

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós Graduação em Ciências dos Materiais



**UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS DE MICROFEIXE DE ÍONS
ENERGÉTICOS PARA CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA
E ELEMENTAR DE AMOSTRAS POLIMÉRICAS E TECIDOS
BIOLÓGICOS**

Elis Moura Stori

Tese de Doutorado

Porto Alegre, maio de 2014

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Programa de Pós Graduação em Ciências dos Materiais

**UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS DE MICROFEIXE DE ÍONS
ENERGÉTICOS PARA CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA
E ELEMENTAR DE AMOSTRAS POLIMÉRICAS E TECIDOS
BIOLÓGICOS**

Elis Moura Stori

Tese realizada sob a orientação do Prof. Dr. Johnny Ferraz Dias apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em preenchimento parcial dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciência dos Materiais.

Porto Alegre, maio de 2014

“Os caminhos que conduzem o
homem ao saber são tão maravilhosos
quanto o próprio saber.”

(Johannes Kepler)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família.

Aos meus, pais Airton e Valéria, sem os quais eu não existiria.

Ao meu irmão, Rafael, meu amigo que meus pais escolheram pra mim

Ao meu esposo, Lúcio, que escolhi e que me escolheu para a construção nossa
própria família.

À minha tia, Milka, que é um pouco minha mãe, e aos meus primos Gabriel e Pérola,
que são um pouco meus irmãos.

À minha avó paterna, Ana, e minha tia-avó materna, Noe, que assumiu o papel de
minha avó.

Aos meus avôs, Arthumiro e Alcebíades, e à minha avó Milka, que estão em algum
lugar desse universo torcendo pelo meu sucesso (*in memoriam*).

Aos meus filhos peludos, Lyra e Ninno, que fazem da minha vida uma bagunça feliz!

AGRADECIMENTOS

A parte dos agradecimentos é sempre a mais prazerosa de se escrever. É aquela parte que você pode contar às pessoas como elas foram importantes para a sua vida e para o seu trabalho. Mas nem sempre é a mais fácil.

Agradeço, primeiramente, a Deus por inventar esse Universo cheio de mistérios para que eu pudesse explorar uma partezinha dele e pudesse exercitar minha curiosidade nesse labirinto emocionante que é a natureza.

Agradeço imensamente à minha família, meus pilares básicos. Meus pais, Airton e Valéria, e meu irmão, Rafael, que formam a base da família na qual eu nasci e sem a qual eu não existiria. Meu esposo, Lúcio, que topou formar comigo os pilares da família que vamos construir com nossa união.

Muito obrigada, a todos vocês pelo apoio. Mãe, Pai, obrigada por me deixarem alçar vôo e sair do ninho, por me puxarem de volta para o mundo da física (sem vocês eu talvez não estivesse escrevendo essas linhas) por me apoiarem, me encorajarem e me educarem para que hoje eu fosse quem eu sou. Maninho, obrigada pelas conversas de apoio, pelas brincadeiras de criança, por ser meu irmão mais velho no Tibia.

Mor, desculpa pelas madrugadas de cama vazia, em que eu passei escrevendo essa tese; obrigada pelo apoio, por ouvir minhas lamentações, por compartilhar das minhas alegrias, por dividir seu conhecimento, por ser meu grande amigo e por me amar!

Tia Milka, Pepé e Gagá, vocês têm importância fundamental na minha vida, obrigada por tudo! Vó Ana, obrigada pela paciência com meus estudos, que não acabam nunca. Tia Noe, obrigada pelos cafés-da-manhã recheados de banana e requeijão fritos.

Aos meus sogros Ivan e Teresinha (minha família emprestada), obrigada por me receberem em sua casa e terem aceito que eu dividisse minhas férias com o trabalho, por me aceitarem como uma nova filha. Diego e Laís (meus sobrinhos

lindos), desculpem não ter podido brincar mais com vocês nas férias. Obrigada pela paciência!

Fundamentalmente, agradeço ao meu orientador Johnny, pelo aprendizado, pelas críticas construtivas, pela paciência de me explicar várias coisas das quais eu não entendia nada (que o pico do Kr, na verdade, é pile up do Fe), por acreditar que eu tinha a capacidade de chegar até aqui e pelas brincadeiras sempre bem-humoradas.

Aos amigos e colegas do LII, Cláudia, Liana, Carla, Paulinho, Maurício, Dêiverti, Lúcia, Anaí, Luiza, Laís, Flávia, Rafaela, Tatiele, Denise e os incontáveis outros. Obrigada pelo apoio, discussões, conversas divertidas e por me ajudarem a desbravar o bichinho temperamental que é a linha de micro-feixe.

Aos professores do laboratório, Moni, Fernando, Henry, Pedro, Paulão, Raquel, Leandro, Gustavo, Papaléo e os muitos outros, que sempre estiveram presentes para uma discussão, um conselho, ou uma conversa descontraída.

Um agradecimento especial aos técnicos, àqueles que fazem o LII o que é: Agostinho, Borba, Miro, Michele, Marcelo, Paulo, Éder, obrigada por manter tudo funcionando sempre, pelas correntes altas e baixas, por resolverem os pepinos, pelos períodos estendidos, exaustivos e divertidos (muitas vezes recheados a pizza) e por tudo o mais que vocês sempre fazem de fundamental para o nosso trabalho.

Aos meus amigos da sala M204, Ismael, Andressa, Cíntia, Daniel, aos que vieram antes e aos que vieram depois, muito obrigada pelas conversas hilárias e curiosas, por descontraírem vários momentos de tensão durante o trabalho e, por várias vezes, compartilhar das lamentações e dificuldades do nosso dia-a-dia na academia.

Aos meus amigos pra toda a vida, Lívia, Luís, Kerri e Mirella, muito obrigada pelo companheirismo e por tentar entender um pouco das coisas que eu faço nesse mundo meio louco. Aos amigos de universidade e mestrado, Celi, Nataha, Thiago, Fred e César, obrigada por manterem a amizade mesmo à distância.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a minha vida e o meu trabalho. À CAPES pela bolsa de doutorado e pelo projeto de pesquisa.

PUBLICAÇÕES

1. **Stori E. M.**, Souza C. T., Amaral L., Fink D., Papaléo R. M., Dias J. F., Use of STIM for morphological studies of microstructure polymer foils, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, v. 306, p. 99 – 103 (2013)
2. Souza C.T., **Stori E. M.**, Fink D., Vacík V., Švorčík V., Papaléo R. M., Amaral L., Dias J. F., Eletronic behaviour of micro-structured polymer foils immersed in electrolyte, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, v. 306, p. 222 – 226 (2013)
3. **Stori E. M.**, Rocha M. L. C. F., Dias J. F., dos Santos C. E. I., de Souza C. T., Amaral L., Dias J. F., Elemental characterization of injuries in fish liver, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, v. 318, p. 83 – 87 (2014)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT	xviii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVOS GERAIS.....	2
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 INTERAÇÃO DE ÍONS COM A MATÉRIA	4
2.1.1 Princípios físicos básicos.....	4
2.1.2 Efeitos da radiação em materiais poliméricos.....	8
2.2 PEIXES COMO BIOMARCADORES AMBIENTAIS	9
2.3 AMOSTRAS MICROESTRUTURADAS POR MICROFEIXE DE ÍONS.....	13
2.4 MICROFEIXE DE ÍONS.....	14
2.5 EMISSÃO DE RAIOSX INDUZIDA POR PARTÍCULAS (PIXE)	18
2.6 MICROSCOPIA IÔNICA DE VARREDURA POR TRANSMISSÃO (STIM)	20
3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	27
3.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE FÍGADO DE PEIXE	27
3.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS POLIMÉRICAS MICROESTRUTURADAS POR MICROFEIXE DE ÍONS.....	29
3.2.1 Amostras do tipo duas linhas.....	29
3.2.2 Amostras do tipo uma linha.....	30
3.2.3 Amostras multiestruturadas	31
3.3 INSTRUMENTAÇÃO E TÉCNICAS ANALÍTICAS	32
3.3.1 Instrumentação da linha de Microfeixe do Laboratório de Implantação Iônica	32
3.3.2 Medidas e análise das amostras de fígado de peixe	36
3.3.3 Medidas e análise das membranas microestruturadas por microfeixe de íons	39
3.3.4 Obtenção de alguns parâmetros prévios às medidas de STIM	43
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	45
4.1 AMOSTRAS DE FÍGADO DE PEIXE.....	45
4.1.1 Análise das medidas de micro-PIXE	45

4.1.2	Análise das medidas de PIXE.....	49
4.2	PELÍCULAS MICROESTRUTURADAS POR MICROFEIXE DE ÍONS	53
4.2.1	Estudo comparativo entre STIM <i>on-axis</i> e <i>off-axis</i>	53
4.2.2	Estudo comparativo entre STIM e MEV	60
4.2.3	STIM com diferentes íons	66
4.2.4	Amostras multi-estruturadas.....	73
5	CONCLUSÕES.....	79
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Diagrama esquemático de alguns produtos da interação de um feixe de íons com a matéria e as técnicas analíticas relacionadas.	5
Figura 2.2: Diagrama esquemático de um feixe de partículas de massa M_1 , número atômico Z_1 e energia E_0 atravessando uma camada monoelementar; de espessura $\Delta x = t$, correspondente a uma densidade areal de Nt ; composta de átomos de massa M_2 , número atômico Z_2	6
Figura 2.3: Poder de freamento eletrônico e nuclear em função da energia do íon incidente ⁵³	7
Figura 2.4: Baía de Santos, sistema estuarino de Santos – São Vicente e canal da Bertioga ⁶⁹	11
Figura 2.5: <i>A. lineatus</i> ⁷⁰	12
Figura 2.6: Esquema ilustrando a focalização do feixe iônico (saindo da página) para dois quadrupolos magnéticos. O primeiro quadrupolo (em a e b) diminui a dimensão do feixe na direção vertical e aumenta na direção horizontal, enquanto que o segundo quadrupolo (em c e d) diminui a dimensão do feixe na direção horizontal e aumenta na direção vertical, resultando em um feixe simétrico.....	15
Figura 2.7: Diagrama esquemático dos sistema de varredura da microssonda iônica.	17
Figura 2.8: Diagrama esquemático do fenômeno de excitação do átomo pelo íon incidente e emissão de raiosX do tipo $K\alpha$ e $K\beta$	18
Figura 2.9: Níveis de energia e transições de raios-X mostrando as séries K e L ⁷⁸ .20	
Figura 2.10: Esquemas das três configurações possíveis de STIM: <i>on-axis</i> , <i>off-axis</i> e <i>on/off-axis</i> (adaptado de ⁸⁰).	23
Figura 2.11: Mapa de STIM <i>on/off-axis</i> apresentando o aumento de espessura sendo a ordem crescente de 1 a 4 (a) e <i>spectros</i> referentes à mesma amostra submetida às configurações de STIM <i>on/off-axis</i> e <i>off-axis</i> (b e c). Adaptado de ⁸⁰ .23	
Figura 2.12: Imagens obtidas por STIM <i>on-axis</i> , <i>off-axis</i> e <i>on/off-axis</i> em grupos diferentes: (A) STIM <i>on-axis</i> de fatia de 14 μm de pele de sola de pé de rato; (B) STIM <i>off-axis</i> de fatia de 25 μm de pele de porco; (C) STIM <i>on/off-axis</i> de fatia de 14 μm de pele de porco; imagens de STIM de fatia de 14 μm de pele de porco nas configurações (D) <i>on-axis</i> , (E) <i>off-axis</i> e (F) <i>on/off-axis</i> ⁸¹	24

Figura 2.13: Espectros de energia de STIM de (A) um feixe de 2 MeV de H_2^+ varrendo sobre uma célula e (B) um feixe de 1 MeV de partículas alfa varrendo a mesma célula ¹¹	25
Figura 2.14: Imagens de STIM de uma célula submetida à varredura de (a) um feixe de 2 MeV de H_2^+ e (b) um feixe de 1 MeV de partículas alfa ¹¹	26
Figura 3.1: Esquema de preparação das amostras de fígado para análise com micro-PIXE.....	28
Figura 3.2: Imagem representativa do padrão de irradiação utilizado na preparação das amostras de duas linhas (A) e esquema das películas submetidas ao processo de corrosão (B)	30
Figura 3.3: Imagem representativa do padrão de irradiação utilizado na preparação das amostras de uma linha (A) e esquema das películas submetidas ao processo de corrosão (B).....	30
Figura 3.4: Imagens representativas dos padrões de irradiação utilizados na preparação das amostras do tipo degrau (A e B) e esquema das películas submetidas ao processo de corrosão em perspectiva (C) e em corte transversal (D)	31
Figura 3.5: Fluências de irradiação e dimensões das amostras multiestruturadas do tipo degrau.....	32
Figura 3.6: Esquema do acelerador de íons do tipo tandemtron de 3MV do Laboratório de Implantação Iônica da UFRGS e seus principais componentes.....	33
Figura 3.7: (A) Esquema da linha de micro-feixe com os principais componentes e as distâncias entre eles. (B) Foto panorâmica da linha de micro-feixe apontando alguns de seus componentes mais importantes.....	34
Figura 3.8: Esquema da câmara de irradiação, ilustrando os diferentes detectores e suas posições.	35
Figura 3.9: Espectro de um padrão de fígado de boi utilizado na calibração para as medidas de PIXE.	37
Figura 3.10: Gráficos canal X energia e desvio padrão X energia para o padrão de fígado de boi.....	37
Figura 3.11: Identificação dos elementos presentes no espectro de PIXE da amostra escolhida para calibração de micro-PIXE.	38

Figura 3.12: Seleção dos picos no espectro de micro-PIXE de alguns elementos identificados no espectro de PIXE da mesma amostra.	38
Figura 3.13: Diagrama esquemático da passagem dos íons por uma amostra estruturada por feixe de íons (A) e espectros característicos de STIM on-axis (B) e off-axis (C). As regiões do espectros em (B e C) destacadas em azul e vermelho são representativas dos íons com e sem perda de energia e as cores estão relacionadas com os íons do esquema em (A).....	40
Figura 3.14: Obtenção dos perfis (A) e ajuste das funções erro e erro complementar (B) dos mesmos para obtenção das medidas de comprimento e largura das estruturas.....	41
Figura 3.15: Ajuste de espectro de polímero de espessura de 2 μ m para calibração em espessura.....	42
Figura 3.16: Curva de calibração para o detector SSB utilizado nas medidas de STIM on-axis.....	43
Figura 3.17: Curvas de calibração de energia versus corrente aplicada nas lentes eletromagnéticas (ou bobinas) para os íons H ⁺¹ (A) e, He ⁺² (B).....	44
Figura 4.1: Mapas de ferro de (a) fígado saudável, (b) fígado lesionado com CMM's e (c) fígado lesionado sem CMM's (área de varredura 2x2mm ²).....	45
Figura 4.2: Espectros de energia de (a) tecido saudável, (b) lesão com CMM's e (c) lesão sem CMM's medidos com micro-PIXE.....	46
Figura 4.3: Gráfico comparativo entre os espectros de energia das três diferentes amostras.....	47
Figura 4.4: Mapas elementares de Fe, P, S, Ca e Ti de amostra de tecido saudável (área de varredura de 25x25 μ m ²).....	47
Figura 4.5: Mapas elementares de Fe, P, S, Cl, K, Ca, Ti, Cr, Ni, Cu e Zn de amostra de tecido lesionado com CMM's focalizados em um CMM (área de varredura de 300x300 μ m ²). Em alguns mapas foram alterados o brilho e o contraste para melhor visualização.....	48
Figura 4.6: Mapas elementares de Fe, P, S, Cl, K, Ca, Ni, Cu e Zn de amostra de tecido lesionado "sem" CMM's focalizados em um CMM (área de varredura de 150x150 μ m ²). Em alguns mapas foram alterados o brilho e o contraste para melhor visualização.....	49

Figura 4.7: Gráfico de barras dos principais elementos para os três casos diferentes.	53
Figura 4.8: Espectros de STIM <i>on-axis</i> (painéis da esquerda) e <i>off-axis</i> (painéis da direita) para amostra submetida a 40 minutos de ataque e os mapas referentes às regiões delimitadas nos gráficos (A, B, C, D, E e F).....	55
Figura 4.9: Imagens de MEV para as amostras descritas na figura 4.8 (40 minutos de ataque químico)	56
Figura 4.10: Espectros de STIM <i>on-axis</i> para amostras irradiadas e submetidas a ataque químico por 20 (I), 30 (II), 40 (III) e 60 minutos (IV).....	57
Figura 4.11: Gráfico da espessura em função do tempo de ataque químico para a primeira bateria de amostras, indicando um decréscimo linear.	57
Figura 4.12: Espectros de STIM <i>on-axis</i> (painéis da esquerda) e <i>off-axis</i> (painéis da direita) para amostra submetida a 60 minutos de ataque e os mapas referentes às regiões delimitadas nos gráficos (A, B, C, D, E, F e G).....	59
Figura 4.13: Micrografia (MEV) mostrando estrutura com material residual devido à ação da reticulação ⁶²	60
Figura 4.14: Espectros de energia de STIM <i>on-axis</i> para amostra submetida a 40 min. de ataque e os mapas referentes às regiões delimitadas nos gráficos (IA, IB e IC) e imagem de MEV da respectiva amostra (II).....	61
Figura 4.15: Gráficos da largura em função do tempo de ataque obtidos através das técnicas de STIM e MEV.....	62
Figura 4.16: Gráficos do comprimento em função do tempo de ataque obtidos através das técnicas de STIM e MEV	63
Figura 4.17: Imagem de MEV de amostra submetida a 1,5 min. de ataque, mostrando uma superfície suave (sem poros) tanto nas paredes da estrutura, quanto na superfície do polímero não irradiado.	64
Figura 4.18: Imagem de MEV de amostra submetida a 15 min. de ataque, mostrando a porosidade causada pela ação do ataque químico tanto nas paredes internas e na superfície do polímero não irradiado.....	64
Figura 4.19: Imagem de MEV de amostra submetida a 20 min. de ataque, mostrando cavidades escavadas nas paredes da estrutura pela ação da solução química.....	65

Figura 4.20: Imagem de MEV de amostra submetida a 60 min. de ataque, mostrando cavidades maiores escavadas nas paredes da estrutura e a porosidade mais pronunciada associada à diminuição da espessura.....	66
Figura 4.21: Espectros de STIM utilizando os íons H^{+1} (painel I), He^{+2} (painel II) e Li^{+3} (painel III) para a mesma estrutura submetida a 15 min. de ataque. Cada painel apresenta os mapas referentes às regiões destacadas nos espectros (A, B e C).....	67
Figura 4.22: Espectros de STIM utilizando os íons H^{+1} (painel I), He^{+2} (painel II) e Li^{+3} (painel III) para a mesma estrutura submetida a 20 min. de ataque. Cada painel apresenta os mapas referentes às regiões destacadas nos espectros (A, B e C).....	68
Figura 4.23: Espectros de energia obtidos através da técnica de STIM utilizando os íons H^{+1} (painel I), He^{+2} (painel II) e Li^{+3} (painel III) para a mesma estrutura submetida a 30 min. de ataque. Cada painel apresenta os mapas referentes às regiões destacadas nos espectros (A, B e C).....	69
Figura 4.24: Gráficos do comprimento (A), largura (B) e espessura (C) em função do tempo de ataque para as medidas realizadas com H^{+1} , He^{+2} e Li^{+3}	71
Figura 4.25: Imagens de MEV para estruturas submetidas a 15 (A), 20 (B) e 30 min (C) de ataque.....	72
Figura 4.26: Imagens comparativas entre imagens de MEV e STIM com He^{+2} ilustrando as estruturas visíveis tanto por MEV quanto por STIM (linhas tracejadas) e estruturas visíveis somente por STIM (linhas cheias). As imagens de STIM estão espelhadas com relação às de MEV.....	73
Figura 4.27: Espectros de STIM utilizando os íons H^{+1} (painel I), He^{+2} (painel II) e Li^{+3} (painel III) para a mesma estrutura irradiada a 6×10^{14} e 3×10^{13} íons/cm ² de dimensões $50 \times 50 \mu\text{m}^2$. Cada painel apresenta os mapas referentes às regiões destacadas nos espectros (A, B e C).....	75
Figura 4.28: Espectros de STIM utilizando os íons H^{+1} (painel I), He^{+2} (painel II) e Li^{+3} (painel III) para a mesma estrutura irradiada a 6×10^{14} e 3×10^{13} íons/cm ² de dimensões $75 \times 75 \mu\text{m}^2$. Cada painel apresenta os mapas referentes às regiões destacadas nos espectros (A, B e C).....	76
Figura 4.29: Imagens de MEV das estruturas do tipo degrau referentes às figuras 4.27 (A) e 4.28 (B).....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Valores em energia (em MeV) para que os íons de H^{+1} , He^{+2} e Li^{+3} atravessem $12\mu m$ de PET	43
Tabela 4.1: Valores médios, desvios padrão, mínimos e máximos para os diferentes elementos para as amostras de fígados saudáveis, desconsiderando os valores nulos para a análise estatística.	50
Tabela 4.2: Valores médios, desvios padrão, mínimos e máximos para os diferentes elementos para as amostras de fígados lesionados com CMM's, desconsiderando os valores nulos para a análise estatística.	51
Tabela 4.3: Valores médios, desvios padrão, mínimos e máximos para os diferentes elementos para as amostras de fígados lesionados sem CMM's, desconsiderando os valores nulos para a análise estatística.	52

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

d	Ângulo de espalhamento
σ	Seção de choque de espalhamento
Ω_B^2	Valor de Bohr para o <i>stragging</i>
π	3,14
ΔE	Variação de energia
ε	Seção de choque de freamento
ϕ	Fluência
°C	Grau Celcius
°	Grau
μm	Micrometro
μm^2	Micrometro quadrado
A	Ampère
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro quadrado
$\frac{dE}{dx}$	Poder de freamento
$d\Omega$	Ângulo sólido diferencial
ERDA	<i>Elastic Recoil Detection Analysis</i> (Análise de Detecção de Recuo Elástico)
E_0	Energia inicial
E_1	Energia final
e	Carga do elétron
FIB	<i>Focused Ion Beam</i> (Feixe de Íons Focalizado)
H ⁺¹	Íon de hidrogênio
H ₂ ⁺	Hidrogênio molecular ionizado
He ⁺²	Íon de hélio
IBIC	<i>Ion Beam Induced Current</i> (Corrente Induzida por Feixe de Íons)
ImageJ	Software de análise de imagens
íons/cm ²	Íons por centímetro quadrado
íons/s	Íons por segundo
keV	Quiloeletronvolt
kV	Quilovolt
LII	Laboratório de Implantação Iônica
Li ⁺³	Íon de lítio
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura

MeV	Megaeletronvolt
MV	Megavolt
M_1	Massa do elemento 1
M_2	Massa do elemento 2
M	Molar
min.	Minuto
m	Metro
NRA	<i>Nuclear Reaction Analysis</i> (Análise por Reação Nuclear)
N	Densidade de partículas
NaOH	Hidróxido de sódio
N_2	Nitrogênio molecular
OMDAQ®	Software de aquisição de dados do sistema de microfeixe da Oxford Microbeam Ltd.
PIXE	<i>Particle Induced X-Ray Emission</i> (Emissão de RaiosX Induzida por Partículas)
PBW	<i>Proton Beam Writing</i> (Litografia por Feixe de Íons)
PMMA	Polimetil metacrilato
PET	Polietileno tereftalato
pA	Picoampère
PIN	Junção p-n possuindo um isolante intrínseco entre as camadas semicondutoras dopadas
RBS	<i>Rutherford Backscattering Spectroscopy</i> (Espectroscopia de Retroespalhamento Rutherford)
STIM	<i>Scanning Transmission Ion Microscopy</i> (Microscopia Iônica de Varredura por Transmissão)
S	Poder de freamento
SSB	<i>Silicon Surface Barrier</i> (Barreira de Superfície de Silício)
SRIM	<i>Stopping and Range of Ions in Matter</i> (Frenamento e Alcance de Íons na Matéria)
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
uma	Unidade de massa atômica
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
USP	Universidade de São Paulo
Z_1	Número atômico do elemento 1
Z_2	Número atômico do elemento 2

RESUMO

As técnicas baseadas em microfeixe de íons energéticos possuem aplicações em diferentes áreas de conhecimento, tais como materiais, biologia, neurociência, ciências ambientais, entre outros. A microsonda iônica também possui a capacidade de fabricar micro-estruturas com aplicações em biomateriais, micro-fotônica, micro-fluídica, membranas porosas e diversas outras.

O Laboratório de Implantação Iônica do Instituto de Física (LII) da UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul) conta com uma linha de microsonda iônica que dispõe de detectores para a realização de diversos tipos de experimentos: Emissão de RaiosX Induzida por Partículas (*Particle Induced X-Ray Emission – PIXE*), Espectroscopia de Espalhamento de Rutherford (*Rutherford Backscattering Spectroscopy – RBS*), Reação Nuclear (*Nuclear Reaction Analysis – NRA*) e Microscopia Iônica de Varredura por Transmissão (*Scanning Transmission Ion Microscopy – STIM*). Além disso, tem-se aperfeiçoado a técnica de micro-fabricação denominada Litografia por Feixe de Prótons (*Proton Beam Writing – PBW*), atualmente em substratos poliméricos.

Este trabalho apresenta dois focos: um deles é a análise de fígado de peixe pela técnica de micro-PIXE. Estes fígados apresentam lesões associadas à exposição de contaminantes. Essas lesões são acompanhadas de células pigmentosas à base de metais chamadas de centros de melanomacrófagos. Observou-se que o fígado de peixe é uma amostra em potencial para estudos ambientais.

Outro foco foi o estudo da técnica de STIM em películas poliméricas micro-fabricadas por PBW. Foram estudadas diferentes configurações geométricas para a técnica de STIM, bem como a utilização de feixes de H^{+1} , He^{+2} e Li^{+3} . Diferentes amostras foram preparadas, desde estruturas simples (possuindo apenas orifícios) até amostras multi-estruturadas do tipo degrau. As medidas de STIM foram comparadas com medidas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de maneira a confirmar a viabilidade e confiabilidade dos estudos morfológicos das amostras em questão.

A técnica de STIM se apresentou viável para o estudo morfológico de microestruturas fabricadas por microfeixe de íons em películas poliméricas, sendo que a melhor configuração é na geometria *on-axis* utilizando o íon He^{+2} que provê melhor resolução em energia, sem comprometer a resolução espacial. Em comparação com medidas de MEV, apresenta vantagens como maior rapidez, preservação da amostra e o poder de resolver estruturas enterradas na amostra. A similaridade entre as duas técnicas com relação às demais características faz do STIM uma excelente alternativa à mais comumente utilizada para diversas análises morfológicas de películas poliméricas.

Palavras-chave: Microscopia Iônica de Varredura por Transmissão (STIM), microestruturação por feixe de prótons, películas poliméricas microestruturadas

ABSTRACT

Ion beam techniques have many applications in different areas such as materials, biology, neuroscience and environmental science among others. The ion microprobe has also the ability of fabricating microstructures with applications in the fields of biomaterials, micro-photonics, micro-fluidics, porous membranes and many others.

The Ion Implantation Laboratory of the Physics Institute at UFRGS has a microprobe beamline equipped with detectors used in different techniques: Particle Induced X-Ray Emission (PIXE), Rutherford Backscattering Spectroscopy (RBS), Nuclear Reaction Analysis (NRA) and Scanning Transmission Ion Microscopy (STIM). Besides, its scanning capability makes allows the use of the micro-fabrication technique called Proton Beam Writing (PBW). Currently, this technique has been used to write micro-structures over polymers. Several projects are in progress for the development and improvement of such techniques, since the microbeam line is a recent acquisition by the laboratory.

This work presents two guidelines: one of them is the analysis of fish liver through the micro-PIXE technique. These livers present injuries associated to the exposure of contaminants. The injuries are characterized by the presence of pigmented cells based on metals called melanomacrophage centers. It was observed that the fish liver is a promising sample for environmental studies.

The other guideline is the study of the STIM technique on micro-fabricated polymer foils by PBW. Different geometric configurations for the STIM technique were explored, as well as the use of different ion beams (H^{+1} , He^{+2} and Li^{+3}). Different samples were prepared, ranging from simple structures (containing only one hole) to step-like multi-structured samples. STIM measurements were compared with Scanning Electron Microscopy (SEM) in order to confirm the viability and reliability of morphological studies of the samples under study.

The STIM technique proved to be suitable for the morphological study of micro-structures fabricated by ion microbeam on polymeric foils. The best

configuration is the on-axis geometry using He^{+2} beam, which provides the best energy resolution without compromising the spatial resolution. In comparison with SEM measurements, advantages such as speed of measurement, non-destructiveness and power of resolving buried structures of the sample were observed. Concerning other features, the similarities between the two techniques make STIM an excellent alternative for morphological analysis of polymeric foils.

Key-words: Scanning Transmission Ion Microscopy (STIM), Proton beam writing (PBW), micro-structured polymeric foils.

1 INTRODUÇÃO

O microfeixe de íons de varredura foi desenvolvido no início da década de 70 em Harwell, empregando várias técnicas analíticas por feixes iônicos¹. Atualmente, diversas são as aplicações em análise de materiais ²⁻⁴, biologia e ciências ambientais⁵⁻¹⁰, entre outros. A instrumentação da microsonda recebeu aprimoramentos e nos dias de hoje é possível realizar as técnicas de feixes iônicos utilizando feixes do diâmetro da ordem de nanômetros¹¹⁻¹⁶.

As técnicas baseadas em emissão de raiosX datam de 1914 quando Mosely realizou uma das primeiras análises multielementares de uma amostra de latão. A técnica de PIXE passou a ser explorada com o crescimento da pesquisa em física nuclear, na década de 50, e o surgimento dos aceleradores de partículas¹⁷. Consequente ao desenvolvimento do microfeixe de íons, surgiu a técnica de microPIXE, atualmente com diversas aplicações, tais como, biologia, paleontologia, ciências ambientais, arqueologia, ciências de alimentos, ciências forenses, entre outros¹⁸⁻²².

A Microscopia Iônica de Varredura por Transmissão (*Scanning Transmission Ion Microscopy – STIM*) usando íons com energia de MeV tem seus primeiros registros ao final da década de 70²³. Atualmente, a técnica tem aplicações em diferentes áreas e não raro se encontram referências à Tomografia por STIM^{6,10,24-36}.

Desenvolvida por Watt et al.³⁷, a técnica de microestruturação por microfeixe de íons, conhecida como Litografia por Feixe de Prótons (*Proton Beam Writing – PBW*), tem aplicações em diferentes áreas, tais quais microfluídica³⁸, microfotônica^{39,40}, eletrônica^{41,42}, biomateriais⁴³⁻⁴⁵, entre outros que provê microestruturas cada vez mais complexas e com mais altas razões de aspecto, tais como microfiltros, membranas porosas e guias de onda.^{4,15,46-49}

Diversas técnicas de análise por feixes iônicos vêm sendo amplamente utilizadas no Laboratório de Implantação Iônica (LII) do Instituto de Física da UFRGS para análise de diversos materiais inorgânicos e biológicos. Mais recentemente, foi adquirido um sistema de microsonda iônica que permite análises mais minuciosas de determinadas amostras. É um sistema único no Brasil e, apesar de sua aquisição

ter sido em 2007, a linha iniciou efetivamente a ser explorada com mais rigor a partir de 2009.

A linha de microsonda conta com detectores para a utilização de diversas técnicas analíticas: Emissão de Raios-X Induzida por Partículas (*Particle Induced X-Ray Emission – PIXE*), Espectroscopia de Espalhamento de Rutherford (*Rutherford Backscattering Spectroscopy – RBS*), Reação Nuclear (*Nuclear Reaction Analysis – NRA*) e Microscopia Iônica de Varredura por Transmissão (*Scanning Transmission Ion Microscopy – STIM*). Além disso se tem aperfeiçoado uma técnica de micro-fabricação denominada Litografia por Feixe de Prótons (*Proton Beam Writing – PBW*), atualmente em substratos poliméricos.

As técnicas de PIXE, RBS e NRA no modo convencional (não realizadas na câmara de microsonda) têm sido amplamente exploradas em diversas linhas de pesquisa no LII. Dessa maneira, se procura aplicar os conhecimentos adquiridos previamente a respeito dessas técnicas para reproduzir e ampliar as suas capacidades no sistema de microsonda. As demais técnicas (STIM e PBW) são mais recentes no laboratório e surgiram somente a partir da aquisição do sistema de microsonda.

A finalidade deste trabalho é apresentar resultados deste processo de utilização da microsonda iônica disponível no LII, bem como ressaltar os avanços nas diversas etapas de desenvolvimento das técnicas analíticas e de preparação de amostras.

1.1 OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos gerais desta tese de doutorado consistem em aperfeiçoar a técnica de STIM e microPIXE utilizando o sistema de microfioxe de íons disponível no LII-UFRGS, desde a otimização do processo de preparação das amostra, até a otimização dos parâmetros de análise para amostras poliméricas microestruturadas por feixe de íons e amostras de fígado de peixe.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparação de um protocolo de preparação de amostras de fígados de peixe para análise com micro-PIXE;
- Averiguação da viabilidade do estudo de fígado de peixes por micro-PIXE e PIXE como potencial estudo para controle ambiental;

- Implementação e exploração da técnica de STIM em diferentes configurações geométricas;
- Utilização da técnica de STIM para amostras poliméricas comparando as potencialidades da técnica utilizando diferentes configurações geométricas;
- Comparação da técnica de STIM com Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de forma a avaliar a viabilidade e confiabilidade para a análise de micro-estruturas fabricadas por PBW em películas poliméricas;
- Comparação da técnica de STIM utilizando diferentes íons;
- Fabricação de multi-estruturas por feixes de íons e posterior análise por STIM utilizando diferentes feixes;
- Desenvolvimento de um processo de análise de dados para películas poliméricas microestruturadas por microsonda iônica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 INTERAÇÃO DE ÍONS COM A MATÉRIA

2.1.1 Princípios físicos básicos

Há diversas interações quando um feixe de partículas carregadas atinge um alvo, entre elas, colisões elásticas, inelásticas, interações nucleares e interação com os elétrons da amostra. As diferentes formas de interações podem resultar em diferentes processos, dentre os quais pode-se citar partículas primárias retroespalhadas, emissão raios X característicos, raios gama e partículas transmitidas.⁵⁰⁻⁵²

As diferentes partículas produzidas nesses processos, quando detectadas, determinam diversas técnicas analíticas. Dentre elas, pode-se citar Espectrometria de Retroespalhamento Rutherford (*RBS – Rutherford Backscattering Spectrometry*), Emissão de Raios X Induzida por Partículas (*PIXE – Particle Induced X-Ray Emission*), Reação Nuclear (*NRA – Nuclear Reaction Analysis*), Detecção de Recuo Elástico (*ERDA – Elastic Recoil Detection Analysis*) e Microscopia Iônica de Varredura por Transmissão (*STIM – Scanning Transmission Ion Microscopy*).⁵⁰⁻⁵² A incidência de um feixe iônico com um material também pode possuir o propósito de modificá-lo, como é o caso de implantação iônica e microfabricação. A Figura 2.1 mostra um esquema com alguns produtos e técnicas provenientes da interação de íons com a matéria, supondo um alvo suficientemente fino para permitir a transmissão e o espalhamento frontal.

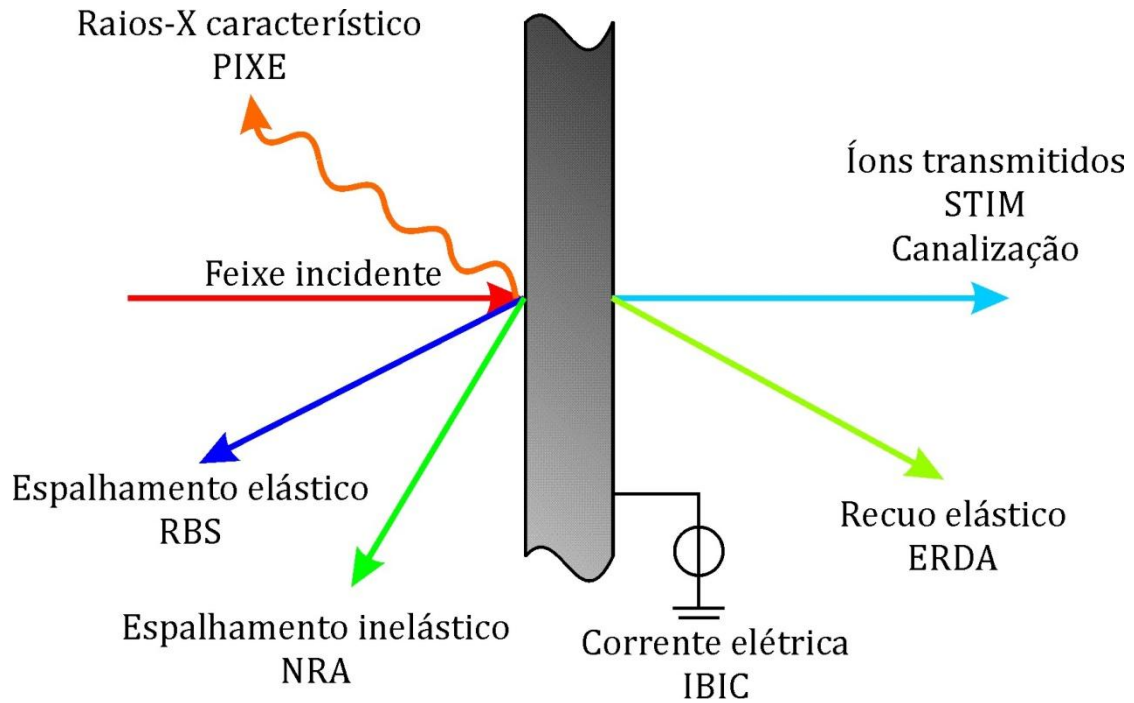


Figura 2.1: Diagrama esquemático de alguns produtos da interação de um feixe de íons com a matéria e as técnicas analíticas relacionadas.

