página 31.
- 18 MELHUISE, W. Measurement of quantum efficiencies of fluorescence and phosphorescence and some suggested luminescence standards. *JOSA*, Optical Society of America, v. 54, n. 2, p. 183–186, 1964. Citado na página 31.
- 19 DEMAS, J. N.; CROSBY, G. A. Measurement of photoluminescence quantum yields. Review. *The Journal of Physical Chemistry*, v. 75, n. 8, p. 991–1024, 1971. Citado 4 vezes nas páginas 32, 33, 34 e 36.
- 20 DRUSHEL, H. V.; SOMMERS, A. L.; COX, R. C. Correction of Luminescence Spectra and Calculation. *Analytical Chemistry*, v. 35, n. 13, p. 2166–2172, 1963. Citado na página 35.
- 21 PARKER, C. A.; REES, W. T. Correction of fluorescence spectra and measurement of fluorescence quantum efficiency. *The Analyst*, v. 85, n. 1013, p. 587–600, 1960. Citado na página 35.
- 22 WILLIAMS, A. T. R.; WINFIELD, S. A.; MILLER, J. N. Relative fluorescence quantum yields using a computer-controlled luminescence spectrometer. *The Analyst*, v. 108, n. 1290, p. 1067, 1983. Citado na página 35.
- 23 DE MELLO, J. C.; WITTMANN, H. F.; FRIEND, R. H. An improved experimental determination of external photoluminescence quantum efficiency. *Advanced Materials*, v. 9, n. 3, p. 230–232, 1997. Citado 2 vezes nas páginas 39 e 40.
- 24 MANGOLINI, L. et al. Plasma synthesis and liquid-phase surface passivation of brightly luminescent Si nanocrystals. *Journal of Luminescence*, v. 121, n. 2 SPEC. ISS., p. 327–334, 2006. Citado 3 vezes nas páginas 42, 43 e 44.
- 25 HU, C.; WHINNERY, J. R. New thermo-optical measurement method and a comparison with other methods. *Applied optics*, v. 12, n. 1, p. 72–79, 1973. Citado 2 vezes nas páginas 45 e 54.
- 26 BRANNON, J. H.; MAGDE, D. Absolute quantum yield determination by thermal blooming. Fluorescein. *Journal of Physical Chemistry*, v. 82, n. 6, p. 705–709, 1978. Citado na página 45.
- 27 GORDON, J. P. et al. Long-transient effects in lasers with inserted liquid samples. *Journal of Applied Physics*, v. 36, n. 1, p. 3–8, 1965. Citado 3 vezes nas páginas 45, 46 e 54.
- 28 SHELDON, S. J.; KNIGHT, L. V.; THORNE, J. M. Laser-induced thermal lens effect: a new theoretical model. *Appl. Opt.*, OSA, v. 21, n. 9, p. 1663–1669, May 1982. Citado 6 vezes nas páginas 45, 46, 48, 49, 50 e 51.
- 29 SHEN, J.; LOWE, R. D.; SNOOK, R. D. A model for cw laser induced mode-mismatched dual-beam thermal lens spectrometry. *Chemical Physics*, v. 165, n. 2-3, p. 385–396, 1992. Citado 3 vezes nas páginas 48, 50 e 51.
- 30 FALCONIERI, M. Thermo-optical effects in Z-scan measurements using high repetition rate lasers. *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics*, v. 1, n. 6, p. 662–667, 1999. Citado 2 vezes nas páginas 49 e 51.

- 31 CRUZ, R. A.; PILLA, V.; CATUNDA, T. Quantum yield excitation spectrum (UV-visible) of CdSe/ZnS core-shell quantum dots by thermal lens spectrometry. *Journal of Applied Physics*, v. 107, n. 8, 2010. Citado 2 vezes nas páginas 50 e 68.
- 32 POTEKIN, A. K. et al. Spatial filters for high-peak-power multistage laser amplifiers. *Applied Optics*, v. 46, n. 20, p. 4423–4430, 2007. Citado na página 52.
- 33 SLABY, J. Application of Spatial Filtering in Thermal Lensing Detection. *Optics Communications*, v. 64, n. 2, p. 89–93, 1987. Citado na página 53.
- 34 SLABY, J. Background illumination filtering in thermal lens spectroscopy. *Analytical Chemistry*, v. 61, n. 22, p. 2496–2499, 1989. Citado 2 vezes nas páginas 53 e 56.
- 35 Bloisi, F. Vicari, L. Cavaliere, P. Martelucci, S. Quartieri, J. Spatial Filtering In the detection of transverse phase modulation through a nonlinear thin film. *Optics Communications*, v. 68, n. 6, p. 391–395, 1988. Citado 2 vezes nas páginas 53 e 56.
- 36 SHEIK-BAHAE, M.; SAID, A. Sensitive measurement of optical nonlinearities using a single beam. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, v. 26, n. 4, 1990. Citado 4 vezes nas páginas 53, 54, 55 e 56.
- 37 XIA, T. et al. Eclipsing Z-scan measurement of $\lambda/10^4$ wave-front distortion. *Optics Letters*, v. 19, n. 5, p. 317, 1994. Citado 4 vezes nas páginas 53, 55, 56 e 79.
- 38 RATIVA M, D. J. *Técnicas Ópticas para Caracterização e Diagnóstico de Sistemas Biológicos*. Recife: UFPE, 2008. Citado 3 vezes nas páginas 53, 54 e 55.
- 39 BINDHU, C. V. et al. Solvent Effect on Absolute Fluorescence Quantum Yield of Rhodamine 6G Determined Using Transient Thermal Lens Technique. *Modern Physics Letters B*, v. 13, n. 16, p. 563–576, 1999. Citado 2 vezes nas páginas 59 e 62.
- 40 ROHWER, L. S.; MARTIN, J. E. Measuring the absolute quantum efficiency of luminescent materials. *Journal of Luminescence*, v. 115, n. 3-4, p. 77–90, 2005. Citado 2 vezes nas páginas 59 e 62.
- 41 WÜRTH, C. et al. Determination of the absolute fluorescence quantum yield of rhodamine 6G with optical and photoacoustic methods - Providing the basis for fluorescence quantum yield standards. *Talanta*, Elsevier B.V., v. 90, p. 30–37, 2012. Citado 2 vezes nas páginas 59 e 62.
- 42 FISCHER, M.; GEORGES, J. Fluorescence quantum yield of rhodamine 6G in ethanol as a function of concentration using thermal lens spectrometry. *Chemical Physics Letters*, v. 260, n. 1-2, p. 115–118, 1996. Citado na página 59.
- 43 ARBEOLA, F. L.; OJEDA, P. R.; ARBEOLA, I. L. The fluorescence quenching mechanisms of Rhodamine 6G in concentrated ethanolic solution. *Journal Of Photochemistry And Photobiology A-Chemistry*, v. 45, n. 3, p. 313–323, 1988. Citado na página 59.
- 44 TOLENTINO DOMINGUEZ, C. et al. Using random laser emission to investigate the bonding energy of laser dye dimers. *Chemical Physics Letters*, Elsevier B.V., v. 464, n. 4-6, p. 245–248, 2008. Citado na página 59.
- 45 KUBIN, R. F.; FLETCHER, A. N. Fluorescence quantum yields of some rhodamine dyes. *Journal of Luminescence*, v. 27, n. 4, p. 455–462, 1982. Citado 2 vezes nas páginas 59 e 62.

- 46 NEGRI, R. M. et al. Carboxylated Zinc-Phthalocyanine, Influence of Dimerization on the Spectroscopic Properties. an Absorption, Emission, and Thermal Lensing Study. *Photochemistry and Photobiology*, v. 53, n. 3, p. 317–322, 1991. Citado na página 59.
- 47 HAMMOND, P. R. Self-absorption of molecular fluorescence, the design of equipment for measurement of fluorescence decay, and the decay times of some laser dyes. *The Journal of Chemical Physics*, v. 70, n. 8, p. 3884–3894, 1979. Citado na página 62.
- 48 LI, B.; GUPTA, R. Optical saturation in continuous-wave photothermal deflection spectroscopy: quantitative investigation of fundamental and harmonic components. *Applied Optics*, v. 40, n. 9, p. 1563, 2001. Citado na página 63.
- 49 BIOSCA, Y. M.; RAMIS-RAMOS, G. Optical saturation thermal lens spectrometry in non-polar solvents. *Analytica Chimica Acta*, v. 345, n. 1-3, p. 257–263, 1997. Citado na página 63.
- 50 BIALKOWSKI, S. E.; CHARTIER, A. Using slow measurement systems to measure fast excited-state kinetics with nonlinear rate-competitive optical bleaching. v. 14, p. 14–17, 2009. Citado na página 63.
- 51 ANDRADE, C. G. et al. Evaluation of glycophenotype in breast cancer by quantum dot-lectin histochemistry. *International Journal of Nanomedicine*, v. 8, p. 4623–4629, 2013. Citado na página 65.
- 52 ROGACH, A. L. et al. Aqueous synthesis of thiol-capped CdTe nanocrystals: State-of-the-art. *Journal of Physical Chemistry C*, v. 111, n. 40, p. 14628–14637, 2007. Citado na página 66.
- 53 DAGTEPE, P. et al. Quantized growth of cdte quantum dots observation of magic-sized cdte quantum dots. *J. Phys. Chem. C*, v. 111, n. 41, p. 14977–14983, 2007. Citado na página 66.
- 54 YU, W. W. et al. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals. *Chemistry of Materials*, v. 15, n. 14, p. 2854–2860, 2003. Citado na página 66.
- 55 ESTUPIÑÁN-LÓPEZ, C.; DOMINGUEZ, C. T.; ARAUJO, R. E. de. Eclipsing thermal lens spectroscopy for fluorescence quantum yield measurement. *Optics Express*, v. 21, n. 15, p. 18592, 2013. Citado 2 vezes nas páginas 69 e 79.
- 56 ESTUPIÑÁN-LÓPEZ, C. et al. A pH dependence study of CdTe quantum dots fluorescence quantum yields using eclipsing thermal lens spectroscopy. *Journal of Luminescence*, Elsevier, v. 174, p. 17–21, 2016. Citado 2 vezes nas páginas 69 e 80.
- 57 GAO, M. et al. Strongly Photoluminescent CdTe Nanocrystals by Proper Surface Modification. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 102, n. 43, p. 8360–8363, 1998. Citado na página 69.
- 58 GAPONIK, N. et al. Thiol-capping of CDTe nanocrystals: An alternative to organometallic synthetic routes. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 106, n. 29, p. 7177–7185, 2002. Citado na página 69.
- 59 ZHANG, H. et al. The influence of carboxyl groups on the photoluminescence of mercaptocarboxylic acid-stabilized CdTe nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 107, n. 1, p. 8–13, 2003. Citado na página 69.

- 60 SILVA, F. O. et al. Effect of surface ligands on the optical properties of aqueous soluble CdTe quantum dots. *Nanoscale Research Letters*, v. 7, n. 1, p. 536, 2012. Citado na página 69.
- 61 KANIYANKANDY, S. et al. Charge carrier dynamics in thiol capped CdTe quantum dots. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 12, n. 16, p. 4210–4216, 2010. Citado na página 70.
- 62 HOY, J. et al. Excitation energy dependence of the photoluminescence quantum yields of core and core/shell quantum dots. *Journal of Physical Chemistry Letters*, v. 4, n. 12, p. 2053–2060, 2013. Citado na página 70.
- 63 SCHNEIDER, R. et al. PH and concentration dependence of the optical properties of thiol-capped CdTe nanocrystals in water and D2O. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 18, n. 28, p. 19083–19092, 2016. Citado na página 71.
- 64 GOMES, A. S. L. et al. Thermally managed eclipse Z-scan. *Optics Express*, v. 15, n. 4, p. 1712, 2007. Citado na página 79.

APÊNDICE A – Artigo Publicado no Optics Express.

Eclipsing thermal lens spectroscopy for fluorescence quantum yield measurement

C. Estupiñán-López, C. Tolentino Dominguez, and R. E. de Araujo*

Laboratory of Biomedical Optics and Imaging, Federal University of Pernambuco, Cidade Universitária, Recife-PE, 50740-530, Brazil

*renato.earaujo@ufpe.br

Abstract: A modified spatial filtering method that improves the sensitivity of single-beam and mode-mismatched thermal lens spectroscopy (TLS) for fluorescence quantum yield measurement is presented. The method is based on the detection of the external part of a laser beam transmitted by the fluorescent sample (eclipsing detection mode). The experimental results show that the signal/noise (S/N) ratio of the absolute quantum yield of Rh6G can be enhanced up to ~1400% using the eclipsing detection mode on the TLS experimental setup. The method was evaluated by measuring the fluorescence quantum yield of varying concentration of ethanolic solutions of Rhodamine 6G.

©2013 Optical Society of America

OCIS codes: (140.6810) Thermal effects; (160.4760) Optical properties; (190.4870) Photothermal effects; (350.6830) Thermal lensing.