O presente trabalho tem enfoque na técnica de Microscopia Iônica de Varredura por Transmissão (STIM) em amostras poliméricas microestruturadas por microsonda iônica. Dessa maneira, é necessário o entendimento de alguns conceitos básicos a respeito da perda de energia dos íons na sua trajetória no interior da amostra, bem como da interação com os átomos da amostra.

Consideremos um feixe de íons com energia inicial E_0 , massa M_1 e número atômico Z_1 , atravessando um alvo de um elemento de massa M_2 , número atômico Z_2 , espessura $\Delta x = t$, correspondente a uma densidade areal de Nt , sendo N a densidade de partículas. A energia que os íons perdem no decorrer do seu trajeto no interior da amostra é ΔE (Figura 2.2).^{51,52}

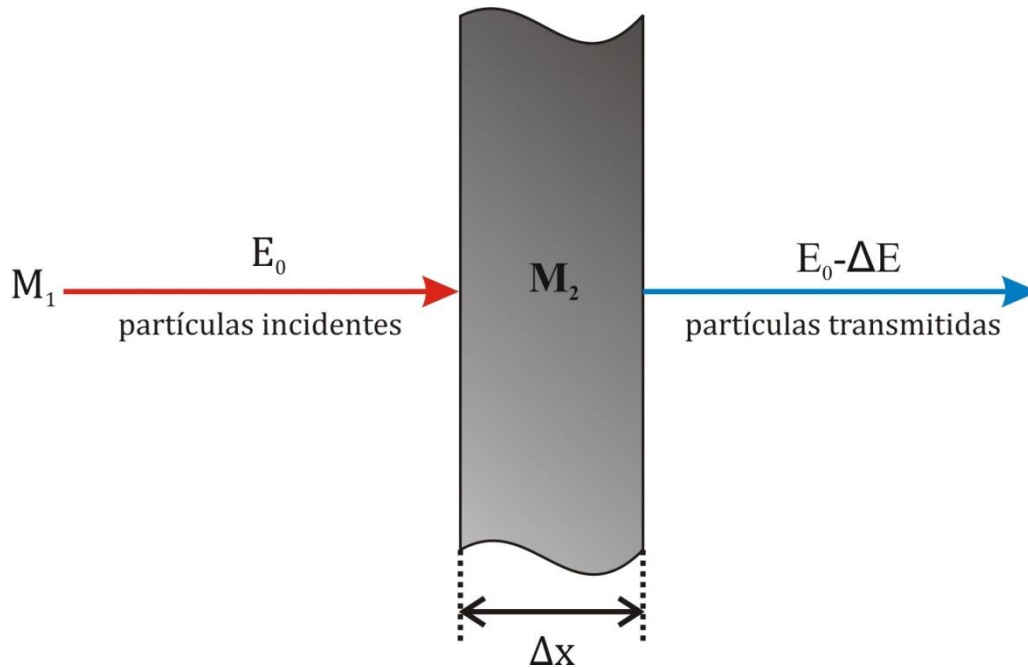


Figura 2.2: Diagrama esquemático de um feixe de partículas de massa M_1 , número atômico Z_1 e energia E_0 atravessando uma camada monoelétrica; de espessura $\Delta x = t$, correspondente a uma densidade areal de Nt ; composta de átomos de massa M_2 , número atômico Z_2

O poder de freamento S , ou seja, a perda de energia do íon ao longo de sua trajetória na amostra, é dada por⁵¹:

$$S = \frac{dE}{dx} = N \cdot Z_2 \cdot (Z_1 \cdot e^2) \cdot f\left(\frac{E}{M_1}\right) \quad (1)$$

em que e é a carga do elétron e $f\left(\frac{E}{M_1}\right)$ é uma função dependente somente do alvo e não do tipo de projétil.⁵¹

Associada ao poder de freamento, tem-se a seção de choque de freamento, que está relacionada à probabilidade da partícula ser desacelerada durante sua trajetória no interior da amostra. Essa grandeza física é dependente da densidade de partículas N ^{51,52}. A seção de choque de freamento ε é dada por^{51,52}:

$$\varepsilon = \frac{1}{N} \cdot \frac{dE}{dx} \quad (2)$$

No caso de energias na ordem de MeV e íons mais leves, que é o caso deste trabalho, os dois processos dominantes de perda de energia são as interações do projétil com os elétrons livres da amostra, ou elétrons ligados, e as interações do projétil com os núcleos blindados ou não. Assim, a seção de choque de freamento é composta por um fator nuclear e um fator eletrônico, bem como o poder de freamento, assim temos que⁵²:

$$\varepsilon = \varepsilon_e + \varepsilon_n \quad (3)$$

$$\frac{dE}{dx} = \frac{dE}{dx}\Big|_e + \frac{dE}{dx}\Big|_n \quad (4)$$

Na Figura 2.3, podemos observar o comportamento do poder de freamento. Para baixas energias é predominante o componente nuclear do poder de freamento, no entanto para energias mais elevadas, predomina o componente eletrônico^{52,53}.

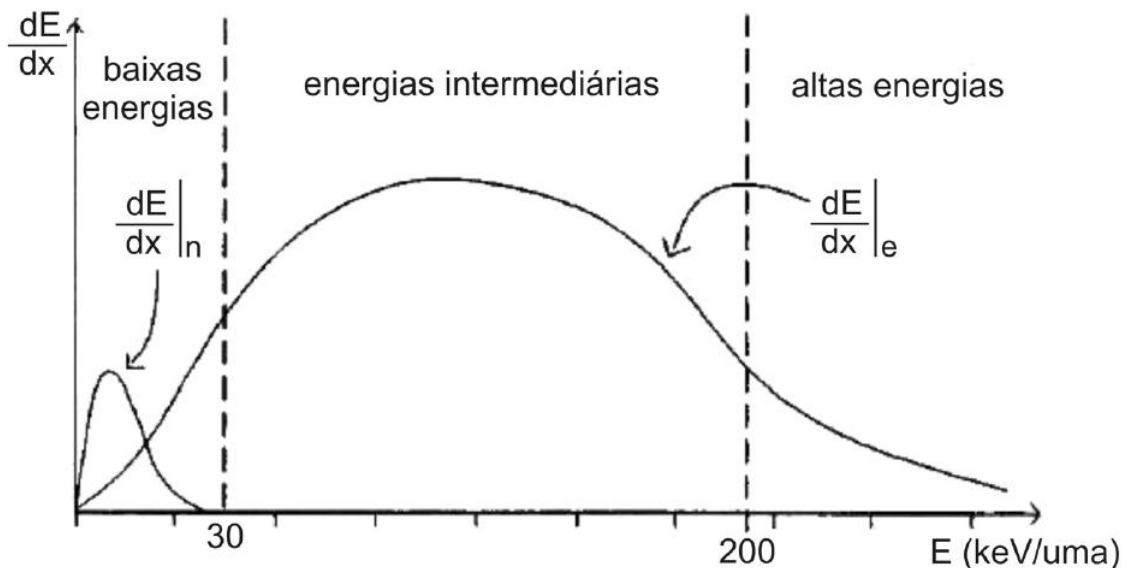


Figura 2.3: Poder de freamento eletrônico e nuclear em função da energia do íon incidente⁵³.

Durante o seu trajeto no interior da amostra, há uma probabilidade do íon interagir eletrostaticamente com o núcleo e sofrer um espalhamento inelástico. A seção de choque diferencial de espalhamento (considerando o ângulo sólido $d\Omega$ determinado pelo detector e sua posição com relação à amostra) é uma função do número atômico do projétil e do alvo (Z_1 e Z_2), bem como suas massas (M_1 e M_2) e do ângulo de espalhamento θ . Assim, tem-se que⁵²:

$$\frac{\sigma}{d\Omega} = \left(\frac{Z_1 \cdot Z_2}{4E}\right)^2 \cdot \frac{4}{\sin^4 \theta} \cdot \frac{\left\{ \left[1 - \left((M_1/M_2) \cdot \sin \theta \right)^2 \right]^{1/2} + \cos \theta \right\}^2}{\left[1 - \left((M_1/M_2) \cdot \sin \theta \right)^2 \right]^{1/2}} \quad (5)$$

Outra propriedade física importante para qualquer análise por feixe de íons é o *straggling* na energia, que é o alargamento da distribuição de energia das partículas. Esse fenômeno ocorre devido a flutuações estatísticas no número de processos de colisões. Isso significa que duas partículas com exatamente a mesma energia podem perder mais ou menos energia durante seu percurso por uma mesma distância dentro da amostra^{51,52}.

O valor para o *straggling* foi derivado por Bohr em 1915, dessa forma chama-se de valor de Bohr Ω_B^2 de dispersão de energia e tem-se que⁵²:

$$\Omega_B^2 = 4\pi \cdot (Z_1 \cdot e^2)^2 \cdot N \cdot Z_2 \cdot t \quad (6)$$

Em que N é a densidade de partículas da amostra, Z_2 é o número atômico dos átomos da amostra e t é a espessura da amostra.

Esses conceitos físicos básicos são essenciais para a compreensão das interações de íons energéticos com a matéria e, portanto, entender de que forma os íons se comportam durante a fabricação e análise das amostras estudadas nesse trabalho.

2.1.2 Efeitos da radiação em materiais poliméricos

A emissão de energia proveniente do impacto de íons rápidos em sólidos moleculares causa reações químicas de alta densidade de energia com produtos finais estruturalmente diferentes daqueles gerados por partículas de baixa perda de energia (elétrons/fótons). A utilização de feixes iônicos para microfabricação em polímeros é bastante vantajosa, pois o feixe não sofre tanto espalhamento quanto o feixe eletrônico. Ademais, um grande número de propriedades podem ser modificadas por feixes iônicos através de mudanças irreversíveis: solubilidade, massa molecular e propriedades ópticas, elétricas e mecânicas⁵⁴⁻⁵⁶.

O aumento da fluência de irradiação pode causar um aumento ou diminuição na massa molecular e, portanto, alterar a solubilidade do polímero. Parâmetros como

energia do feixe e massa do íon também são determinantes para as alterações nas propriedades do material^{54,56}.

Ao atravessarem uma amostra, íons energéticos causam trilhas iônicas, ou seja, um caminho principal de modificação do material (a passagem do íon) e uma penumbra de dissipação de energia, formando trilhas do tipo tubular. O feixe iônico causa ruptura das ligações, gerando radicais livres que são responsáveis pelas principais transformações químicas em polímeros irradiados por íons, tais como cisão de cadeias, reticulação, formação de ligações duplas e triplas e, também, emissão de moléculas voláteis e fragmentos moleculares^{55,57-59}.

Em se tratando de litografia por feixes de íons, a ocorrência de cisão de cadeias ou reticulação polimérica é dependente do polímero. O processo de reticulação ocorre quando cadeias lineares ou ramificadas se interligam por ligações covalentes, sendo essas ligações cruzadas, ou seja, formando um polímero tridimensional. O comportamento de cisão ou reticulação pode ser alterado para o mesmo polímero dependendo da dose de irradiação^{55,60}.

Conforme o íon percorre uma amostra, ele sofre perdas de energia e causa diferentes efeitos no material. Considerando um próton de energia 1 MeV, ao longo de seu trajeto através da amostra, as interações com o material fazem com que sua energia cinética se dissipe, transferindo-a para os átomos e elétrons da amostra. A princípio, com alta energia, predominam as interações inelásticas, causando ionização dos átomos da amostra e excitação dos mesmos. Para menores energias predominam os fenômenos térmicos, que podem auxiliar nos processos de modificação do polímero. No caso de materiais isolantes, ocorre a chamada explosão Coulombiana em que o acúmulo de energia na nuvem eletrônica dos átomos causa o deslocamento e possível emissão de átomos e moléculas^{58,61-64}.

2.2 PEIXES COMO BIOMARCADORES AMBIENTAIS

Ecossistemas marinhos são frequentemente afetados por atividades humanas, como o despejo de poluentes e esgoto devido a atividades habitacionais e industriais. Devido ao desenvolvimento de tais setores, é essencial o controle e regulamentação do impacto de atividades humanas sobre a natureza⁶⁵.

Oceanos têm um grande poder de diluição. Estuários e baías, por outro lado, possuem uma menor capacidade de diluir contaminantes devido à sua baixa atividade hidrodinâmica. No entanto, essas regiões recebem uma carga maior de descarte de efluentes industriais, domésticos e agrícolas. Esse tipo de efluentes modificam os habitats naturais e o ambiente se torna contaminado quando o descarte é alto o suficiente para aumentar a concentração de certas substâncias a níveis acima dos naturais para a área ⁶⁶.

Uma maneira de controlar o impacto humano sobre tais ambientes é o biomonitoramento, que estuda organismos vivos. Tais organismos refletem as mudanças nas condições de seus habitats de acordo com os níveis de contaminação, sendo assim possível analisar diversos parâmetros do sistema biológico/ecológico ⁶⁷.

O estudo de biomarcadores é uma entre várias abordagens comumente utilizadas nesse tipo de monitoramento. Biomarcadores são respostas biológicas abaixo do nível do indivíduo, isto é, a nível molecular, celular ou do tecido ^{67,68}.

O caso particular da região da baía de Santos do sistema estuarino de Santos – São Vicente e do canal da Bertioga (Figura 2.4) é um objeto de estudo relevante devido à sua importância para o ciclo de vida de diversas espécies de peixes que utilizam essa área para reprodução, crescimento e moradia. A região também conta com uma intensa atividade pesqueira ⁶⁹.

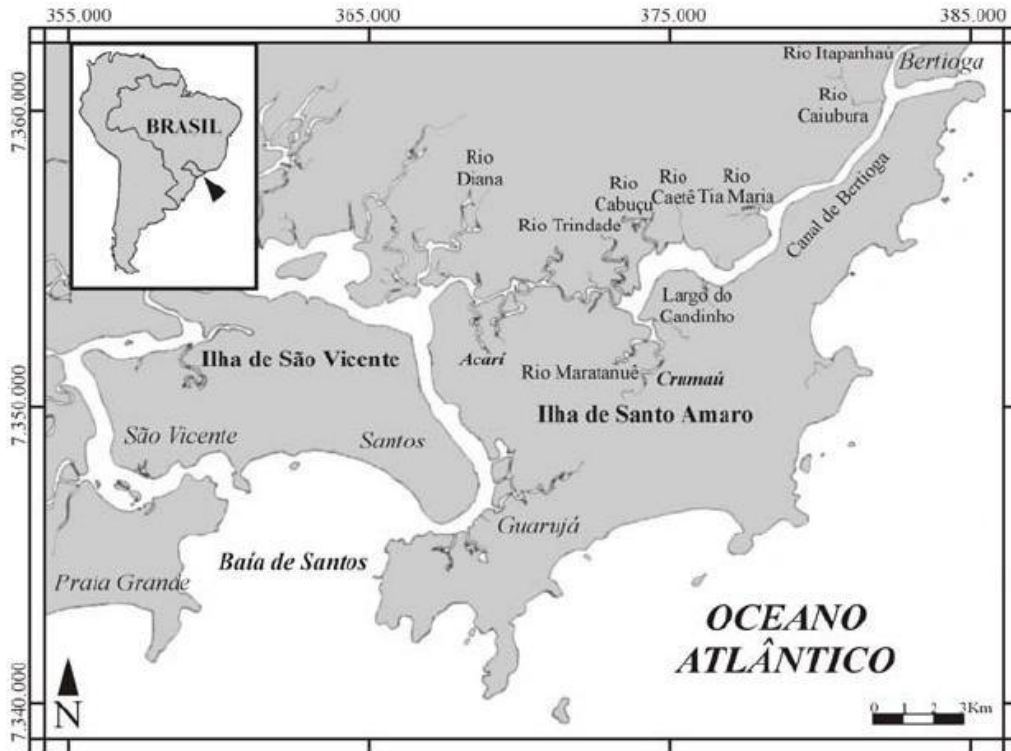


Figura 2.4: Baía de Santos, sistema estuarino de Santos – São Vicente e canal da Bertioga ⁶⁹.

A espécie de peixe escolhida foi a *Achirus lineatus* (Figura 2.5), conhecida como linguado. Ela se distribui ao longo da costa americana. Estes animais habitam rios e, principalmente, estuários e zonas costeiras. Os peixes dessa espécie vivem preferencialmente perto do solo dos sistemas aquáticos, se enterrando na areia e lama e, portanto, estão constantemente em contato com o sedimento que contém a maioria dos contaminantes de tais ambientes ^{69,70}.

Estudos prévios com relação a esse peixe foram feitos utilizando seus fígados e gônadas, ambos para estudos histopatológicos, e seus músculos para análise quantitativa da presença de metais pesados no tecido. Seus músculos apresentaram diversos metais em quantidades maiores que as consideradas apropriadas para o consumo humano e seus fígados e gônadas apresentaram lesões devido aos contaminantes ⁶⁹.

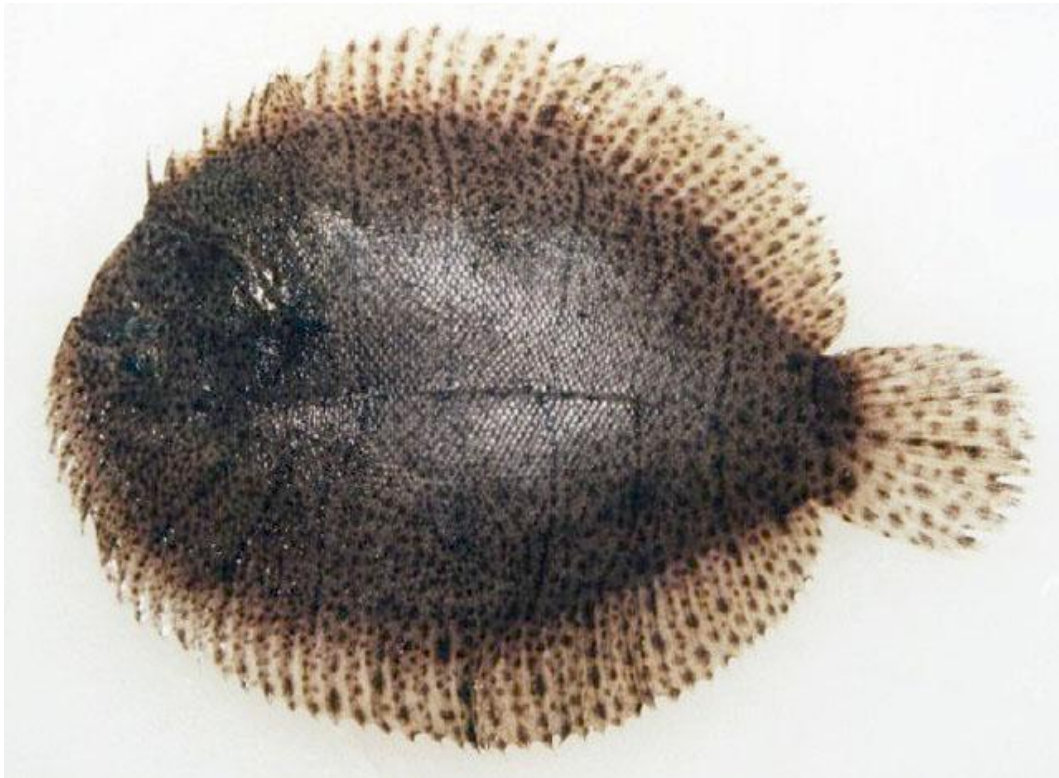


Figura 2.5: *A. lineatus* ⁷⁰.

As lesões nas gônadas e fígados se apresentam como modificações na estrutura do tecido celular. Essas modificações têm diversas variações e possuem diferentes nomes, mas em geral sua ocorrência é acompanhada pela presença de centros de melanomacrófagos (CMMs) ⁶⁹.

O fígado é um órgão primário para a identificação de lesões devido ao seu papel central em várias funções metabólicas. Tais funções tornam o fígado suscetível a uma bioacumulação de contaminantes em níveis em até várias ordens de grandeza mais altos do que o acúmulo observado no meio ambiente ou mesmo em outros órgãos ⁷¹.

Os CMMs são células pigmentosas que podem refletir idade, status de saúde ou condições estressantes como, por exemplo, deficiência nutricional ou substâncias danosas no ambiente do peixe. Eles são geralmente compostos de pigmentos livres de ferro, porém os CMMs presentes em peixes ósseos podem conter pigmentos a base de ferro ⁷¹⁻⁷³.

O estudo apresentado neste trabalho baseou-se nas lesões de fígados de peixes. Uma vez que essas modificações são microestruturadas, foi feita uma abordagem utilizando microPIXE (*micro-Particle Induced X-Ray Emission*). Para estudo quantitativo foi feito PIXE convencional (técnicas elucidadas na seção 2.4 deste trabalho).

2.3 AMOSTRAS MICROESTRUTURADAS POR MICROFEIXE DE ÍONS

A técnica de microestruturação por microsonda iônica conhecida como *Proton Beam Writing* (PBW) é uma importante ferramenta para construção de padrões em polímeros e semicondutores com resolução espacial da ordem de sub-micron, além de proporcionar a construção de estruturas tridimensionais com alta razão de aspecto^{74,75}.

É uma técnica de impressão direta e não requer máscaras, o que a torna uma técnica mais simples e rápida do que outras técnicas litográficas. Por exemplo, a litografia com feixe de elétrons requer a utilização de um material eletro-ativo que pode ser tanto desnaturado ou reticulado com a exposição à radiação ionizante. No caso de íons, seu baixo espalhamento ao longo do seu trajeto pelo material proporciona a fabricação de estruturas mais profundas^{74,75}.

Outras técnicas litográficas baseadas em feixes eletrônicos, raiosX ou feixes iônicos de baixa energia (*Focused Ion Beam - FIB*) apresentam diversas desvantagens com relação ao PBW. Técnicas com feixes eletrônicos possuem a desvantagem do alto espalhamento dos elétrons ao longo do seu trajeto pelo material, o que permite somente a fabricação de estruturas rasas. As técnicas de raiosX altamente colimados, além de exigirem o uso de máscaras, requerem acesso a uma fonte de luz síncrotron. Enquanto FIB, apesar da vantagem de possibilitar a fabricação de estruturas tridimensionais por sputtering, é uma técnica mais lenta e demonstra problemas com redeposição do material removido ^{74,75}.

A técnica de PBW é composta de duas etapas. Primeiramente, a amostra é irradiada utilizando-se o padrão desejado e posteriormente é submetida a uma solução química para a revelação das estruturas. A irradiação promove a fragilização ou enrijecimento do material. A revelação através da solução pode ser positiva ou negativa dependendo do efeito da irradiação sobre o material. Em geral

a revelação de estruturas em semicondutores é do tipo negativa e estruturas em polímeros do tipo positiva. A solução química varia de acordo com o material a ser removido^{74,75}.

Diversas aplicações requerem diferentes aperfeiçoamentos da técnica de forma a adequar às necessidades de cada utilização. Algumas das aplicações são: fabricação de substratos para crescimento celular⁴³⁻⁴⁵, fabricação de microfiltros⁴⁹, microfluídica e microfotônica^{39,40,76}.

2.4 MICROFEIXE DE ÍONS

Nas últimas décadas, a demanda por feixes iônicos de alta energia para análise elementar e estrutural vem crescendo consideravelmente com os avanços nas pesquisas em física do estado sólido e eletrônica. Diante desta demanda, o desenvolvimento de microssondas iônicas representou um avanço para as técnicas analíticas por feixes de íons. O principal objetivo da utilização de microssondas iônicas é a obtenção de um feixe com o menor tamanho possível na superfície da amostra⁵⁰.

O princípio de funcionamento deste tipo de equipamento é similar ao sistema óptico clássico. Neste caso, o objeto é um feixe previamente colimado por uma fenda denominada “fenda objeto” e este feixe é então reduzido por um sistema de focalização. A teoria regente da óptica iônica é baseada nos conceitos clássicos como demagnificação e aberrações esférica e cromática⁵⁰.

Feixes iônicos podem ser focalizados de diversas maneiras: lentes coaxiais eletrostáticas, solenoides cilíndricos supercondutores e quadrupolos magnéticos. Lentes eletrostáticas e solenoides não apresentam aberrações intrínsecas, no entanto, possuem menor poder de demagnificação^{50,51}.

Quadrupolos magnéticos possuem um alto poder de focalização pois suas linhas de campo são perpendiculares à velocidade do íon. No entanto, a focalização de um quadrupolo não é simétrica, uma vez que ele focaliza em um plano e desfocaliza no plano ortogonal. Para a obtenção de um feixe focalizado nos dois planos é preciso utilizar no mínimo dois quadrupolos. Diversas configurações são feitas para

diferentes sistemas, utilizando dois, três ou quatro quadrupolos (chamadas de dubletos, tripletos e quadrupletos)^{50,51}.

A Figura 2.6 mostra um esquema simplificado de como se dá a focalização de um feixe iônico utilizando uma associação de dois quadrupolos, um dubleto. O primeiro quadrupolo (em a e b) diminui a dimensão do feixe verticalmente, enquanto aumenta horizontalmente. Por outro lado o segundo quadrupolo (em c e d), que possui a polarização oposta ao primeiro, diminui a dimensão do feixe horizontalmente e aumenta verticalmente. O resultado final esperado é um feixe simétrico nas duas direções.

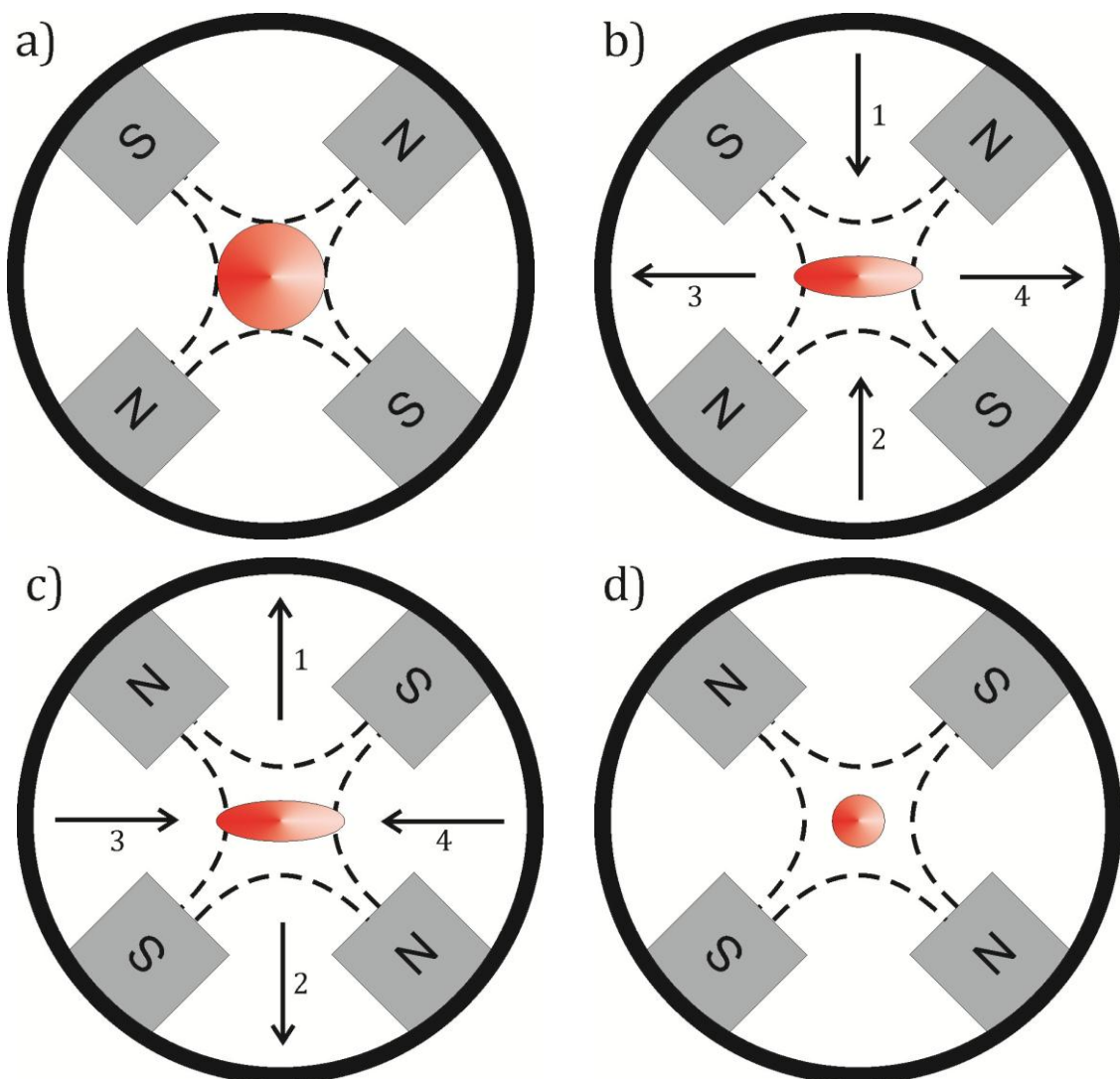


Figura 2.6: Esquema ilustrando a focalização do feixe iônico (saindo da página) para dois quadrupolos magnéticos. O primeiro quadrupolo (em a e b) diminui a dimensão do feixe na direção vertical e aumenta na direção horizontal, enquanto que o segundo quadrupolo (em c e d) diminui a dimensão do feixe na direção horizontal e aumenta na direção vertical, resultando em um feixe simétrico.

Para avaliar o potencial de cada sistema de lentes, é necessário levar em consideração as aberrações do sistema, que podem ser intrínsecas (associadas a um sistema de focalização) ou parasíticas (relacionadas a defeitos de fabricação, desalinhamento das lentes, instabilidade dos quadrupolos)⁵⁰.

O fator de demagnificação e astigmatismo estão altamente correlacionados. O fator de demagnificação é a razão entre as dimensões do feixe antes e depois de passarem pelo sistema de focalização. Há um fator para o eixo x e um fator para o eixo y. Para o sistema de quadrupoleto, o fator de demagnificação é igual para ambos os eixos. No entanto, para sistemas do tipo dubleto e tripleto esses fatores são levemente diferentes, o que causa astigmatismo, ou seja, um feixe elipsoide ao invés de circular^{50,51}.

Aberração cromática está associada à energia do feixe e ao ângulo com que o feixe está posicionado com relação às lentes. Portanto, para minimizar esta aberração é necessário um alinhamento preciso das lentes para que o campo magnético esteja o mais perpendicular possível ao eixo do feixe. Outro fator importante é a estabilidade do feixe, uma vez que quanto menor a dispersão de energia, menor é o efeito da aberração cromática. Um terceiro fator é a estabilidade do campo magnético das lentes e, portanto, da corrente de excitação dos quadrupolos⁵⁰.

Aberração esférica está principalmente associada com o espalhamento do feixe e o ângulo com que cada íon interage com os campos magnéticos das lentes. No entanto, seus efeitos são consideravelmente menores que os da aberração cromática, se tornando mais efetivos para a obtenção de feixes com tamanhos na ordem de sub-microns⁵⁰.

O sistema que apresenta maior demagnificação é o tripleto. No entanto, quanto maior a demagnificação, maiores são os efeitos das aberrações cromáticas e esféricas. Para a otimização deste sistema, o acelerador deve ser o mais estável possível, para que haja uma menor dispersão em energia, e é necessário um alinhamento minucioso do sistema óptico. A dispersão em energia também causa uma flutuação na corrente, de forma que o feixe não seja varrido uniformemente ao longo da amostra, de forma que alguns pontos da amostra serão atingidos por uma corrente mais elevadas do que outros pontos⁵¹.

A varredura é feita por placas eletrostáticas ou magnéticas, localizadas antes ou depois do sistema de focalização. A escolha de cada tipo e configuração de placas de varredura depende de cada sistema de microsonda. Placas eletrostáticas são mais rápidas que as magnéticas e evitam o dano nas amostras, no entanto, requerem um sistema de vácuo. A escolha da posição das placas vai influenciar tanto na distância focal como na abrangência da varredura^{50,51}.

O sistema de varredura está associado ao de coleta de dados, atualizando a posição associada a cada evento medido, possibilitando a obtenção de imagens resolvidas espacialmente⁵¹. Sendo assim, para cada ponto varrido da amostra, ao final da medida, se obterá um espectro de contagens por canal associado a ele, como observa-se na Figura 2.7.

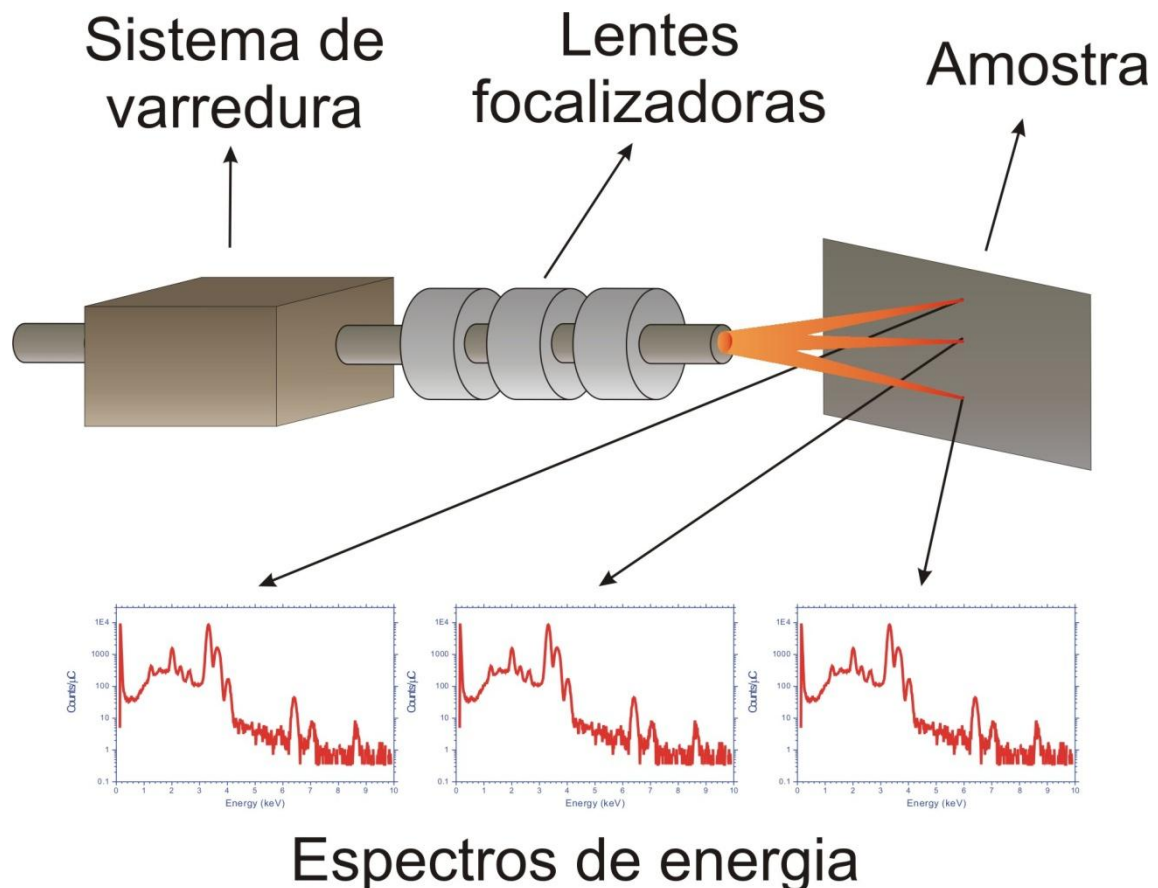


Figura 2.7: Diagrama esquemático dos sistema de varredura da microsonda iônica.

2.5 EMISSÃO DE RAIOSX INDUZIDA POR PARTÍCULAS (PIXE)

Com a incidência de um feixe de partículas carregadas sobre um material, diversas interações ocorrem. Uma delas é a excitação dos átomos que compõem a amostra através da ejeção de um elétron das camadas mais internas. Os elétrons tendem a se rearranjarem para que o átomo retorne a um estado energético mais estável. Para tal ele pode emitir um outro elétron, denominado elétron Auger, ou emitir um fóton de raio-X característico através do rearranjo dos elétrons ^{51,77}. Um esquema simplificado desse processo pode ser observado da Figura 2.8.