References and links

1. N. J. Dovichi and J. M. Harris, "Laser induced thermal lens effect for calorimetric trace analysis," *Anal. Chem.* **51**(6), 728–731 (1979).
2. T. Imasaka, K. Miyaishi, and N. Ishibashi, "Application of the thermal lens effect for determination of iron(II) with 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline disulfonic acid," *Anal. Chim. Acta* **115**(1), 407–410 (1980).
3. G. C. Nieman and S. D. Colson, "Pressure effects on the two-photon spectrum of trans-butadiene as detected by gas phase transient lensing spectroscopy," *J. Chem. Phys.* **68**(6), 2994–2996 (1978).
4. J. R. Whinnery, "Laser measurement of optical absorption in liquids," *Acc. Chem. Res.* **7**(7), 225–231 (1974).
5. C. E. Buffett and M. D. Morris, "Thermal lens detection for liquid chromatography," *Anal. Chem.* **54**(11), 1824–1825 (1982).
6. R. A. Leach and J. M. Harris, "Thermal lens calorimetry," *J. Chromatogr. A* **218**, 15–19 (1981).
7. D. R. Snook and R. D. Lowe, "Thermal lens spectroscopy. A review," *Analyst (Lond.)* **120**(8), 2051–2068 (1995).
8. J. P. Gordon, R. C. C. Leite, R. S. Moore, S. P. S. Porto, and J. R. Whinnery, "Long transient effects in lasers with inserted liquid samples," *J. Appl. Phys.* **36**(1), 3–8 (1965).
9. R. C. C. Leite, R. S. Moore, and J. R. Whinnery, "Low absorption measurement by mean of the thermal lens effect using a He:Ne laser," *Appl. Phys. Lett.* **5**(7), 141–143 (1964).
10. J. Shen, R. D. Lowe, and R. D. Snook, "A model for cw laser induced mode-mismatched dual-beam thermal lens spectrometry," *Chem. Phys.* **165**(2–3), 385–396 (1992).
11. M. L. Baesso, J. Shen, and R. D. Snook, "Time-resolved thermal lens measurement of thermal diffusivity of soda-lime glass," *Chem. Phys. Lett.* **197**(3), 255–258 (1992).
12. S. J. Sheldon, L. V. Knight, and J. M. Thorne, "Laser-induced thermal lens effect: a new theoretical model," *Appl. Opt.* **21**(9), 1663–1669 (1982).
13. P. P. Sorokin, J. R. Lankard, V. L. Moruzzi, and E. C. Hammond, "Flashlamp-pumped organic-dye lasers," *J. Chem. Phys.* **48**(10), 4726–4742 (1968).
14. G. A. Crosby and J. N. Demas, "The measurement of fluorescence quantum yields. Review," *J. Phys. Chem.* **75**(8), 991–1024 (1971).
15. C. Würth, M. Grabolle, J. Pauli, M. Spieles, and U. Resch-Genger, "Comparison of methods and achievable uncertainties for the relative and absolute measurement of photoluminescence quantum yields," *Anal. Chem.* **83**(9), 3431–3439 (2011).
16. R. A. Cruz, V. Pilla, and T. Catunda, "Quantum yield excitation spectrum (UV-visible) of CdSe/ZnS core-shell quantum dots by thermal lens spectrometry," *J. Appl. Phys.* **107**(8), 083504 (2010).
17. A. Kurian, N. A. George, B. Paul, V. P. N. Nampoori, and C. P. G. Vallabhan, "Studies on fluorescence efficiency and photodegradation of Rhodamine 6G doped PMMA using a dual beam thermal lens technique," *Laser Chem.* **20**(2–4), 99–110 (2002).

18. C. Hu and J. R. Whinnery, "New thermo-optical measurement method and a comparison with other methods," *Appl. Opt.* **12**(1), 72–79 (1973).
19. J. H. Brannon and D. J. Magde, "Absolute quantum yield determination by thermal blooming. Fluorescein," *J. Phys. Chem.* **82**(6), 705–709 (1978).
20. K. Suzuki, A. Kobayashi, S. Kaneko, K. Takehira, T. Yoshihara, H. Ishida, Y. Shiina, S. Oishi, and S. Tobita, "Reevaluation of absolute luminescence quantum yields of standard solutions using a spectrometer with an integrating sphere and a back-thinned CCD detector," *Phys. Chem. Chem. Phys.* **11**(42), 9850–9860 (2009).
21. C. Würth, M. G. González, R. Niessner, U. Panne, C. Haisch, and U. R. Genger, "Determination of the absolute fluorescence quantum yield of rhodamine 6G with optical and photoacoustic methods—providing the basis for fluorescence quantum yield standards," *Talanta* **90**, 30–37 (2012).
22. A. M. Brouwer, "Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution (IUPAC Technical Report)," *Pure Appl. Chem.* **83**(12), 2213–2228 (2011).
23. A. Mandelis, M. Munidasa, and A. Othonos, "Single-ended infrared photothermal radiometric measurement of quantum efficiency and metastable lifetime in solid-state laser materials: The Case of Ruby ($\text{Cr}^{3+}:\text{Al}_2\text{O}_3$)," *IEEE J. Quantum Electron.* **29**(6), 1498–1504 (1993).
24. S. M. Lima, A. A. Andrade, R. Lebullenger, A. C. Hernandez, T. Catunda, and M. L. Baesso, "Multiwavelength thermal lens determination of fluorescence quantum efficiency of solids: Application to Nd^{3+} -doped fluoride glass," *Appl. Phys. Lett.* **78**(21), 3220 (2001).
25. J. Slaby, "Application of spatial filtering in thermal lensing detection," *Opt. Commun.* **64**(2), 89–93 (1987).
26. J. Slaby, "Background illumination filtering in thermal lens spectroscopy," *Anal. Chem.* **61**(22), 2496–2499 (1989).
27. F. Bloisi, L. Vicari, P. Cavaliere, S. Martellucci, and J. Quartieri, "Spatial filtering in the detection of transverse phase modulation through a nonlinear thin film," *Opt. Commun.* **68**(6), 391–395 (1988).
28. T. Xia, D. J. Hagan, M. Sheik-Bahae, and E. W. Van Stryland, "Eclipsing Z-scan measurement of $\lambda/10^4$ wavefront distortion," *Opt. Lett.* **19**(5), 317–319 (1994).
29. A. S. L. Gomes, E. L. Filho, C. B. de Araújo, D. Rativa, and R. E. de Araujo, "Thermally managed eclipse Z-scan," *Opt. Express* **15**(4), 1712–1717 (2007).
30. R. Silva, M. A. C. de Araújo, P. Jali, S. G. C. Moreira, P. Alcantara, Jr., and P. C. de Oliveira, "Thermal lens spectroscopy: Optimizing amplitude and shortening the transient time," *AIP Adv.* **1**(2), 022154 (2011).
31. B. Li and R. Gupta, "Optical saturation in continuous-wave photothermal deflection spectroscopy: quantitative investigation of fundamental and harmonic components," *Appl. Opt.* **40**(9), 1563–1569 (2001).
32. Y. M. Biosca and G. Ramis-Ramos, "Optical saturation thermal lens spectrometry in non-polar solvents," *Anal. Chim. Acta* **345**(1–3), 257–263 (1997).
33. S. E. Bialkowski, A. Chartier "Using slow measurement systems to measure fast excited-state kinetics with nonlinear rate-competitive optical bleaching," in *Photoacoustic and Photothermal Phenomena: Tenth International Conference*, F. Scudieri, M. Bertolotti, eds., AIP Conf. Proc. 463, 14–17 (1999).
34. M. Fischer and J. Georges, "Fluorescence quantum yield of rhodamine 6G in ethanol as a function of concentration using thermal lens spectroscopy," *Chem. Phys. Lett.* **260**(1–2), 115–118 (1996).
35. F. López Arbeloa, P. Ruiz Ojeda, and I. López Arbeloa, "The fluorescence quenching mechanisms of rhodamine 6G in concentrated ethanolic solution," *J. Photochem. Photobiol., A* **45**(3), 313–323 (1988).
36. C. Tolentino Dominguez, E. de Lima, P. C. de Oliveira, and F. López Arbeloa, "Using random laser emission to investigate the bonding energy of laser dyes dimers," *Chem. Phys. Lett.* **464**(4–6), 245–248 (2008).
37. R. F. Kubin and A. N. Fletcher, "Fluorescence quantum yields of some rhodamine dyes," *J. Lumin.* **27**(4), 455–462 (1982).
38. R. M. Negri, A. Zalts, E. A. San Román, P. F. Aramendi, and S. E. Braslavsky, "Carboxylated Zinc-Phthalocyanine, influence of dimerization on the spectroscopy properties. An absorption, emission, and thermal lensing study," *Photochem. Photobiol.* **53**(3), 317–322 (1991).
39. C. V. Bindhu, S. S. Harilal, V. P. N. Nampoori, and C. P. G. Vallabhan, "Solvent effect on absolute fluorescence quantum yield of rhodamine 6G determine using transient thermal lens technique," *Mod. Phys. Lett. B* **13**(16), 563–576 (1999).
40. L. S. Rohwer and J. E. Martin, "Measuring the absolute quantum efficiency of luminescent materials," *J. Lumin.* **115**(3–4), 77–90 (2005).
41. R. R. Hammond, "Selfabsorption of molecular fluorescence, the design of equipment for measurement of fluorescence decay, and the decay times of some laser dyes," *J. Chem. Phys.* **70**(8), 3884–3894 (1979).

1. Introduction

Thermal Lens Spectroscopy (TLS) is a powerful and well-established tool for material characterization. TLS can be applied to the measurement of analyte concentrations [1,2], characterization of trace elements in gases [3], measurement of absolute absorption coefficients [4], and spectrometry for liquid chromatography [5,6]. In particular, TLS has been established as an accurate technique to evaluate quantum yield, diffusivity and thermal conductivity of liquid and transparent solid media [7]. The first reports of the thermal lens

effect were made by Gordon et. al [8] and by Leite et. al [9]. Since then, the TLS experimental configurations have evolved (i) from intra to extra-cavities setups and (ii) from the use a single-beam to a dual-beam excitation-probe detection mode, which is considered to be the most sensitive extra-cavity configuration [10–12].

In the optical characterization of organic laser dyes, η is also an essential parameter on laser threshold determination [13,14]. The fluorescence quantum efficiency is the rate between radiative and nonradiative processes occurring in luminescent materials. The techniques to determine η can be classified into absolute and relative method [14–16]. Earlier quantum yields measurements based mostly in fluorometry were wrong mainly due to lack of care of experimental conditions and suffered from the low resolution of the measuring instruments. Therefore, TLS emerges as a technique which presents more accurate results for η values when compared with methods that directly explore relative and absolute fluorescence analysis [14–18], which involve the characterization of total light emitted by the sample or require comparison between the emission of the unknown and standard sample [15,19–22]. The TLS high sensitivity allows the evaluation of samples with low analyte concentration (10^{-11} mol/L) or with low absorptivities of 10^{-7} cm $^{-1}$ [2,17]. In this sense, the TLS may be 100 times more sensitive than methods that direct explore fluorescence analyses [2]. Using a suitable experimental design, thermal lens techniques can detect variations of the refractive index across the probe beam waist as small as 10^{-8} , which corresponds to temperature variations of 10^{-5} °C in liquids [18]. Other techniques based on thermal processes, as photothermal radiometry [23] and photoacoustic methods [21] can be used to determine the quantum yield of fluorescent materials.