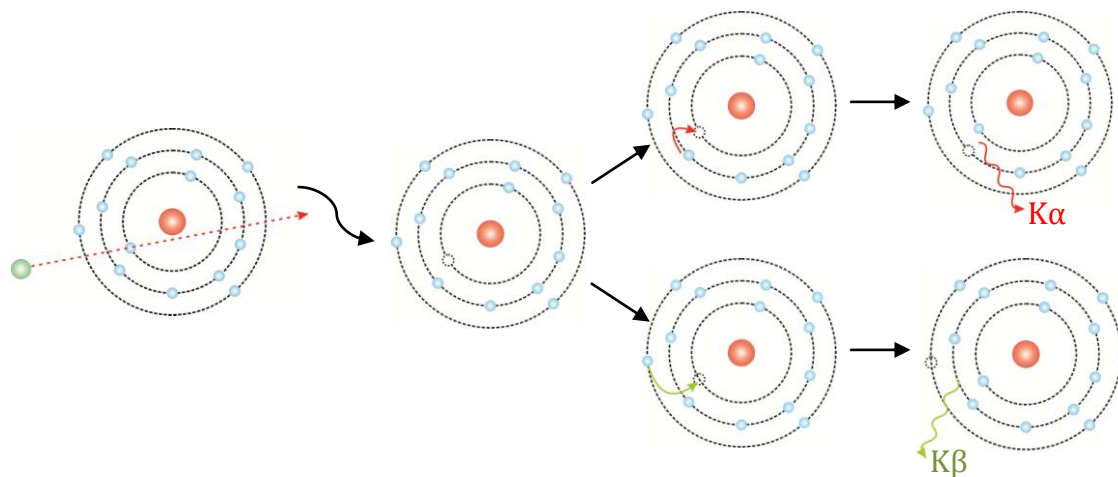


Figura 2.8: Diagrama esquemático do fenômeno de excitação do átomo pelo íon incidente e emissão de raios X do tipo $K\alpha$ e $K\beta$

Cada fóton de raio X é característico não só do átomo que o emitiu, como também as camadas eletrônicas envolvidas na transição. Algumas são ilustradas na Figura 2.9. Cada fóton é detectado por um detector de silício dopado com lítio - Si(Li). Cada pulso é amplificado e finalmente registrado em um analisador e um espectro de contagens em função de canais é construído⁷⁷.

Considerando o número de transições eletrônicas existentes, o espectro esperado é bastante complexo. No entanto grande parte das transições não são resolvíveis, portanto o espectro são os grupos compostos dos conjuntos de linhas $K\alpha$, $K\beta$, $L\alpha$, $L\beta$, $L\gamma$, $M\alpha$, e assim por diante⁵¹.

O espectro de raio X apresenta um ruído contínuo juntamente com os raio X característico emitido pela amostra. O ruído é composto da interação dos íons com

os elétrons da amostra, bem como a interação dos elétrons secundários com a amostra⁵¹.

Mesmo com os agrupamentos das emissões em um só pico, o espectro de PIXE pode ser bastante complexo, havendo a sobreposição de alguns picos. Portanto, se faz o uso de softwares apropriados para a deconvolução de tais picos e a identificação dos mesmos. Além disso, é possível calcular a concentração de cada elemento. Nesse processo, é feita uma calibração do sistema com padrões, onde parâmetros como o ângulo sólido coberto pelo detector e a eficiência do mesmo são determinados⁷⁷.

A técnica é pouco sensível a elementos muito leves, portanto não é uma técnica apropriada para análises dos elementos majoritários de amostras orgânicas. No entanto é sensível a núcleos mais pesados, chegando a limites de detecção na ordem de partes por milhão, sendo assim a técnica aconselhada para determinar e quantificar elementos traço em uma amostra orgânica⁷⁷.

Vários tipos de amostras podem ser analisadas, sendo amostras finas, amostras grossas com matriz conhecida ou desconhecida, e amostras intermediárias. No entanto, a amostra deve ser homogênea para ser uma análise representativa de toda a amostra ⁵¹.

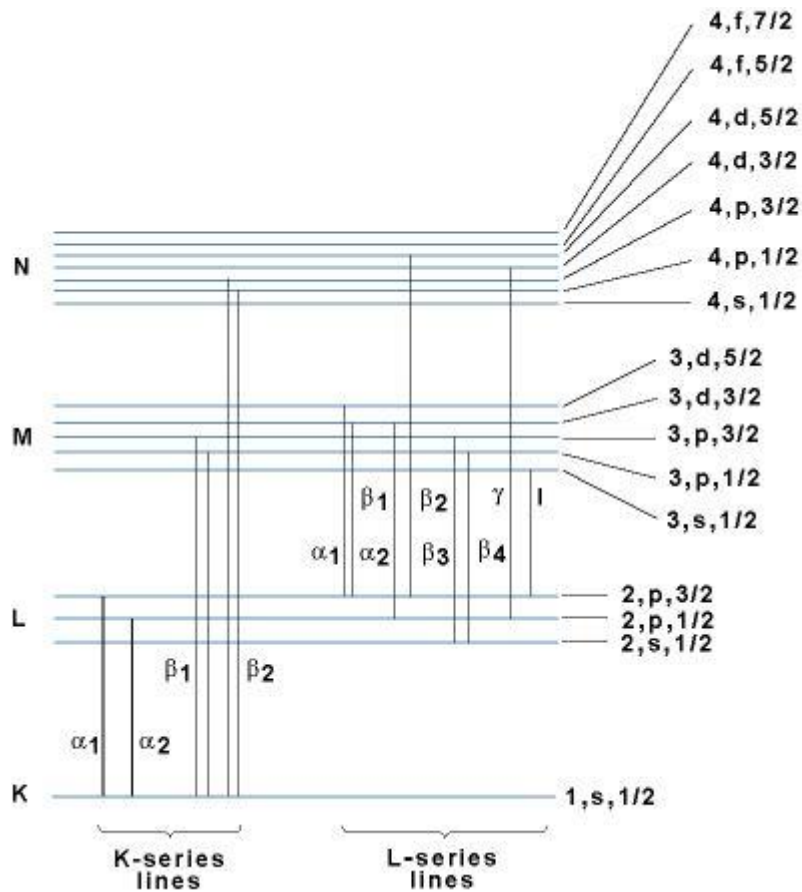


Figura 2.9: Níveis de energia e transições de raios-X mostrando as séries K e L ⁷⁸.

A técnica de PIXE pode ser utilizada associada a um sistema de microsonda iônica, possibilitando a elaboração de mapas elementares e assim permitindo a análise de amostras não homogêneas. A técnica se assemelha à de EDX (*Energy-Dispersive X-ray Spectrometry*) realizada com uma microsonda eletrônica. No entanto, o limite de detecção é consideravelmente menor, devido à menor radiação de fundo. A vantagem da resolução espacial da microsonda eletrônica se limita a amostras com espessura até $1\mu\text{m}$, devido ao grande espalhamento dos elétrons ao longo da amostra. A microsonda iônica sofre menor espalhamento no interior da amostra e, portanto, permite uma maior resolução espacial para maiores espessuras ⁷⁷.

2.6 MICROSCOPIA IÔNICA DE VARREDURA POR TRANSMISSÃO (STIM)

A técnica de STIM consiste em medir a energia dos íons transmitidos por uma amostra submetida a um feixe de íons. É uma técnica que permite fazer imagens representativas da variação da densidade da amostra⁵¹.

Em sua configuração original, um detector de partículas é posicionado atrás da amostra, alinhado com o eixo do feixe de íons (também chamado de *on-axis STIM* ou *STIM em linha*). Devido às diferenças de momento, os ângulos de espalhamento íon-elétron são pequenos. Além disso, a uma baixa corrente, a probabilidade de espalhamento de ângulos mais altos, devido à interação nuclear, são relativamente pequenas^{77,79}.

Para tais análises, o tipo de íon utilizado e a energia são normalmente escolhidos para que o feixe possa atravessar a amostra e que a perda de energia seja primariamente devido à interação com os elétrons da amostra. Diferentes energias e diferentes íons resultarão em diferentes separações em energia, uma vez que a componente eletrônica da perda de energia é dependente desses dois parâmetros^{77,79}.

STIM em linha (on-axis) é uma técnica altamente eficiente e relativamente rápida, pois cada íon incidente produz um evento mensurável. Por isso é essencialmente uma técnica de baixa corrente, na ordem de milhares de íons por segundo. Isso possibilita uma alta resolução espacial, porém impede que a técnica, nessa configuração, seja associada a outras técnicas como *micro-PIXE* e *micro-RBS* que requerem correntes na ordem de 100 pA^{51,77}.

No caso em que o interesse da técnica esteja associado a outros tipos de medida, a configuração *off-axis*, ou fora do eixo, pode ser adotada. Neste caso, o detector não está alinhado com o eixo do feixe logo atrás da amostra, mas posicionado a ângulos entre 15° e 45°. A corrente deve ser elevada, chegando a medir dezenas ou centenas de pA, para aumentar a probabilidade de interações entre os íons e os núcleos da amostra, pois é essa interação que possibilitará a formação da imagem, devido ao ângulo de detecção ser maior^{77,80}.

A desvantagem dessa configuração é que o espectro de energia não é puramente resultante da perda de energia devido à densidade. Os picos sofrem um alargamento devido a interação do feixe com os núcleos da amostra e, portanto, também possuem informação de composição, no caso de amostras multielementares. Outro fator que alarga os picos é o efeito de espalhamento do íon tanto na entrada quanto na saída da amostra. Outro inconveniente do *STIM off-*

axis é que não há o pico característico caso haja um orifício na amostra, que seria um pico sem perda de energia. Este efeito pode melhorar a qualidade das imagens 77,80.

Pallon et al.⁸⁰ propõe uma configuração híbrida chamada de configuração “*on/off-axis*”. A montagem experimental é semelhante à do STIM *off-axis*, no entanto se posiciona uma película polimérica de espessura e densidade conhecidas atrás da amostra, alinhada com o feixe e uma fenda que intercepta os íons com espalhamentos a ângulos maiores. Esta configuração pode ser observada na Figura 2.10. Neste caso os íons transmitidos a baixos ângulos (sem interação com os núcleos da amostra) são espalhados pela película polimérica em direção ao detector na posição *off-axis*. Nesse caso, o sinal que é lido é equivalente ao STIM *on-axis*. Essa configuração não só melhora a resolução em energia do espectro, como também permite a visualização de um buraco da amostra através do pico característico sem perda de energia. Além disso pode-se utilizar correntes na ordem de pA, permitindo realizar a técnica de STIM simultaneamente às técnicas de micro-RBS e micro-PIXE . A Figura 2.11(a) apresenta em a um mapa de STIM na configuração *on/off-axis* em as intensidades de cinza (de 1 a 4) são representativos do aumento da espessura, enquanto que as Figura 2.11(b) e Figura 2.11(c) apresenta os espectros para a mesma amostra utilizando as duas configurações *off-axis* e *on/off-axis*⁸⁰.

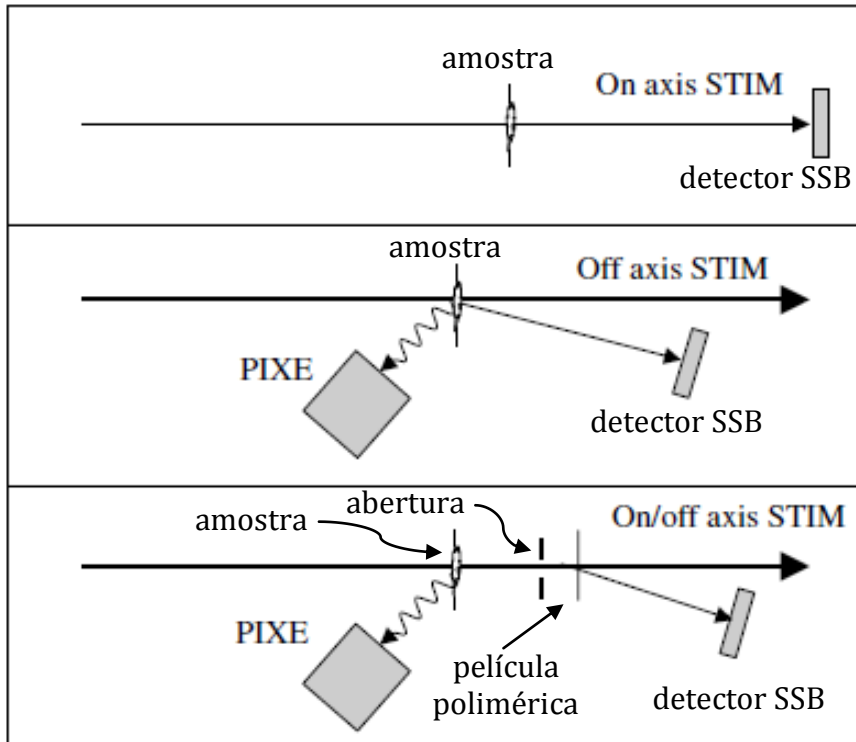


Figura 2.10: Esquemas das três configurações possíveis de STIM: *on-axis*, *off-axis* e *on/off-axis* (adaptado de⁸⁰).

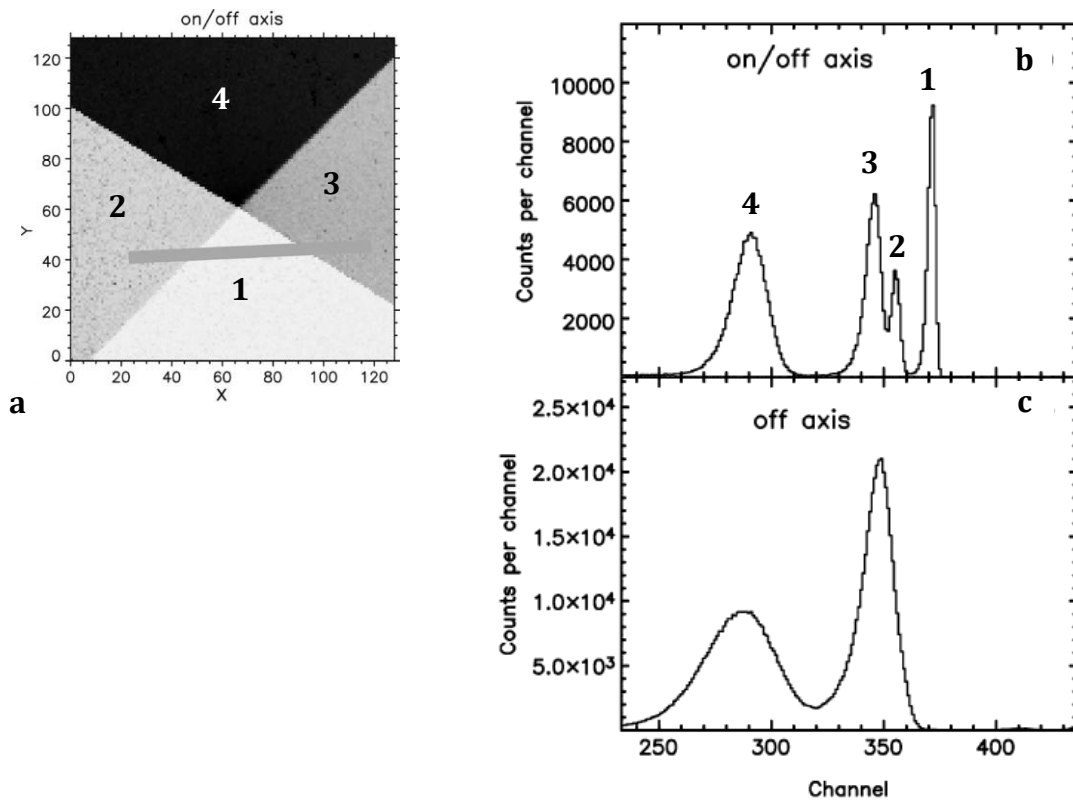


Figura 2.11: Mapa de STIM *on/off-axis* apresentando o aumento de espessura sendo a ordem crescente de 1 a 4 (a) e espectros referentes à mesma amostra submetida às configurações de STIM *on/off-axis* e *off-axis* (b e c). Adaptado de⁸⁰.

É claramente visível que a configuração *off-axis* não é capaz de resolver as diferenças de densidade da amostra e que a configuração *on/off-axis* contorna esse problema. É possível observar um pico extra no espectro referente à configuração *on/off-axis* que é representativo de um orifício na amostra pois sua energia é igual à energia do feixe incidente.

A configuração *on/off-axis* é interessante para aprimorar a resolução em energia para casos em que a técnica de STIM tenha que ser utilizada com outras técnicas. No entanto, a técnica de STIM *on-axis* é geralmente mais efetiva pois provê uma resolução espacial melhor. Aguer et al.⁸¹ apresenta um estudo de tecido de pele em que as configurações *on/off-axis* e *off-axis* prejudicaram a resolução espacial, a ponto de não mais identificar as camadas celulares do tecido. As imagens podem ser observadas na Figura 2.12.

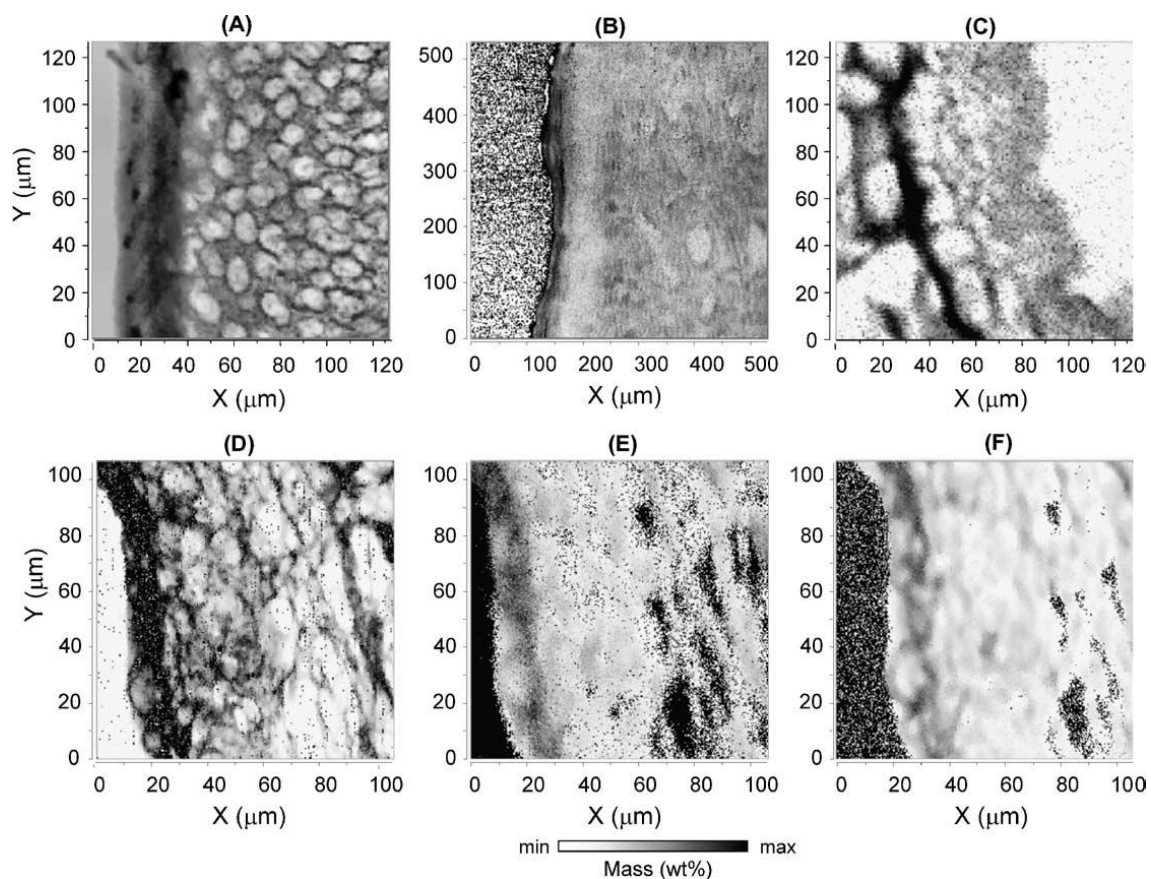


Figura 2.12: Imagens obtidas por STIM *on-axis*, *off-axis* e *on/off-axis* em grupos diferentes: (A) STIM *on-axis* de fatia de 14 μm de pele de sola de pé de rato; (B) STIM *off-axis* de fatia de 25 μm de pele de porco; (C) STIM *on/off-axis* de fatia de 14 μm de pele de porco; imagens de STIM de fatia de 14 μm de pele de porco nas configurações (D) *on-axis*, (E) *off-axis* e (F) *on/off-axis*⁸¹

Como dito anteriormente, a escolha do íon e da energia do feixe são importantes para o resultado final do espectro e das imagens. Minqin *et al.*¹¹ elucidou as diferenças de irradiar uma mesma amostra com um feixe de 2 MeV de H_2^+ (equivalente a um feixe de 1 MeV de H^{+1}) e um feixe de 1 MeV de partículas alfa (He^{+2}).

Primeiramente, como pode ser observado na Figura 2.13, a perda de energia do feixe de partículas alfa é muito mais significativa que a perda de energia do feixe de H_2^+ . Isso ocorre, pois o poder de freamento eletrônico para partículas alfa é maior¹¹.

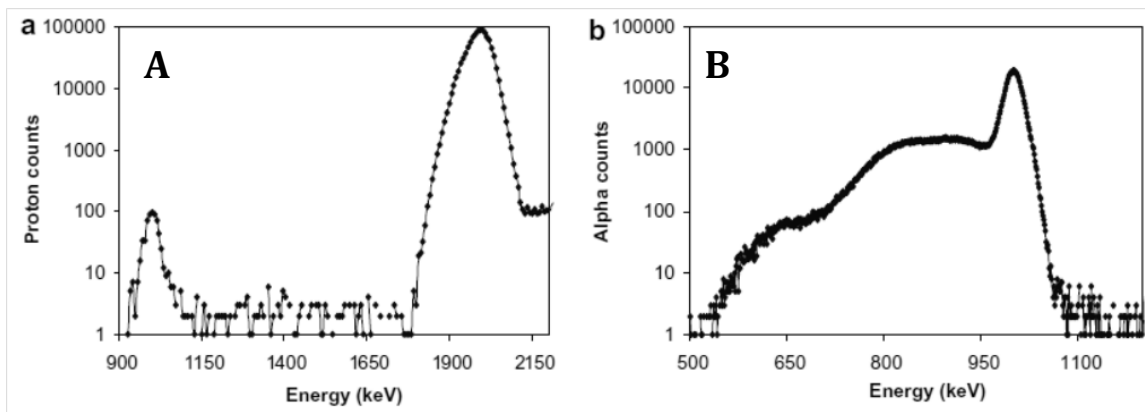


Figura 2.13: Espectros de energia de STIM de (A) um feixe de 2 MeV de H_2^+ varrendo sobre uma célula e (B) um feixe de 1 MeV de partículas alfa varrendo a mesma célula¹¹

Na Figura 2.14 observa-se o efeito dos dois feixes nas imagens formadas a partir dos gráficos da Figura 2.13. Observa-se que para o feixe de 1 MeV de partículas alfa a separação em energia é melhor, revelando maiores detalhes da célula como, por exemplo, sub-estruturas no núcleo. A imagem foi formada utilizando um ajuste de energia média, considerando todo o espectro de energia¹¹.

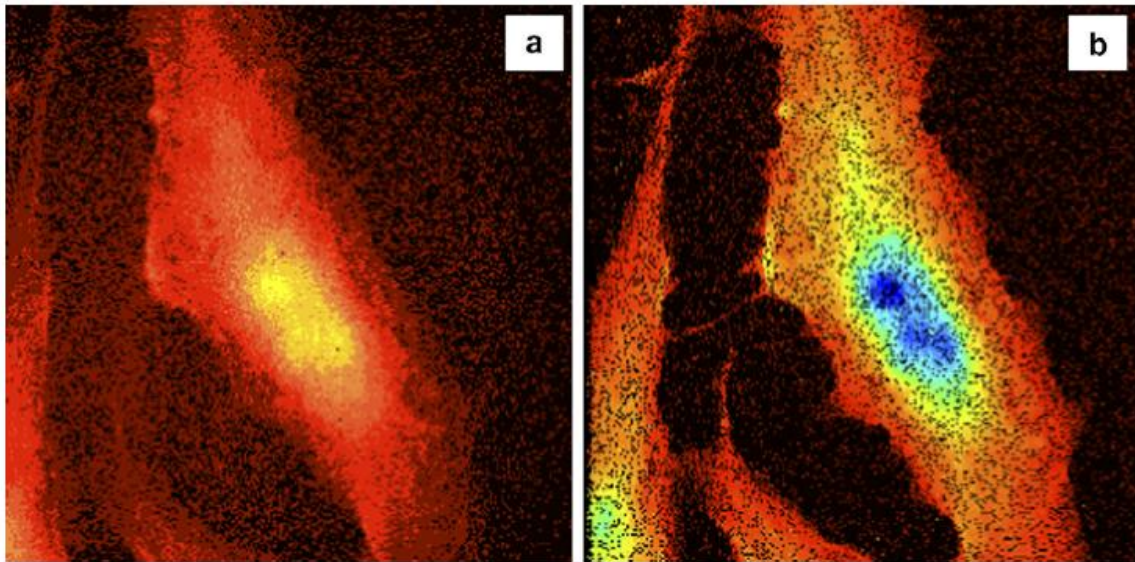


Figura 2.14: Imagens de STIM de uma célula submetida à varredura de (a) um feixe de 2 MeV de H_2^+ e (b) um feixe de 1 MeV de partículas alfa¹¹.

Várias abordagens do espectro podem ser feitas para a formação das imagens de STIM. A mais simples é a divisão do espectro em janelas de energia e montar uma imagem para cada janela. A desvantagem dessa abordagem é que gera imagens ruidosas ^{51,79}. No entanto, essa abordagem pode ser vantajosa para algumas amostras, como o caso elucidado por Pallon et al.⁸⁰ e no caso abordado neste trabalho, como será elucidado posteriormente.

Outra abordagem, mais comumente usada, que produz imagens de maior qualidade é fazer um ajuste da perda média de energia em cada posição, considerando todo o espectro ^{51,79}.

3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE FÍGADO DE PEIXE

Para estudos histopatológicos, protocolos bem estabelecidos são amplamente usados. Os fígados são extraídos tão logo os peixes são abatidos, pois sua autólise inicia-se imediatamente após a morte dos animais, e são quimicamente fixados em solução formalina 10% tamponada. Então, os fígados são desidratados em séries alcoólicas crescentes, de 70% a 100% por 60 minutos cada e, em seguida, submetidos a dois banhos de xilol de 60 minutos e então emblocados em parafina. Após o esfriamento, os blocos são submetidos a microtomia e fatias de 4-5 μ m são produzidas e fixadas em lâminas de vidro, reidratadas e coloridas com hematoxilina/eosina para análise por microscopia óptica.

Para a análise dos fígados de peixe por micro-PIXE, no entanto, algumas modificações no protocolo padrão precisaram ser feitas. Primeiramente, laminas de vidro são substratos indesejáveis para análises por PIXE devido à presença de silício e eventuais outros elementos que interferem no espectro de energia resultante, causando má interpretação dos dados. Portanto, é preferível o uso de um substrato “invisível” ao feixe iônico, como um polímero. Para tal, foi preparado um substrato de um filme de 2 μ m de espessura de poli(tereftalato de etileno) (PET Mylar®)

Outra problema para a análise com feixes iônicos é o uso de corantes, que podem conter metais em sua composição e também influenciar a análise. Por isso, as amostras destinadas à análise com micro-PIXE não devem ser coloridas, o que leva a outro problema, uma vez que as modificações dos tecidos não coloridos são de difícil observação, mesmo com ajuda de um microscópio, por falta de contraste entre as células lesionadas e o tecido saudável.

Para contornar esse problema, lâminas de vidro foram sobrepostas com as lâminas de tecidos tingidos e os contornos dos fígados e regiões lesionadas foram desenhados sobre elas. As lâminas desenhadas foram posicionadas sobre os tecidos emblocados e, com a ajuda de um micro-ordenador de tecidos (*tissue microarrayer*), cilindros contendo somente tecido modificado foram reemblocados e novas lâminas circulares foram

preparadas e fixada nos substratos de Mylar®. A Figura 3.1 mostra um esquema da preparação das amostras.

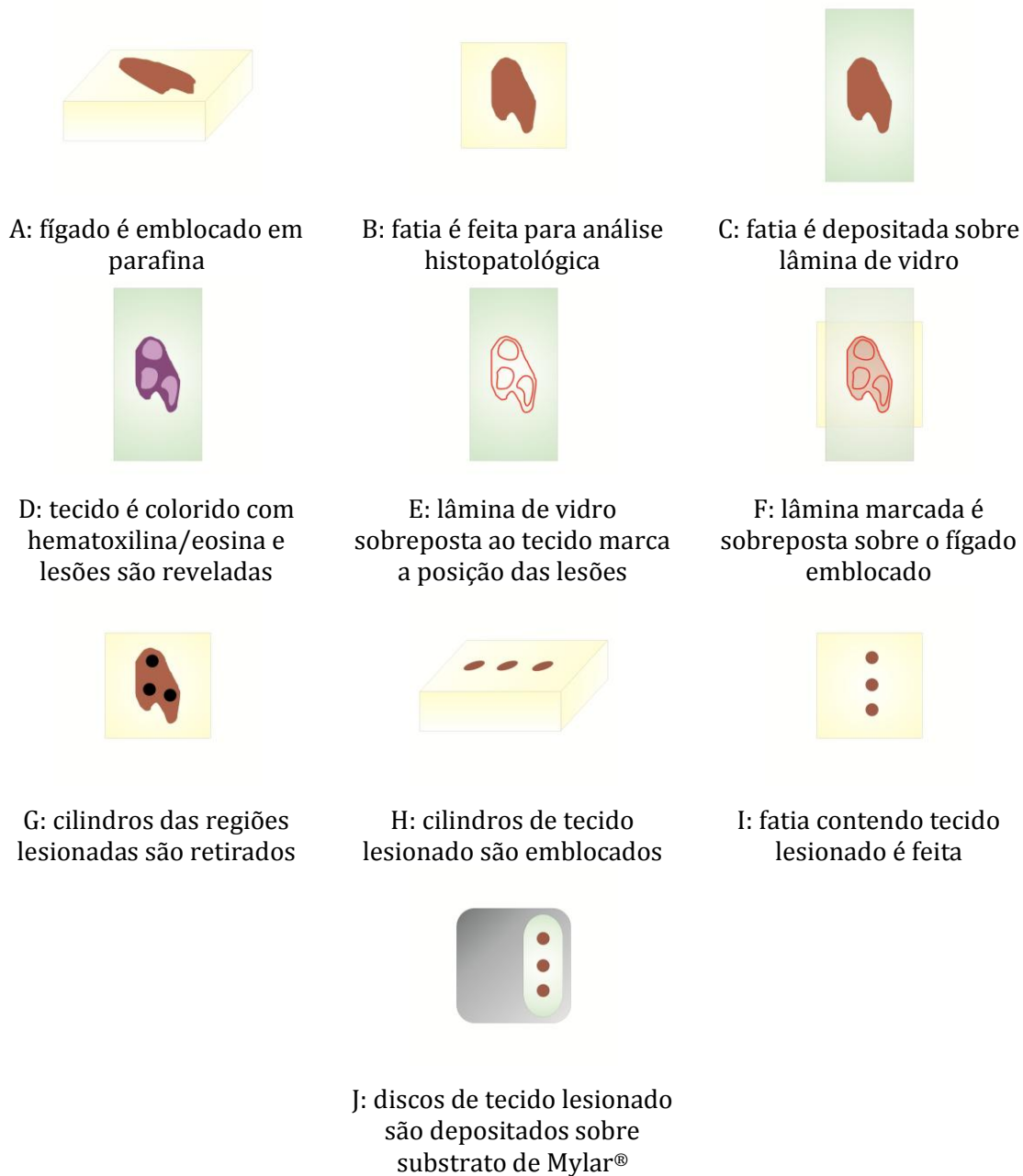


Figura 3.1: Esquema de preparação das amostras de fígado para análise com micro-PIXE.

Antes de estabelecer esse processo de preparação de amostras, diversos testes foram realizados com fatias inteiras de fígado e as análises eram realizadas nas proximidades dos CMM's, pois sabe-se que essas estruturas sempre acompanham as lesões. O processo de coleta de amostras foi realizado pelo Instituto Oceanográfico da Universidade de São

Paulo. O processo de preparação das lâminas foi desenvolvido em colaboração entre o Laboratório de Implantação Iônica da UFRGS e o Instituto Oceanográfico da USP.

3.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS POLIMÉRICAS MICROESTRUTURADAS POR MICROFEIXE DE ÍONS

Folhas de poli(tereftalato de etileno) (PET - Mylar®), de $\sim 1 \text{ cm}^2$ de área e $12 \mu\text{m}$ de espessura, foram irradiadas, à temperatura ambiente, com prótons de 3 e 2 MeV de energia. Foram empregadas fluências de 1×10^{13} a 6×10^{15} íons/ cm^2 e correntes variando de 100 a 200 pA para produzir diferentes estruturas nas folhas.

As estruturas foram desenhadas, utilizando diferentes padrões, com feixe de tamanho $\sim 2,0 \times 2,5 \mu\text{m}^2$. Depois de irradiadas, as amostras foram submetidas a uma solução corrosiva de 6 M de NaOH em um banho térmico a $(60 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ com agitação magnética constante.

O tempo do processo de corrosão variou de 1 a 60 minutos. Tempos tão baixos como 1 minuto foram suficientes para remover completamente o material da área irradiada para as maiores fluências. As amostras foram posteriormente analisadas por STIM *on-axis* e *off-axis*, bem como por MEV. As amostras foram divididas em três grupos: duas linhas, uma linha e multi-estruturadas.

Durante a estruturação, utilizou-se a razão 1 pixel da imagem para $1 \mu\text{m}$ do sistema de varredura.

3.2.1 Amostras do tipo duas linhas

O primeiro grupo, em caráter de teste, foi composto de amostras com padrões de duas linhas de $1 \times 100 \text{ pixel}^2$ (Figura 3.2A). A fluência utilizada para a irradiação foi de 6×10^{15} íons/ cm^2 e os tempos de ataque foram de 20, 30, 40 e 60 minutos em uma solução aquosa de 6 M de NaOH a uma temperatura de $60 \text{ }^\circ\text{C}$. A Figura 3.2B apresenta um esquema das amostras submetidas ao processo de corrosão.

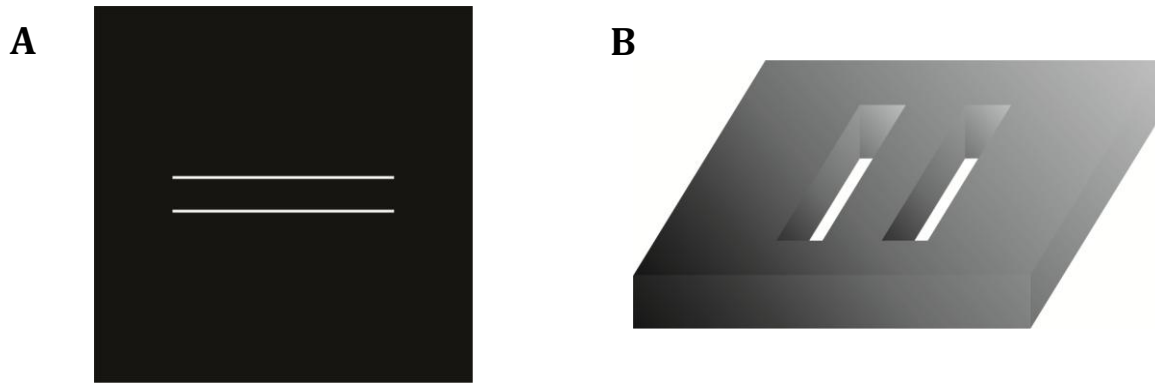


Figura 3.2: Imagem representativa do padrão de irradiação utilizado na preparação das amostras de duas linhas (A) e esquema das películas submetidas ao processo de corrosão (B)

3.2.2 Amostras do tipo uma linha

O segundo grupo de amostras é composta de estruturas de uma linha de $1 \times 100 \text{ pixel}^2$ (Figura 3.3A). A fluência utilizada para a irradiação das amostras foi de 6×10^{14} e 6×10^{15} íons/cm² e os tempos de ataque foram variados (descrição abaixo) em uma solução aquosa de 6M de NaOH a uma temperatura de 60 °C. A Figura 3.3B apresenta um esquema da amostras após submetidas ao processo de corrosão.