To determine η with the TLS technique, a Gaussian beam from a modulated cw or pulsed laser is focused onto a liquid or solid medium containing fluorophores. After the absorption of the excitation beam, the fluorophores at ground energy state are promoted to higher excited states, from which they decay by radiative and nonradiative processes. The latter process relies on the transference of heat to the host, heating it, and thus leading to a time-dependent transverse spatial profile of the temperature $\Delta T(r,t)$ in the sample. The temperature gradient $\Delta T(r,t)$ creates a refractive index gradient (dn/dT) normal to the beam axis. The resulting gradient (dn/dT) produces a lens-like object, which is known as a thermal lens (TL). The spatial and temporal evolution of $\Delta T(r,t)$ in the medium can be described by the heat transfer equation [8,10,12]. The diffraction theory predicted that when a probe laser beam propagates through the TL, its wavefront changes. A consistent theoretical model for the TL effect based on Fresnel diffraction approximations for excitation-probe configuration was developed by Sheldon et. al [12] for both the mode-matched (also valid for single-beam scheme) and by Shen et. al [11] for mode-mismatched conditions. Equation (1) is the analytical expression for the intensity of probe beam reaching the detector in the mode-mismatched configuration [10].

$$I = I_0 \left[1 - \frac{\theta}{2} \tan^{-1} \left(\frac{2mV}{\left[(1+2m)^2 + V^2 \right] (t_c/2t) + 1 + 2m + V^2} \right) \right]^2, \quad (1)$$

where I_0 is the intensity of the probe beam at $t = 0$, $m = (w_p/w_{ex})^2$, w_p and w_{ex} are the beam waist of probe and excitation beams in the sample, respectively. V is given by:

$$V = z/z_{0p} + (z_{0p}/z_2) \left[1 + (z/z_{0p})^2 \right], \quad (2)$$

where focus of the probe is considered the origin of z -axis. Z and Z_2 represent the sample and the detector positions (see Fig. 1), respectively. Z_{0p} is the probe beam Rayleigh range, t_c is the characteristic heat diffusion time $t_c = \omega_{ex}/4D$, with $D = k/\rho C_p$ as the thermal diffusivity, ρ

is the volumetric density, and C_P is the specific heat of sample. θ is the thermal phase shift, whose amplitude is given by Eq. (3) [10, 17].

$$\theta = -\frac{\varphi P_{abs}}{k\lambda_n} \frac{dn}{dT}, \quad (3)$$

with φ being the fraction of absorbed energy transformed in thermal energy, also called the absolute nonradiative quantum efficiency; λ_p is the probe beam wavelength, κ is the thermal conductivity of solvent, dn/dT is the thermo-optic coefficient, and P_{abs} is the absorbed power from excitation beam, given by $P_{abs} = P_{ex} (1 - e^{-\alpha L})$, where α is the linear optical absorption coefficient at the excitation wavelength (λ_{ex}) and L is the thickness of sample. For nonfluorescent materials, $\varphi = 1$ and for fluorescent materials $\varphi < 1$, with

$$\varphi = 1 - \eta \frac{\lambda_{ex}}{\langle \lambda_{ex} \rangle}, \quad (4)$$

where $\langle \lambda_{em} \rangle = \int \lambda_{em} dN(\lambda_{em}) / \int dN(\lambda_{em})$ is the average emission wavelength and $dN(\lambda_{em})$ is the number of photons emitted per second in an incremental wavelength centered at λ_{em} . Defining $\Theta \equiv -\theta/P_{abs}$ and $\Theta_0 = (dn/dT)/k\lambda_p$ [24], and using Eq. (3) and (4), the expression to fluorescence quantum yield is [16].

$$\eta = \left(1 - \frac{\Theta}{\Theta_0}\right) \frac{\langle \lambda_{em} \rangle}{\lambda_{av}}, \quad (5)$$

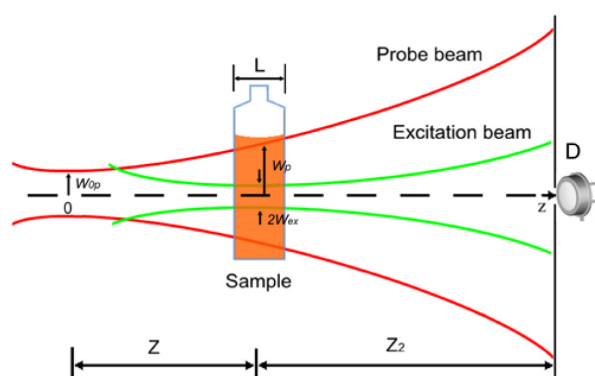


Fig. 1. Scheme of the geometric position of the laser beams in a dual-beam mode-mismatched TL (DTL) configuration.

The use of a spatial filter to increase the TL sensitivity was first proposed by Slaby [25,26] and by Bloisi. et al [27], who observed the enhanced of the S/N ratio of the diffracted beam. The use of a spatial filter was also introduced in the Z-scan technique (Eclipse Z-Scan) to improve the sensitivity in nonlinear refraction measurements [28]. As consequence of the presence of the wavefront spatial filter, the transmitted beam appears like a solar eclipse. In eclipse detection mode, significant intensity changes are expected to be measured in the wings of the transmitted beam rather than near the center [28,29].

In this work, we present a modified detection mode for a single-beam and a mode-mismatched TLS on quantum yield measurements that improves the sensitivity of the technique. The proposed modified setup, detects only the external fraction of the transmitted

beam by blocking the central part using a spatial filter. This mode is referred to as the eclipsing detection mode.

To evaluate the modified system, we measured the fluorescence quantum yield of Rh6G dye molecule in an ethanolic solution and recorded the (S/N) ratio of the detected beam. It is known that, in addition to the background noise own of detector, the spatial noise due the fluctuations of the beam intensity also contributes to the overall background signal. The spatial noise originates from convective motions in the TL region and the laser's instability. If the background signal is large, the detection limit of TLS is reduced and the experimental errors become considerable. We show that the S/N ratio during the measurement of absolute quantum yield of Rh6G can be enhanced up to ~1400% when an eclipsing detection mode is explored in the TLS experimental setup.

From here on, the new methodology will be referred to as Eclipse Thermal Lens (ETL) and S-ETL or D-ETL when a single-beam laser or dual-beam (excitation-probe lasers).

2. Experimental Details

The experimental setup for TLS used to evaluate the quantum yield of Rh6G is shown in Fig. 2. The excitation beam was a modulated frequency-doubled cw Nd:YAG laser (Compass 215M-20; Coherent, Inc.) emitting at 532 nm. The fluorescent samples for TL experiments were ethanolic solutions of Rh6G with concentrations between 10^{-4} and 10^{-7} M. The samples were enclosed into a 1 mm optical length quartz cuvette. Two additional samples for fluorescence characterization were prepared, 5×10^{-4} and 1×10^{-3} M. Both, the Rh6G (dye content 99%) and the ethyl alcohol (puriss. P.A. > 99.8%) were provided by Sigma Aldrich Co., with the Rh6G being used without further purification. The acquisition of absorption spectra was performed using a UV-Vis spectrophotometer model evolution 600 BB (Thermo Scientific Inc.). The emission spectra were acquired by a spectrometer model HR400 (Ocean Optics Inc.). To focus the excitation beam onto the Rh6G samples, spherical lenses were used, with a $f = 10$ cm lens used in the single-beam and a $f = 15$ cm lens used in the mode-mismatched configuration). The excitation beam waist at the sample was ~ 15 μ m in S-ETL and ~ 20 μ m in the D-ETL mode-mismatched configuration. In the D-ETL setup a HeNe laser (632.8 nm) was used as the probe beam. It was focused on the sample in a counter-propagating direction, establishing an angle of $\approx 3.5^\circ$ with the excitation beam. The red laser power at the sample was 1.1 mW. The probe beam diameter at the sample was measured as approximately 56 μ m. A chopper was used to control the excitation the laser exposure time on the sample (duty cycle = 0.05, rotation frequency: 200 Hz for the S-ETL configuration and 20 Hz for the mode-mismatched configuration). The difference in the chopper frequencies implies an increase of an order of magnitude in the transient time of TL signal in the excitation-probe mode mismatched configuration. This longer time to detect of TL signal can be explained as a consequence of how fast the effect is created and how long a measurement is performed. In the conventional single-beam TL the same laser is used to create and measure the TL effect, resulting in characteristic transient time. In the mode-mismatched configuration, the probe's diameter is larger than the excitation beam (2.8, in this experiment), resulting in the increase time needed for the system to reach steady-state [30].

A convergent lens was positioned just after to the wavefront spatial filter to collect and direct the light to the photodetector, allowing for the detection not only of the diffracted beam but also the external part of transmitted beam, increasing the TL signal. The photodetector used to measure the TL signal scanned by both the green and red lasers was a silicon photodiode model BPW21R with spectral response peak at 565 nm, its low performance at 632 nm reduce the sensitivity of the dual-beam TLS technique.

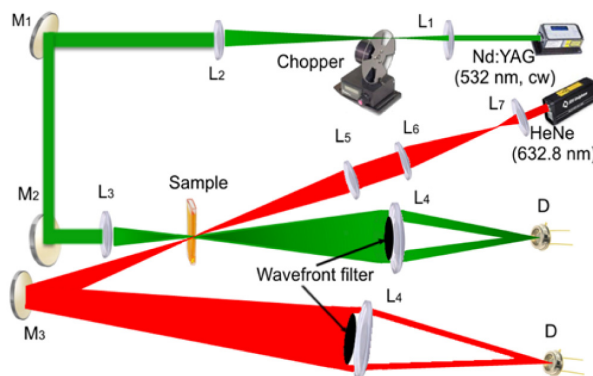


Fig. 2. Experimental setup for S-ETL/D-ETL method. L_1 and L_7 ($f = 3.5$ cm), L_2 ($f = 25$ cm), L_3 and L_4 ($f = 10$ cm), L_5 ($f = 15$ cm), L_6 ($f = 20$ cm) are spherical lens; M_1 , M_2 and M_3 are aluminum mirrors; D is a silicon photodiode.

3. Results and Discussions

3.1. single-beam configuration

We measured the values of η of Rh6G and the S/N ratio of the TL signal using the S-ETL and the traditional single-beam TL methods. Figure 3 shows the transient signals (focal and post-focal) due to the thermal effect in a sample of 10^{-6} M of Rh6G measured using single-beam TLS [Fig. 3(a)] and when a spatial filter was used [Fig. 3(b)]. No averaging was performed on the oscilloscope detected signals. The signal in Fig. 3(b) appears inverted with respect to Fig. 3(a) due to convergent role of lens L_4 . The optical power of excitation beam was 8 mW. The inset in Fig. 3(b) is a digital image of transmitted beam. Comparing Figs. 3(a) and 3(b), clearly, we can observe an enhanced in the S/N ratio when the S-ETL method is used. The S/N ratios were evaluated at a stationary regime ($t = 2.5$ ms). S/N values were measuring assuming different values for the beam waist (at the filter position)/wavefront filter diameter ratio as shown in Table 1. An enhanced of $\sim 300\%$ on the S/N ratio was observed by exploring the S-ETL method when compared with its respective values obtained by the conventional single-beam TL.

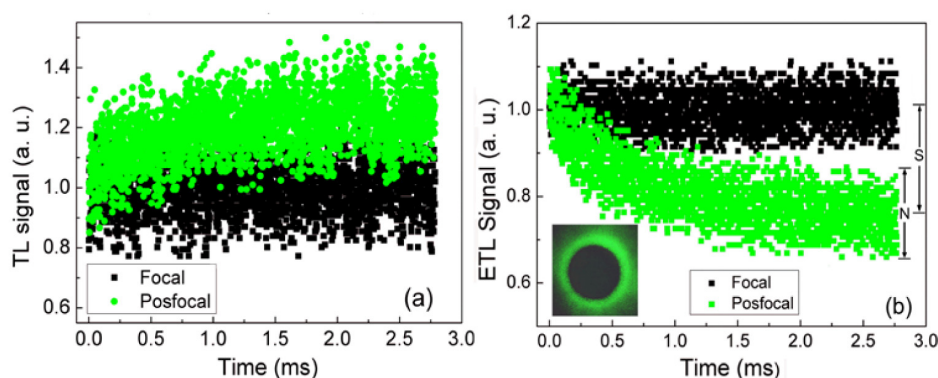


Fig. 3. TL signal from a 10^{-6} M of Rh6G in ethanol solution obtained by (a) single-beam TL and (b) S-ETL methods. The inset image in (b) is a digital image of excitation beam after the wavefront filtering. N and S indicate noise and signal respectively.

Table 1. Signal/noise ratios for three different beam/filter diameters ratio. The Rh6G concentration was 10^{-6} M and the excitation power was 8 mW.

beam/filter (diameters ratio)	signal/noise (ETL)	signal/noise (single-beam TL)	signal/noise (ETL/TL)
1.50	1.38		2.32
1.54	1.74	0.59	2.93
1.56	1.47		2.48

The dependence of η as a function of the excitation power using the S-ETL and the traditional single-beam TL methods was also evaluated. Figure 4(a) shows the excitation power dependence of η , obtained by the S-ETL method, for a 10^{-6} M of Rh6G. No significant change of the fluorescence quantum yield value was observed at excitation powers between 4.2 and 8.0 mW. Below 4.2 mW, the TL signal was not detectable. In this study, the maximum power density of excitation laser was $\sim 11 \times 10^6$ W/m², closed to the value ($\approx 10^6$ W/m²) for optical saturation in the majority of laser dyes [31–33]. The optical saturation produces a nonlinear dependence of TL signal with the excitation power limiting the sensitivity of photothermal effects. To guarantee the sensitivity of TLS in Rh6G solutions is necessary to ensure the full transference of thermal energy from nonradiative decays to the solvent. The TL signal was faint for Rh6G concentrations lower than 10^{-6} M. Table 2 shows the mean values of quantum yield ($\langle\eta\rangle$) obtained considering excitation powers between 4.2 and 8 mW. In Table 2, the $\langle\eta\rangle$ values obtained here, with the S-ETL method, are compared with those reported in the literature using different methods. Table 2 also shows that the measured quantum yield values decrease as concentration of the dye increase. The η dependence with dye concentration can be better observed in Fig. 4(b). A decrease of $\sim 10\%$ in the quantum yield was measured when the Rh6G concentration increase from 10^{-6} M ($\eta \sim 94\%$) to 10^{-4} M ($\eta \sim 84\%$). Evaluating the samples fluorescent spectra, a red shift (up to 12 nm) of the emission peak was observed as the dye concentration increased, which can be attributed to reabsorption of light emitted by monomers and by fluorescents (J-type) and non-fluorescents (H-type) dimers [34–36]. Moreover, considering a dimerization constant for Rh6G in ethanol as $K_d = 0.22$ [35], we estimate that dimers concentration in our most concentrated sample (1×10^{-4} M) was $C_d = 2.2 \times 10^{-9}$ M. Therefore, the observed decrease of the quantum efficiency can be mainly attributed to reabsorption processes of monomers, which are a consequence of the overlaps between absorption and emission spectrum of Rh6G, as discussed in reference [37,38].