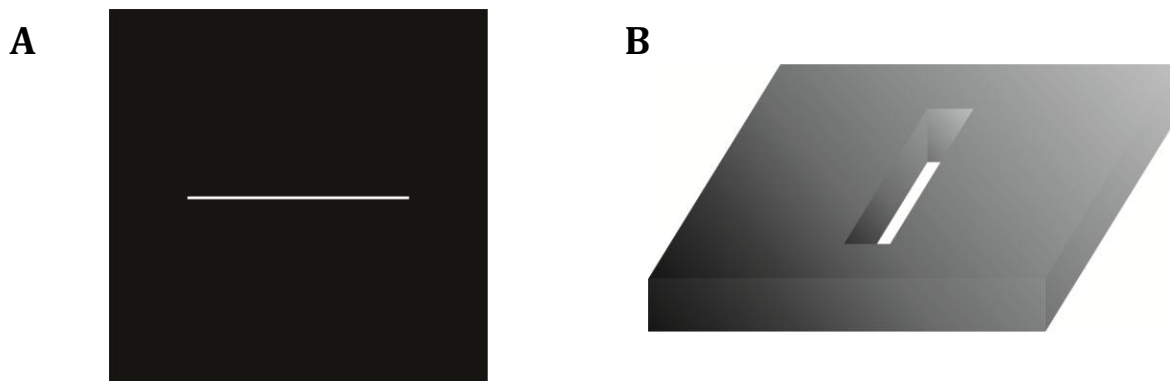


Figura 3.3: Imagem representativa do padrão de irradiação utilizado na preparação das amostras de uma linha (A) e esquema das películas submetidas ao processo de corrosão (B)

Esse grupo de amostras é dividido em três conjuntos:

- O primeiro conjunto de amostras foi utilizado na comparação entre STIM *on-axis* e *off-axis* e obtenção de alguns resultados preliminares. Os tempos de ataque para esse conjunto foram de 2,5, 7, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos. A fluência utilizada foi de 6×10^{15} íons/cm².
- O segundo conjunto de amostras foi utilizado para estudo comparativo com a técnica de MEV e verificar a compatibilidade de ambas as técnicas (STIM e MEV). Os

tempos de ataque para esse conjunto foram de 0, 1, 1,5, 2, 2,5, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos. A fluência utilizada foi de 6×10^{15} íons/cm².

- O terceiro conjunto de amostras foi produzido visando o estudo da técnica de STIM com diferentes íons (H^{+1} , He^{+2} e Li^{+3}). Os tempos de ataque para esse conjunto foram de 1, 5, 10, 15, 20, 30 e 40 minutos. A fluência utilizada foi de 6×10^{14} íons/cm².

3.2.3 Amostras multiestruturadas

O terceiro grupo de amostras é composto de multiestruturas. Foram usados dois padrões para cada amostra, sendo um quadrado menor e um quadrado maior vazado (Figura 3.4A e 3.4B) de modo que após a irradiação a estrutura esperada fosse um degrau e um buraco conforme ilustrado nas Figura 3.4C.e 3.4D

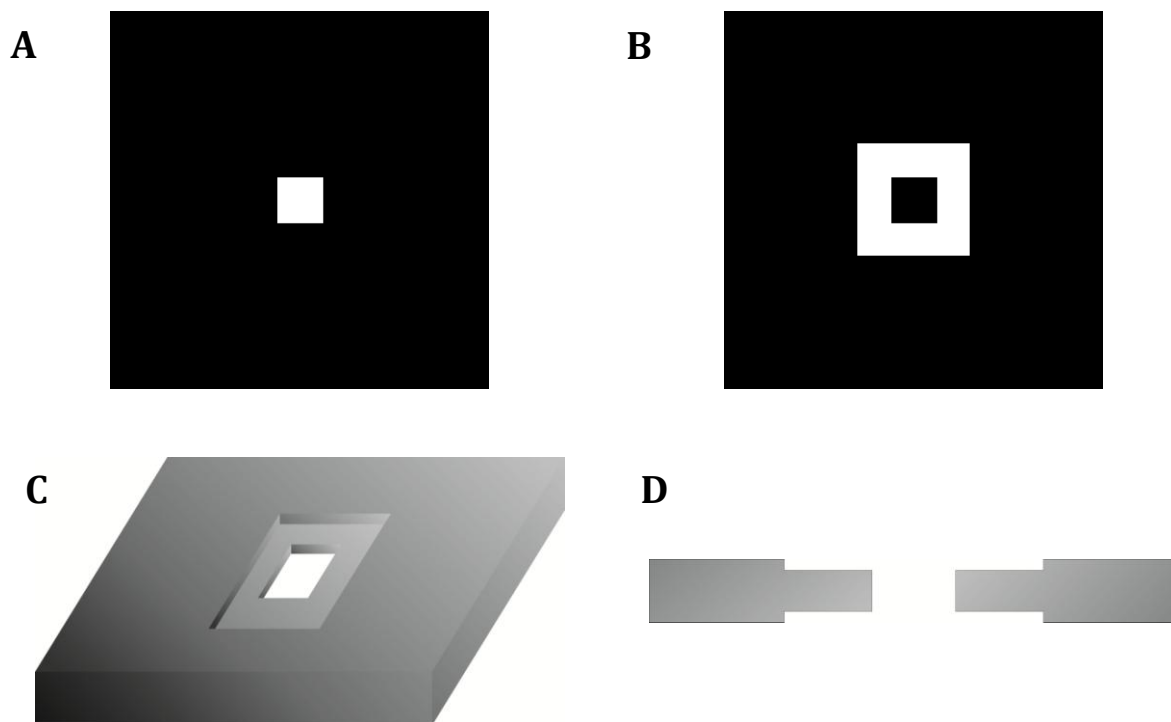


Figura 3.4: Imagens representativas dos padrões de irradiação utilizados na preparação das amostras do tipo degrau (A e B) e esquema das películas submetidas ao processo de corrosão em perspectiva (C) e em corte transversal (D)

As fluências utilizadas para a irradiação das amostras foi de 6×10^{14} íons/cm² para o quadrado e de 6×10^{13} , 4×10^{13} , 3×10^{13} e 1×10^{13} íons/cm² para o quadrado vazado. Três tamanhos de estruturas foram fabricados conforme indicado na Figura 3.5.

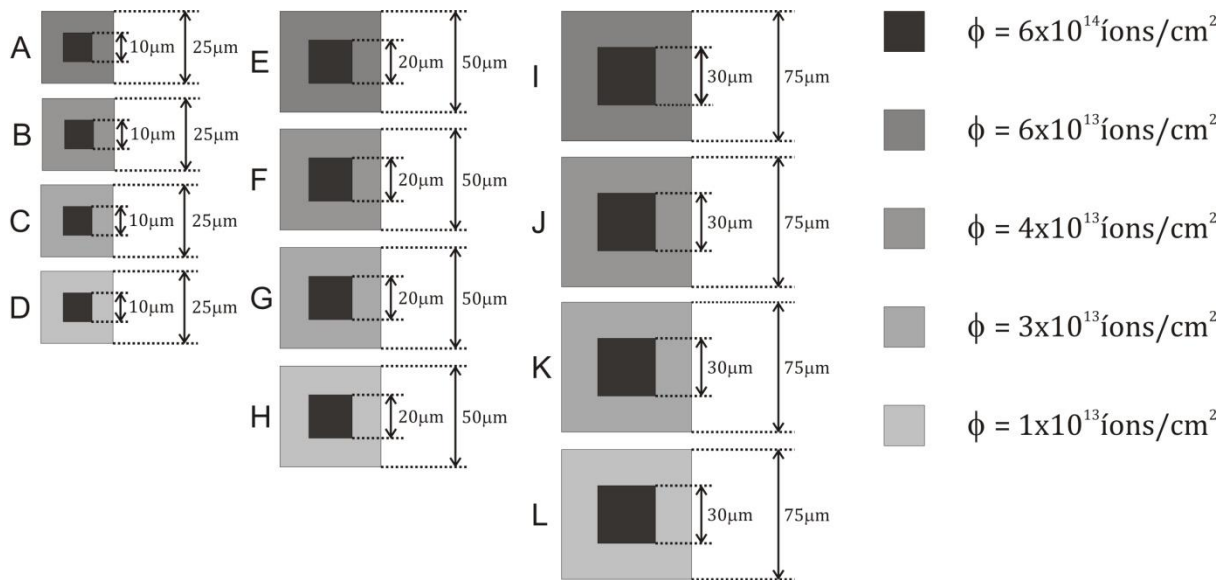


Figura 3.5: Fluências de irradiação e dimensões das amostras multiestruturadas do tipo degrau.

3.3 INSTRUMENTAÇÃO E TÉCNICAS ANALÍTICAS

3.3.1 Instrumentação da linha de Microfeixe do Laboratório de Implantação Iônica

Os experimentos utilizando feixes de íons foram realizados no LII-UFRGS, utilizando um acelerador do tipo tandem de 3MV. Um esquema deste tipo de acelerador e seus principais componentes pode ser visualizado na Figura 3.6.

Os íons oriundos de uma fonte tipo *duoplasmatron*, inicialmente negativos, são selecionados por sua massa e, posteriormente, acelerados. No meio do acelerador, um *stripper* de gás N_2 muda a carga dos íons para positiva. O feixe é então novamente acelerado em direção às linhas de análise e implantação, sendo defletido para a linha de escolha e focalizado.

A linha utilizada no decorrer desse trabalho foi a de microfeixe, tanto na preparação das amostras de películas poliméricas micro-estruturadas por feixe iônico como na análise dessas mesmas amostras por STIM. O sistema de microfeixe iônico foi produzido pela empresa Oxford Microbeams Ltd.

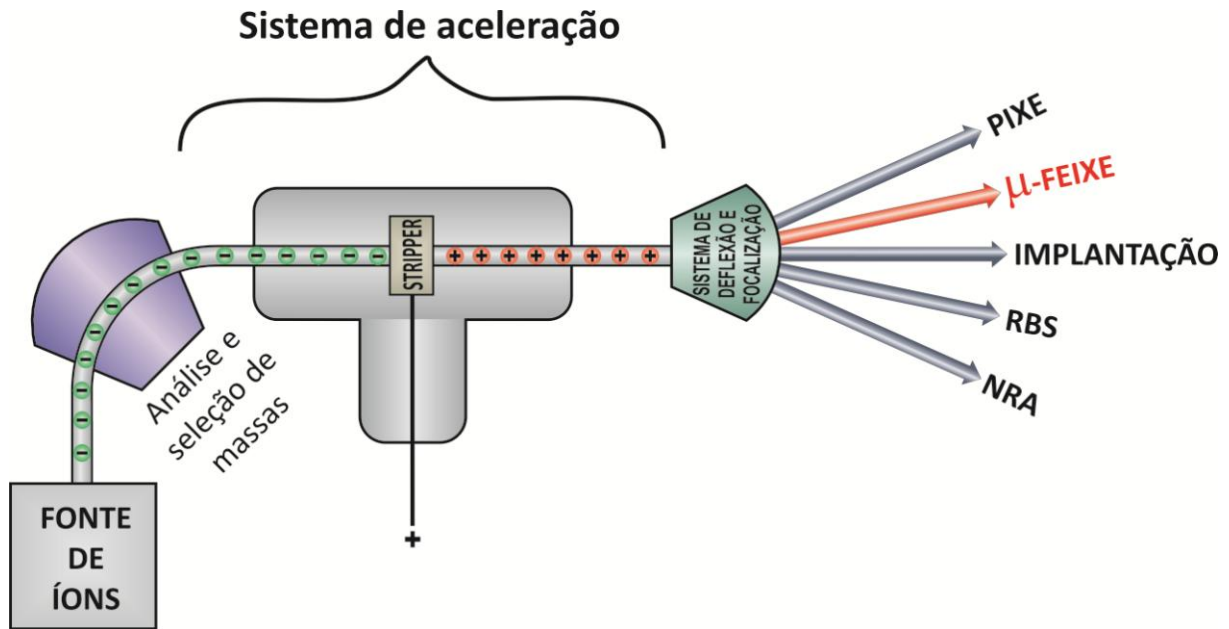


Figura 3.6: Esquema do acelerador de íons do tipo tandetron de 3MV do Laboratório de Implantação Iônica da UFRGS e seus principais componentes.

Uma vez defletido para a linha de micro-feixe, o feixe é colimado na fenda objeto, novamente colimado na fenda imagem. Posteriormente, o feixe passa pelas placas de varredura e é, então, focalizado por três quadrupolos magnéticos. A configuração utilizada dos quadrupolos é tal que a corrente das duas primeiras lentes é manipulada em conjunto e a da terceira é controlada independentemente. Na Figura 3.7A pode-se observar um esquema dos principais componentes da linha de micro-feixe e na Figura 3.7B observa-se uma foto panorâmica da linha toda, desde a saída do feixe do sistema de aceleração até a câmara de irradiação.

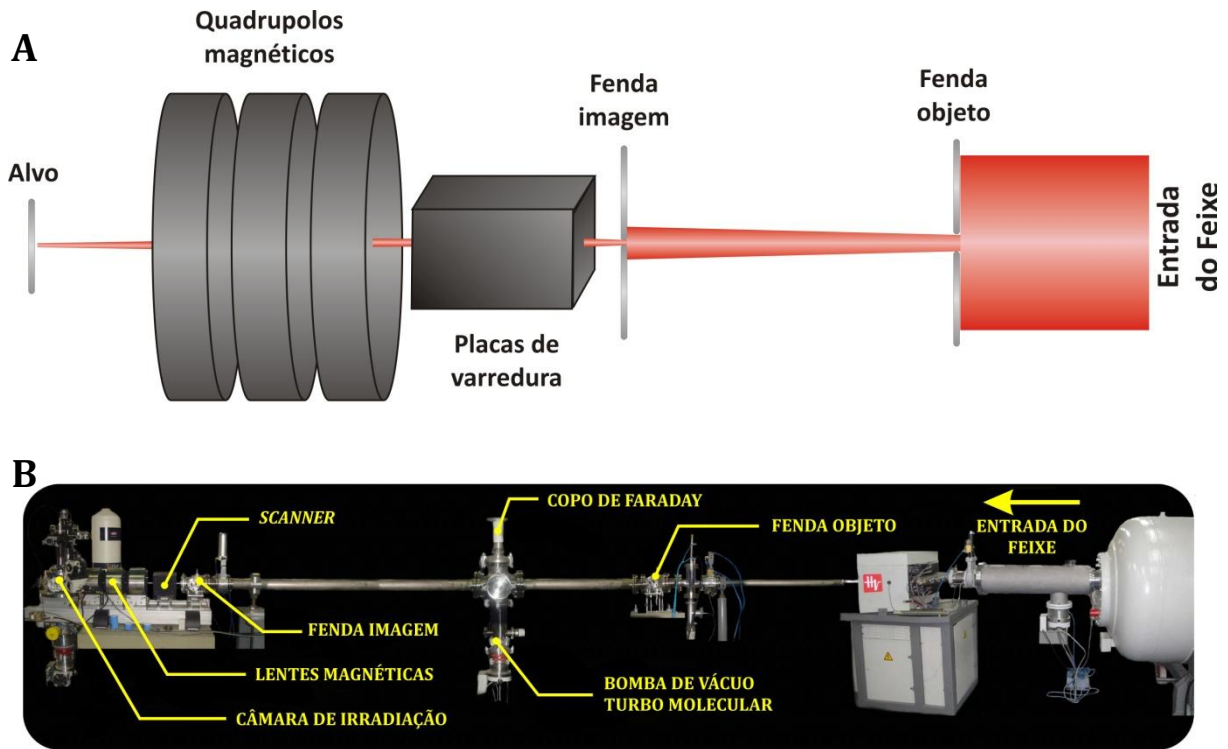


Figura 3.7: (A) Esquema da linha de micro-feixe com os principais componentes e as distâncias entre eles. (B) Foto panorâmica da linha de micro-feixe apontando alguns de seus componentes mais importantes.

A câmara de irradiação é padrão da Oxford Microbeams Ltd. e nela estão contidos três detectores, sendo um de silício dopado com lítio utilizado para detecção de raios X e posicionado a um ângulo de 135° com relação ao eixo de incidência do feixe. Há também outros três detectores de barreira de superfície, dos quais um é utilizado para STIM *off-axis* posicionado a 23° com relação ao eixo de incidência do feixe, outro é utilizado para medidas de RBS e RNA, posicionado a 158° , e o terceiro utilizado para STIM *on-axis* com posição alternável de forma que ora ele ora um copo de Faraday são posicionados a 0° . Um esquema da câmara pode ser observado na Figura 3.8.

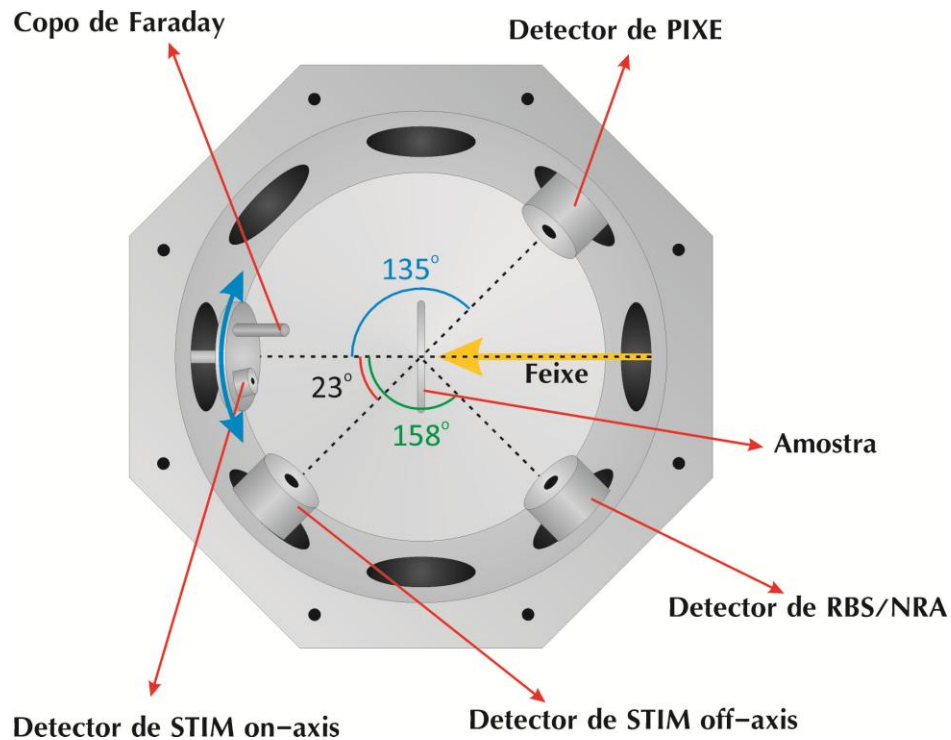


Figura 3.8: Esquema da câmara de irradiação, ilustrando os diferentes detectores e suas posições.

Os dados de STIM foram coletados e, em grande parte, analisados utilizando o programa de aquisição de dados OMDAQ[®] fornecido pelo fabricante do equipamento.

Os detectores utilizados nas medidas de STIM foram do tipo barreira de superfície (*SSB* – *silicon surface barrier*) e diodo PIN. O detector de barreira de superfície constitui de uma junção de dois semicondutores dopados do tipo p e do tipo n, quando uma partícula carregada atinge o detector, forma-se um par elétron-lacuna, gerando o sinal. Neste trabalho, os detectores tipo SSB utilizados são da marca Ortec e possuem resolução de 12 keV. O diodo PIN possui uma camada de um isolante intrínseco entre os semicondutores dopados, que acumula portadores de carga de ambos os semicondutores, o sinal é gerado quando as taxas de produção de elétrons e buracos no isolante entram em equilíbrio. O detector tipo diodo PIN utilizado neste trabalho possui resolução em energia pior do que os detectores tipo SSB.

3.3.2 Medidas e análise das amostras de fígado de peixe

As amostras de fígado de peixe foram submetidas a duas técnicas distintas para seu estudo, micro-PIXE e PIXE convencional. As medidas de micro-PIXE foram realizadas com o feixe de prótons a 3MeV de energia com a corrente variando entre 20 e 150pA devido às instabilidades da máquina e o tamanho aproximado do feixe foi de $2,5 \times 2,5 \mu\text{m}^2$. As medidas foram feitas utilizando diferentes tamanhos de varredura, desde $25 \times 25 \mu\text{m}^2$ até $2000 \times 2000 \mu\text{m}^2$, dependendo da região de interesse da amostra. Ainda não se dispõe de um programa de análise capaz de quantificar os resultados de micro-PIXE, portanto tal estudo é de caráter qualitativo somente.

As medidas de PIXE convencional foram realizadas em uma câmara diferente e o tamanho do feixe no caso foi de aproximadamente $3 \times 3 \text{mm}^2$. As amostras foram analisadas com ajuda do software analítico GUPIXWIN®. Para tais medidas, a energia do feixe de prótons foi mantida em 2MeV e a corrente variou entre 5 e 9nA.

Previamente aos estudos de PIXE e micro-PIXE é importante a realização da calibração dos espectros. Para tal, é necessário realizar a medida de um padrão para que, conhecendo os elementos presentes e então obtendo o gráfico contagens X canais desta medida, se possa estabelecer uma relação entre a energia e os canais fornecidos pelas medidas. Esse procedimento foi feito inicialmente para as medidas de PIXE.

Tomemos como exemplo o gráfico de contagem X canais da Figura 3.9. Tomam-se diversos picos de energia conhecidos e obtem-se destes picos o canal correspondente a eles e as energias associadas, bem como a largura do pico e o erro associado a esta largura.

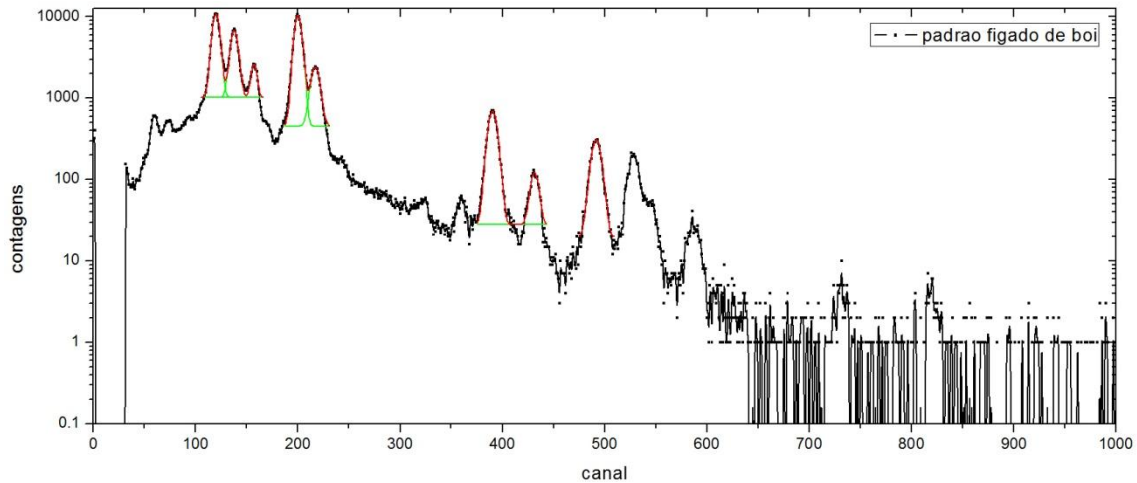


Figura 3.9: Espectro de um padrão de fígado de boi utilizado na calibração para as medidas de PIXE.

A partir desses ajustes se obtêm as curvas de calibração da Figura 3.10.

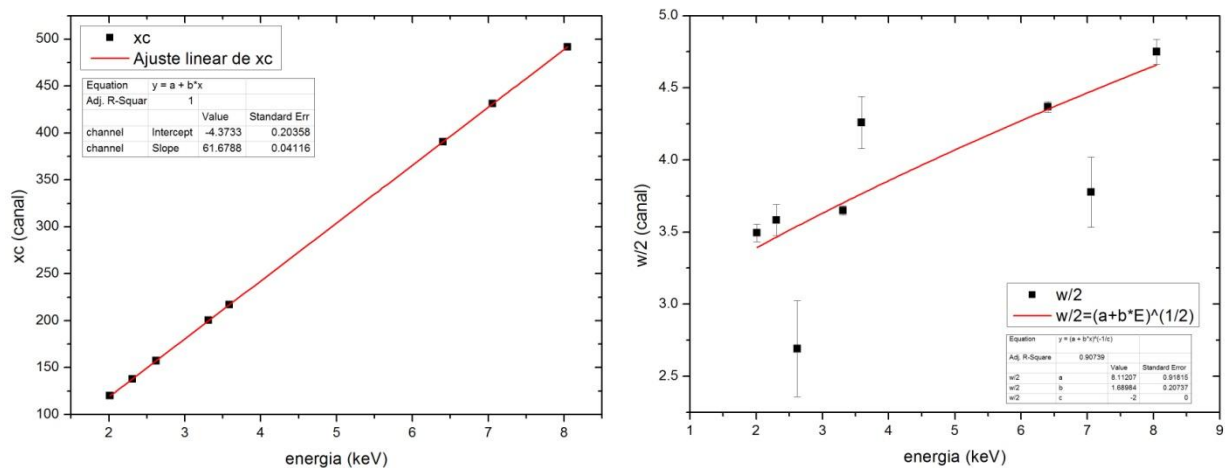


Figura 3.10: Gráficos canal X energia e desvio padrão X energia para o padrão de fígado de boi.

A partir desses gráficos se obtêm os valores dos parâmetros de calibração denominados A_1 , A_2 , A_4 e A_5 a partir das seguintes expressões:

$$c = A_1 + A_2 \times E$$

$$\sigma = \sqrt{A_4 + A_5 \times E}$$

em que c é canal, E é energia e σ é a metade da largura à meia altura do pico (desvio padrão).

Esses parâmetros de calibração são utilizados no programa GUPIXWIN® para as análises quantitativas.

Para a calibração das medidas de micro-PIXE foi feita uma comparação entre dois espectros de PIXE e micro-PIXE da mesma amostra. Primeiramente, após a calibração das medidas de PIXE, foram determinados os elementos presentes na amostra escolhida (Figura 3.11). Após isso comparou-se com o gráfico contagens X canais obtido através da medida de micro-PIXE desta mesma amostra e selecionou-se os picos correspondentes (Figura 3.12). A partir deste ponto foram realizados os processos de calibração acima relatados.

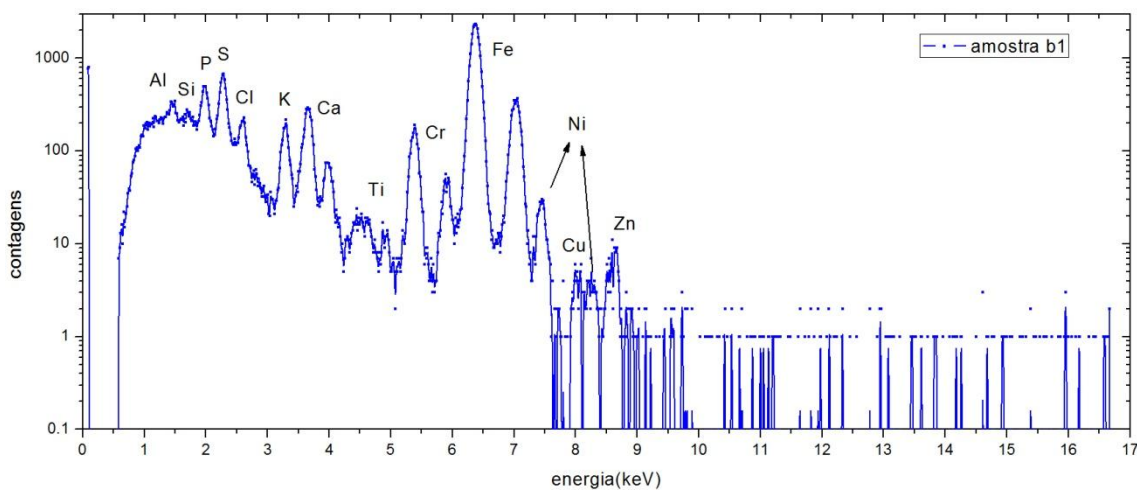


Figura 3.11: Identificação dos elementos presentes no espectro de PIXE da amostra escolhida para calibração de micro-PIXE.

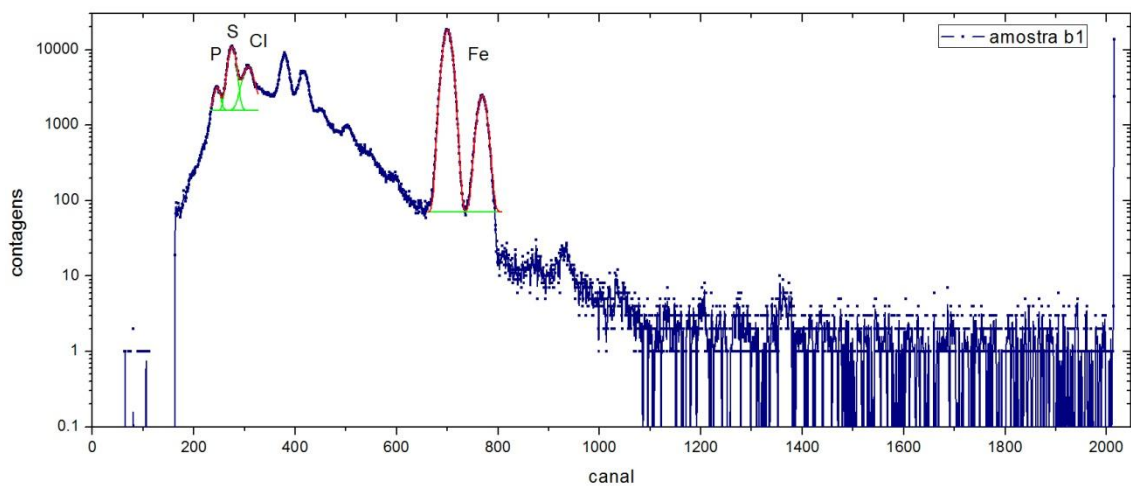


Figura 3.12: Seleção dos picos no espectro de micro-PIXE de alguns elementos identificados no espectro de PIXE da mesma amostra.

3.3.3 Medidas e análise das membranas microestruturadas por microfeixe de íons

As amostras de membranas microestruturadas por microfeixe de íons foram medidas e analisadas tanto por STIM como por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Porém, como o foco deste trabalho são as técnicas analíticas por micro-feixe iônico, as medidas de MEV serão abordadas somente como um controle comparativo para as medidas de STIM. As medidas de STIM foram realizadas nos modos *on-axis* e *off-axis* para averiguar se as diferentes configurações poderiam fornecer informações distintas.

O primeiro grupo de amostras foi analisado utilizando um diodo PIN como detector de STIM *on-axis*. Posteriormente, no entanto, ele foi substituído por um detector de barreira de superfície para aprimorar a resolução em energia. As medidas foram realizadas com microfeixe de H^{+1} a 1 MeV, He^{+2} a 3 MeV e Li^{+3} a 5,5 MeV. As medidas de STIM *off-axis* foram realizadas a correntes de aproximadamente 10pA, para diminuir danos na amostra, em tempos variados.

Para as medidas de STIM *on-axis* a corrente oriunda do acelerador foi reduzida através do sistema de controle do mesmo para aproximadamente 1000 íons/s, para não danificar o detector de partículas. Posteriormente essa redução foi feita através da diminuição das aberturas da fenda objeto. Para o Li^{+3} novamente a redução foi feita pelo sistema de controle do acelerador, pois a corrente máxima atingida para esse íon era consideravelmente baixa, mesmo sem a diminuição das aberturas da fenda objeto. O tamanho do feixe variou desde $1,5 \times 1,5$ a $2,5 \times 2,5 \mu m^2$. As varreduras variaram de 50×50 a $150 \times 150 \mu m^2$, de forma que abrangissem totalmente as estruturas.

Consideremos o diagrama da Figura 3.13A, que ilustra um feixe iônico com energia inicial E_0 (em vermelho) sendo varrido e transmitido através de uma amostra polimérica contendo uma perfuração. Os íons que passam pela região do polímero não irradiado sofrem uma perda de energia que, no caso de medidas de STIM *on-axis*, quando coletados pelo detector formarão um pico de energia em uma posição mais à esquerda do espectro, conforme observamos na área delimitada em azul da Figura 3.13B. Os íons que passam pelo orifício não sofrem perda de energia e, portanto, esses íons formarão um pico em uma posição à direita do espectro, conforme observa-se na área delimitada em vermelho na Figura 3.13B.

Para o caso de STIM off-axis os íons precisam sofrer algum desvio para serem coletados pelo detector. Isso não ocorre quando os íons atravessam algum orifício da amostra. Nesse caso o espectro em energia para uma amostra com espessura homogênea e um orifício apresentará apenas um pico de energia que é característico dos íons que atravessaram a região não irradiada da amostra, conforme observa-se pela região delimitada em azul na Figura 3.13C.

Para o mapeamento das estruturas foram selecionados os diferentes picos de perda de energia além de irregularidades encontradas nos espectros.

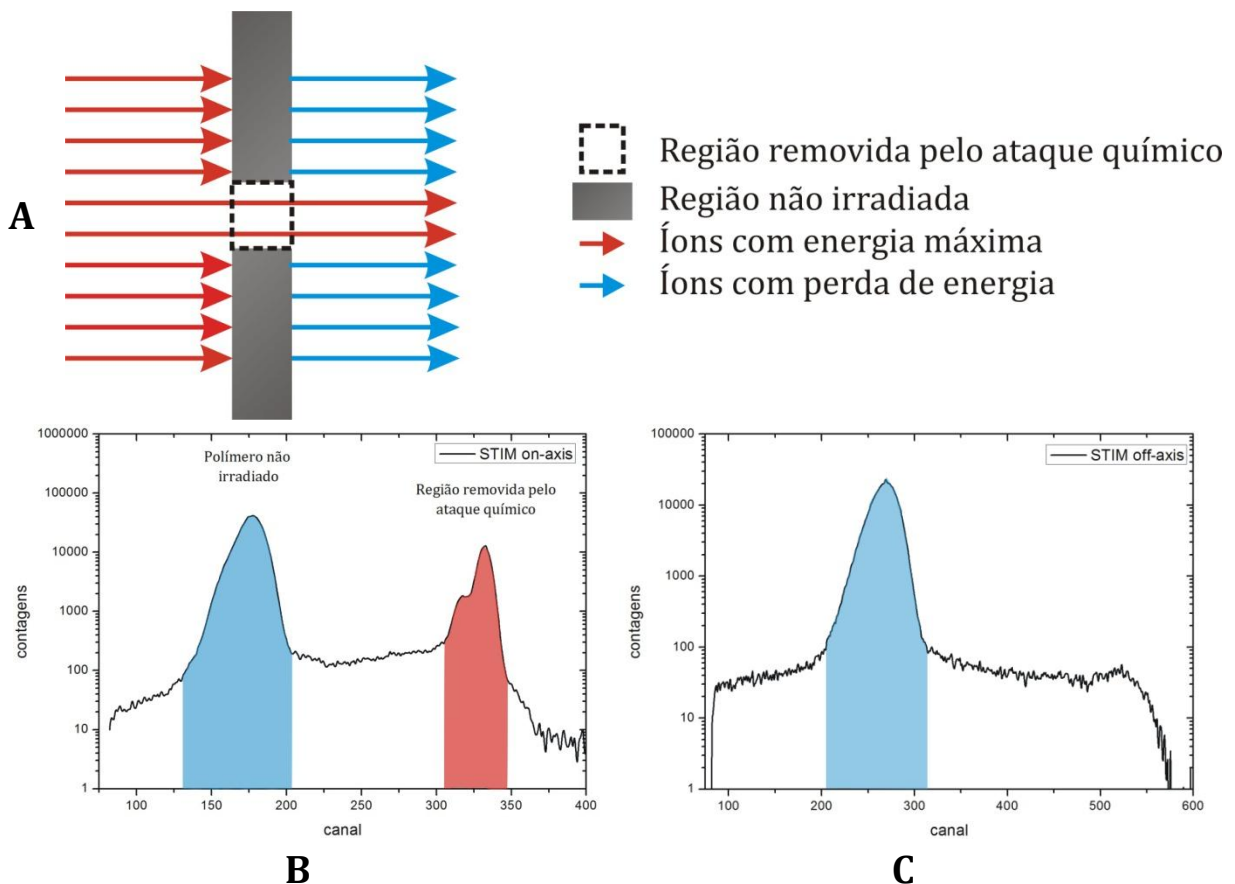


Figura 3.13: Diagrama esquemático da passagem dos íons por uma amostra estruturada por feixe de íons (A) e espectros característicos de STIM on-axis (B) e off-axis (C). As regiões do espectros em (B e C) destacadas em azul e vermelho são representativas dos íons com e sem perda de energia e as cores estão relacionadas com os íons do esquema em (A)

Com os espectros e mapas de STIM on-axis foi possível medir o tamanho das estruturas e a espessura do polímero não atacado.

As medidas de comprimento e largura foram feitas utilizando-se do programa computacional de análise de imagens ImageJ⁸². Para tal, foi feito um fatiamento do pico

sem perda de energia, de forma a obter mapas sequenciais. Escolheu-se o mapa de maior intensidade de sinal, de forma que representasse a região central do pico e, assim, essa imagem foi utilizada na análise de tamanho.

Com ajuda do software ImageJ⁸² foram traçados perfis de intensidade perpendicularmente e paralelamente às estruturas conforme a Figura 3.14A. Para as amostras do segundo conjunto do grupo de amostras com uma linha foram traçados três perfis perpendiculares e um paralelo. No caso do terceiro conjunto, foram traçados quatro perfis perpendiculares e três perfis paralelos às estruturas.

As medidas são resultantes das médias de todos os perfis realizados. Também fez-se a média de várias estruturas com o mesma fluência de irradiação e mesmo tempo de ataque químico.