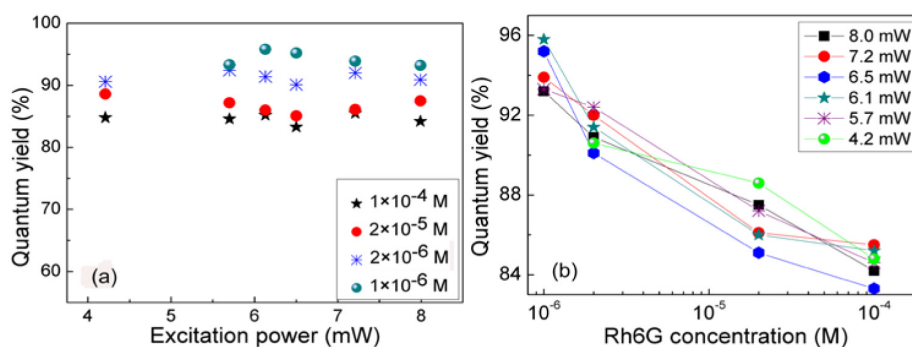


Fig. 4. Fluorescence quantum yield values of Rh6G obtained by S-ETL method as a function of, (a) the excitation power and (b) its molar concentration.

Table 2. Mean values of quantum yield values for different Rh6G concentrations obtained by S-ETL methods.

Rh6G concentration (M)	< η > (%)	
	S-ETL	Other authors (method, solvent)
1×10^{-4}	84	~77 (TL, methanol) [39], 89.5 (integrating sphere, ethanol) [40]
2×10^{-5}	87	~87.5 (integrating sphere, ethanol) [21]
2×10^{-6}	91	~88 (ethanol, integrating sphere) [40]
1×10^{-6}	93	~91 (integrating sphere, ethanol) [21].

3.2. Dual-beam configuration

In this section, the dual-beam mode-mismatched TL (DTL) configuration exploring the eclipse detection mode (D-ETL) is evaluated. Figures 5(a) and 5(b) respectively, show the normalized postfocal TL signal measured with and without the presence of the wavefront spatial filter. No average was performed on the oscilloscope detected signals. A large increment in the TL signal is observed when the eclipse is used. The eclipse detection mode provides 14-fold increase in the ratio S/N of the DTL signal, when the beam excitation power was 9 mW. Table 3 shows the S/N values obtained at different power excitations of the Nd:YAG laser. The Rh6G concentration was 2×10^{-5} M. Note that the ratio S/N is reduced from 14.1 to 11.9 when the power of laser beam was increased from 9 mW (7.2 W/cm^2) to 11 mW (8.8 W/cm^2), due probably to detector saturation.

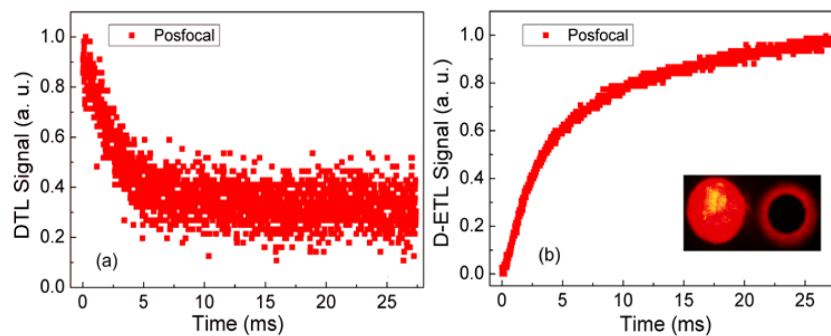


Fig. 5. Normalized TL signal of a HeNe probe beam (632 nm) passing through a sample of 2×10^{-5} M of Rh6G in ethanol solution when excited by 9 mW from a cw Nd:YAG laser (532 nm). Signal obtained using (a) dual-beam mode mismatched TL (DTL) and (b) D-ETL method. The inset image in (b) is a digital image of the probe beam, before and after the wavefront filter.

Table 3. Ratio S/N between the D-ETL and the conventional DTL techniques. The Rh6G concentration was 2×10^{-5} M.

beam/filter (diameters ratio)	Excitation Power (mW)	S/N		
		D-ETL	DTL	D-ETL/DTL
1.54	11.1	23.5	2.0	11.9
	9.0	27.3	1.9	14.1
	7.1	16.3	1.7	9.8
	6.0	15.0	1.5	10.2
	4.2	6.0	1.9	3.2
	3.4	5.4	1.6	3.4
	2.7	4.1	1.1	3.8

The dependence of quantum yield of Rh6G with the dye concentration was also observed using D-ETL. Table 4 shows the medium values of η for different Rh6G concentrations. One can note that η values decrease as the dye concentration increases. Moreover, the obtained values agree very well with those reports by others authors.

Table 4. Mean values of quantum yield values for different Rh6G concentrations obtained by D-ETL method compared with those obtained by other authors

Rh6G concentration (M)	< η > (%)	
	D-ETL	Other authors (method, solvent)
1×10^{-4}	84	~77 (TL, methanol) [39], 89.5 (integrating sphere, ethanol) [40]
2×10^{-5}	87	~87.5 (integrating sphere, ethanol) [21]
2×10^{-6}	91	~88 (ethanol, integrating sphere) [40]
1×10^{-6}	93	~91. (integrating sphere, ethanol) [21],
2×10^{-7}	96	93 (fluorescence, ethanol) [41], 95 (fluorescence, ethanol) [37]

Figure 6(a) and 6(b) show η values for Rh6G versus the excitation power, obtained with and without the use of the wavefront spatial filter, respectively. Note that in the presence of spatial filter, it was possible to measure values to η of samples with concentration of 2×10^{-7} M. Without spatial filter, no η values were obtained for Rh6G concentrations below 10^{-6} M. The comparison between the η values, for concentrations $\sim 10^{-5}$ M, in Fig. 6(a) with those in Fig. 6(b), shows that the greater sensitivity of D-ETL method allows measure η with a laser power 1.6 times lower (2.7 mW) than using S-ETL or single-beam TL method (4.2 mW). Figure 7 shows values of η as a function of Rh6G concentration. Fluorescence quantum yield decrease as the Rh6G concentration increase, as observed in the S-ETL [Fig. 4(b)].

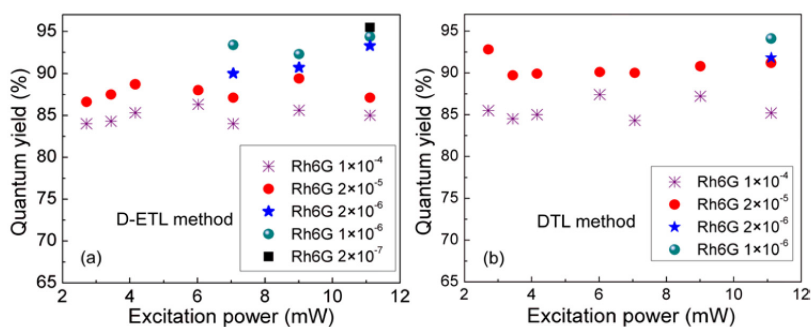


Fig. 6. Fluorescence quantum yield of Rh6G dissolved in ethanol as function of excitation power. Measurements performed (a) with and (b) without a wavefront filter in the dual-beam TL.

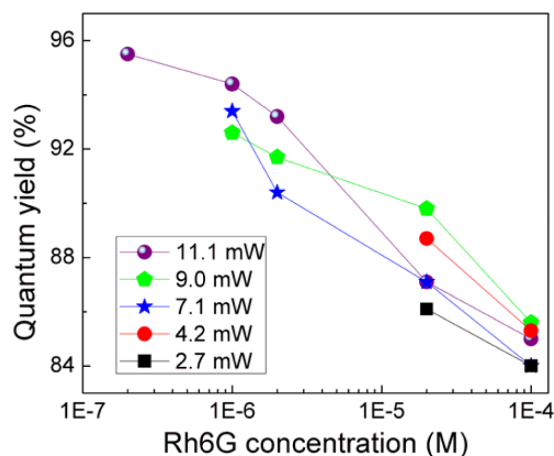


Fig. 7. Fluorescence quantum yield of ethanolic solutions of Rh6G as a function of its molar concentration for different excitation powers measured by D-ETL method.

4. Conclusions

A modified method for thermal lens spectroscopy called of Eclipse Thermal Lens (ETL) was used to measure the quantum yield of Rh6G solution. By using a wavefront spatial filter, the sensitivity in the TL detection was increased by a factor of ~ 3 in the traditional single-beam TL technique and by ~ 14 in the dual-beam mode-mismatched configuration. The larger sensitivity and the low excitation powers required on the presented method allow the evaluation of quantum yield reducing photobleaching and optical saturation effects. Moreover, the TL technique, with the eclipse detection mode, is of special interest for the evaluation of fluorescence quantum yield at low concentration of fluorophore, whose quantum efficiency is large, condition where the thermal effects are not well pronounced, reducing the performance of conventional TL methods.

Acknowledgments

This study was support by CAPES, the Center of Excellence of Nanophotonics and Biophotonics (PRONEX/FACEPE/CNPq), and INCT Fotônica (CNPq).

APÊNDICE B – Artigo Publicado no Journal of Luminescence.

Journal of Luminescence 174 (2016) 17–21



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Luminescence

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jlumin



Full Length Article

A pH dependence study of CdTe quantum dots fluorescence quantum yields using eclipsing thermal lens spectroscopy



C. Estupiñán-López^a, C. Tolentino Dominguez^{a,d}, P.E. Cabral Filho^{a,b}, B.S. Santos^{a,c},
A. Fontes^{a,b,*}, R.E. de Araujo^{a,**}

^a Laboratory of Biomedical Optics and Imaging, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^b Biophysics and Radiobiology Department, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^c Pharmaceutical Sciences Department, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^d Centre for Telecommunication Studies, Pontifical Catholic University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 June 2015

Received in revised form

29 December 2015

Accepted 30 December 2015

Available online 29 January 2016

Keywords:

Quantum dots

Thermal lens

Quantum efficiency

Emission spectroscopy

ABSTRACT

In this study we evaluated the absolute fluorescence quantum yield (Φ) of hydrophilic CdTe QDs in function of different pHs, modified from the alkaline to acid, by using two different chemicals compounds, the mercaptosuccinic acid (MSA—the stabilizing agent of the QDs synthesis) or hydrochloric acid (HCl). The pH control of QDs suspensions is essential for the use of fluorescent nanoparticles in biological systems. We used the eclipsing thermal lens spectroscopy technique to determine the absolute fluorescence quantum yield values. The results showed variations on the Φ values as a function of the pH, which allowed a better understanding of QDs emission characteristics, establishing parameters for their use in biomedical applications such as optical images of biological systems, immunoassays, flow cytometry, biosensors and others.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In life sciences, the development and characterization of new materials are of great importance, specifically those that enable their innovation and improvement for purposes related to biological process comprehension, diagnosis and therapies. In this context, fluorescence based techniques such as microscopy for imaging living cells, tissues and small animals; flow cytometry; fluoroimmunoassay and optical biosensors [1–4], which explore fluorescent probes, have been shown to be important tools to understand biological mechanisms [5]. Fluorescent probes allow the development of fluorescence based assays with high sensibility, which can provide the identification and quantification of biomolecules with high specificity. Among the fluorescent probes, the Quantum Dots (QDs) present valuable advantages, which have allowed us to enjoy the full potential of fluorescence. QDs are fluorescent colloidal nanocrystals composed by semiconductor materials, with dimensions ranging from 2 to 10 nm, which present unique optical properties, as: (1) broad absorption bands,

allowing the excitation of multiple QDs' colors by a single light source. This advantage is also interesting for experiments with QDs as FRET (Forster Resonance Energy Transfer) donors for minimizing the possibility of direct excitation of the acceptor [6]; (2) high resistance to photobleaching, approximately 100 times higher than organic fluorophores, allowing to follow in time several long and lasting biological processes, and (3) narrow emission spectra, permitting multiplex analysis [7–9]. Due to these special properties, QDs have been applied as fluorescent probes for molecular, cellular and *in vivo* imaging; cytometry and fluoroimmunoassays; for biosensors and also, more recently, as photosensitizers in photodynamic therapy (PDT) [10].

QDs have a complex structure where the core, responsible for the fluorescence emission, is coated with a passivation layer that offers the photostability and provides the quality of the emission of these nanocrystals. Besides, hydrophilic QDs present a functionalization layer conferred by the stabilizing agents that contains chemical functional groups, which also allow QDs conjugation with biomolecules. The bioconjugation provides specificity to the optical fluorescence techniques, leading to particular interactions between QDs and biological systems. The conjugation can be performed by adsorption or by covalent bound. In order to apply bare QDs or conjugated QDs, it is always required adjustments of physical and chemical conditions, as temperature and pH, in order to have nanocrystals suspensions appropriated for biological applications [11]. It is known that these adjustments, especially for

* Correspondence to: Departamento de Biofísica e Radiobiologia, CCB, UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

** Correspondence to: Departamento de Eletrônica e Sistemas, Centro de Tecnologia, UFPE, R. Acadêmico Hélio Ramos, s/n, 50740-530 Recife, PE, Brazil.

E-mail addresses: adriana.fontes.biofisica@gmail.com (A. Fontes), renato.earaujo@ufpe.br (R.E. de Araujo).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jlumin.2015.12.052>

0022-2313/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

conjugation, can modify the fluorescence efficiency of these nanocrystals [12]. These changes can be quantified by absolute fluorescence quantum yield (Φ) measurements, which evaluate the efficiency of fluorophores to emit radiation [13].

Fluorescence quantum yield is defined as the ratio of the number of emitted photons by the number of absorbed photons by a fluorophore. There are still few works that evaluate changes in absolute quantum yields and they are usually related to hydrophobic QDs [14,15]. Moreover, different techniques have been explored to measure fluorescence quantum yield. These techniques can be classified into absolute and relative method [15,16]. Briefly, relative techniques, that compare fluorescence emission spectra, use reference materials with known quantum yield values to quantify the fluorescence efficiency of a new sample. The need for reference materials limits the use of relative methods. Besides, absolute methods, exploring integrated sphere or thermal lens spectroscopy (TLS), can directly provide quantum yield quantification without the use of standard samples. In particular, TLS emerges as a technique which presents more accurate results for Φ values when compared with methods that directly explore relative and absolute fluorescence analyses [16,17].

This study aimed to evaluate the absolute fluorescence quantum yield of Cadmium Telluride (CdTe) QDs, synthesized in aqueous medium, according to different pHs adjusted by the addition of mercaptosuccinic acid (MSA) or hydrochloric acid (HCl), which are two chemical compounds usually explored on the pH control of QDs suspensions [18,19]. For example, the pH of hydrophilic QDs soon after the synthesis is usually around 10.0, the pH of biological samples is around 7.0 and the pH to perform covalent conjugation by using the most applied coupling agents, EDC and Sulfo – NHS (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide and N-hydroxysulfosuccinimide sodium salt), is around 6.0 [20]. CdTe QDs are the most used hydrophilic nanocrystals for biological applications.

In order to calculate the Φ values for the samples, we used the thermal lens (TL) spectroscopy in single-beam configuration and eclipsing mode detection (S-ETL), which joins the higher sensitivity of the eclipsing mode (when compared to conventional TL modes) with the more accurate results of Φ provided by TL techniques (when compared to other methods that explore relative and absolute fluorescence analysis) [21,22]. These results can provide a better understanding of processes that modify the QDs' emission characteristics, when the pH values of the suspension is changed, helping to establish parameters and specific limits for improving their applications in life sciences.

2. Experimental procedures

2.1. Samples preparation

CdTe QDs were synthesized in aqueous medium with adaptations of the method described by Andrade and co-authors [19]. Briefly, QDs were prepared by adding reduced tellurium, Te^{2-} , in a solution containing $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ (cadmium perchlorate) at pH > 10 in the presence of MSA, which acts as stabilizing and functionalizing agent, in a molar ratio of 5:1:6.0 Cd:Te:MSA. The reaction proceeded for 5 h at 80 °C, in inert atmosphere and under constant stirring. All reagents were obtained from Sigma Aldrich. The Te^{2-} aqueous solution was prepared by reducing metallic tellurium with NaBH_4 at a high pH (using 100 μL of NaOH, 2 mol L^{-1}), also under heating and in inert nitrogen atmosphere. Finally, the suspension was diluted in a proportion of 1:6 (QDs:Water – v/v), resulting in samples with a final pH=10.3 and absorbance less than 0.1 at the wavelength of 532 nm.

Two groups of samples were prepared. A first group with the pHs adjusted by the addition of the stabilizing agent, MSA (4.9%), obtaining samples with pHs: 9.8; 9.1; 8.4; 7.3; 6.2 and 5.3. A second group of samples with pHs: 9.8; 9.1; 8.4 and 8.0, with values adjusted using HCl (1 mol L^{-1}). All samples were prepared to reach equal molar concentrations, and therefore the samples absorbance remains the same for all pH values. All samples were prepared and analyzed in quintuplicate, for each pH suspension.

2.2. Thermal lens spectroscopy

When a laser beam travels through an absorbing sample, the illuminate region suffers a local increase of its temperature, which is generated by energy absorption followed by a non-radiative energy decay in the material. The last process produces a sample heating that in turn induces localized changes in its refractive index (n). The localized changes in n result on an optical lens behavior of the sample, known as thermal lens (TL) effect [13,23].

In order to create the TL effect, the light from a Gaussian beam laser is focused on an absorbing sample and the temporal intensity dynamics of the transmitted beam is evaluated. The most acceptable theoretical model that explains the TL effect in a single-beam configuration is based on a Gaussian beam propagation theory and Fresnel diffraction. The model was developed by Sheldon and collaborators [24]. The analytical expression for the temporal behavior of the intensity of transmitted beam is:

$$I = I_0 \left[1 - \frac{\theta}{2} \tan^{-1} \left(\frac{2V}{[9 + V^2] \left(\frac{t_c}{2t} \right) + 3 + V^2} \right) \right]^2 \quad (1)$$

where I_0 is the beam intensity at $t=0$, θ is the thermal phase shift and V is given by

$$V = \frac{z}{z_R} + \left(\frac{z_R}{z_2} \right) \left[1 + \left(\frac{z}{z_R} \right)^2 \right] \quad (2)$$

Considering the position of the beam waist as the origin of the z coordinate, z is the position of the sample and z_2 is the distance of the sample to the photodetector; z_R is the Rayleigh length; t_c is the characteristic heat diffusion time, given by $t_c = \omega_{ex}/4D$, being $D = \kappa/\rho C_p$ the thermal diffusivity, ρ is the volumetric density and C_p the specific heat of the sample and ω_{ex} the excitation beam waist.

The amplitude of θ , in Eq. (1), is determined from Eq. 3:

$$\theta = - \frac{\phi P_{abs}}{k \lambda_{ex}} \frac{dn}{dT} \quad (3)$$

being ϕ the fraction of absorbed energy converted in thermal energy, also called absolute nonradiative quantum yield; λ_{ex} is the excitation wavelength; κ is the thermal conductivity of solvent; dn/dT the thermo-optic coefficient and P_{abs} is the laser power absorbed by the sample, which is obtained from $P_{abs} = P_{ex} (1 - e^{-\alpha L})$, α is the linear absorption coefficient at the excitation wavelength (λ_{ex}), P_{ex} the incident excitation power and L is the optical path length of the sample.

The nonradiative quantum yield, ϕ , for fluorescent materials is given by.

$$\phi = 1 - \Phi \frac{\lambda_{ex}}{\lambda_{em}} \quad (4)$$

Thus, the Φ of the sample can be obtained analyzing the temporal dynamics of the laser beam that passes through the sample, determining the power absorbed (P_{abs}) and by using Eqs. (1), (3) and (4).

2.3. Experimental set-up

QDs suspensions were characterized by UV–vis electronic absorption spectroscopy (Shimadzu, model 1800 UV–vis). After the pH adjustment, the emission spectra for all QDs systems were immediately obtained using $\lambda_{exc}=532$ nm, excitation slit of 15 nm and emission slit of 2.5 nm, in a fluorescence spectrofluorometer (PerkinElmer, LS55).

The experimental scheme to evaluate the quantum yield of the CdTe nanostructures is shown in Fig. 1. Single beam eclipse TL was explored due to its high sensitivity and set-up simplicity. As excitation source it was used a CW laser (Nd: YAG; Compass 215M-20, Coherent Inc.) emitting at 532 nm. QDs suspensions were placed in a glass cuvette with $L=1$ mm. A lens (L_3 in Fig. 1) of 10 cm of focal length was used to focus the laser beam on the sample. A chopper was used to control the laser exposure time on the sample (duty cycle=0.05, frequency=110 Hz). An opaque circular mask blocking the central region of the propagating beam was placed between the sample and the detector to increase the sensitivity of the TL technique [21]. The incident laser power on the samples was maintained in 9 mW, the spot size of the incident laser beam (ω_{ex}) was 5 mm, the Rayleigh length (z_R) was 1.1 mm and the detector was placed 65 cm (z_2) from the sample, and that sample was placed at $z\sim 1.16$ mm. Typical values for the parameters dn/dT , C_p , κ and ρ can be found in the literature [25].

3. Results and discussions

Fig. 2 shows the absorption spectra of the CdTe QDs suspension used in the experiments at the original pH of 10.3. One can observe the first absorption peak at about 552 nm, indicating an average diameter of approximately 3 nm for the nanoparticles [26,27]. Furthermore using the Beer–Lambert equation and molar coefficient extinction proposed by Yu et al. [28], it was estimated the QDs concentration as $4.8 \mu\text{mol L}^{-1}$ for the original suspension. After dilution in water at 1:6 (v/v), the final concentration used in

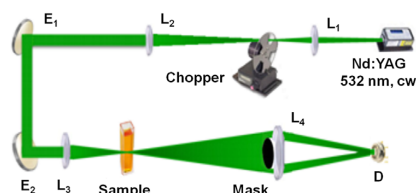


Fig. 1. Experimental scheme of the thermal lens arrangement in the eclipsing mode. L_1 , L_2 , L_3 and L_4 are biconvex lenses; M_1 , M_2 are aluminum mirrors; D is the photodetector, the black circle represents a spatial mask.

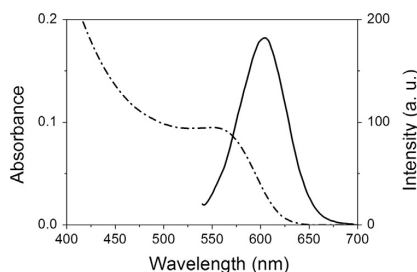


Fig. 2. Absorption (dashed line) and emission (full line) spectrum of CdTe QDs suspension. $\lambda_{exc}=532$ nm.

the experiments was $0.8 \mu\text{mol L}^{-1}$. The adjustment of the pHs, by using HCl or MSA, did not change the absorption spectra.

The QDs maximum emission peak was about 604 nm at original alkaline pH and the full width half maximum (FWHM) was approximately 58 nm, at $\lambda_{exc}=532$ nm. Fig. 3 shows the emission spectra of the QD suspension with different pH values. When HCl was applied on the sample pH adjustment (see Fig. 3a) a significant change on the QDs emission was observed. By lowering the sample pH, from 10.3 to 7.9, with HCl an 8.7 times reduction of the emission peak was observed (Fig. 3a). Fig. 3b shows the QD emission spectrum for two different pH obtained using MSA. One can observe a slightly change of the spectrum peak intensity and a blue shift, about 7 nm, probably indicating an improvement of the QDs passivation layer.

The analyses of the fluorescence emission spectra showed that adjustments on the pH of QDs suspensions induce changes on the fluorescence properties of the nanostructures. Fig. 4 shows the behavior of the integrated emission intensity (that is proportional to quantum yield) for samples with pH adjusted by MSA and HCl. When the suspension pH was reduced by using HCl, we observed a decrease on the QDs emission intensity. In Fig. 4 one can identify a decrease about 7.5 times of the QDs emission, when the pH was changed from 10.3 to 7.9 for HCl samples. Moreover, when the pH was adjusted to a value smaller than 7.9 with HCl, the QDs suspension precipitated. Two main processes are accounted for this observation: the increase in the acid solution, by adding H^+ ions, which induces the removal of the nanocrystals stabilizing/passivation layer (1) and decreases the negative charge of QDs surface (2). By lowering the sample pH using MSA, the integrated emission intensity of the QDs suspension increased.

On the evaluation of the fluorescence quantum yield, the eclipsing TL spectroscopy was explored. Fig. 5 shows a typical result obtained by the thermal-lens technique. In Fig. 5 one can observe a temporal behavior of the collected light on the TL experimental arrangement. The transient behavior of the light intensity reaching the photodetector indicates the shaping of the thermal lens in the sample. The red curve represents the theoretical fit adjusted to the experimental data, by using the Eq. (1). With the theoretical fit adjustment we were able to obtain a fluorescence quantum yield value for all samples used.