Para obter o valor do comprimento e da largura através dos perfis foram ajustadas funções erro e erro complementar aos perfis, conforme elucidado na Figura 3.14B

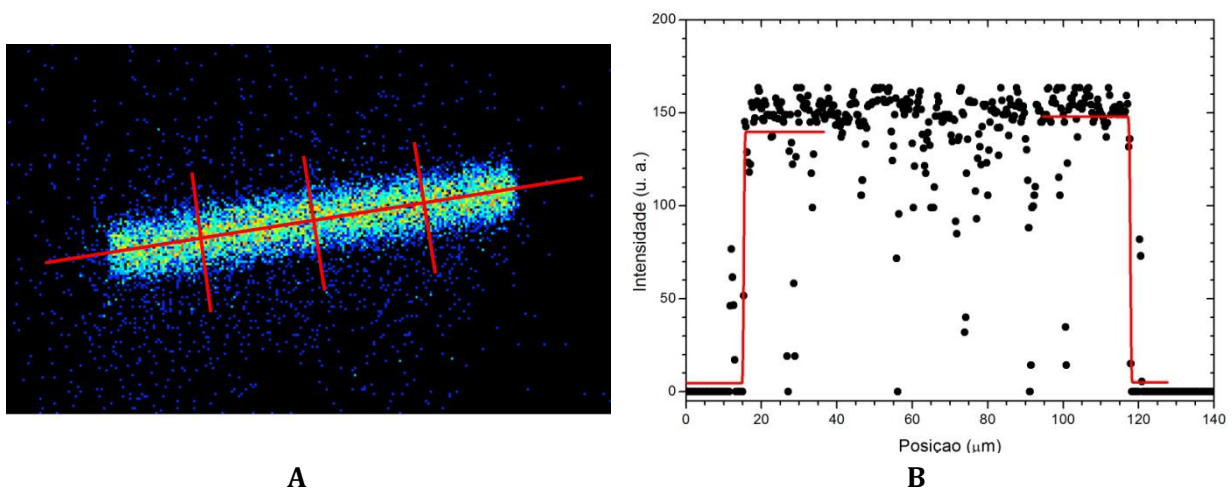


Figura 3.14: Obtenção dos perfis (A) e ajuste das funções erro e erro complementar (B) dos mesmos para obtenção das medidas de comprimento e largura das estruturas

Para a medida da espessura do polímero não irradiado, foi feita uma calibração de espessura em função da posição do pico de íons transmitidos pelo polímero, utilizando películas de diferentes espessuras conhecidas (de 2 a 10 μm). Para o ajuste dos picos foi utilizada uma combinação das seguintes funções (Figura 3.15)⁸³:

$G(x) = H_g \cdot \exp \left[\frac{-(x - x_c)^2}{\sigma \cdot \sqrt{2}} \right]$	Gaussiana
$S(x) = 0,5 \cdot H_s \cdot \operatorname{erfc} \left(\frac{x - x_c}{\sigma \cdot \sqrt{2}} \right)$	Função degrau
$TS(x) = 0,5 \cdot H_{ts} \cdot \left[\operatorname{erfc} \left(\frac{x - x_c}{\sigma \cdot \sqrt{2}} \right) - \operatorname{erfc} \left(\frac{x - x_t}{\sigma \cdot \sqrt{2}} \right) \right]$	Função degrau truncada
$D(x) = 0,5 \cdot H_d \cdot \exp \left(\frac{x - x_c}{\beta} \right) \cdot \operatorname{erfc} \left(\frac{x - x_c}{\sigma \cdot \sqrt{2}} + \frac{\sigma}{\beta \cdot \sqrt{2}} \right)$	Função exponencial

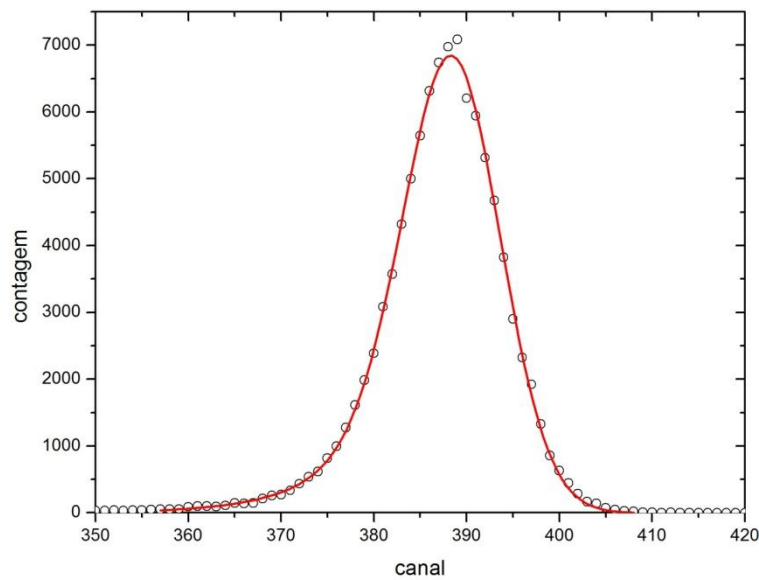


Figura 3.15: Ajuste de espectro de polímero de espessura de 2µm para calibração em espessura.

Os picos referentes ao polímero não irradiado também foram ajustados segundo as funções acima para a análise das espessuras das amostras depois de submetidas ao ataque químico.

A partir do ajuste dos espectros de calibração, foi extraída a curva de calibração como a exibida na Figura 3.16 para posterior utilização na análise das espessuras das amostras.

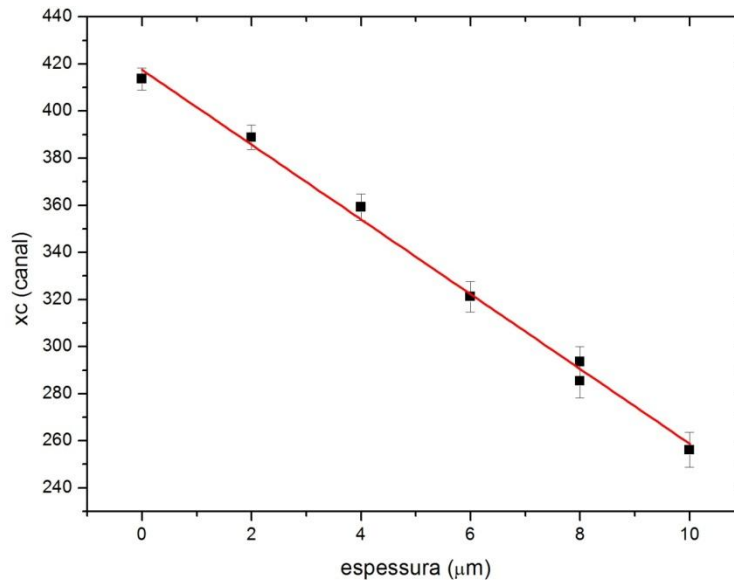


Figura 3.16: Curva de calibração para o detector SSB utilizado nas medidas de STIM on-axis

3.3.4 Obtenção de alguns parâmetros prévios às medidas de STIM

Previamente à realização das medidas de STIM foi necessário um estudo a respeito das configurações ótimas para tais medidas.

Considerando três íons distintos, é necessário saber o alcance de cada um em uma folha de PET de forma a utilizar a energia correta para a análise. Para isso foram feitas simulações utilizando o programa computacional SRIM⁸⁴ (*Stopping and Range of Ions in Matter*). Na Tabela 3.1 são listados os valores de energia para que cada íon atravessasse uma folha de PET de 12 μm de espessura.

Tabela 3.1: Valores em energia (em MeV) para que os íons de H^{+1} , He^{+2} e Li^{+3} atravessassem 12 μm de PET

Íon	Energia para atravessar 12 μm de PET (MeV)
H^{+1}	0,725
He^{+2}	2,670
Li^{+3}	4,660

Ademais, para cada íon e para cada valor de energia, é necessário ajustar os valores das correntes aplicadas nas lentes magnéticas para obter o menor tamanho de feixe. Dessa forma, para os íons H^{+1} e He^{+2} , foram feitas calibrações de energia *versus* corrente aplicada nas lentes, e obtiveram-se os gráficos da Figura 3.17. Não foi possível realizar a calibração para Li^{+3} devido à restrição de tempo de uso do acelerador.

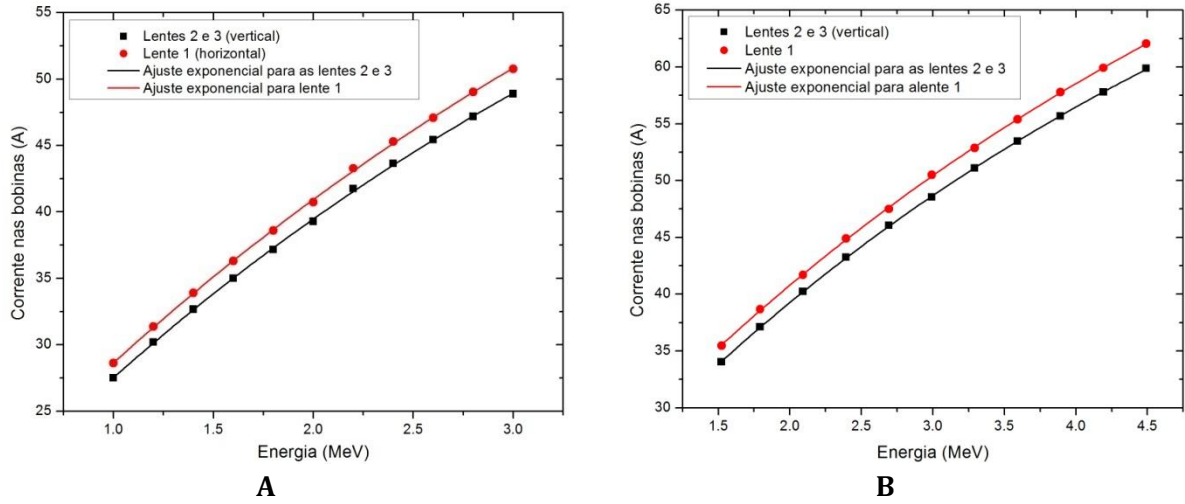


Figura 3.17: Curvas de calibração de energia versus corrente aplicada nas lentes eletromagnéticas (ou bobinas) para os íons H⁺ (A) e, He²⁺ (B).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 AMOSTRAS DE FÍGADO DE PEIXE

4.1.1 Análise das medidas de micro-PIXE

Como o elemento traço mais abundante no tecido do fígado é o ferro, usou-se seu mapa para uma análise a respeito da estrutura morfológica dos três diferentes tipos de amostra: tecido saudável, tecido lesionado com CMM's e tecido lesionado sem CMM's. Esses mapas podem ser observados na Figura 4.1.

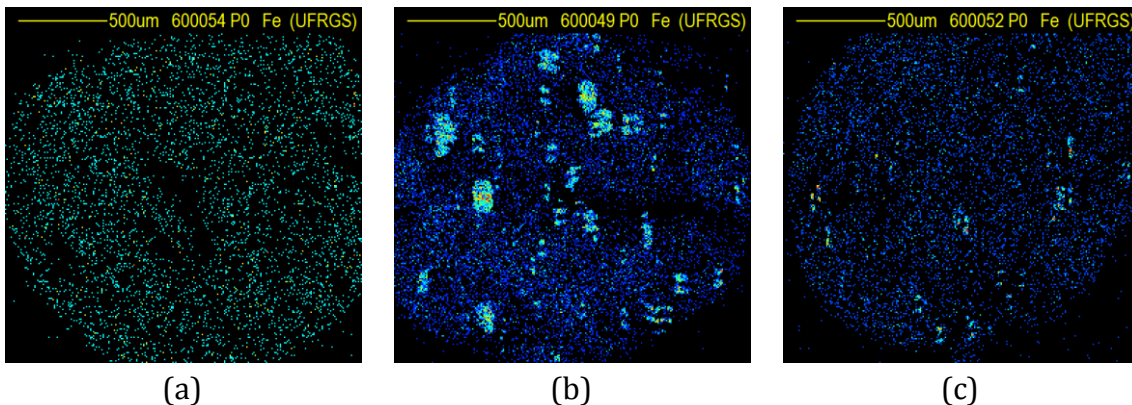
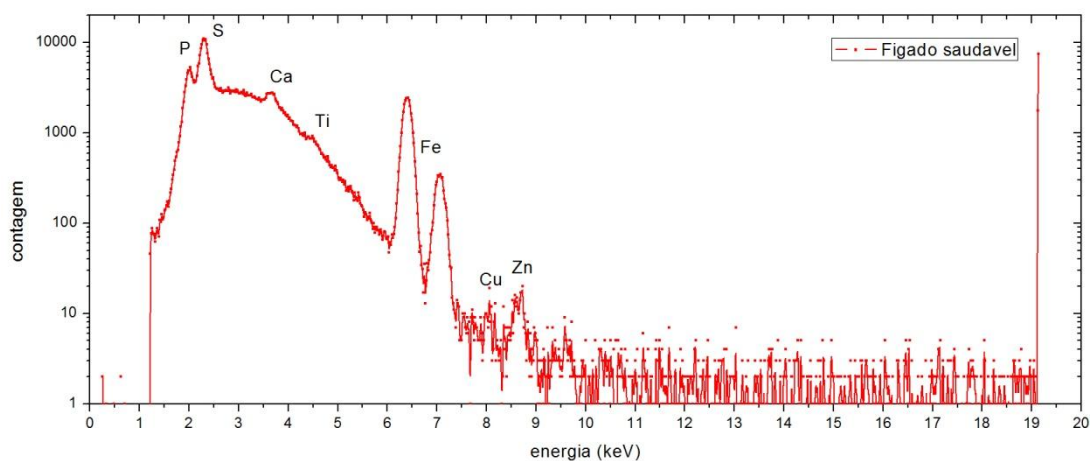


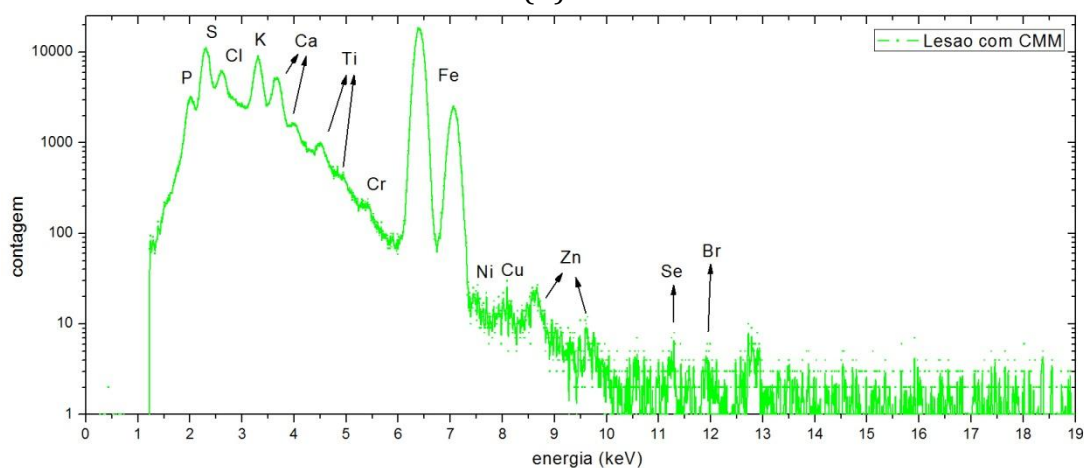
Figura 4.1: Mapas de ferro de (a) fígado saudável, (b) fígado lesionado com CMM's e (c) fígado lesionado sem CMM's (área de varredura 2x2mm²).

Observa-se pelos mapas que, no caso de fígado saudável, não ocorre a presença de CMM's e que, no caso de fígados lesionados com CMM's, a ocorrência de ferro predomina nestas estruturas. A amostra que, pelo estudo histopatológico, se acreditava ser livre de CMM's apresentou focos de ferro consideravelmente menores que a amostra de fígado lesionado com CMM's, o que leva à conclusão que este tipo de amostra (fígado lesionado sem CMM's) possui CMM's pequenos demais pra serem observados pelo estudo histopatológico, mas que se apresentam claros com o estudo através do micro-PIXE.

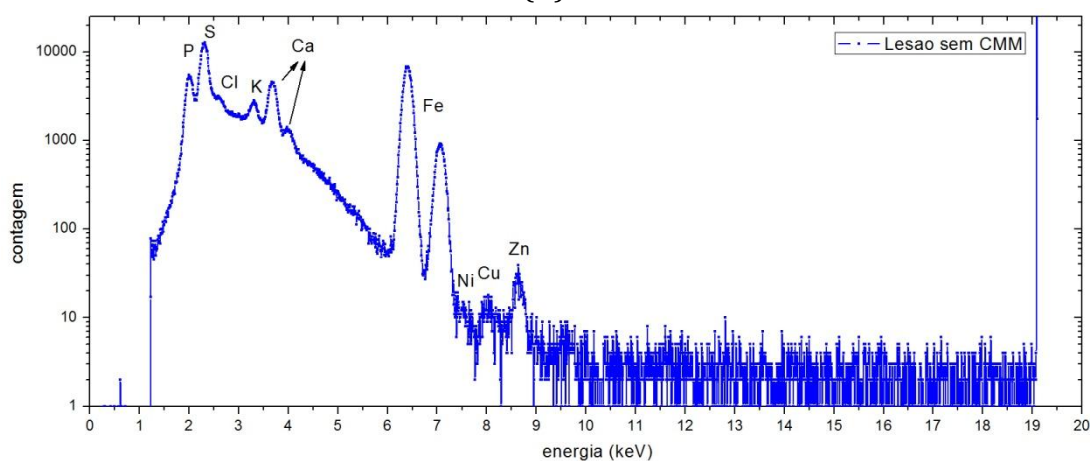
Medidas com áreas de varredura menores foram realizadas nas três diferentes amostras e seus espectros (com a indicação dos diferentes elementos encontrados) estão apresentados na Figura 4.2.



(A)



(B)



(C)

Figura 4.2: Espectros de energia de (a) tecido saudável, (b) lesão com CMM's e (c) lesão sem CMM's medidos com micro-PIXE.

A Figura 4.3 mostra um gráfico comparativo entre os três diferentes espectros (normalizados pela carga, área de varredura e background) e observa-se que há

diferença tanto na concentração dos elementos, como nos elementos presentes nas três situações.

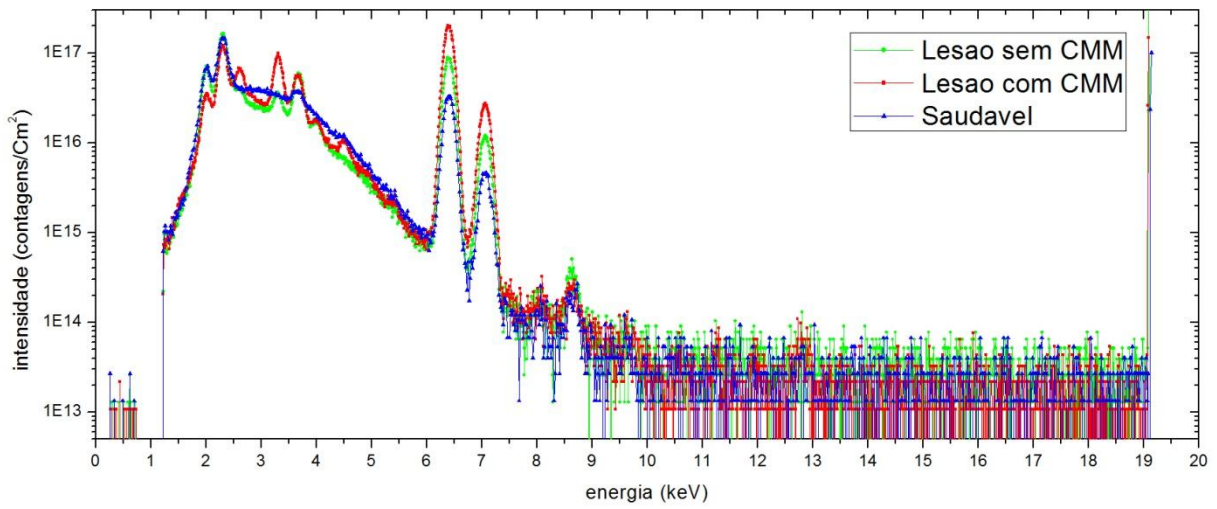


Figura 4.3: Gráfico comparativo entre os espectros de energia das três diferentes amostras.

Diferentes mapas dos diversos elementos foram feitos para determinar a correlação entre eles e estão mostrados nas Figura 4.4, Figura 4.5 e Figura 4.6.

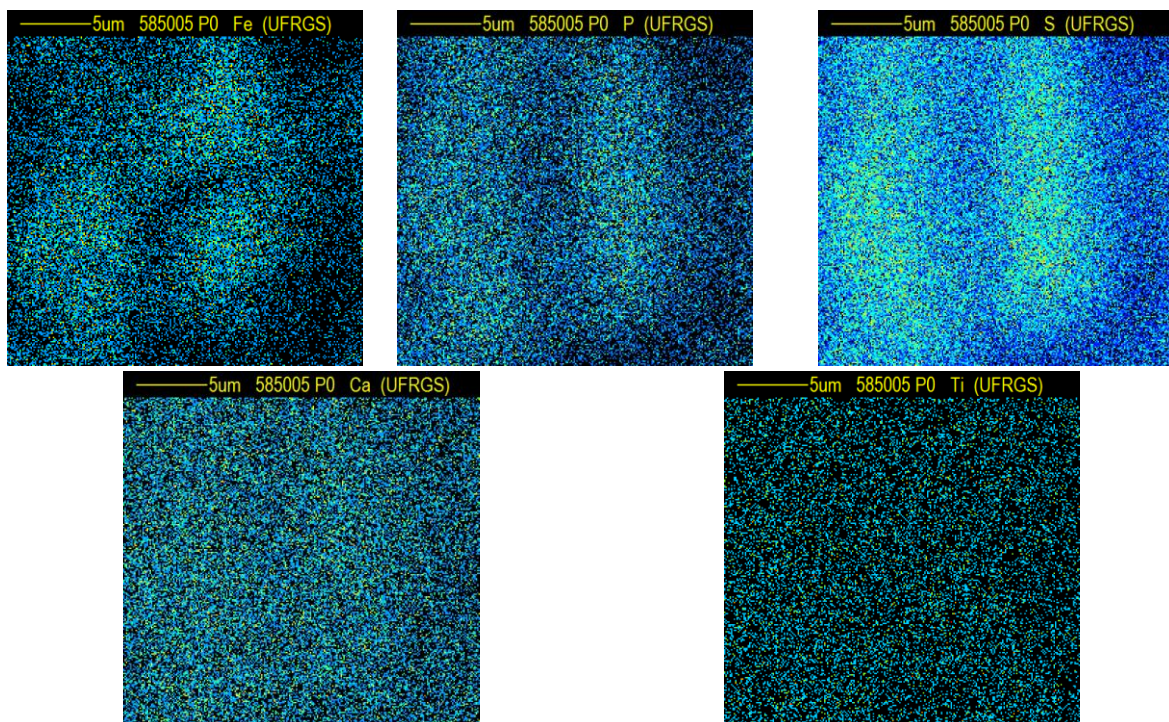


Figura 4.4: Mapas elementares de Fe, P, S, Ca e Ti de amostra de tecido saudável (área de varredura de $25 \times 25 \mu\text{m}^2$).

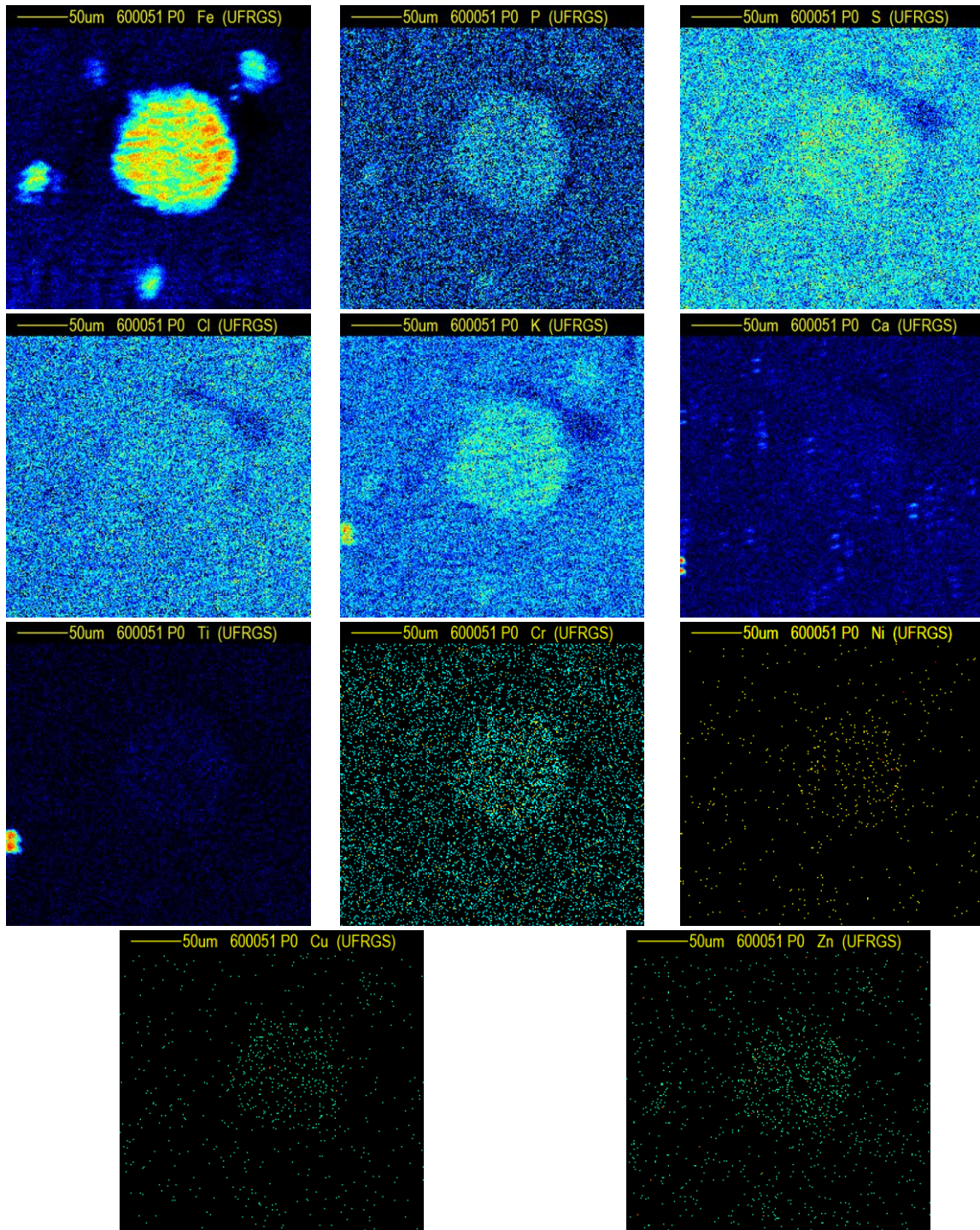


Figura 4.5: Mapas elementares de Fe, P, S, Cl, K, Ca, Ti, Cr, Ni, Cu e Zn de amostra de tecido lesionado com CMM's focalizados em um CMM (área de varredura de 300x300μm²). Em alguns mapas foram alterados o brilho e o contraste para melhor visualização.

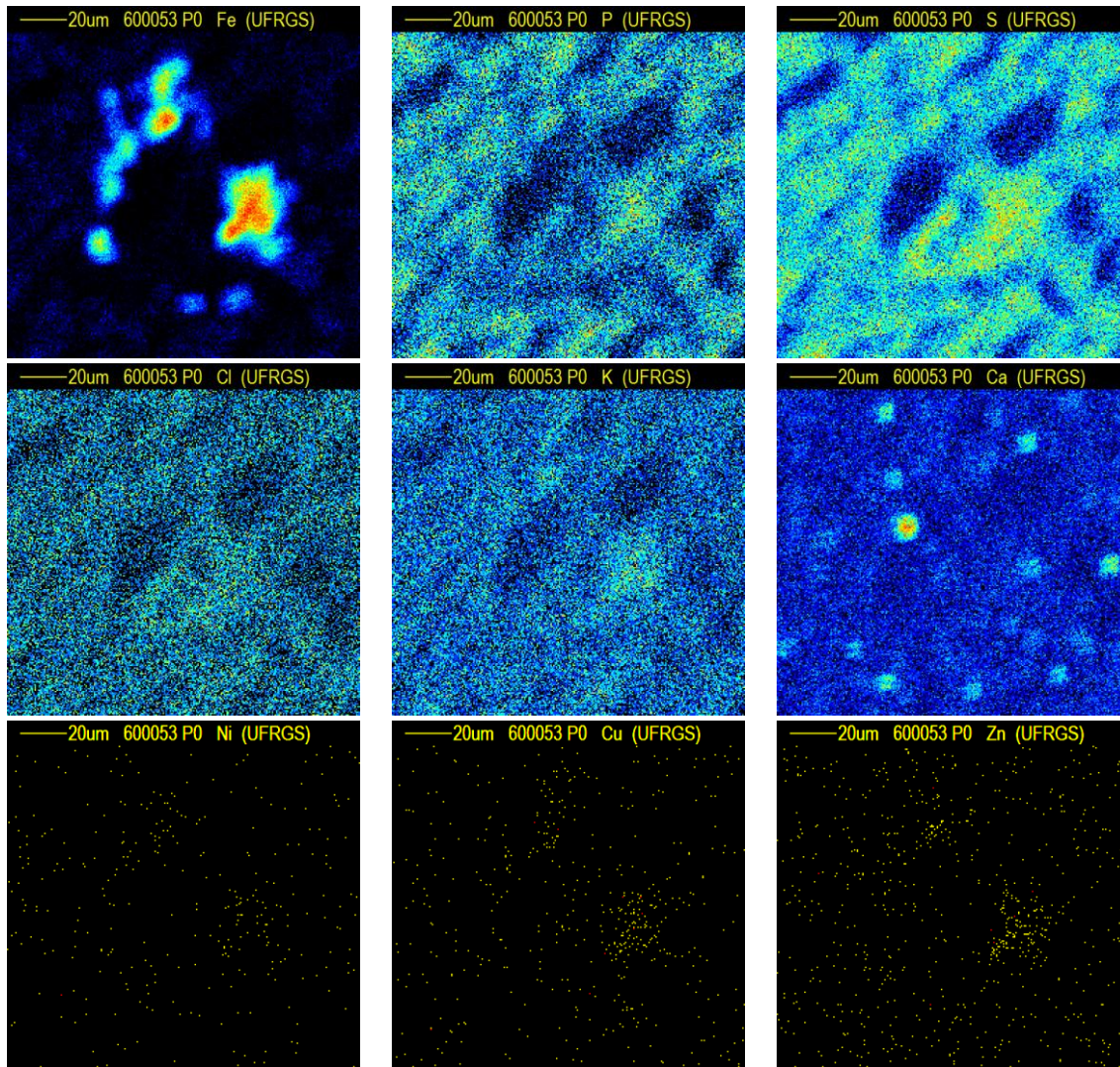


Figura 4.6: Mapas elementares de Fe, P, S, Cl, K, Ca, Ni, Cu e Zn de amostra de tecido lesionado “sem” CMM’s focalizados em um CMM (área de varredura de $150 \times 150 \mu\text{m}^2$). Em alguns mapas foram alterados o brilho e o contraste para melhor visualização.

É possível observar nas Figura 4.4, Figura 4.5 e Figura 4.6 que grande parte dos elementos estão correlacionado, sendo em sua presença ou ausência, e que grande parte dos elementos se apresenta em maior concentração nos centros de melanomacrófagos. O cálcio é uma exceção e se distribui de forma diferente e indepente dos CMM’s.

4.1.2 Análise das medidas de PIXE

Uma vez que o sistema de microPIXE ainda não está apto a realização de análises quantitativas, 18 amostras (6 de cada tipo) foram submetidas a medidas de PIXE para que se pudesse quantificar e diferenciar em concentração os três tipos de amostras já analisados.

As 18 medidas foram submetidas à análise usando o programa *Gupixwin* e foi feita a verificação da presença e concentração de diversos elementos. Após a obtenção dos valores, calculou-se o valor médio da concentração de cada elemento para as três diferentes situações, para que pudessem ser comparadas entre si. Tabela 4.1 Tabela 4.2 Tabela 4.3 mostram as médias obtidas para cada elemento detectado desconsiderando os valores nulos.

Tabela 4.1: Valores médios, desvios padrão, mínimos e máximos para os diferentes elementos para as amostras de fígados saudáveis, desconsiderando os valores nulos para a análise estatística.

Elemento	N total	Concentração média (ng/cm²)	Desvio padrão (ng/cm²)	Mínimo (ng/cm²)	Máximo (ng/cm²)
AlK	6	215	103	146	420
SiK	6	55	26	32	104
P K	6	1310	803	788	2900
S K	6	1457	781	967	3001
K KA	6	88	86	31	257
CaKA	6	754	152	610	1026
TiKA	6	8.9	2.5	6.5	13.1
CrKA	6	88	41	23	140
MnKA	5	9.1	2.9	5.2	13.2
FeKA	6	1816	912	934	3162
NiKA	6	17	7	11	27
CuKA	6	5.9	3.7	1.3	11.5
ZnKA	6	28	8	20	39

Tabela 4.2: Valores médios, desvios padrão, mínimos e máximos para os diferentes elementos para as amostras de fígados lesionados com CMM's, desconsiderando os valores nulos para a análise estatística.

Elemento	N total	Concentração média (ng/cm²)	Desvio padrão (ng/cm²)	Mínimo (ng/cm²)	Máximo (ng/cm²)
AlK	6	250	159	88	518
SiK	6	126	120	36	363
P K	6	755	151	599	944
S K	6	1124	468	694	2033
CaKB	6	649	81	556	798
TiKA	6	14	11	4	36
CrKA	6	112	53	55	175
MnKA	6	10.2	4.5	4.4	16.5
FeKA	6	2651	1387	848	4490
NiKA	6	28	13	11	42
CuKA	6	7.1	3.7	3.0	13.4
ZnKA	6	17	3	11	21

Tabela 4.3: Valores médios, desvios padrão, mínimos e máximos para os diferentes elementos para as amostras de fígados lesionados sem CMM's, desconsiderando os valores nulos para a análise estatística.

Elemento	N total	Concentração média (ng/cm²)	Desvio padrão (ng/cm²)	Mínimo (ng/cm²)	Máximo (ng/cm²)
AlK	6	278	61	222	359
SiK	5	67	52	19	155
P K	6	1531	338	1147	2075
S K	6	1529	163	1342	1812
ClK	6	171	140	44	405
K KA	6	211	153	53	458
CaKB	6	570	80.40092	488	665.2
TiKA	6	8.7	2.8	3.9	11.4
CrKA	6	126	49	79	210
MnKA	6	13	6	7	25
FeKA	6	1046	198	792	1302
NiKA	6	31	15	22	61
CuKA	6	6.9	2.5	3.5	9.8
ZnKA	6	21	5	14	27

Fez-se então o gráfico de barras da Figura 4.7 apresentando os elementos comuns a todas as amostras.

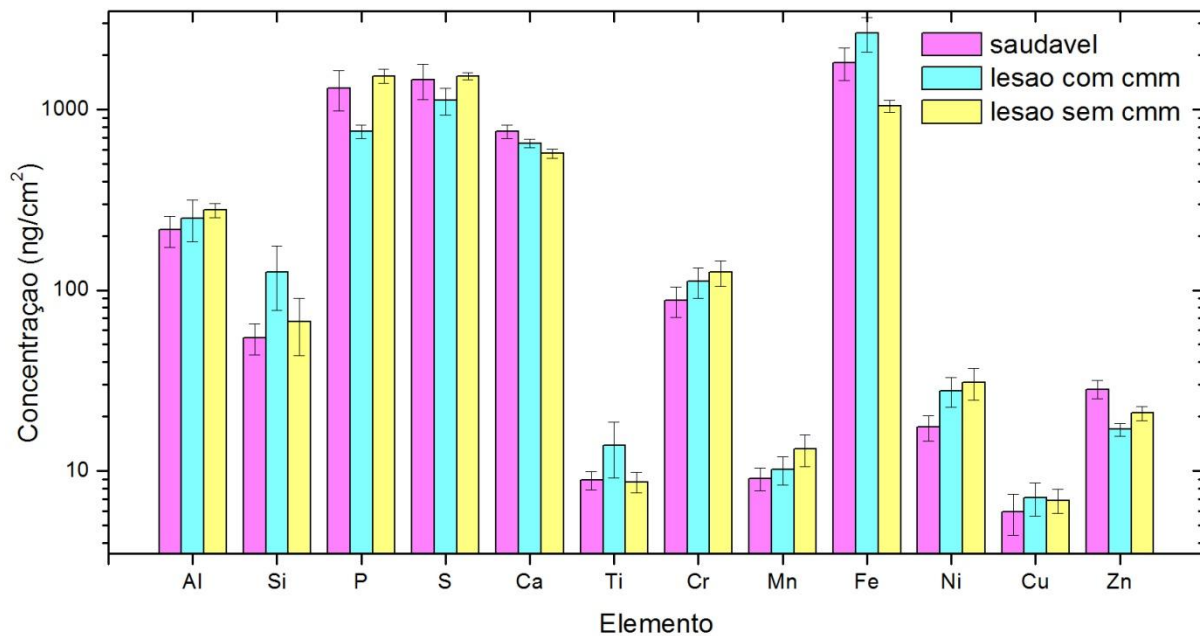


Figura 4.7: Gráfico de barras dos principais elementos para os três casos diferentes.