Fig. 6 shows the variation of quantum yield values when the pH was adjusted with MSA (stars) or HCl (circles). By adding MSA to the sample, Φ changes from $\sim 62\%$ to $\sim 68\%$ were obtained with pHs going from 7.3 to 5.0. When the MSA was used, the QD passivation layer was improved. MSA participate actively in the formation of this layer, by the association of thiol groups on the nanocrystals surface, minimizing the defects related with unpaired Cd^{2+} ions. Furthermore, using the MSA solution to pH adjustment the samples remained stable and without precipitation. The fluorescence quantum yield values present an uncertainty of approximately 5%, rising mainly from the fitting adjustment of Eq. (1) on the TL experimental curves. A $\sim 10\%$ change was also observed by evaluating the integrated emission intensity, for the same pH range. Moreover, suspensions with pH higher than 7.5 are less fluorescent. MSA samples with high pH are expected to contain emitting and non-emitting nanocrystals and therefore the Φ values presented are smaller ($\sim 50\%$). In this case, for non-homogeneous samples, the values of Fig. 6 should be considered as collective scale Φ , rather than an individual quantum yield, due to the TL spectroscopy limitations. TL spectroscopy and fluorescent intensity analysis techniques are more appropriated for homogeneous samples [29].

When the samples pHs were changed using HCl, the Φ values decreased. Pilla et al. reported similar behavior using hydrophobic re-dispersed CdSe/ZnS QDs [14]. By adding HCl for pH adjustment, stronger population inhomogeneities, consisted by the presence of

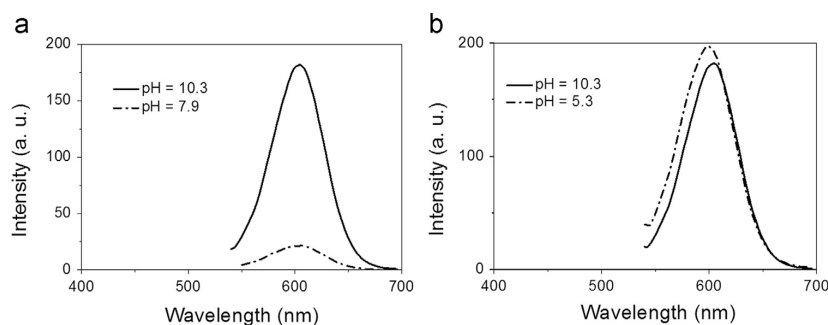


Fig. 3. Emission spectrum of CdTe QDs with pH adjusted with (a) HCl and (b) MSA. The excitation wavelength was 532 nm.

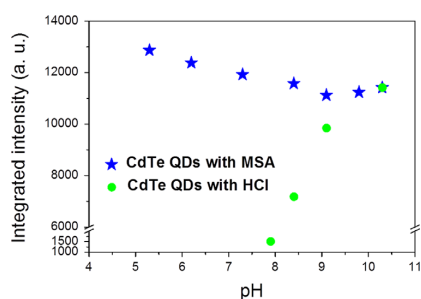


Fig. 4. Integrated emission intensity of QD suspensions with pH adjusted with MSA (stars) and HCl (circles).

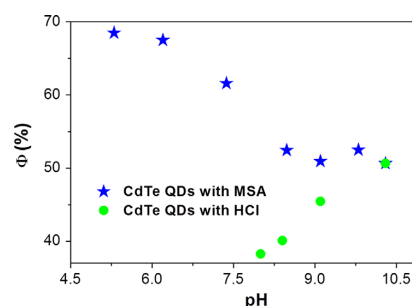


Fig. 6. Quantum yield of CdTe QDs whose pH was adjusted with MSA (stars) or HCl (circles).

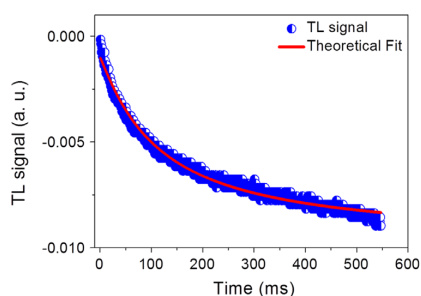


Fig. 5. TL signal (blue curve) and theoretical fit (red line) for CdTe QDs at the pH=10.3. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

higher amounts of low fluorescent as well as non-fluorescent nanocrystals, can be achieved. Moreover samples, adjusted with HCl and with pH equal or lower than 7.9, showed flocculation and phase separation one day after the pH adjustment. This behavior is attributed probably to the removal or degradation of the QDs stabilizing/passivation layer by the HCl, and consequently defects on the surface was exposed, reducing the efficiency of the electron-hole recombination and also the suspension stability. Therefore, for those inhomogeneous samples, the fluorescence intensity method and TL spectroscopy are limited showing a high discrepancy in their results (Figs. 6 and 4).

4. Conclusions

It is well known the expanding use of QDs in biological applications. When these nanocrystals are applied in biological systems a special care must be taken to the experimental procedures performed on

different pH regimes of the original systems (usually obtained and kept at pH > 10 for hydrophilic procedures). A neutral pH (close to the physiological) or acid pH (for bioconjugation) will be imposed to the nanocrystals suspension and their optical properties may vary greatly from their original description. We observed significant changes on the fluorescence quantum yield of CdTe QDs by adjusting the suspension pH using HCl or MSA. The absolute quantum yield of CdTe QDs was measured using the TL technique in the eclipsing mode and the QDs fluorescence spectra were also analyzed. We showed that stabilizing agents should be preferred for adjusting the pH QDs suspensions, leading to a stable suspension with a high quantum yield. Moreover, the results allow a better understanding of the pH effects on the emission characteristics of QDs, establishing parameters for their use in biomedical applications.

Acknowledgments

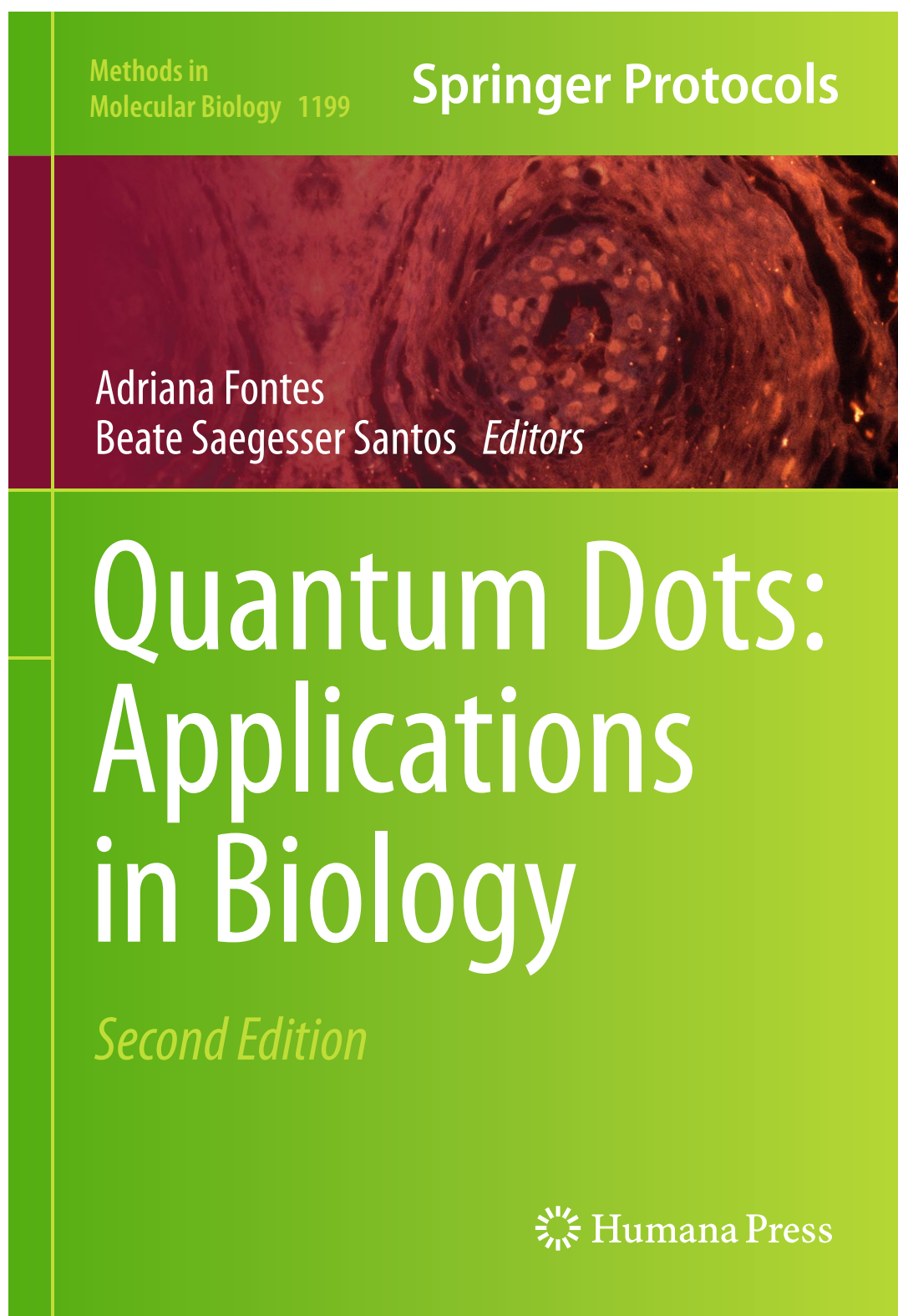
Authors are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) for financial supports and student fellowships. We are also grateful to the National Institute of Science in Photonics (INFo) for financial resources.

References

- [1] A.M. De Grand, J.V. Frangioni, *Technol. Cancer Res. Treat.* 2 (2003) 553.
- [2] C. Szymanski, H. Yi, J. Liu, E. Wright, C. Payne, Imaging intracellular quantum dots: fluorescence microscopy and transmission electron microscopy, in: S. J. Rosenthal, D.W. Wright (Eds.), *NanoBiotechnology Protocols*, Humana Press, New York, 2013, pp. 21–33.
- [3] M.R. Loken, A.M. Stall, *J. Immunol. Methods* 50 (1982) R85.
- [4] S.A. Khan, G.T. Smith, F. Seo, A.K. Ellerbee, *Biosens. Bioelectron.* 64 (2015) 30.

- [5] T.J. Deerinck, *Toxicol. Pathol.* 36 (2008) 112.
- [6] I.L. Medintz, H. Mattoussi, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 11 (2009) 17.
- [7] A. Sukhanova, I. Nabiev, *Expert Opin. Med. Diagn.* 2 (2008) 429.
- [8] X. Michalet, F.F. Pinaud, L.A. Bentolila, J.M. Tsay, S. Doose, J.J. Li, G. Sundaresan, A.M. Wu, S.S. Gambhir, S. Weiss, *Science* 307 (2005) 538.
- [9] I.L. Medintz, H.T. Uyeda, E.R. Goldman, H. Mattoussi, *Nat. Mater.* 4 (2005) 435.
- [10] S. Shukla, *Adv. Mater. Rev.* 1 (2014) 10.
- [11] P. Guo, C. Wei, *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 1 (2005) 122.
- [12] Y. Zhang, T.-H. Wang, *Theranostics* 2 (2012) 631.
- [13] J.H. Brannon, D. Magde, *J. Phys. Chem.* 82 (1978) 705.
- [14] V. Pilla, L.P. Alves, J.F. de Santana, L.G. da Silva, R. Ruggiero, E. Munin, *J. Appl. Phys.* 112 (2012) 104704.
- [15] R.A. Cruz, V. Pilla, T. Catunda, *J. Appl. Phys.* 107 (2010) 083504.
- [16] G.A. Crosby, J.N. Demas, *J. Phys. Chem.* 75 (1971) 991.
- [17] C. Würth, M. Grabolle, J. Pauli, M. Spieles, U. Resch-Genger, *Anal. Chem.* 83 (2011) 3431.
- [18] R.B. Lira, A.T. de Sales Neto, K.K.H.G. Carvalho, E.S. Leite, J.A.G. Brasil, D.P.L. Azevedo, P.E. Cabral Filho, M.B. Cavalcanti, A.J. Amaral, P.M.A. Farias, B.S. Santos, A. Fontes, *Biocompatible water soluble quantum dots as new biophotonic tools for hematologic cells: applications for flow cell cytometry*, in: 2010, pp. 75750P-75750P-75755.
- [19] C.G. Andrade, P.E. Cabral Filho, D.P.L. Tenório, B.S. Santos, E.I.C. Beltrão, A. Fontes, L.B. Carvalho, *Int. J. Nanomed.* 8 (2013) 4623.
- [20] G.T. Hermanson, Chapter 3-zero-length crosslinkers, in: G.T. Hermanson (Ed.), *Bioconjugate Techniques*, second ed., Academic Press, New York, 2008, pp. 213–233.
- [21] C. Estupiñán-López, C.T. Dominguez, R. de Araujo, *Opt. Express* 21 (2013) 18592.
- [22] R.D. Snook, R.D. Lowe, *Analyst* 120 (1995) 2051.
- [23] C. Hu, J.R. Whinnery, *Appl. Opt.* 12 (1973) 72.
- [24] S. Sheldon, L. Knight, J. Thorne, *Appl. Opt.* 21 (1982) 1663.
- [25] C. Estupiñán-López, C.T. Dominguez, P.E. Cabral Filho, A. Fontes, R.E. de Araujo, *Quantum Dots Fluorescence Quantum Yield Measured by Thermal Lens Spectroscopy. Quantum Dots: Applications in Biology*, in: Springer, New York, 2014, pp. 93–101.
- [26] A.L. Rogach, T. Franzl, T.A. Klar, J. Feldmann, N. Gaponik, V. Lesnyak, A. Shavel, A. Eychmüller, Y.P. Rakovich, J.F. Donegan, *J. Phys. Chem. C* 111 (2007) 14628.
- [27] P. Dagtepe, V. Chikan, J. Jasinski, V.J. Leppert, *J. Phys. Chem. C* 111 (2007) 14977.
- [28] W.W. Yu, L. Qu, W. Guo, X. Peng, *Chem. Mater.* 15 (2003) 2854.
- [29] J. Laverdant, W.D. de Marillac, C. Barthou, V.D. Chinh, C. Schwob, L. Coolen, P. Benalloul, P.T. Nga, A. Maître, *Materials* 4 (2011) 1182.