Apesar das incertezas relativamente grandes, podemos observar, a partir do gráfico, que alguns elementos, tais como Si, Ti, Fe e Cu, têm maior concentração nas amostras que apresentam lesões e CMM's e concentrações mais baixas nos dois outros casos. Isso indica que a presença dos CMM's, mais do que a presença de lesões, é a responsável pelo aumento de concentração desses elementos no fígado. Por outro lado, o contrário ocorre com os elementos P, S e Zn.

Para o Cr, Mn, e Ni, a concentração é menor para os fígados saudáveis, aumenta progressivamente para os fígados lesionados com CMM's e os fígados lesionados sem CMM's. Esse resultado indica que a presença de lesão, mais do que a presença de CMM's, é a principal responsável pelo aumento da concentração desses elementos. O contrário ocorre com o Ca.

4.2 PELÍCULAS MICROESTRUTURADAS POR MICROFEIXE DE ÍONS

4.2.1 Estudo comparativo entre STIM *on-axis* e *off-axis*

As primeiras amostras foram feitas em caráter de teste para avaliar a viabilidade das medidas de STIM *on-axis* e *off-axis*. Para tal, foi utilizado um detector do tipo diodo PIN

para as medidas de STIM on-axis e um detector de barreira de superfície para as medidas de STIM off-axis. As amostras foram todas irradiadas a uma fluência de 6×10^{15} íons/cm² e os tempos de ataque químico variaram de 20 a 60 minutos.

À uma primeira avaliação, observou-se que para as diferentes modalidades de STIM obtinha-se diferentes informações. Observa-se na Figura 4.8 que ao selecionar diferentes regiões dos espectros de STIM on-axis obtemos os mapas da região irradiada e não irradiada, no entanto, selecionando diferentes regiões dos espectros de STIM off-axis outras estruturas estão visíveis (Figura 4.8F). Essas estruturas são observáveis na imagem de MEV (Figura 4.9), no entanto, não é claro o que as manchas aparentes representam.

Considerando a posição da seleção no espectro, observa-se que elas estão atribuídas à uma maior energia do que o pico referente ao polímero não irradiado. Isso significa que nessas regiões o feixe perde menos energia do que perde ao atravessar o polímero não irradiado. O feixe interage com menos material nessas regiões, sugerindo uma densidade menor. No entanto, observa-se uma homogeneidade no restante do polímero não irradiado, o que sugere que a densidade não varia ao longo da amostra.

Essas observações indicam que essa região da amostra possui uma espessura inferior à do polímero não irradiado. O que nos leva a inferir que essas estruturas possam assemelhar-se a cavernas escavadas pelo ataque químico nas paredes das estruturas uma vez que a solução tenha corroído completamente a região irradiada do polímero.

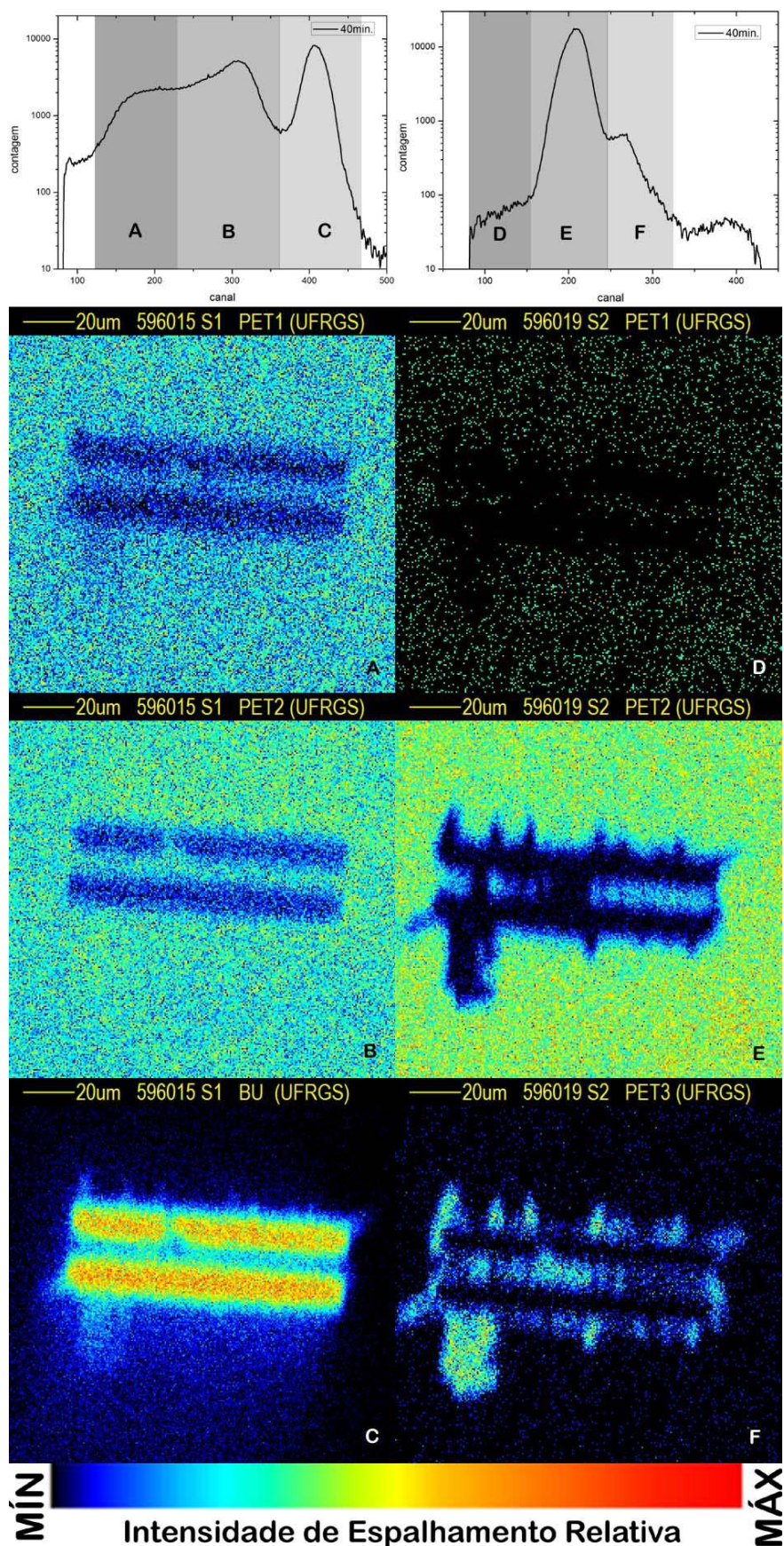


Figura 4.8: Espectros de STIM *on-axis* (painéis da esquerda) e *off-axis* (painéis da direita) para amostra submetida a 40 minutos de ataque e os mapas referentes às regiões delimitadas nos gráficos (A, B, C, D, E e F).

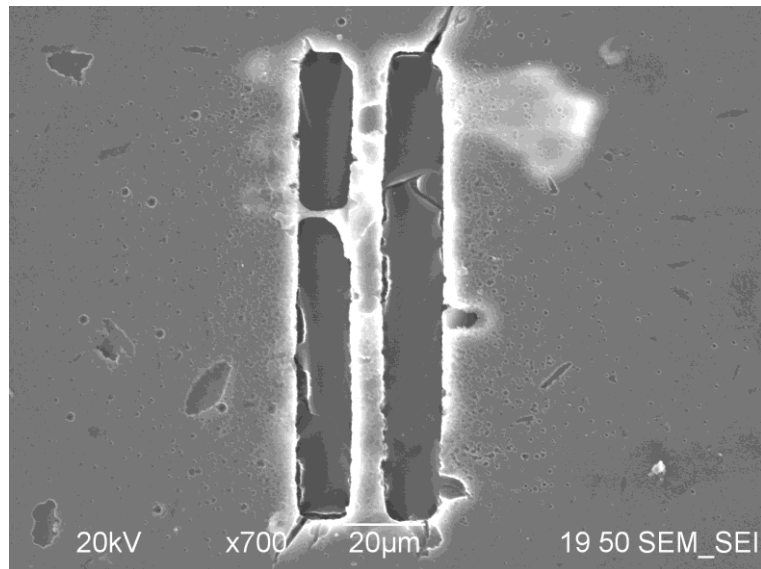


Figura 4.9: Imagens de MEV para as amostras descritas na Figura 4.8 (40 minutos de ataque químico)

Na Figura 4.10 pode-se observar os espectros de STIM *on-axis* para as amostras submetidas a diferentes tempos de ataque. É perceptível que com o aumento do tempo de ataque químico o pico referente ao polímero não irradiado se aproxima consideravelmente do pico referente ao polímero irradiado

Para esse grupo de amostras foi feita a calibração do detector de STIM *on-axis* (diodo PIN) e com os ajustes descritos no capítulo três foi determinada a espessura de cada amostra. Na Figura 4.11 observa-se o gráfico para as espessuras das amostras obtidas através do ajuste dos espectros. Observamos a tendência decrescente indicando que a solução de ataque químico age em toda a superfície do polímero, mesmo que em menor proporção em comparação com a região irradiada.

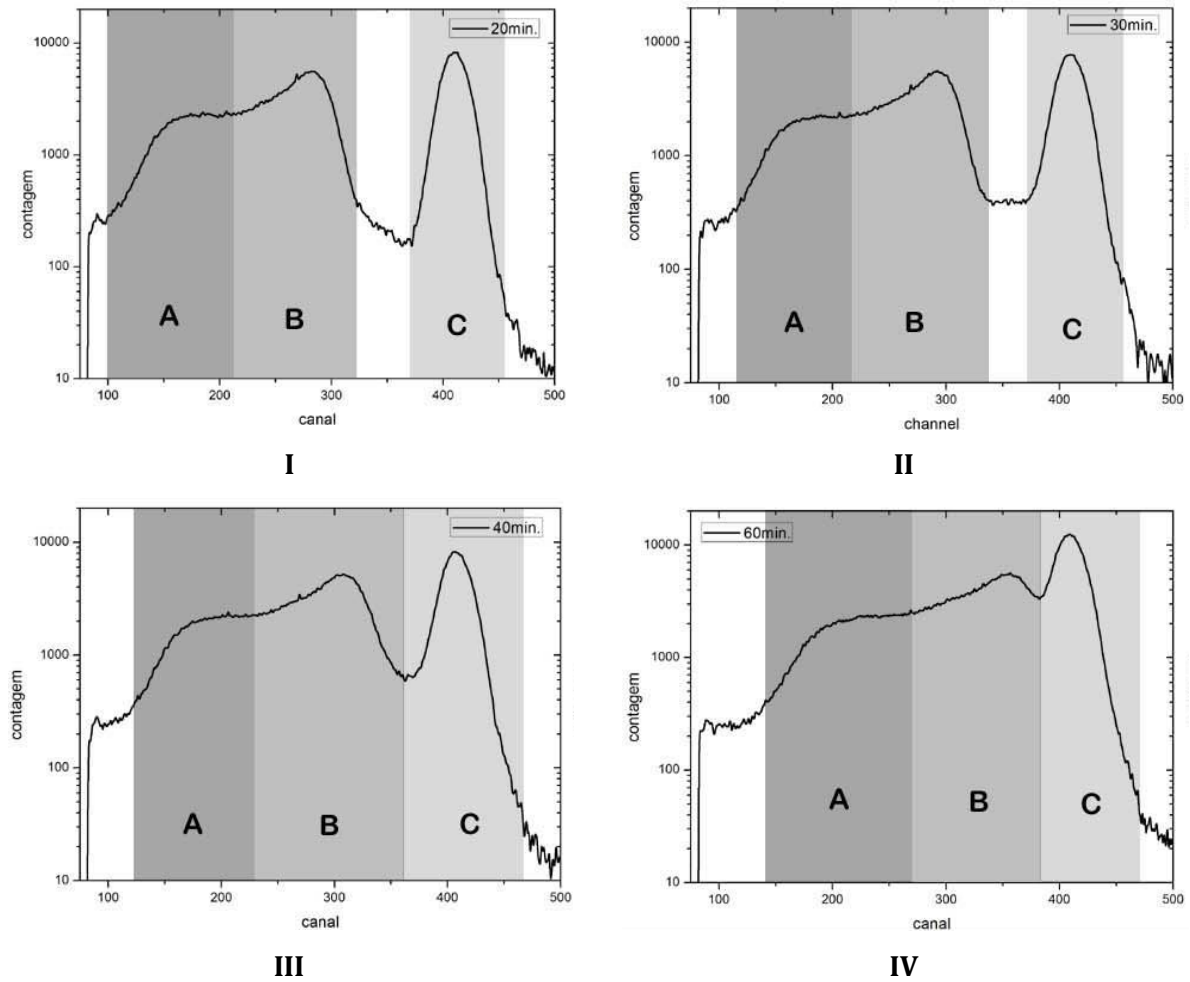


Figura 4.10: Espectros de STIM on-axis para amostras irradiadas e submetidas a ataque químico por 20 (I), 30 (II), 40 (III) e 60 minutos (IV).

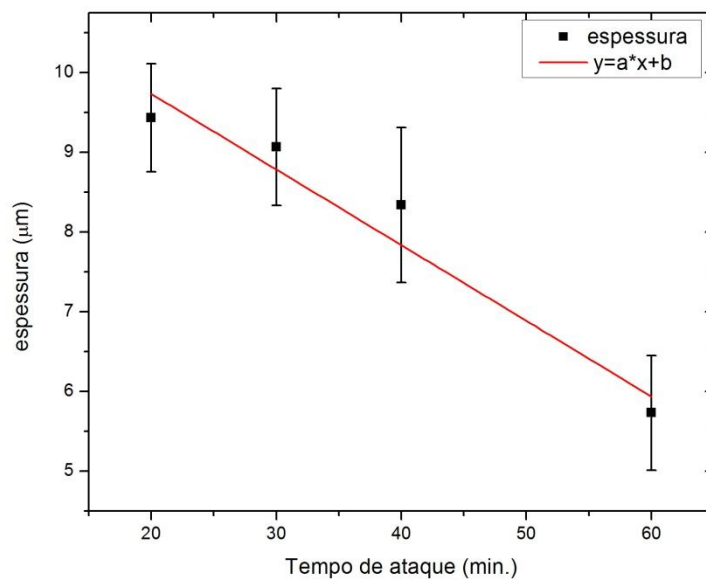


Figura 4.11: Gráfico da espessura em função do tempo de ataque químico para a primeira bateria de amostras, indicando um decréscimo linear.

Posterior a esse estudo, foram produzidas amostras de uma linha para uma averiguação das informações obtidas com as imagens de STIM das amostras de duas linhas. Um detector SSB substituiu o diodo PIN no caso das medidas de STIM on-axis. Durante sua preparação, as amostras foram irradiadas a uma fluência de 6×10^{15} íons/cm².

O detector de barreira de superfície possui uma maior resolução em energia e, portanto, forneceu espectros de STIM on-axis distintos dos obtidos no primeiro grupo de amostras, como pode ser observado na Figura 4.12.

Foram observados picos adjacentes entre os dois picos característicos da amostra em diversos espectros de STIM on-axis, o que não era visível nas primeiras medidas. Selecionando a região entre os dois picos, as estruturas de espessura intermediárias, antes somente observáveis por STIM off-axis, são reveladas no mapa, confirmando que tais estruturas têm, de fato, uma espessura menor que a do polímero não irradiado. No entanto, essas estruturas não são caracterizadas como orifícios, pois sua posição no espectro está mais à esquerda que o pico referente à região completamente corroída.

Mais uma vez, notou-se que conforme o aumento do tempo de ataque químico, para as medidas de STIM on-axis, os picos referentes ao orifício e ao polímero não irradiado se aproximam, sendo que o pico de menor energia se desloca para a direita, indicando que a espessura do polímero não irradiado diminui com o aumento do tempo de exposição à solução química.

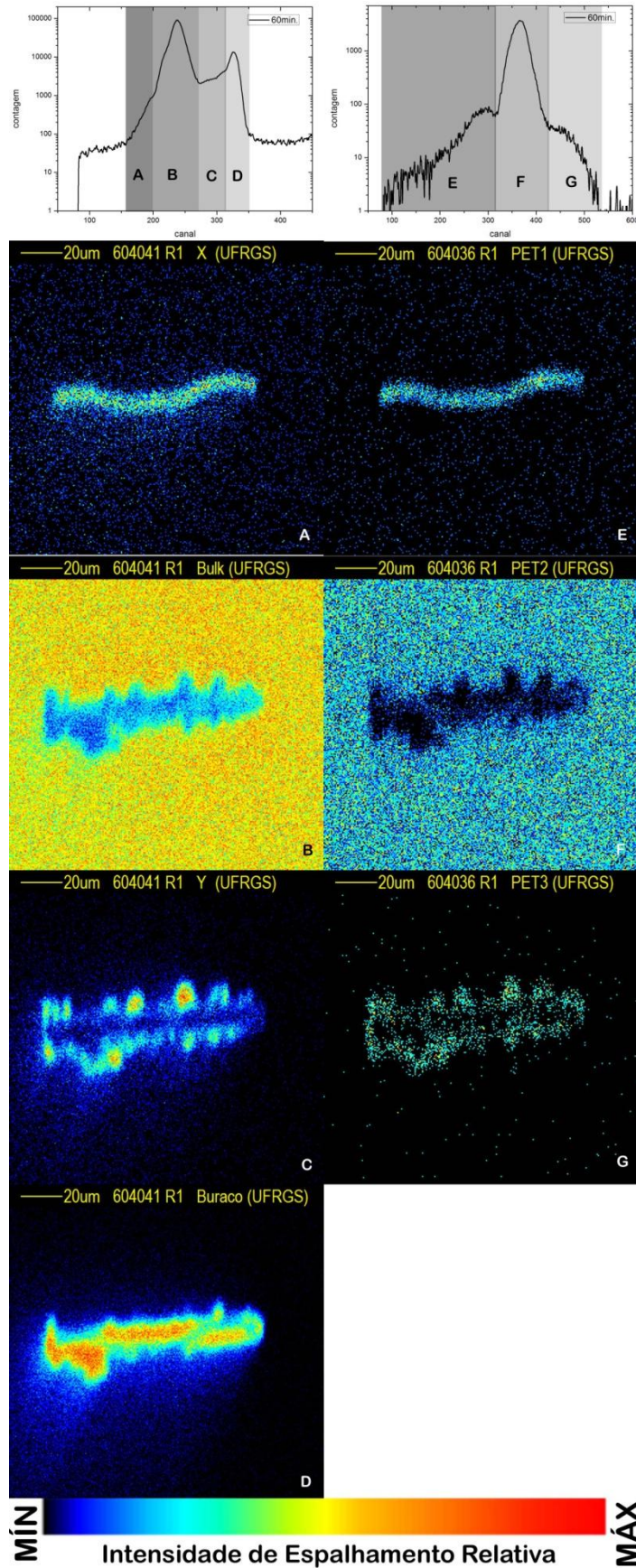


Figura 4.12: Espectros de STIM *on-axis* (painéis da esquerda) e *off-axis* (painéis da direita) para amostra submetida a 60 minutos de ataque e os mapas referentes às regiões delimitadas nos gráficos (A, B, C, D, E, F e G)

Observa-se na Figura 4.12 que há a presença de uma estrutura com um formato ondulatório. De Souza et al. ⁶² observou que tais estruturas ocorrem para irradiações com fluências na ordem de 6×10^{15} íons/cm². Elas estão fixadas às paredes do orifício formado pela estruturação (Figura 4.13), essas regiões foram chamadas de pontos de reticulação. A reticulação age de forma a dificultar a ação da solução de corrosão e dessa maneira o material irradiado não é totalmente retirado durante o ataque químico.

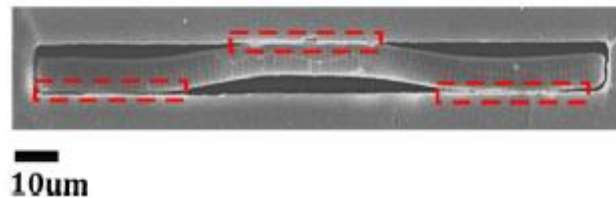


Figura 4.13: Micrografia (MEV) mostrando estrutura com material residual devido à ação da reticulação⁶².

Após a constatação de que tanto STIM *on-axis* quanto *off-axis* forneciam as mesmas informações com relação à morfologia das amostras, foram suspensas as medidas de STIM *off-axis* para evitar redundância de informação e poupar tempo. A medida de STIM na configuração *on-axis* é preferível à *off-axis*, pois é mais rápida e menos danosa à amostra, uma vez que as correntes utilizadas são muito menores.

4.2.2 Estudo comparativo entre STIM e MEV

Após averiguar a viabilidade da técnica de STIM e constatar que a configuração *on-axis* é satisfatória, com relação às informações morfológicas, surgiu o interesse de compará-la com MEV, que é a técnica mais usual para o estudo desse tipo de estrutura, com intuito de averiguar se as informações obtidas pelas duas técnicas são compatíveis.

Para tal objetivo, foram fabricadas amostras de uma linha com uma fluência de 6×10^{15} íons/cm² que foram medidas tanto com a técnica de STIM quanto com a técnica de MEV. Com as imagens obtidas por STIM foi possível obter os valores de comprimento e largura das estruturas. Com as imagens de MEV em visão planar foi possível obter os valores de comprimento e largura das estruturas.

As imagens de STIM e MEV de um exemplo das amostras podem ser visualizadas na Figura 4.14.

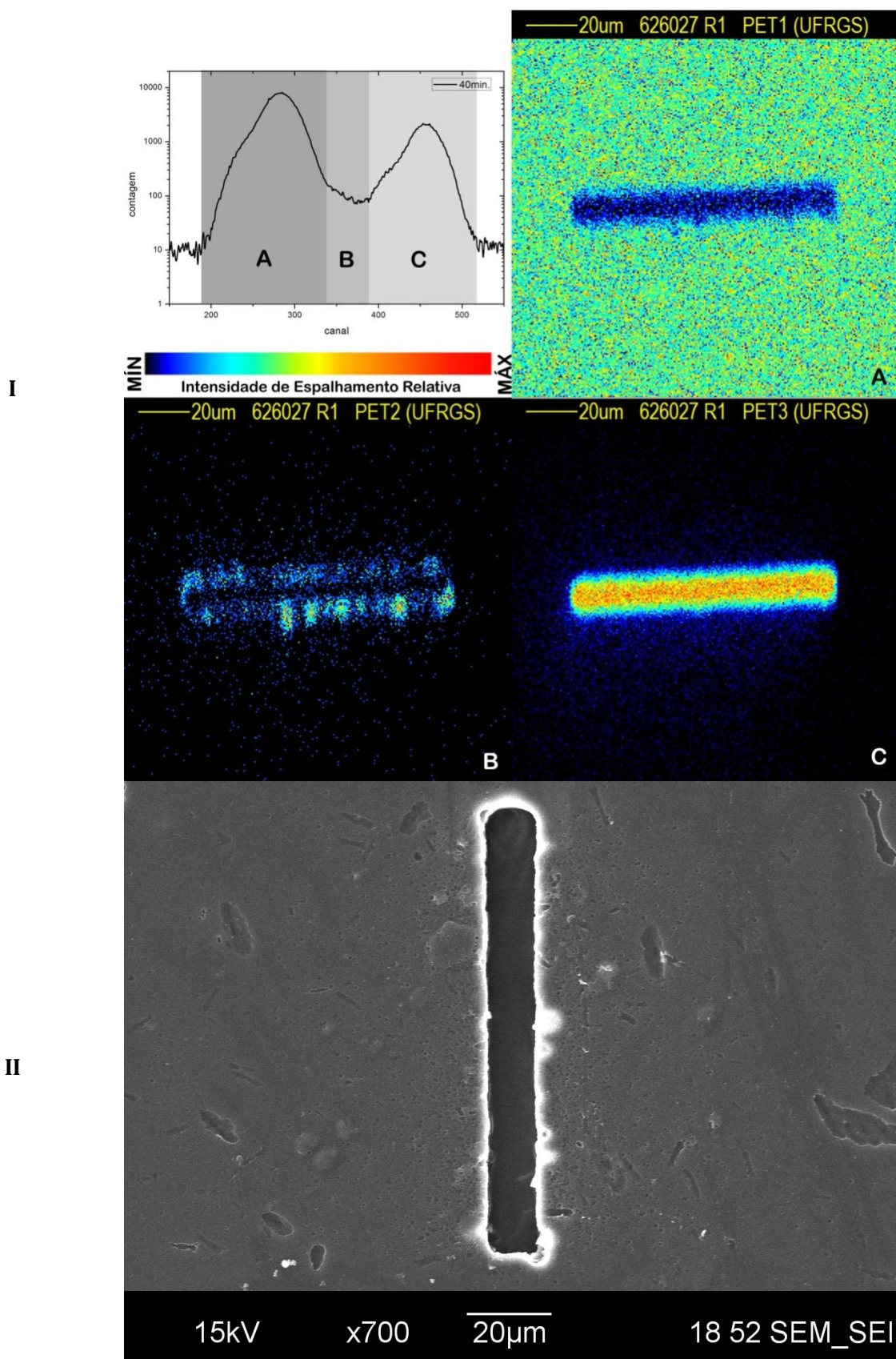


Figura 4.14: Espectros de energia de STIM on-axis para amostra submetida a 40 min. de ataque e os mapas referentes às regiões delimitadas nos gráficos (IA,IB e IC) e imagem de MEV da respectiva amostra (II)

As Figura 4.15 e Figura 4.16 mostram os gráficos para o comprimento e largura das estruturas em função do tempo de ataque obtidos por MEV e STIM. Podemos observar que, embora a tendência de crescimento linear para a técnica de STIM esteja acima do mesmo ajuste para MEV, grande parte das medidas de STIM e MEV são compatíveis, sendo que o valor de uma encontra-se dentro da barra de erro da outra (e vice-versa). Dessa maneira constata-se a compatibilidade das técnicas e a credibilidade da técnica de STIM. Para o caso do comprimento, as barras de erro são os desvios padrões das médias, considerando um $N=3$, pois para cada amostras foram feitas 3 medidas de comprimento. No caso da largura, em que somente uma medida foi feita, erro é obtido através do desvio padrão do ajuste das funções erro e erro complementar.

A tendência crescente aponta que as estruturas aumentam conforme o tempo de exposição à solução de ataque. Uma vez que a solução agiu preferencialmente sobre a região irradiada, removendo o material desta, a ação passa a ocorrer (de forma mais lenta) nas paredes da estrutura, ampliando-a em todas as direções.

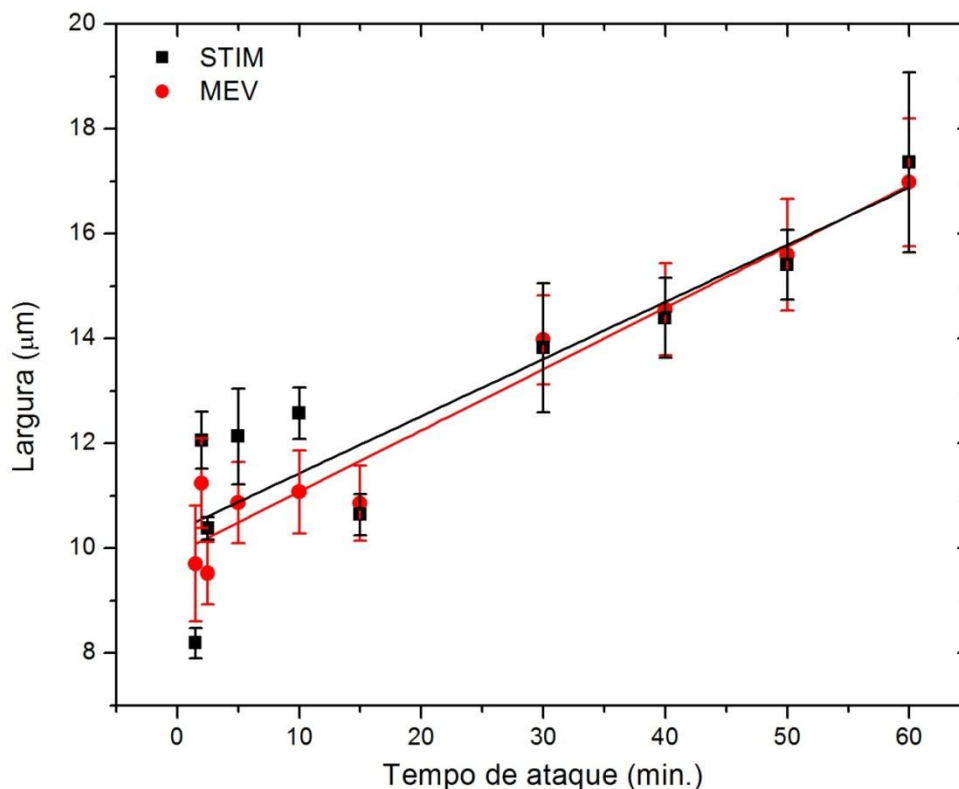


Figura 4.15: Gráficos da largura em função do tempo de ataque obtidos através das técnicas de STIM e MEV

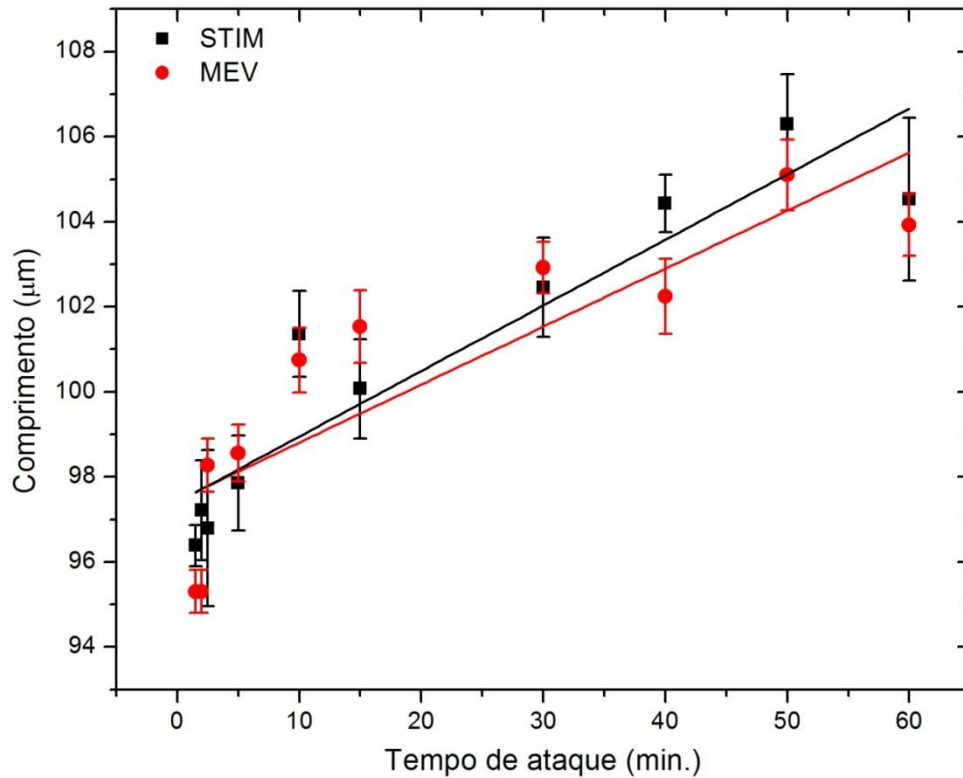


Figura 4.16: Gráficos do comprimento em função do tempo de ataque obtidos através das técnicas de STIM e MEV

A Figura 4.17 mostra uma imagem obtida por MEV ressaltando as paredes de uma estrutura em que a amostra foi submetida a 1,5 minutos de ataque químico. É possível observar que as superfícies da região não irradiada da amostra bem como das paredes da estruturas são suaves, não apresentando porosidade. A Figura 4.18 apresenta uma amostra submetida a 15 minutos de ataque químico. Pode-se observar a porosidade tanto nas paredes da estrutura quanto no polímero não irradiado, indicando a ação do ataque químico.

Na Figura 4.19 observa-se uma amostra submetida a 20 minutos de ataque, apresentando uma estrutura com paredes bastante mais porosas e com cavidades que foram escavadas pela solução química, constatando a suposição, através do estudo por STIM, que esse comportamento ocorreria. No entanto a superfície não mostra uma porosidade extrema, indicando que as regiões próximas às paredes das estruturas são mais frágeis e suscetíveis ao ataque químico que o restante da amostra.

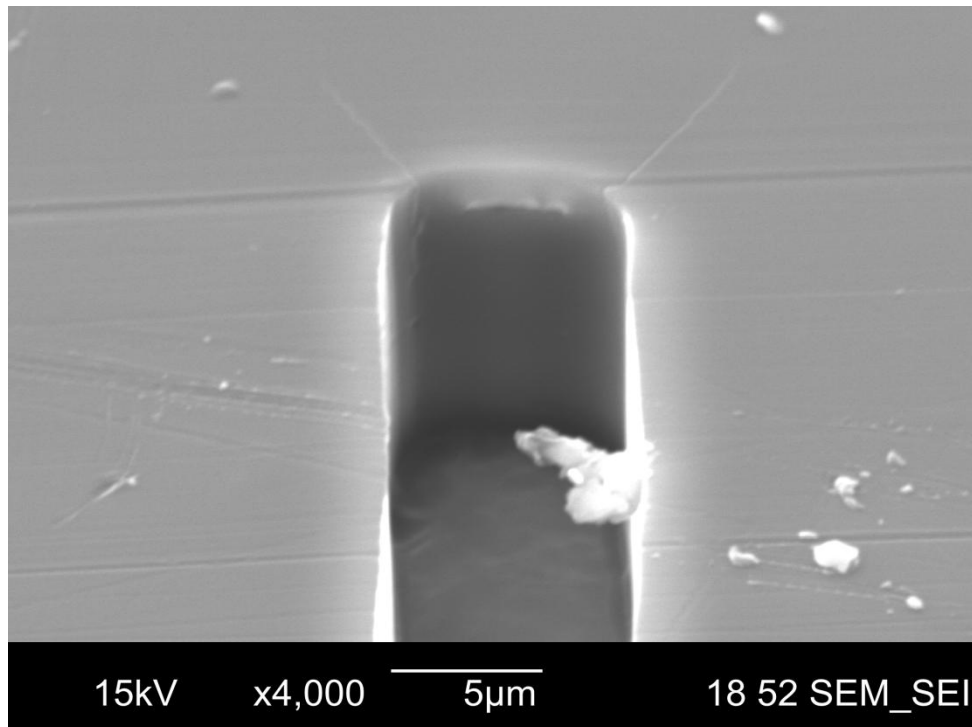


Figura 4.17: Imagem de MEV de amostra submetida a 1,5 min. de ataque, mostrando uma superfície suave (sem poros) tanto nas paredes da estrutura, quanto na superfície do polímero não irradiado.

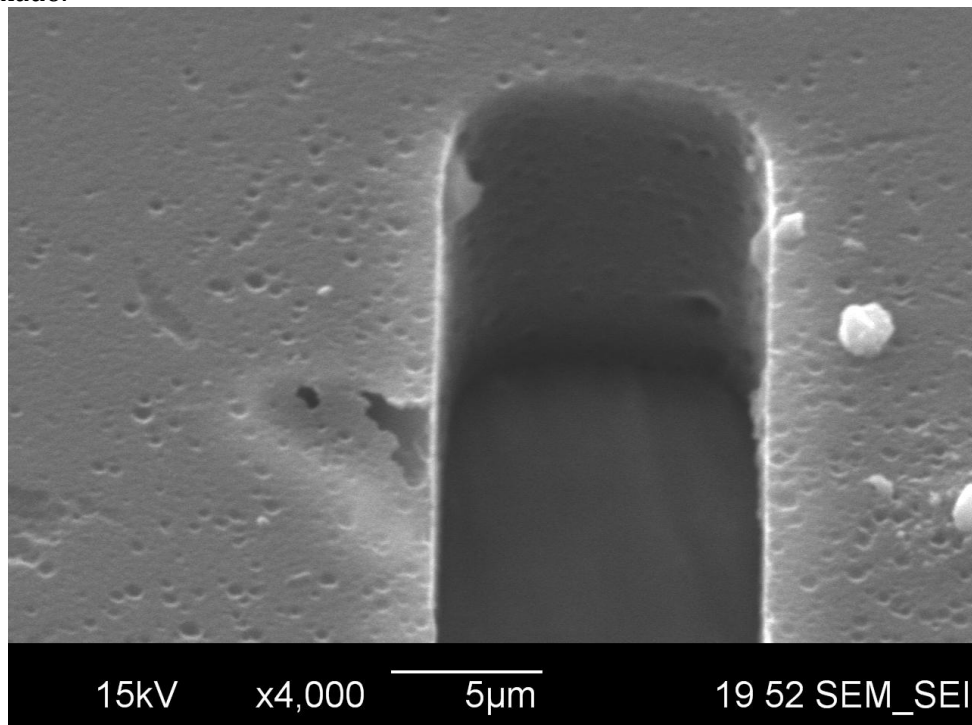


Figura 4.18: Imagem de MEV de amostra submetida a 15 min. de ataque, mostrando a porosidade causada pela ação do ataque químico tanto nas paredes internas e na superfície do polímero não irradiado.