APÊNDICE C – Capítulo de Livro.



Chapter 7

Quantum Dots Fluorescence Quantum Yield Measured by Thermal Lens Spectroscopy

Carlos Estupiñán-López, Christian Tolentino Dominguez,
Paulo E. Cabral Filho, Adriana Fontes, and Renato E. de Araujo

Abstract

An essential parameter to evaluate the light emission properties of fluorophores is the fluorescence quantum yield, which quantify the conversion efficiency of absorbed photons to emitted photons. We detail here an alternative nonfluorescent method to determine the absolute fluorescence quantum yield of quantum dots (QDs). The method is based in the so-called Thermal Lens Spectroscopy (TLS) technique, which consists on the evaluation of refractive index gradient thermally induced in the fluorescent material by the absorption of light. Aqueous dispersion carboxyl-coated cadmium telluride (CdTe) QDs samples were used to demonstrate the Thermal Lens Spectroscopy technical procedure.

Key words Quantum dots, Fluorescence, Quantum yield, Thermal lens, Optical properties

1 Introduction

During the last two decades, thanks to the progress in wet chemistry, highly luminescent semiconductor nanocrystals or quantum dots (QDs) have been achieved [1, 2], then, in order to evaluate the application and validation of new fluorophores for applications in life and material science, a complete spectroscopic characterization is requires. In this sense, an essential parameter in the comparison and in the determination of the optical quality of QDs is the fluorescence quantum yield or quantum efficiency (Φ_f) [3–5]. For example, the optical properties of QDs are dependent of its size and physicochemical properties [6], and therefore a realistic knowledge of Φ_f allows optimize the synthesis parameters of these functional fluorophores. The fluorescence quantum efficiency is defined as the ratio of the number of emitted photons divided by the number of absorbed photons occurring into luminescent materials. From Φ_f it is possible to determine the analytical sensitivity from the fluorophore side using the expression

$B = \Phi_f \times \varepsilon(\lambda_{\text{ex}})$, where B is the fluorophore's brightness and $\varepsilon(\lambda_{\text{ex}})$ is the molar absorption coefficient at the excitation wavelength. Φ_f also is important for the calculation of the efficiencies of fluorescence resonance energy transfer (FRET) processes [7].

Different techniques have been used to measure this quantity, depending on whether the fluorophore is in solution or in solid phase. These techniques can be classified into absolute and relative method [8–10]. Earlier quantum yields measurements based mostly in fluorometric methods were wrong mainly due to lack of care on the experimental conditions and suffered from the low resolution of the measuring instruments, as review by Demas and Crosby [8]. In that context, Thermal Lens Spectroscopy (TLS) emerges as a technique that presents more accurate results for Φ_f measurements when compared with methods that directly explore relative and absolute fluorescence analysis [8–12], which require an accurate measure of total light emitted by the sample or involve a careful comparison between the emission of the unknown and standard sample [9, 13–16]. Lens Spectroscopy was introduced by Gordon et al. [17] and by Leite et al. [18] in 1960s, and since then it has been established as a powerful tool for material characterization. In recent years, TLS technique has been used to evaluate fluorescence quantum yield, diffusivity, and thermal conductivity of liquid and transparent solid media showing precision and high sensitivity [19, 20], for scattering samples other techniques are recommended (*see Note 1*).

The TL method is based on the principle of energy conservation. So if P_{in} and P_{out} are the incident and transmitted power of excitation beam, respectively, then the absorbed power P_{abs} is the sum of the luminescence emission power P_L and the thermal power transformed to heat P_{th} , consequently

$$P_{\text{in}} = P_{\text{out}} + P_L + P_{\text{th}} = P_{\text{out}} + P_{\text{abs}} \quad (1)$$

Defining the transmission ratio $T = P_{\text{out}}/P_{\text{in}}$ and the absorbance $A = 1 - T$. The absorbed power is given by

$$AP_{\text{in}} = P_{\text{abs}} \quad (2)$$

In order to measure Φ_f using the TLS technique, a modulated Gaussian laser beam is focused onto a host containing fluorophores and the transmitted light, at the center of the beam profile, is detected in the far-field. By absorption of the excitation laser beam, the fluorophores at ground energy state are promoted to excited states, from which they decay by radiative and nonradiative processes. The latter process relies on the transference of heat to the host, heating it, and thus leading to a time-dependent transverse spatial profile of the temperature $\Delta T(r, t)$ in the sample, creating a refractive index gradient (dn/dT) normal to the beam axis.

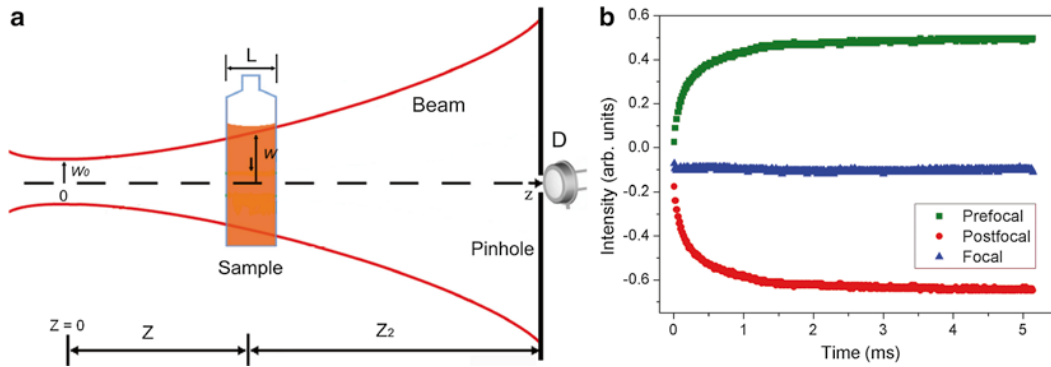


Fig. 1 (a) Scheme of the geometric position of the excitation beam for quantum yield measurement using TLS, D is a photodetector, w_0 the beam waist, and L the sample thickness. (b) TLS signal evolution for sample at the prefocal, focal, and postfocal position

It produces a lens-like object, the so-called thermal lens effect [20]. The thermal lens evolution as a function of time can be evaluated by monitoring the light intensity measured by the far-field photodetector (Fig. 1a). A typical signature of the TLS signal, measured with an oscilloscope, is presented in Fig. 1b, with the sample at positions $z \approx -z_R$ (prefocal), $z = 0$ (focal), and $z \approx z_R$ (postfocal). Here z_R is the Rayleigh length (*see* Note 2).

The analytical expression for the time dependence of the light beam reaching the detector is shown in Eq. 3 [21].

$$I = I_0 \left[1 - \frac{\theta}{2} \tan^{-1} \left(\frac{2V}{[9 + V^2](t_c/2t) + 3 + V^2} \right) \right]^2 \quad (3)$$

where I_0 is the intensity of the beam at $t=0$. V is given by:

$$V = z/z_R + (z_R/z_2) \left[1 + (z/z_R)^2 \right] \quad (4)$$

Where the focus of the excitation beam is considered the origin of z -axis ($z=0$). The parameters z and z_2 represent the sample and the photodetector positions (Fig. 1a), respectively. t_c is the characteristic heat diffusion time given by $t_c = w_{ex}^2/4D$, with $D = (k/\rho) C_p$ as the thermal diffusivity, ρ is the volumetric density, and C_p is the specific heat of sample and w_{ex} is the excitation beam radius measured at the sample position. Typical values for these parameters can be found in the literature for different solvents (Table 1). The parameter θ is the thermal phase shift.

The thermal phase shift can be obtained by fitting the experimental result with Eq. 3. Moreover the thermal phase shift, θ , can be associated to the fraction of absorbed light energy transformed

Table 1
Physical parameters for some solvents

Sample	$-dn/dT \times 10^{-4} \text{ (K}^{-1}\text{)}$	$C_p \text{ (kJ/kg K)}$	$\kappa \text{ (W/m K)}$	$\rho \text{ (kg/m}^3\text{)}$
Water	0.8 [21]	4.18 [25]	0.609 [24]	995.7 [22]
Ethanol	3.9 [21]	2.46 [26]	0.171 [24]	785.1 [23]
Methanol	3.9 [21]	2.53 [27]	0.202 [24]	786.5 [23]

in thermal energy, also called the absolute nonradiative quantum efficiency, φ , as shows Eq. 5 [11, 28].

$$\theta = -\frac{\varphi P_{abs}}{\kappa \lambda_{ex}} \frac{dn}{dT}, \quad (5)$$

where λ_{ex} is the excitation beam wavelength, κ is the thermal conductivity of solvent, dn/dT is the thermo-optic coefficient of solvent and P_{abs} is the absorbed power from excitation beam, given by $P_{abs} = P_{in} (1 - e^{-\alpha L})$, where P_{in} is the excitation power, α is the linear optical absorption coefficient at the excitation wavelength, and L is the thickness of sample. In the TL experiment P_{abs} can be calculated directly measuring P_{in} and P_{out} e using Eq. 1 (see **Note 3**). Typical values for κ and dn/dT are shown in Table 1.

For nonfluorescent materials, $\varphi = 1$ and for fluorescent materials $\varphi < 1$. Fluorescence quantum yield and the absolute nonradiative quantum efficiency are related by Eq. 6.

$$\varphi = 1 - \Phi_f \frac{\lambda_{ex}}{\langle \lambda_{em} \rangle} \quad (6)$$

Where $\langle \lambda_{em} \rangle = \int \lambda_{em} dN(\lambda_{em}) / \int dN(\lambda_{em})$ is the average emission wavelength and $dN(\lambda_{em})$ is the number of photons emitted per second in an incremental wavelength centered at λ_{em} . Therefore, fluorescence quantum yield can be determined by monitoring the thermal lens evolution in the sample. Figure 2 shows the theoretical fit of Eqs. 3 and 4 adjust to postfocal TL signal obtained for CdTe QDs aqueous suspension, synthesized using the method reported in the literature [29, 30].

From the fit adjustment, the thermal phase shift (θ) was calculated, and using Eqs. 5 and 6, the fluorescence quantum yield of CdTe QDs was determined. In Table 2 the calculated quantum yield for two CdTe QDs samples are shown.

It is important to be aware that reabsorption processes due to the superposition between the absorption spectra and emission spectra in more concentrated samples can change the measured Φ_f value (see **Note 4**). Excitation wavelength, sample pH, thermal conductivity of solvent are also relevant parameters for the fluorescence quantum yield determination.

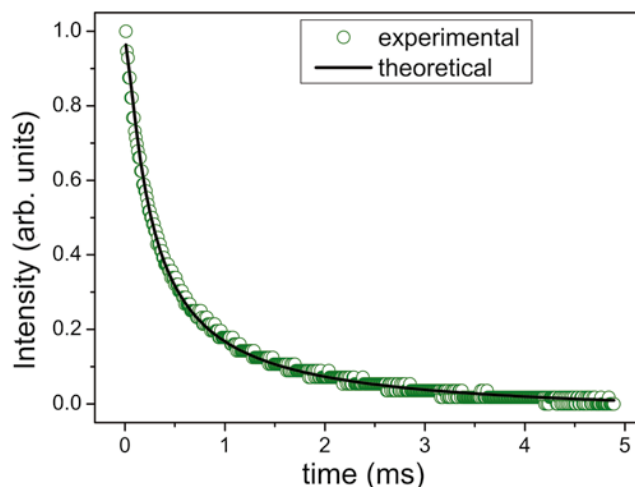


Fig. 2 Theoretical fit of Eq. 1 adjusted to postfocal TL signal of a CdTe QDs sample excited with $\lambda_{\text{ex}} = 532$ nm

Table 2

Mean values for fluorescence quantum yield ($\langle\Phi_f\rangle$) of CdTe QDs measured using TLS. Other important values are also listed

Sample	Absorbance	P_{in}^a (mW)	P_{out}^b (mW)	$\langle\lambda_{em}\rangle$ (nm)	$\langle\Phi_f\rangle$ (%)	σ^c (%)
S1	0.68	11.7	9.9	547.7	71.1	4.5
S2	0.07	11.8	10.9	538.6	89.0	3.5

^a P_{in} is the laser power before the sample

^b P_{out} is the laser power after the sample

^c σ is the standard deviation

2 Materials

Typical TLS experimental setup/materials to measure fluorescence quantum yield is shown in Fig. 3.

1. UV-Vis spectrophotometer for absorbance measurements (e.g., spectrophotometer model Evolution 600 B, Thermo Scientific, Inc.).
2. Spectrometer for emission spectra acquisitions (e.g., spectrometer model HR4000, Ocean Optics, Inc.).
3. Continuous wave (CW) laser, power > 15 mW. Example: Frequency-doubled (532 nm, cw) Nd:YAG laser (Compass 215M-20; Coherent, Inc.).
4. Spherical lenses, L_1 and L_2 (telescope), forming a telescope to expand the laser beam (*see Note 5*).

98 Carlos Estupiñán-López et al.

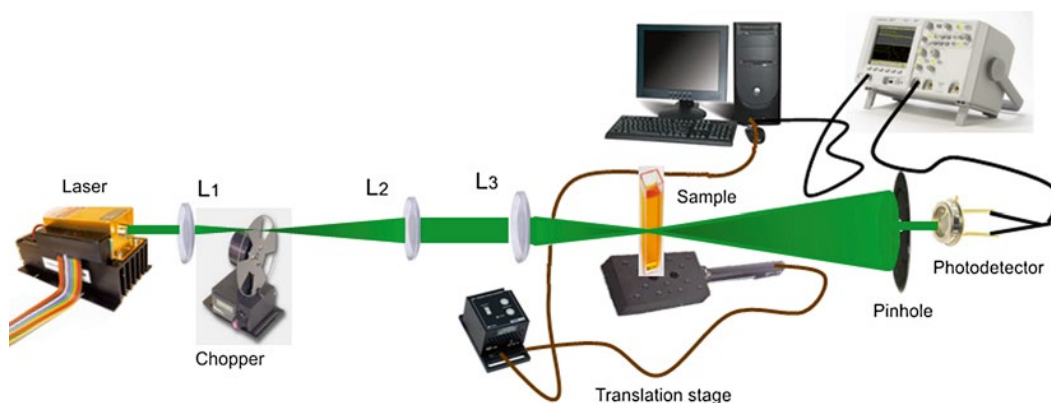


Fig. 3 Experimental scheme to measure the fluorescence quantum yield of CdTe QDs. L_1 , L_2 , and L_3 are spherical lens

5. Variable frequency Chopper to modulate the laser beam, controlling the excitation time on the sample. Example: Modulation with duty cycle = 0.05 and rotation frequency = 50 Hz.
6. Convergent lens, L_3 , to focus the beam onto the sample. Example: 10 cm focal lens.
7. Manual or motorized linear translation stage, use to better place the sample within the Rayleigh length of laser beam.
8. Pinhole, placed in a far field (>80 cm) from the sample, allowing the transmission only of the central part of the beam. The diameter of the pinhole should $\sim 1\%$ of the beam diameter.
9. Silicon photodiode placed after of the pinhole (*see Note 6*).
10. Digital oscilloscope.
11. A quartz cuvette, with thickness smaller than the Rayleigh length after lens L_3 . Example: 1 mm thick cuvette for 1.5 mm Rayleigh length (*see Note 6*).
12. QDs suspensions with absorption lower than 0.1 at the laser wavelength of the experiment (*see Note 4*).

3 Methods

1. Measure the absorbance and emission spectra of sample using a spectrophotometer and a photoluminescence spectrometer, respectively. In the absorbance measurements may be necessary dilute the sample and use a cuvette of 1 cm of optical length (*see Note 4*).
2. Place the sample at the prefocal or postfocal position ($z \approx -z_R$ or z_R). At those positions, one can observe the highest change in the oscilloscope signal (Fig. 1b).

3. Observe the time evolution of the detected signal shown in the oscilloscope. If necessary, minimize the rise time of signal (*see Note 7*).
4. Record the time evolution of the detected signal sometimes to confirm that the shape and intensity of the TL signal remains constant over the time (*see Note 8*).
5. Fit the experimental curve using Eqs. 3 and 4, and calculate the thermal phase shift value, θ .
6. Use Eq. 5 and the obtained value of θ to determine the absolute nonradiative quantum efficiency, φ . To perform this procedure the excitation wavelength, the thermal conductivity of solvent, and the thermo-optic coefficient of solvent should be known.
7. Use Eq. 6 and the obtained value of φ to determine the sample fluorescence quantum yield. To perform this procedure the average emission wavelength should be calculated.
8. Use the equation $\langle \lambda_{em} \rangle = \int \lambda_{em} dN(\lambda_{em}) / \int dN(\lambda_{em})$ to calculate the average emission wavelength integrating over all emission spectrum.

4 Notes

1. TLS is only convenient to measure the quantum efficiency of transparent samples. For scattering samples, we suggest use the integrating sphere method.
2. Obtain the Rayleigh length from using the expression $z_R = \pi w_0^2 / \lambda_{ex}$, where λ_{ex} is the excitation wavelength and $w_0 = f \lambda_{ex} / (w_i \pi)$ with w_0 being the minimum laser beam waist and w_i is the beam waist before L_3 and f is the focal length of L_3 . Both w_0 and w_i can be measured using the knife-edge technique [31].
3. When measure P_{in} and P_{out} using an optical power meter having a photodiode sensor, ensure to select the correct wavelength (laser excitation wavelength). Note that to obtain the correct values of P_{in} and P_{out} , the power loss due to reflection in the faces of cuvette must be discounted ($\sim 4\%$ per face). After using the Eq. 1, P_{abs} can be calculated as $P_{abs} = P_{in} - P_{out}$.
4. After to fill the cuvette with the QDs solution, wait for some minutes to stabilize the sample, measure the absorption and emission spectra at least twice at intervals of 5 min to confirm that spectra intensities remain constant over time. Spectral changes suggest aggregation and reabsorption processes; in this case, dilute the sample and repeat the procedure.
5. Make sure that Rayleigh length is larger than the cuvette length, because it is necessary ensure that laser beam cross

100 Carlos Estupiñán-López et al.

section remains at least constant throughout the cuvette. Occasionally, it is necessary to expand the beam laser to obtain the condition $z_R > L$. If necessary, substitute the lens L_1 and L_2 by other lens having different focal lengths until obtaining the required condition.

6. Use an appropriate photodiode to detect the TL signal. Example: If the excitation laser emitted at 532 nm, you can use a photodiode model BPW21R with maximum spectral response at 565 nm.
7. In order to obtain the real TL signal, ensure that the Chopper is at focal point of lens L_1 and verified that rise time of TL signal in the oscilloscope is $< 40 \mu\text{s}$. Move the Chopper parallel to beam laser trajectory until to minimize this value.
8. The TL signal in the oscilloscope must be recorded at least 5 times; consequently an equal number of θ values will be obtained. The better value of Φ_f is obtained considering the average value over all the data values.

Acknowledgments

This study was supported by CAPES, the Center of Excellence of Nanophotonics and Biophotonics (PRONEX/FACEPE/CNPq), FACEPE, and INCT Fotônica (CNPq).

References

1. Murray CB, Norris DJ, Bawendi MG (1993) Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E = S, Se, Te) semiconductor nanocrystallites. *J Am Chem Soc* 115: 8706–8715
2. Rosenthal SJ, McBridea J, Pennycook SJ, Feldman LC (2007) Synthesis, surface studies, composition and structural characterization of CdSe, core/shell and biologically active nanocrystals. *Surf Sci Rep* 62:111–157
3. Qu L, Peng X (2002) Control of photoluminescence properties of CdSe nanocrystals in growth. *J Am Chem Soc* 124:2049–2055
4. Deka S, Quarta A, Lupo MG, Falqui A, Boninelli S, Giannini C, Morello G, de Giorgi M, Lanzani G, Spinella C, Cingolani R, Pellegrino T, Manna L (2009) CdSe/CdS/ZnS double shell nanorods with high photoluminescence efficiency and their exploitation as bio-labeling probes. *J Am Chem Soc* 131: 2948–2958
5. Donega CM, Hickey SG, Wuister SF, Vanmaekelbergh D, Meijerink A (2003) Single-step synthesis to control the photoluminescence quantum yield and size dispersion of CdSe nanocrystals. *J Phys Chem B* 107:489–496
6. Laverdant J, de Marcillac WD, Barthou C, Chinh VD, Schwob C, Coolen L, Benalloul P, Nga PT, Maître A (2011) Experimental determination of the fluorescence quantum yield of semiconductor nanocrystals. *Materials* 4: 1182–1193
7. Sapsford KE, Berti L, Medintz IL (2006) Materials for fluorescence resonance energy transfer analysis: beyond traditional donor-acceptor combinations. *Angew Chem Int Ed* 45:4562–4588
8. Demas JN, Crosby GA (1971) The measurement of fluorescence quantum yields. A review. *J Phys Chem* 75:991–1024
9. Würth C, Grabolle M, Pauli J, Spieles M, Resch-Genger U (2012) Comparison of methods and achievable uncertainties for the relative and absolute measurement of fluorescence quantum yields. *Anal Chem* 83:3431–3439

10. Cruz RA, Pilla V, Catunda T (2010) Quantum yield excitation spectrum (UV-visible) of CdSe/ZnS core-shell quantum dots by thermal lens spectrometry. *J Appl Phys* 107:083504
11. Kurian A, George NA, Paul B, Nampoori VPN, Vallabhan CPG (2002) Studies on fluorescence efficiency and photodegradation of Rhodamine 6G doped PMMA using a dual beam thermal lens technique. *Laser Chem* 20:99–110
12. Hu C, Whinnery JR (1973) New thermooptical measurement method and a comparison with other methods. *Appl Opt* 12:72–79
13. Brannon JH, Magde DJ (1978) Absolute quantum yield determination by thermal blooming. Fluorescein. *J Phys Chem* 82: 705–709
14. Suzuki K, Kobayashi A, Kaneko S, Takehira K, Yoshihara T, Ishida H, Shiina Y, Oishi S, Tobita S (2009) Reevaluation of absolute luminescence quantum yields of standard solutions using a spectrometer with an integrating sphere and a back-thinned CCD detector. *Phys Chem Chem Phys* 11:9850–9860
15. Würth C, González MG, Niessner R, Panne U, Haisch C, Genger UR (2012) Determination of the absolute fluorescence quantum yield of rhodamine 6G with optical and photoacoustic methods—providing the basis for fluorescence quantum yield standards. *Talanta* 90:30–37
16. Brouwer AM (2011) Standards for fluorescence quantum yield measurements in solution (IUPAC technical report). *Pure Appl Chem* 83:2213–2228
17. Gordon JP, Leite RCC, Moore RS, Porto SPS, Whinnery JR (1965) Long transient effects in lasers with inserted liquid samples. *J Appl Phys* 36:3–8
18. Leite RCC, Moore RS, Whinnery JR (1964) Low absorption measurement by mean of the thermal lens effect using a He:Ne laser. *Appl Phys Lett* 5:141–143
19. Snook DR, Lowe RD (1995) Thermal lens spectroscopy. A review. *Analyst* 120: 2051–2068
20. Estupiñán-López C, Dominguez CT, de Araujo RE (2013) Eclipsing thermal lens spectroscopy for fluorescence quantum yield measurement. *Opt Express* 21:18592–18601
21. Sheldon SJ, Knight LV, Thorne JM (1982) Laser-induced thermal lens effect: a new theoretical model. *Appl Opt* 21:1663–1668
22. http://www.engineeringtoolbox.com/water-density-specific-weight-d_595.html. Accessed 07 Jan 2014
23. http://www.engineeringtoolbox.com/liquids-densities-d_743.html. Accessed 07 Jan 2014
24. http://www.engineeringtoolbox.com/thermal-conductivity-liquids-d_1260.html. Accessed 07 Jan 2014
25. http://www.engineeringtoolbox.com/water-thermal-properties-d_162.html. Accessed 07 Jan 2014
26. http://www2.ucdsb.on.ca/tiss/stretton/database/Specific_Heat_Capacity_Table.html. Accessed 07 Jan 2014
27. <http://thermo.sdsu.edu/testcenter/testhome/Test/solve/basics/tables/tablesComb/hhv.html>. Accessed 07 Jan 2014
28. Shen J, Love RD, Snook RD (1992) A model for cw laser induced mode-mismatched dual-beam thermal lens spectrometry. *Chem Phys* 165:385–396
29. Santos BS, Farias PMA, Fontes A (2008) Semiconductor quantum dots for biological applications. In: Henini M (ed) *Handbook of self assembled semiconductor nanostructures novel devices in photonics and electronics*. Elsevier, The Netherlands, pp 771–798
30. Menezes FD, Brasil AG Jr, Moreira WL, Barbosa LC, Cesar CL, Ferreira RC, de Farias PMA, Santos BS (2005) CdTe core shell quantum dots for photonic applications. *Microelectr J* 36:989–991
31. de Araújo MA, Silva R, de Lima E, Pereira DP, de Oliveira PC (2009) Measurement of Gaussian laser beam radius using the knife-edge technique: improvement on data analysis. *Appl Opt* 48:393–396