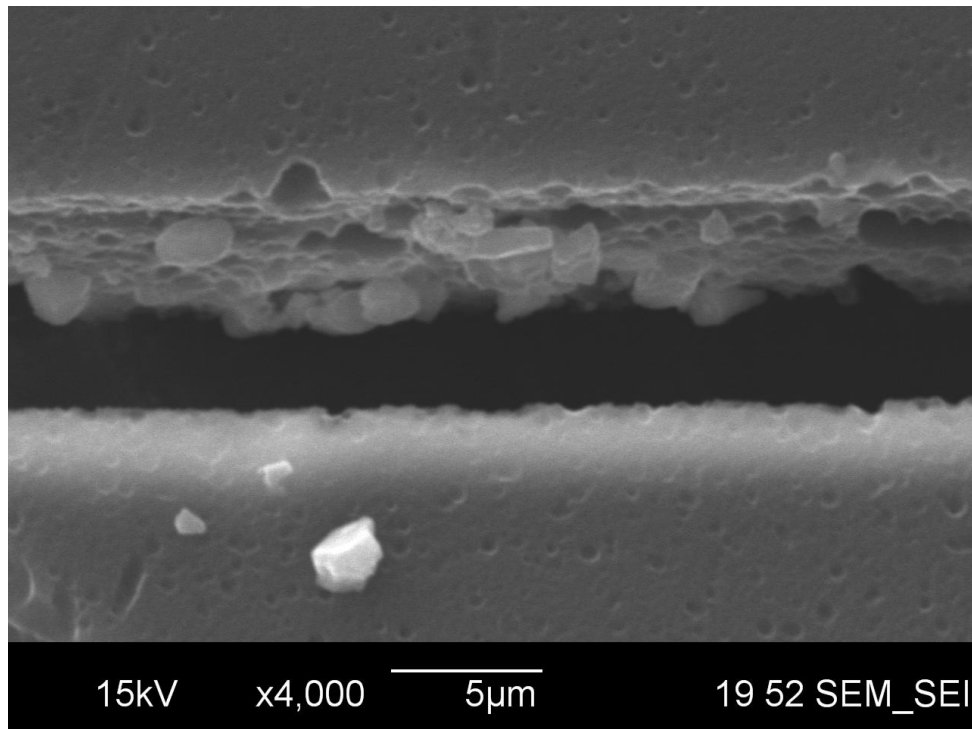


Figura 4.19: Imagem de MEV de amostra submetida a 20 min. de ataque, mostrando cavidades escavadas nas paredes da estrutura pela ação da solução química.

A Figura 4.20 mostra uma amostra submetida a 60 minutos de ataque químico e observa-se uma superfície com bastante porosidade e a espessura da película é bastante reduzida. As paredes da estrutura apresentam cavidades ainda maiores sendo que algumas não são mais internas, mas atingem a superfície, como bolhas que eclodem do interior para a superfície da amostra.

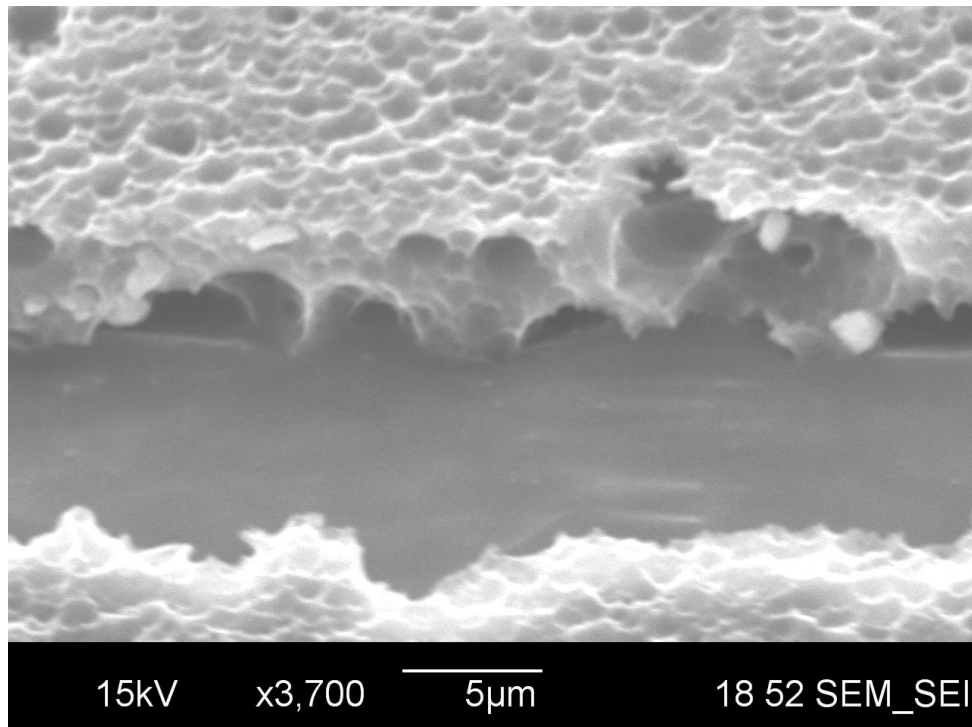


Figura 4.20: Imagem de MEV de amostra submetida a 60 min. de ataque, mostrando cavidades maiores escavadas nas paredes da estrutura e a porosidade mais pronunciada associada à diminuição da espessura.

4.2.3 STIM com diferentes íons

Após constatação da viabilidade e confiabilidade da técnica de STIM em relação à mais usual (MEV), partiu-se para o estudo do efeito do íon para as medidas. Para tal, foram preparadas estruturas com a mesma fluência de irradiação de 6×10^{14} íons/cm². O padrão utilizado foi de uma linha de 1×100 pixel². Em cada amostra foram fabricadas doze estruturas, das quais, quatro foram medidas por STIM, utilizando H⁺¹, He⁺² e Li⁺³, a 1, 3 e 5,5 MeV respectivamente, e posteriormente, por MEV. Alguns exemplos são elucidados nas Figura 4.21 a Figura 4.23.

Observando os espectros e os mapas nota-se que, com o aumento o número atômico do íon, melhor a separação em energia. É claramente visível que as estruturas de espessuras intermediárias são mais visíveis no caso do Li⁺³ do que no caso do He⁺², da mesma forma que são mais visíveis para o He⁺² do que para o H⁺¹. Os gráficos apresentam picos intermediários melhor resolvidos em energia e alguns picos adjacentes são melhor observáveis para íons mais pesados. Isso já havia sido previsto e observado por Minqin et al.¹¹, e se dá devido ao maior poder de freamento para os íons mais pesados, que aumenta a resolução em energia e, desta maneira, aumenta a sensibilidade a menores variações de espessura.

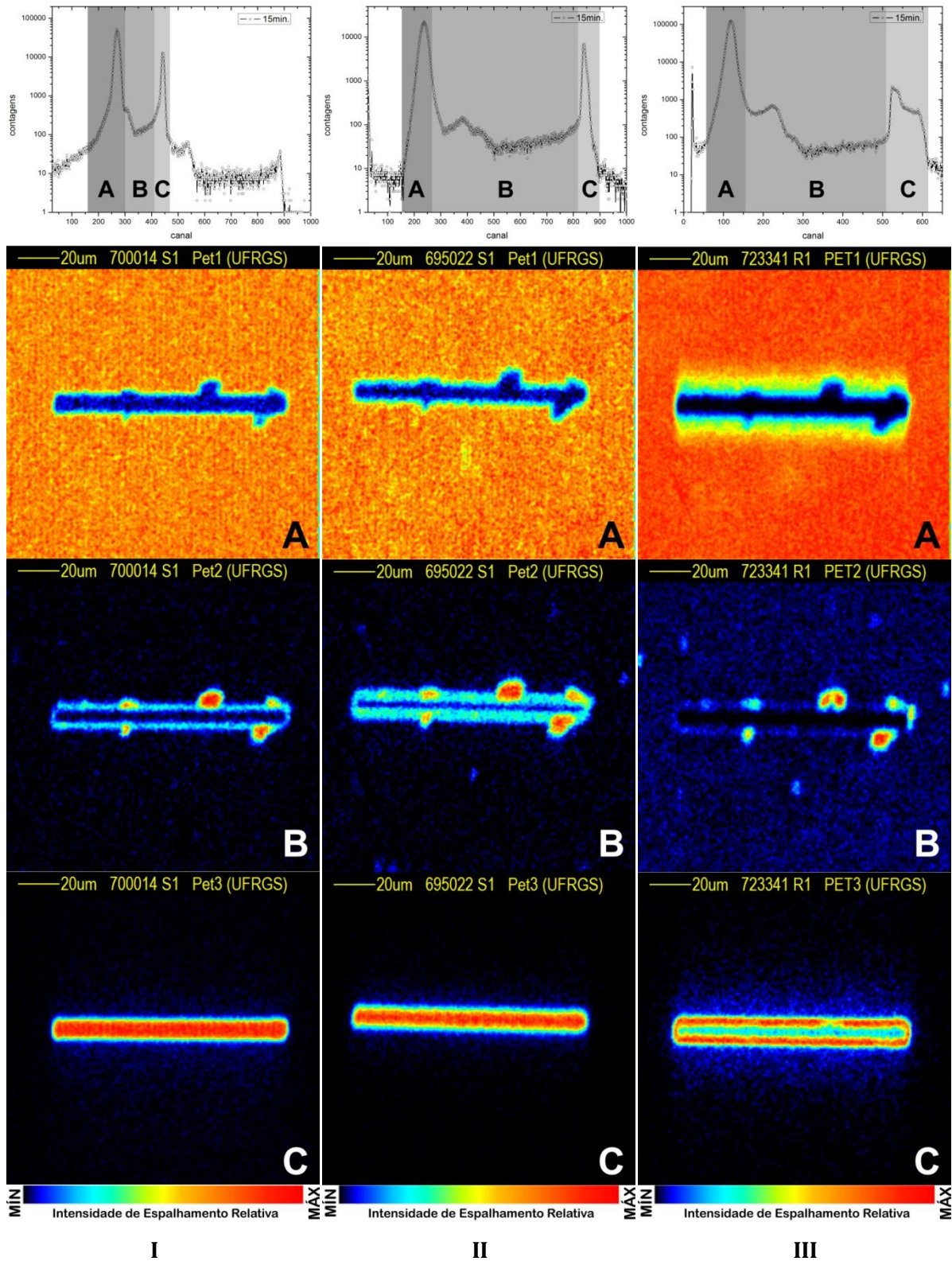


Figura 4.21: Espectros de STIM utilizando os íons H^+ (painel I), He^{+2} (painel II) e Li^{+3} (painel III) para a mesma estrutura submetida a 15 min. de ataque. Cada painel apresenta os mapas referentes às regiões destacadas nos espectros (A, B e C)

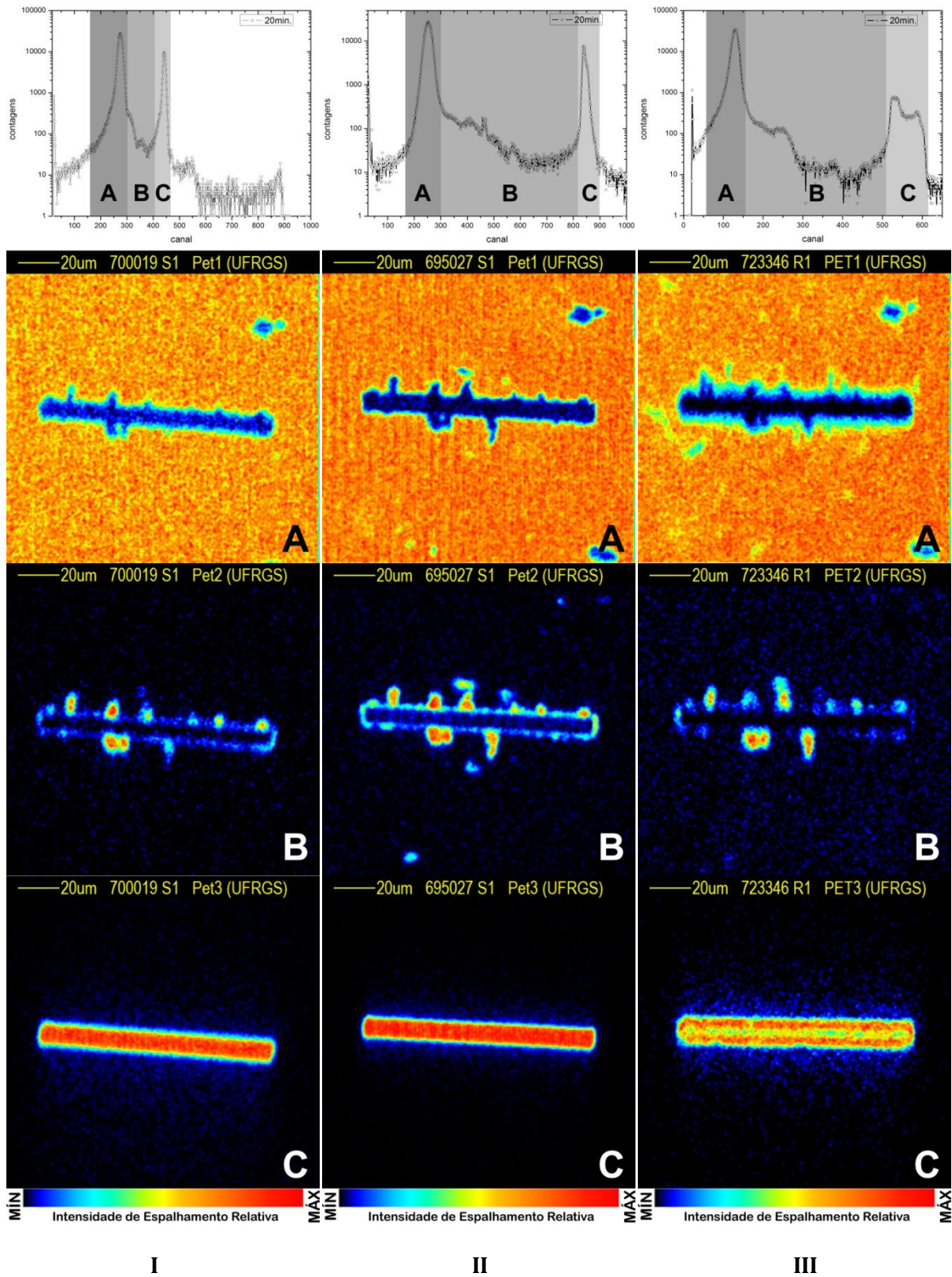


Figura 4.22: Espectros de STIM utilizando os íons H^+ (painel I), He^{+2} (painel II) e Li^{+3} (painel III) para a mesma estrutura submetida a 20 min. de ataque. Cada painel apresenta os mapas referentes às regiões destacadas nos espectros (A, B e C)

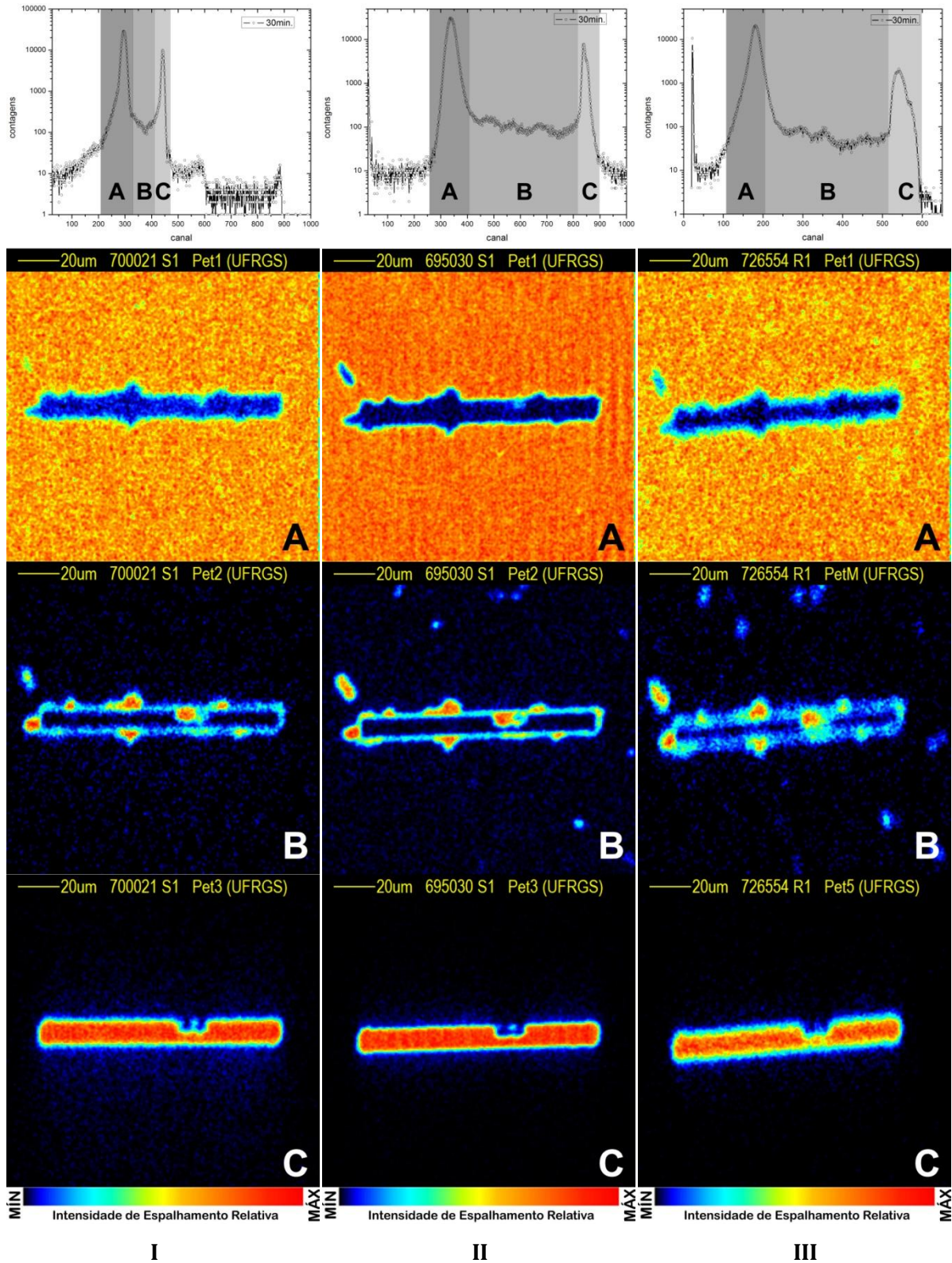


Figura 4.23: Espectros de energia obtidos através da técnica de STIM utilizando os íons H^{+1} (painel I), He^{+2} (painel II) e Li^{+3} (painel III) para a mesma estrutura submetida a 30 min. de ataque. Cada painel apresenta os mapas referentes às regiões destacadas nos espectros (A, B e C)

No entanto, observa-se a diminuição da resolução espacial com o aumento do número atômico, fazendo com que as imagens tenham bordas menos bem definidas. Isso é perceptível no gráfico da Figura 4.24A que mostra que para o Li^{+3} a largura das estruturas são maiores que para o He^{+2} e H^{+1} . Esse mesmo comportamento não se observa para o comprimento das estruturas (Figura 4.24B), em que os valores das medidas são muito próximos para todos os íons.

O tamanho do feixe foi muito similar para as medidas com H^{+1} e He^{+2} , em torno de $1,5 \times 1,5 \mu\text{m}^2$. No entanto para as medidas com Li^{+3} o tamanho do feixe foi de aproximadamente $2,5 \times 2,5 \mu\text{m}^2$. Isso explica o motivo pelo qual há um aumento na largura. A assimetria do feixe (constatada por de Souza et al⁶²) pode explicar o porquê do comprimento não sofrer alteração com a mudança do íon. Apesar disso, tanto no caso do comprimento quanto da largura, a tendência crescente se apresenta para todos os íons com coeficientes angulares similares. No caso da largura e comprimento, as medidas de STIM com íons Li^{+3} das amostras submetidas a 30 e 40 min. foram descartadas devido a problemas no sistema de varredura.

No caso da espessura (Figura 4.24C) a consistência é ainda maior, sendo que os ajustes lineares são praticamente paralelos. A variação entre o Li^{+3} e o H^{+1} , que são os valores extremos, é menor que $1 \mu\text{m}$. Como a resolução em energia está associada diretamente à precisão das medidas de espessura, poderíamos concluir que o valor mais confiável é obtido utilizando-se o Li^{+3} .

Ademais da diminuição da resolução espacial, para os mapas do Li^{+3} observamos um fenômeno curioso (Figura 4.21IIIC) em que grande parte dos íons transmitidos sem perda de energia (ou seja, que atravessam o orifício) se concentram próximo às bordas, fazendo com que a região correspondente ao centro do orifício fique com menor contagem de partículas. Considerou-se a possibilidade de esse fenômeno se tratar de difração de partículas, no entanto o comprimento de onda de de Broglie para todas as partículas utilizadas é de seis a sete ordens de grandeza menor do que a abertura dos orifícios.

Considerando esse fator, uma possível explicação para esse fenômeno é um efeito eletrostático devido à passagem dos íons pelo polímero. É possível que, durante a passagem das partículas pelo polímero, haja um processo de acúmulo de carga. O Li^{+3}

possui uma maior carga positiva, que sofre maior influência do campo elétrico, sofrendo maior deflexão do que no caso do He^{+2} e do H^{+1} .

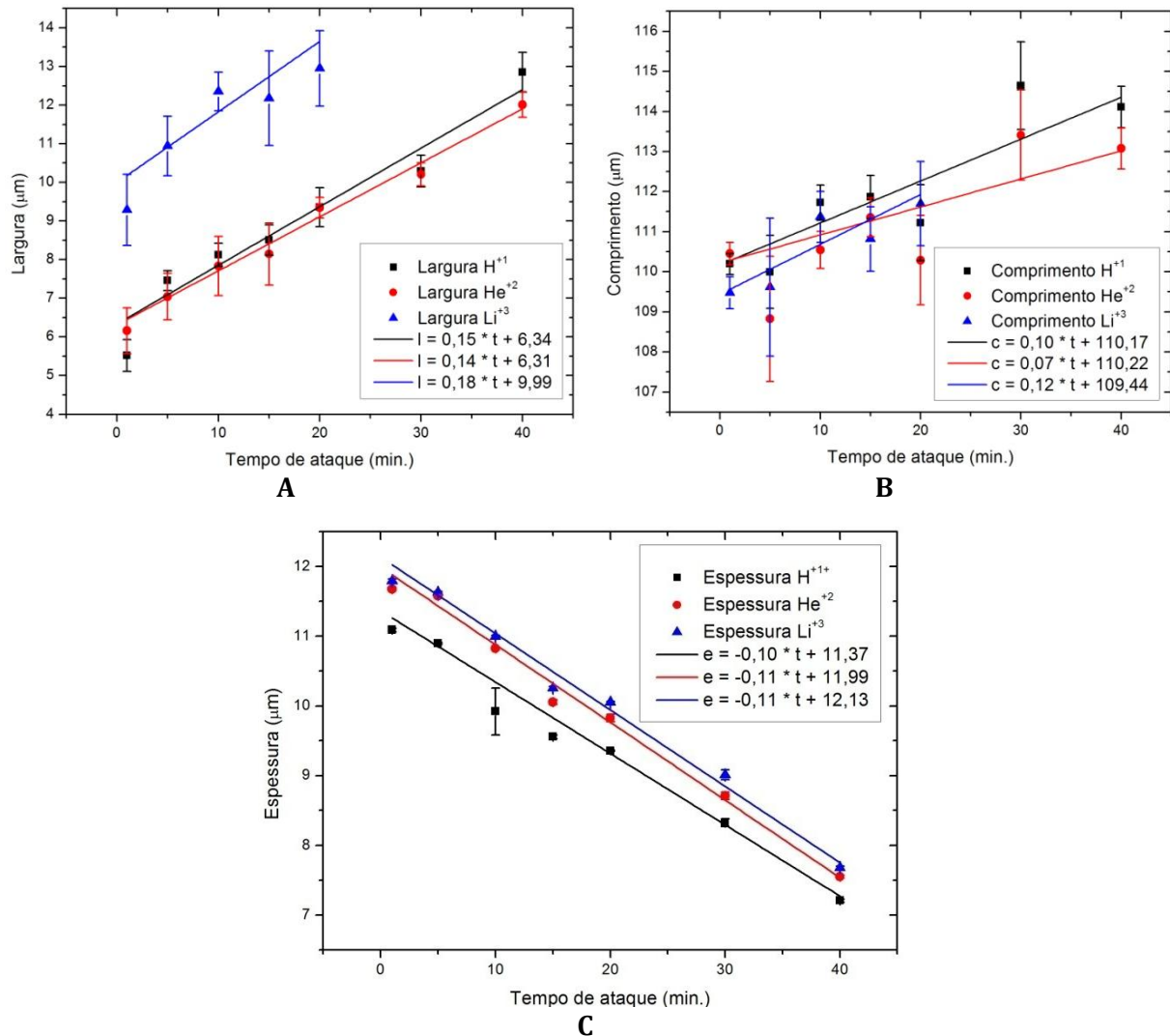


Figura 4.24: Gráficos do comprimento (A), largura (B) e espessura (C) em função do tempo de ataque para as medidas realizadas com H^{+1} , He^{+2} e Li^{+3} .

As barras de erros em todos os gráficos foram obtidas através do desvio padrão da média das medidas. No caso do comprimento, foram traçados quatro perfis para cada amostra e no total foram medidas quatro amostras, dessa forma temos $N=16$. Para o caso da largura, três perfis para cada uma das quatro amostras medidas, dessa maneira temos que $N=12$. Para o caso da espessura, temos $N=4$, pois os valores foram obtidos diretamente dos espectros das quatro amostras medidas.

A Figura 4.25 mostra as imagens em MEV equivalentes às Figura 4.21 a Figura 4.23. Podemos observar que algumas estruturas são comuns entre as amostras de STIM e MEV, como exemplificado na Figura 4.26A. No entanto algumas estrutura são somente visíveis nas imagens de STIM, como é o caso exemplificado na Figura 4.26B em que algumas estruturas são observadas tanto na imagem de MEV quanto na imagem de STIM (linhas tracejadas), no entanto, outras são somente observadas na imagem de STIM (linhas cheias).

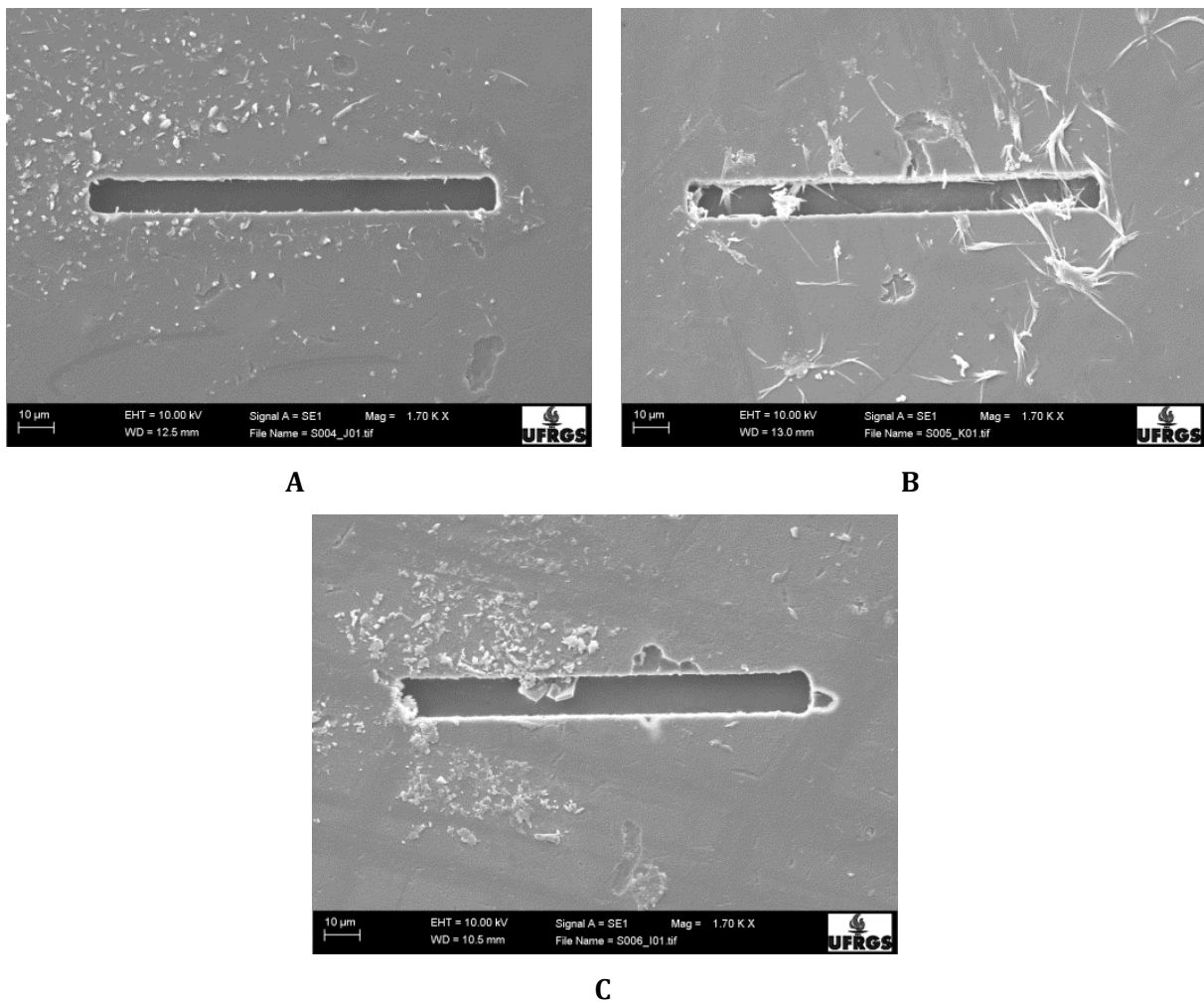
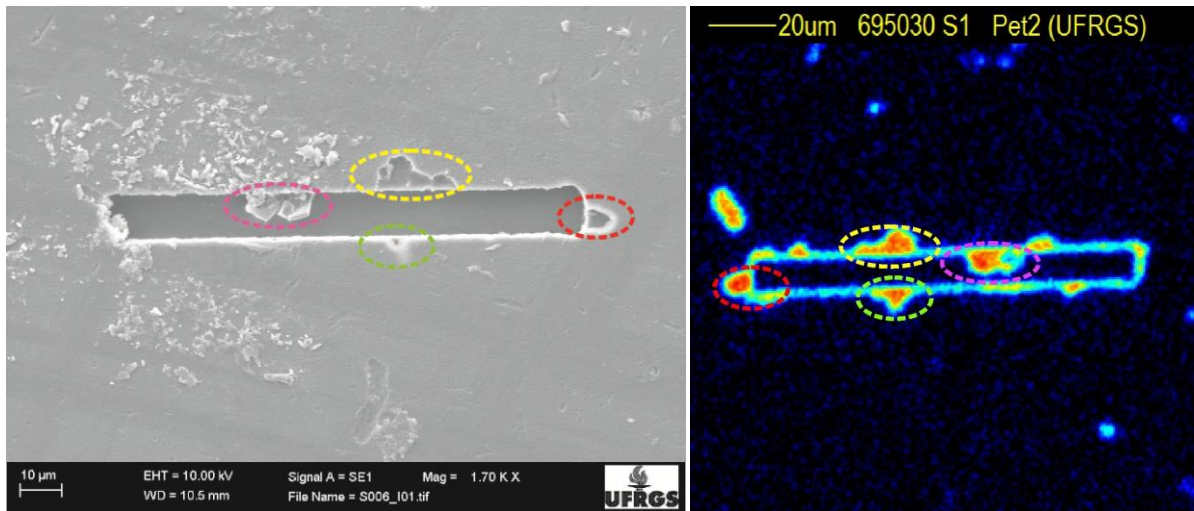
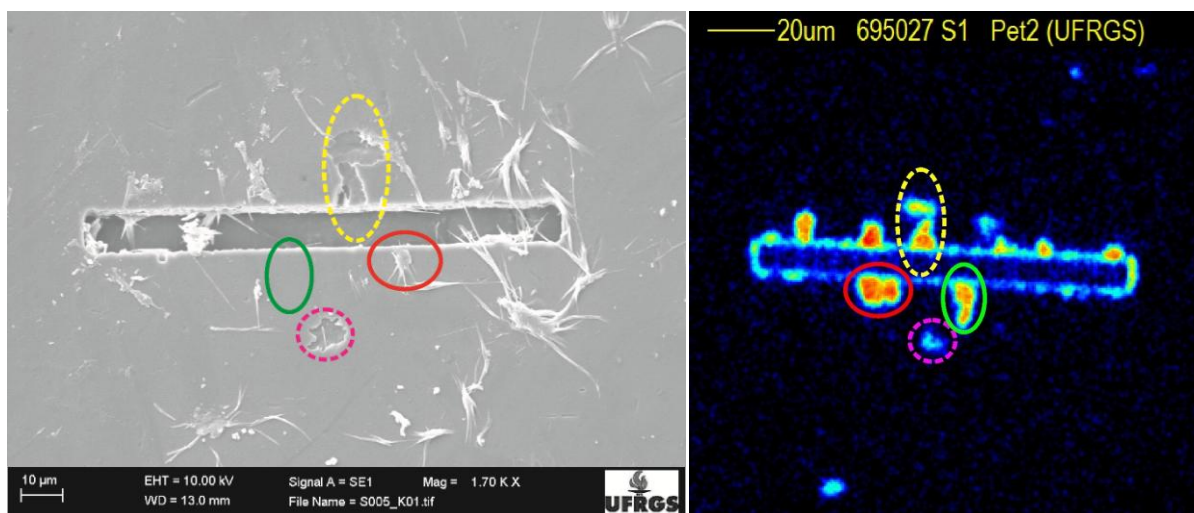


Figura 4.25: Imagens de MEV para estruturas submetidas a 15 (A), 20 (B) e 30 min (C) de ataque.

Percebe-se que as imagens são espelhadas com relação ao eixo vertical. Isso ocorre devido à eletrônica de aquisição do sistema de STIM.



A



B

Figura 4.26: Imagens comparativas entre imagens de MEV e STIM com He^{+2} ilustrando as estruturas visíveis tanto por MEV quanto por STIM (linhas tracejadas) e estruturas visíveis somente por STIM (linhas cheias). As imagens de STIM estão espelhadas com relação às de MEV.

4.2.4 Amostras multi-estruturadas

O objetivo de fabricar amostras multi-estruturadas, além de verificar a viabilidade da técnica de estruturação na obtenção de uma estrutura em formato degrau, foi de avaliar a resolução da técnica de STIM para uma estrutura de espessura intermediária entre o orifício e o polímero não irradiado e razoavelmente bem definida. As estruturas foram fabricadas de forma que o orifício tenha recebido uma fluência fixa de 6×10^{14} íons/cm² enquanto que o degrau foi submetido a uma fluência variável entre 6×10^{13} e 1×10^{13} íons/cm². Todas as estruturas foram fabricadas em uma mesma amostra que esteve sob ação do ataque químico por 3 min.

As amostras foram analisadas por STIM utilizando íons H^{+1} , He^{+2} e Li^{+3} e, posteriormente, metalizadas e analisadas por MEV. Os espectros e imagens obtidos por STIM de duas das estruturas estão nas Figura 4.27 e Figura 4.28 enquanto que as respectivas imagens de MEV podem ser vistas na Figura 4.29.

Analisando todas as fluências para a formação do degrau, observa-se que 6×10^{13} e 4×10^{13} íons/cm² não são ideais para a formação da estrutura, uma vez que para o tempo de 3 min. todo o material é retirado pela solução de ataque. Para as fluências de 3×10^{13} e 1×10^{13} íons/cm² há a formação do degrau, no entanto para o segundo caso a estrutura é muito superficial. Com a estrutura menor ($25 \times 25 \mu\text{m}^2$) houve problemas durante a corrosão e o degrau não se formou à fluência de 3×10^{13} íons/cm².

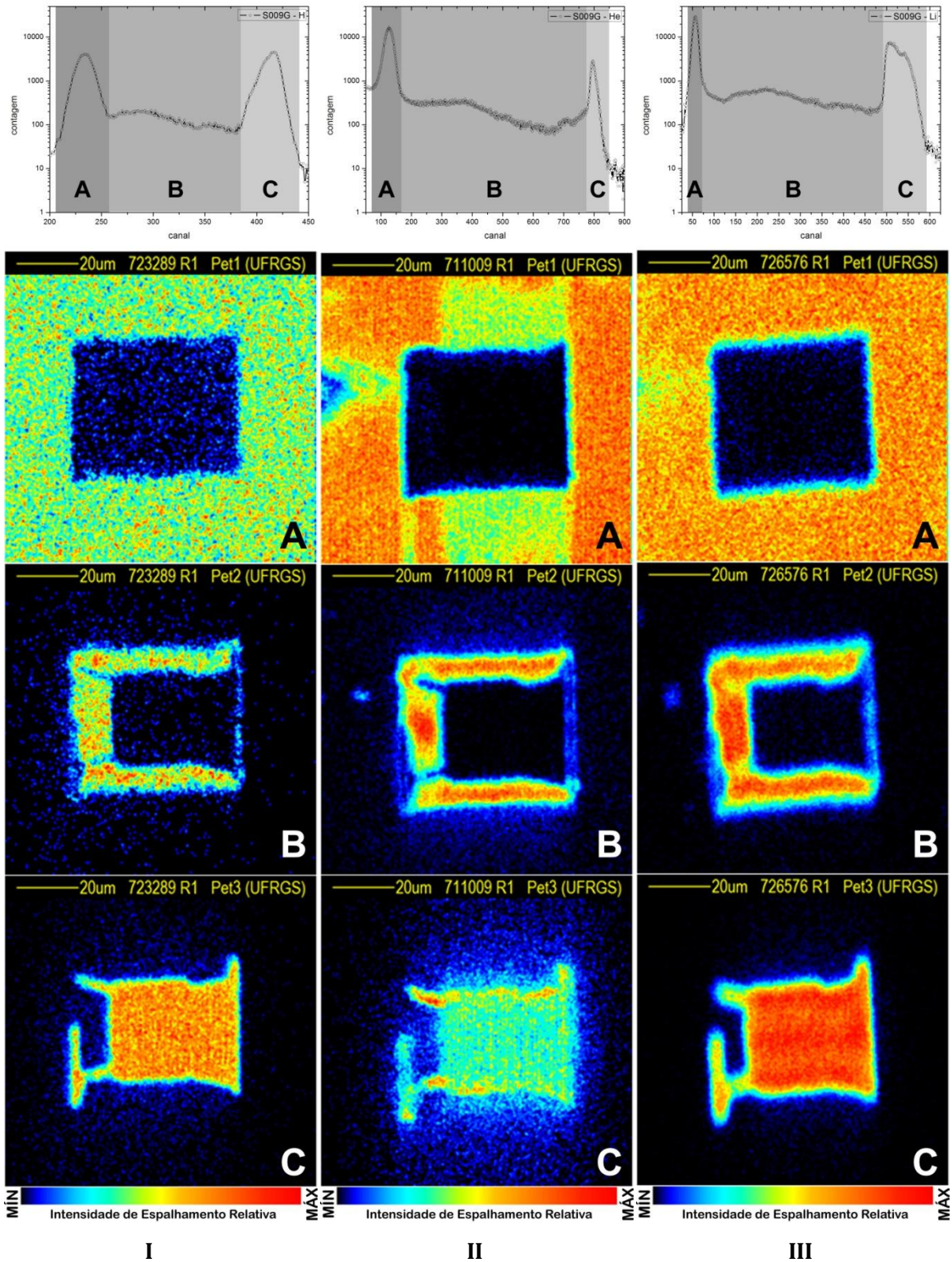


Figura 4.27: Espectros de STIM utilizando os íons H^+ (painel I), He^{+2} (painel II) e Li^{+3} (painel III) para a mesma estrutura irradiada a 6×10^{14} e 3×10^{13} íons/cm² de dimensões $50 \times 50 \mu m^2$. Cada painel apresenta os mapas referentes às regiões destacadas nos espectros (A, B e C)

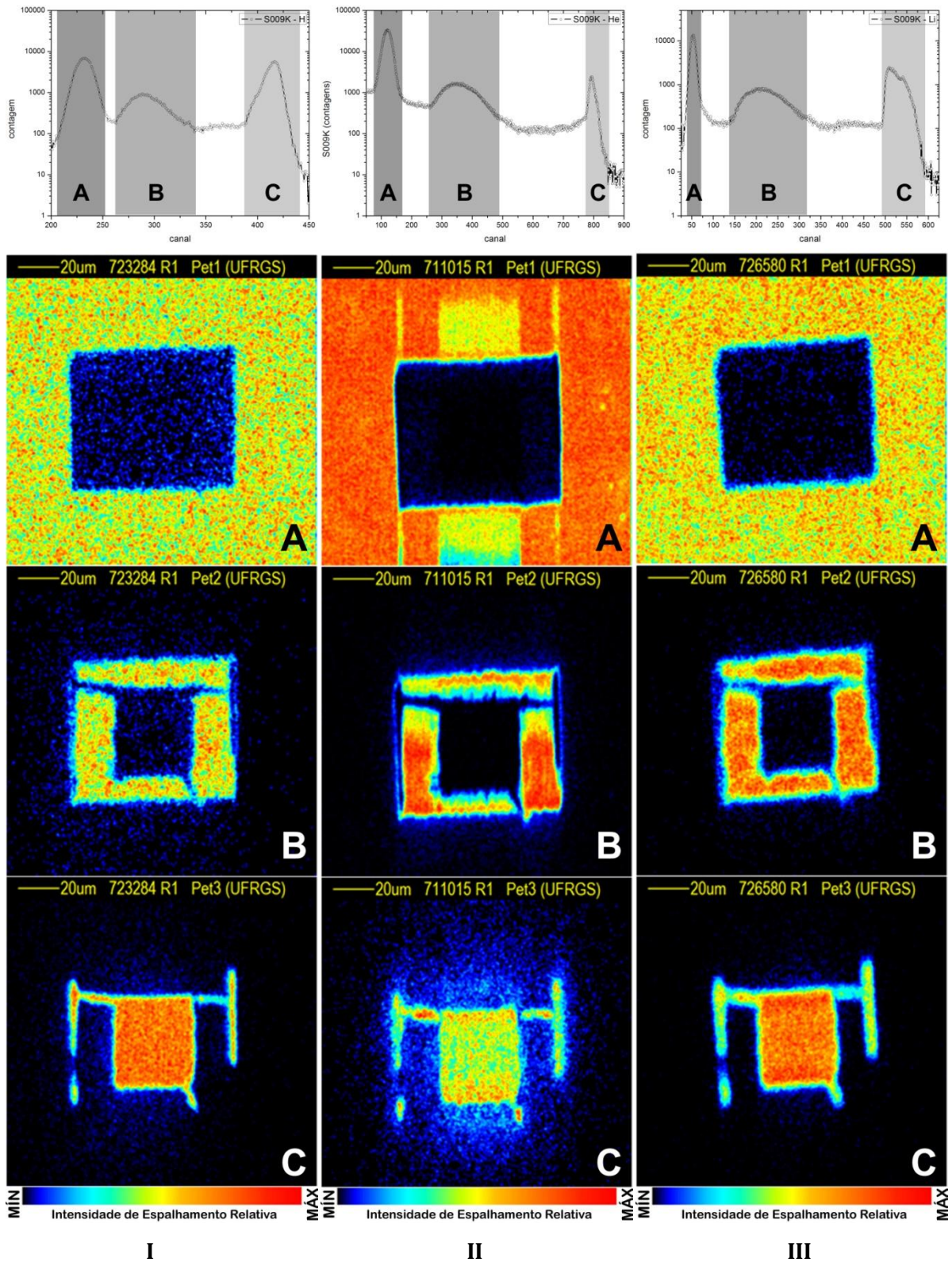


Figura 4.28: Espectros de STIM utilizando os íons H^+ (painel I), He^{+2} (painel II) e Li^{+3} (painel III) para a mesma estrutura irradiada a 6×10^{14} e 3×10^{13} íons/cm² de dimensões 75x75 µm². Cada painel apresenta os mapas referentes às regiões destacadas nos espectros (A, B e C)

Através das imagens de MEV das estruturas irradiadas a 3×10^{13} íons/cm² de dimensões 50x50 e 75x75 μm^2 (Figura 4.29) observa-se que a superfície do degrau não é suave, mas possui indentações no sentido vertical. Isso ocorre pois o tamanho do feixe é maior do que a distância considerada entre um pixel e outro no momento da estruturação, em que a escala é de 1pixel/1 μm . Dessa forma, há sobreposição de irradiação sendo que em algumas regiões a carga acumulada é o dobro da esperada e em outras é o triplo⁶².

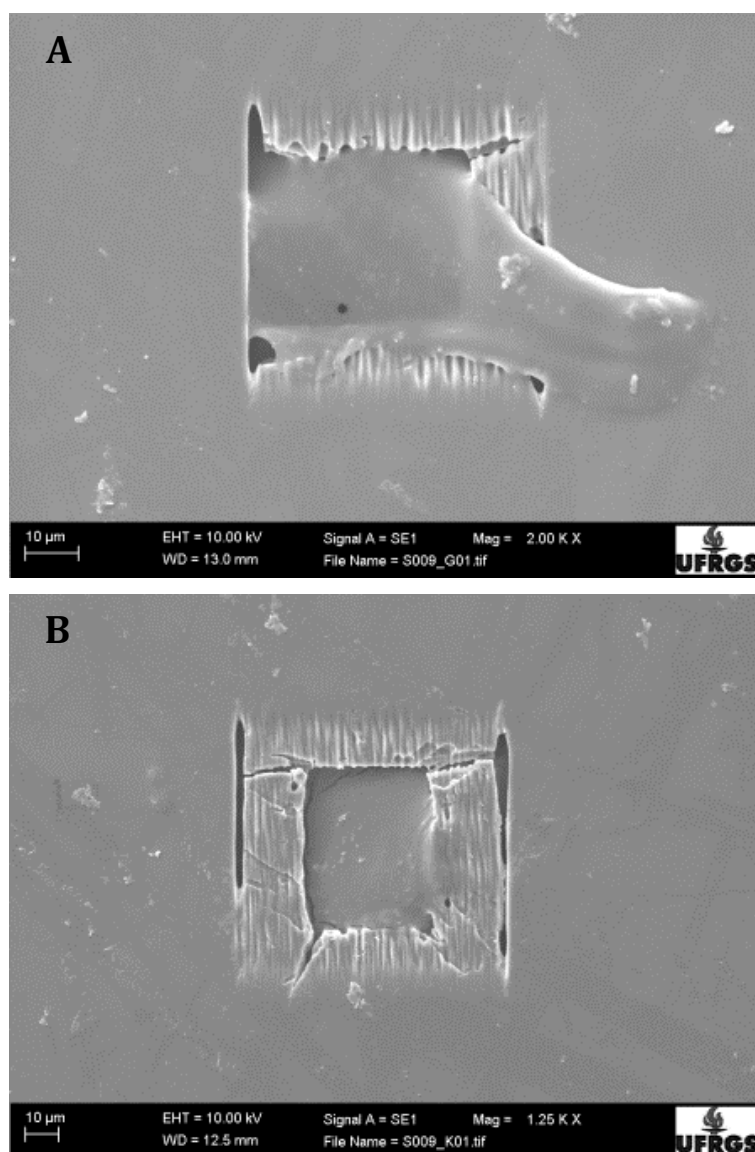


Figura 4.29: Imagens de MEV das estruturas do tipo degrau referentes às Figura 4.27 (A) e Figura 4.28 (B).

Esse efeito de acúmulo de carga pode ter dois efeitos: fragilizar ou enrijecer o material. Se ele for o suficiente para fragilizar o polímero, a corrosão será preferencial nos pontos de sobreposição de cargas. No entanto, o acúmulo de carga pode causar reticulações que,

ao invés de facilitar, dificulta a corrosão, o que faz com que nessas regiões haja uma resistência à ação da solução de ataque químico⁶². Essas indentações não são observadas por STIM pois são menores que a resolução espacial do microfeixe de íons.

As medidas utilizando íons He^{+2} apresentam uma corrente muito alta e dessa forma os mapas são muito ruidosos, em especial as regiões representativas do polímero não irradiado e do orifício.

No caso das medidas utilizando íons Li^{+3} nos mapas representativos do orifício, novamente observamos que há regiões de maiores e menores intensidade, sendo que as maiores intensidades ocorrem próximo às bordas (nos orifícios menores como na Figura 4.28IIIC) e em alguns casos também no meio do orifício (para estruturas maiores como na Figura 4.27IIIC). No segundo caso, há um aumento na intensidade no meio da estrutura, pois as bordas estão distantes demais para causar efeito nos íons que passam por essa região.

A melhor amostra do tipo degrau foi a de dimensão $75 \times 75 \mu\text{m}^2$, irradiada a 3×10^{13} íons/ cm^2 . Através dos espectros da Figura 4.28 observa-se que o pico referente ao degrau, apesar de bastante largo, é o mais bem separado dos demais elementos do gráfico, se comparados com as medidas das demais estruturas.

Como foi feita uma calibração em espessura para o STIM é possível estabelecer de forma aproximada e simplificada a espessura do degrau, ajustando-se curva gaussianas aos picos referentes a tais estruturas.

Observa-se que a espessura é de aproximadamente $8 \pm 2 \mu\text{m}$ para os três casos.

5 CONCLUSÕES

Ao longo deste trabalho, foram feitos estudos elementares de amostras de fígado de peixe utilizando as técnicas de PIXE e microPIXE.

Observou-se que é possível realizar medidas de microPIXE em amostras de fígado de peixes contendo lesões, devido à presença dos CMMs que acompanham as lesões. Mesmo fígados lesionados, que aparentemente não contêm CMMs à luz de um estudo histopatológico, apresentam CMMs muito pequenos para serem detectados pela microscopia óptica, porém são claramente visíveis nos mapas de microPIXE de ferro. Observou-se também a correlação entre diversos elementos distribuídos ao longo da amostra.

Através da técnica de PIXE convencional, determinou-se que alguns elementos estão relacionados à lesão, mas não aos CMMs, pois apresentam maior concentração em fígados lesionados com CMMs menores. Por outro lado, outros elementos são inerentes aos CMMs pois apresentam em maior concentração nos fígados lesionados com CMMs maiores.

Com esses resultados, o fígado de peixe se mostrou adequado para o estudo de controle ambiental.

Também, neste trabalho, foi utilizada a técnica de STIM em diferentes estruturas fabricadas por PBW para caracterização morfológica. Foram comparados os resultados considerando duas configurações geométricas distintas, bem como utilizando três diferentes íons (H^{+1} , He^{+2} e Li^{+3})

Primeiramente, foram realizadas medidas em estruturas do tipo duas linhas (dois orifícios em formato de linha), em duas configurações: *on-axis*, utilizando um detector diodo-PIN, e *off-axis*, utilizando um detector SSB. Em princípio, a configuração *off-axis* apresentava estruturas de espessura intermediárias que não era observável através da configuração *on-axis*.

Um detector SSB substituiu o diodo-PIN na configuração *on-axis*. Novamente foram medidas e comparadas as duas configurações geométricas, para estruturas do tipo uma linha. Observou-se que, com o novo detector, a configuração *on-axis* foi capaz de revelar

as estruturas intermediárias. A utilização de um diodo PIN como forma de detector de partículas é efetivo até certo ponto: o espectro em energia separa o pico referente ao orifício e o pico referente ao polímero não irradiado, no entanto, não apresenta resolução em energia para distinguir as estruturas de espessuras intermediárias.

Após constatada a compatibilidade entre as configurações de STIM *on-axis* e *off-axis*, optou-se por dar continuidade ao trabalho utilizando somente a primeira configuração, pois se apresenta mais rápida, menos danosa à amostra (devido à corrente baixa na ordem de até 1000 íons/s) e provê informações apenas da densidade da amostra (em contraponto à configuração *off-axis* que também provê informação química devido ao maior espalhamento).

A partir de então, procurou-se comparar as técnicas de STIM e MEV. A microscopia eletrônica de varredura é a técnica mais usual para o estudo morfológico apresentado nesse trabalho e essa comparação permite avaliar a viabilidade e confiabilidade da técnica de STIM com relação às imagens e aos tamanhos das estruturas medidas.

Observou-se que os tamanhos das estruturas foram compatíveis quando medidas por ambas as técnicas, atestando a confiabilidade do STIM. Constata-se, também, que várias estruturas são observáveis por STIM, mas não por MEV, ou porque estão presentes apenas de um lado da amostra, ou porque não estão na superfície da amostra, mas no seu interior. Nesse aspecto, a técnica de STIM é mais desejável. Outra característica que a favorece é a rapidez da medida e análise e a conservação da amostra, uma vez que a medida de MEV exige metalização de amostras poliméricas, inviabilizando o uso posterior das películas.

Os estudos utilizando os íons de H^{+1} , He^{+2} e Li^{+3} mostraram que o aumento da massa do íon provê maiores informações com relação às estruturas de espessura intermediárias, tais como degraus ou bolhas no interior da amostra. Diversas estruturas, não visíveis utilizando o íon H^{+1} , se tornavam visíveis utilizando os íons He^{+2} e Li^{+3} . O tamanho das estruturas medidas com os íons H^{+1} e He^{+2} se mostraram compatíveis, no entanto, devido à diferenças no tamanho do feixe e por efeito de carga nas bordas, as estruturas medidas por Li^{+3} se apresentaram maiores que as demais. Esse efeito é atribuído à diminuição da resolução espacial. Dessa maneira, é necessário um comprometimento

entre a resolução em energia, que aumenta com a massa do íon, e a resolução espacial, que diminui.

Para as imagens obtidas com o feixe de Li^{+3} , observa-se que algum fenômeno concentra os íons nas bordas da estrutura. Esse efeito não pode ser atribuído ao fenômeno de difração, pois para todos os íons o comprimento de onda de de Broglie é de seis a sete ordens de grandeza menor do que a abertura dos orifícios. Dessa forma, atribuiu-se esse efeito a um fenômeno de carregamento da amostra e, sendo o íon Li^{+3} mais carregado, o mesmo se torna mais suscetível a esse fenômeno, sofrendo desvios em sua trajetória ao passar pela amostra. Esse efeito é observado com mais intensidade nas amostras de uma linha, porém são também visíveis nas amostras multi-estruturadas, que apresentam orifícios maiores.

Para amostras multi-estruturadas, concluiu-se que a fluência mais apropriada para a fabricação do degrau é de 3×10^{13} íons/cm². No entanto, observa-se que ele também se forma de maneira menos pronunciada utilizando a fluência de 1×10^{13} íons/cm², o que sugere que fluências intermediárias provêm degraus de espessuras interemediárias. Para estruturas muito pequenas (na ordem de $25 \times 25 \mu\text{m}^2$) ocorrem problemas durante o ataque químico e as estruturas sofrem mal-formações. A superfície dos degraus apresentaram indentações causadas pela reticulação do polímero resultante da sobreposição do feixe.

Em resumo, a técnica de STIM se apresentou viável para o estudo morfológico de microestruturas fabricadas por microfeixe de íons, sendo que a melhor configuração é na geometria on-axis e utilizando o íon He^{+2} , que provê melhor separação em energia, sem comprometer a resolução espacial. A técnica de STIM apresentou vantagens como rapidez, não-destrutibilidade e o poder de resolver estruturas enterradas na amostra, em comparação com a técnica de MEV, e a similaridade entre as duas técnicas com relação às demais características faz da técnica de STIM uma excelente alternativa à mais comumente utilizada para diversas análises morfológicas de películas poliméricas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Saint, A., Bench, B. S., Cholewa, M., Dooley, S., Jamieson, D. N., Legge, G. J. F., High resolution techniques for the scanning proton microprobe. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **56-57**, 717–721 (1991).
2. Stori, E. M., de Souza, C. T., Amaral, L., Fink, D., Papaléo, R. M., Dias, J. F., Use of STIM for morphological studies of microstructured polymer foils. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **306**, 99–103 (2013).
3. Souza, C. T., Stori, E. M., Fink, D., Vacík, V., Svorcík, V., Papaléo, R. M., Amaral, L., Dias, J. F., Electronic behavior of micro-structured polymer foils immersed in electrolyte. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **306**, 222–226 (2013).
4. Spemann, D., Reinert, T., Vogt, J., Andrea, T., Barapatre, N., Feder, R., Jakob, A. M., Liebing, N., Meinecke, Ch., Menzel, F., Rothermel, M., Butz, T., Materials analysis and modification at LIPSION – Present state and future developments. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **269**, 2175–2179 (2011).
5. Stori, E. M., Rocha, M. L. C. F., Dias, J. F., dos Santos, C. E. I., de Souza, C. T., Amaral, L., Dias, J. F., Elemental characterization of injuries in fish liver. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **318**, 83–87 (2014).
6. Chen, X., Chen, C. B., Udalagama, C. N. B., Minquin, R., Fong, K. E., Yung, L. Y. L., Giorgia, P., Bettiol, A. A., Watt, F., High-resolution 3D imaging and quantification of gold nanoparticles in a whole cell using scanning transmission ion microscopy. *Biophys. J.* **104**, 1419–25 (2013).
7. Jankovská, I., Miholová, D., Lukesová, D., Kalous, L., Valék, P., Romocuský, S., Vadlejch, J., Petrtyl, M., Langrová, I., Cadková, Z., Concentrations of Zn, Mn, Cu and Cd in different tissues of perch (*Perca fluviatilis*) and in perch intestinal parasite (*Acanthocephalus lucii*) from the stream near Prague (Czech Republic). *Environ. Res.* **112**, 83–5 (2012).
8. Cao, L., Huang, W., Shan, X., Ye, Z. & Dou, S. Tissue-specific accumulation of cadmium and its effects on antioxidative responses in Japanese flounder juveniles. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **33**, 16–25 (2012).
9. Aich, A., Chakraborty, A., Sudarshan, M., Chattopadhyay, B. & Mukhopadhyay, S. K. Study of trace metals in Indian major carp species from wastewater-fed fishponds of East Calcutta Wetlands. *Aquac. Res.* **43**, 53–65 (2012).
10. Watt, F., Bettiol A. A., van Kan, J. A., Ynsa, M. D., Minquin, R., Rajendran, R., Huifang, C., Fwu-Shen, S., Jenner, A. M., Imaging of single cells and tissue using MeV ions. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **267**, 2113–2116 (2009).

11. Minqin, R., van Kan, J. A., Bettiol, A. A., Daina, L., Gek, C. H., Huat, B. B., Whitlow H, J., Osipowicz, T., Watt, F., Nano-imaging of single cells using STIM. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **260**, 124–129 (2007).
12. Barberet, P., Incerti, S., Andersson, F., Delalee, F., Serani, L., Moretto, P., Technical description of the CENBG nanobeam line. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **267**, 2003–2007 (2009).
13. Barberet, P., Daudin, L., Gordillo, N., Sorieul, S., Simon, M., Sez nec, H., Idarraga, I., Incerti, S., Balana, A., Moretto, P., First results obtained using the CENBG nanobeam line: Performances and applications. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **269**, 2163–2167 (2011).
14. Dymnikov, A., Glass, G., Obtaining 1–10nm optimal beam spot size in the magnetic quadrupole nanoprobe. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **273**, 258–261 (2012).
15. van Kan, J. A., Malar, P., de Vera, A. B., Chen, X., Bettiol A. A., Watt, F., Proton beam writing nanoprobe facility design and first test results. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. A Accel. Spectrometers, Detect. Assoc. Equip.* **645**, 113–115 (2011).
16. Butz, T., Legge, G. J. F., From micro- to nanoprobes: auspices and horizons. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **113**, 317–322 (1996).
17. Johansson, S. A. E., Campbell, J. L. & Malmqvist, K. G. *Particle-Induced X-Ray Emission Spectrometry (PIXE)*. (John Wiley & Sons, 1995).
18. Engstedt, O., Koch-Schmidt, P., Larsson, P., Strontium (Sr) uptake from water and food in otoliths of juvenile pike (*Esox lucius* L.). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* **418-419**, 69–74 (2012).
19. Elfman, M., Eriksson, M., Kristiansson, P., Malmqvist, K., Pallon, J., Application of microPIXE and STIM in analyses of fossil and Recent polychaete jaws (scolecodonts). *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **158**, 287–291 (1999).
20. Svedäng, H., André, C., Jonsson, P., Elfman, M. & Limburg, K. E. Migratory behaviour and otolith chemistry suggest fine-scale sub-population structure within a genetically homogenous Atlantic Cod population. *Environ. Biol. Fishes* **89**, 383–397 (2010).
21. Huszank, R., Simon, a., Szilágyi, E., Keresztessy, K. & Kovács, I. Micro-ERDA, micro-RBS and micro-PIXE techniques in the investigation of fish otoliths. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **267**, 2132–2135 (2009).

22. Romolo, F. S., Cristopher, M. E., Donghi, M., Ripani, L., Jeynes, C., Wbb, R. P., Ward, N. I., Kirkby, K. J., Bailey, M. J., Integrated Ion Beam Analysis (IBA) in Gunshot Residue (GSR) characterisation. *Forensic Sci. Int.* **231**, 219–28 (2013).
23. Sealock, R. M., Jamieson, D. N. & Legge, G. J. F. Scanning transmission microscopy with a 2 MeV alpha particle microbeam. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **29**, 557–566 (1987).
24. Watt, F., Chen, X., de Vera, A. B., Udalagama, C. N. B., Ren, M., van Kan, J. A., Bettiol, A. A., The Singapore high resolution single cell imaging facility. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **269**, 2168–2174 (2011).
25. Li, Y. Q., Habchi, C., Liu, X., Liu, Y. Y., Zheng, Y., Li, X. Y., Shen, H., Scanning transmission ion microscopy computed tomography (STIM-CT) for inertial confinement fusion (ICF) targets. *Fusion Eng. Des.* **88**, 188–194 (2013).
26. Watt, F., Osipowicz, T., Choo, T. F., Orlic, I. & Tang, S. M. Nuclear microprobe analysis and imaging: Current state of the art performances. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **136-138**, 313–317 (1998).
27. Schwertner, M., Sakellariou, A., Reinert, T. & Butz, T. Scanning transmission ion micro-tomography (STIM-T) of biological specimens. *Ultramicroscopy* **106**, 574–81 (2006).
28. Reinert, T., Sakellariou, A., Schwertner, M., Vogt, J. & Butz, T. Scanning transmission ion microscopy tomography at the Leipzig nanoprobe LIPSION. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **190**, 266–270 (2002).
29. Habchi, C., Niguyen, D. T., Devès, G., Incerti, S., Lemelle, L., Van Vang, P. L., Moretto, P., Ortega, R., Seznec, H., Sakellariou, A., Sergeant, C., Cimionovici, A., Ynsa, M. D., Gontier, E., Heiss, M., Pouthier, T., Boudou, A., Rebillat, F., Three-dimensional densitometry imaging of diatom cells using STIM tomography. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **249**, 653–659 (2006).
30. Andrea, T., Rothermel, M., Werner, R., Butz, T. & Reinert, T. Limited angle STIM and PIXE tomography of single cells. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **268**, 1884–1888 (2010).
31. Andrea, T., Rothermel, M., Butz, T. & Reinert, T. The improved STIM tomography set-up at LIPSION: Three-dimensional reconstruction of biological samples. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **267**, 2098–2102 (2009).
32. Reinert, T., Andrea, T., Barapre, N., Hohlweg, M., Koal, T., Larisch, W., Reinert, A., Spemann, D., Vogt, J., Werner, R., Butz, T., Biomedical research at LIPSION – Present state and future developments. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **269**, 2254–2259 (2011).

33. Rothermel, M., Reinert, T., Andrea, T. & Butz, T. First results on ion microtomography at LIPSION. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **268**, 2001–2005 (2010).
34. Andrea, T., Rothermel, M., Butz, T. & Reinert, T. The improved STIM tomography set-up at LIPSION: Three-dimensional reconstruction of biological samples. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **267**, 2098–2102 (2009).
35. Reinert, T., Sakellariou, a., Schwertner, M., Vogt, J. & Butz, T. Scanning transmission ion microscopy tomography at the Leipzig nanoprobe LIPSION. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **190**, 266–270 (2002).
36. Rothermel, M., Reinert, T., Andrea, T. & Butz, T. First results on ion microtomography at LIPSION. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **268**, 2001–2005 (2010).
37. Proton Beam Writing. at <<http://www.pbeamwriting.com/>>, acessado em 30/04/2014
38. Feder, R., Menzel, F. & Butz, T. Micro-fluidic target chamber machined by proton beam writing for the in situ analysis of gas absorption in synthetic crystals. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **269**, 2439–2443 (2011).
39. Udalagama, C., Teo, E. J., Chan, S. F., Kumar, V. S., Bettiol, A. A., Watt, F., Proton beam writing of long, arbitrary structures for micro/nano photonics and fluidics applications. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **269**, 2417–2421 (2011).
40. Bettiol, A. A., Sum, T. C., Cheong, F. C., Sow, C. H., Rao, S. V., van Kan, J. A., Teo, E. J., Ansari, K., Watt, F., A progress review of proton beam writing applications in microphotonics. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **231**, 364–371 (2005).
41. Menzel, F., Spemann, D., Lenzner, J., Böhlmann, W., Zimmermann, G., Butz, T., Fabrication of microstructures in III–V semiconductors by proton beam writing. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **267**, 2321–2326 (2009).
42. Scholz, U., Menzel, F., Pluta, M., Grill, W. & Butz, T. Acoustic mode converters micromachined in silicon by proton beam writing. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **269**, 2452–2456 (2011).
43. Larisch, W., Koal, T., Werner, R., Hohlweg, M., Reinert, T., Butz, T., Proton beam writing of microstructures in Agar gel for patterned cell growth. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **269**, 2444–2447 (2011).
44. Ng, C. K. M., Cheng, J. P., Cheng, S. H. & Yu, K. N. Convenient fabrication of three-dimensional cell-culture substrates through introduction of micrometer-size pores on

- polyallyldiglycol carbonate polymer films. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. A Accel. Spectrometers, Detect. Assoc. Equip.* **619**, 401–407 (2010).
45. Ng, C. K. M., Tjhin, V. T., Lin, A. C. C., Cheng, J. P., Cheng, S. H., Yu, K. N., Fabrication of substrates with curvature for cell cultivation by alpha-particle irradiation and chemical etching of PADC films. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **278**, 15–19 (2012).
 46. Menzel, F., Spemann, D. & Butz, T. High-aspect ratio microstructures in p-type GaAs and InP created by proton beam writing. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **269**, 2457–2461 (2011).
 47. Menzel, F., Spemann, D., Koal, T. & Butz, T. 3D-structures with arbitrary shapes created in negative resists by grayscale proton beam writing. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **269**, 2427–2430 (2011).
 48. Menzel, F., Spemann, D., Petriconi, S., Lenzner, J. & Butz, T. Proton beam writing of submicrometer structures at LIPSION. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **260**, 419–425 (2007).
 49. Furuta, Y., Nishikawa, H., Satoh, T., Ishii, Y., Kamiya, T., Nakao, R., Uchida, S., Applications of microstructures fabricated by proton beam writing to electric-micro filters. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **267**, 2285–2288 (2009).
 50. Llabador, Y. & Moretto, P. *Applications of Nuclear Microprobes in the Life Science*. (World Scientific Publishing, 1998).
 51. Wang, Y. & Nastasi, M. A. *Handbook of modern ion beam materials analysis*. (Materials Research Society, 2009).
 52. Chu, W. K., Mayer, J. W. & Nicolet, M. A. *Backscattering Spectrometry*. (Academic Press, 1978).
 53. Luce, F. P. Estabilidade de nanopartículas em sílica: efeitos térmicos e de irradiação com elétrons e íons energéticos. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.
 54. Calcagno, L. & Foti, G., Ion irradiation of polymers. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **59-60**, 1153–1158 (1991).
 55. Klaumünzer, S., Zhu, Q. Q., Schnabel, W. & Schumacher, G. Ion-beam-induced crosslinking of polystyrene — still an unsolved puzzle. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **116**, 154–158 (1996).
 56. Calcagno, L., Compagnini, G. & Foti, G. Structural modification of polymer films by ion irradiation. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **65**, 413–422 (1992).

57. Vacik, J., Havranek, V., Hnatowicz, V., Horak, P., Fink, P., Apel, P., Study of ion tracks by micro-probe ion energy loss spectroscopy. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* 10–13 (2014). doi:10.1016/j.nimb.2014.02.084
58. Davenas, J., Stevenson, I., Celette, N., Cambon, S., Gardette, J. L., Rivaton, A., Vignoud, L., Stability of polymers under ionising radiation: The many faces of radiation interactions with polymers. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **191**, 653–661 (2002).
59. Davenas, J., Xu, X. L., Boiteux, G. & Sage, D. Relation between structure and electronic properties of ion irradiated polymers. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **39**, 754–763 (1989).
60. Venkatesan, T. High energy ion beam modification of polymer films. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **7-8**, 461–467 (1985).
61. Papaléo, R. M. Estudo das Modificações Induzidas na Estrutura Química e nas Propriedades Físicas do Poli(etileno tereftalato) (PET) por Bombardeamento Iônico. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1990.
62. De Souza, C. T. MICROESTRUTURAÇÃO DE MEMBRANAS DE POLI(TEREFTALATO DE ETILENO) POR MICROFEIXE. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.
63. Johnson, R. E. & Brown, W. L. Electronic Mechanisms for Sputtering of Condensed-Gas Solids by Energetic Ions. **198**, 103–118 (1982).
64. De Souza, C. T. Formação de Nanoporos em Folhas de Policarbonato Pelo Método de Track-Etching. Dissertação de Mestrado, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2009.
65. Halpern, B. S., Walbridge, S., Selkoe, K. A., Kappel, C. V., Micheli, F., D'Agrosa, C., Bruno, J. F., Casey, K. S., Ebert, C., Fox, H. E., Fujita, R., Heinemann, D., Lenihan, H. S., Madin, E. M. P., Perry, M. T., Selig, E. R., Spalding, M., Steneck, R., Watson, R., A global map of human impact on marine ecosystems. *Science* 319, 948–52 (2008).
66. Sindermann, C. J. *Ocean Pollution: Effects on Living Resources and Humans*. (CRC Press, 1995). at
http://books.google.com.br/books?id=Q0HRu_HP3PIC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
67. Lam, P. K. S. Use of biomarkers in environmental monitoring. *Ocean Coast. Manag.* **52**, 348–354 (2009).
68. Van der Oost, R., Beyer, J. & Vermeulen, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **13**, 57–149 (2003).

69. Da Rocha, M. L. C. F. Indicadores ecológicos e biomarcadores de contaminação ambiental na ictiofauna da baía de Santos e do canal de Bertiooga. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 2009.
70. Fishbase. at <www.fishbase.org>, acessado em 30/04/2014
71. Au, D. W. T. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Mar. Pollut. Bull.* **48**, 817–34 (2004).
72. Leknes, I. L. Melano-macrophage centres and endocytic cells in kidney and spleen of pearl gouramy and platyfish (Anabantidae, Poeciliidae: Teleostei). *Acta Histochem.* **109**, 164–8 (2007).
73. Saunders, H. L., Oko, A. L., Scott, A. N., Fan, C. W. & Magor, B. G. The cellular context of AID expressing cells in fish lymphoid tissues. *Dev. Comp. Immunol.* **34**, 669–76 (2010).
74. Mistry, P., Gomez-Morilla, I., Grime, G. W., Webb, R., Jeynes, C., Gwilliam, R., Cansell, A., Merchant, M., Kirkby, K. J., New developments on the Surrey microbeam applications to lithography. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **231**, 428–432 (2005).
75. Mistry, P., Gomez-Morilla, I., Grime, G.W., Webb, R.P., Gwilliam, R., Cansell, A., Merchant, M., Kirkby, K.J., Teo, E.J., Breese, M.B.H., Bettiol, A.A., Blackwood, D.J., Watt, F., New developments in the applications of proton beam writing. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **237**, 188–192 (2005).
76. Bettiol, A. A., Rao, V. S., Sum, T. C., van Kan, J. A. & Watt, F., Fabrication of optical waveguides using proton beam writing. *J. Cryst. Growth* **288**, 209–212 (2006).
77. Johansson, S. A. E., Campbell, J. L. & Malmqvist, K. G. *Particle-Induced X-Ray Emission Spectrometry (PIXE)*. (John Wiley & Sons, 1995).
78. Access Science. at <http://www.accessscience.com/>, acessado em 30/04/2014
79. Bench, G., Saint, A., Legge, G. J. F. & Cholewa, M. Applications of energy loss contrast STIM. **77**, 175–183 (1993).
80. Pallon, J., Auzelyte, V., Elfman, M., Garmer, M., Kristiansson, P., Malmqvist, K., Nilsson, C., Shariff, A., Wegdén, M., An off-axis STIM procedure for precise mass determination and imaging. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **219-220**, 988–993 (2004).
81. Aguer, P., Alves, L.C., Barberet, Ph., Gontier, E., Incerti, S., Michelet-Habchi, C., Kertész, Zs., Kiss, A.Z., Moretto, P., Pallon, J., Pinheiro, T., Surlève-Bazeille, J.E., Szikszai, Z., Verissimo, A., Ynsa, M.D., Skin morphology and layer identification using different STIM geometries. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **231**, 292–299 (2005).

82. ImageJ. at <<http://imagej.nih.gov/ij/>>, acessado em 30/04/2014
83. Phillips, G. W. & Marlow, K. W. Automatic analysis of gamma-ray spectra from germanium detectors.pdf. *Nucl. Instruments Methods Phys.* **137**, 525–536 (1976).
84. Ziegler, J. F. SRIM & TRIM. at <<http://www.srim.org/>>, acessado em 30/04/2014