Técnicas de análises de superfícies

Propriedades físicas: morfologia, rugosidade

<u>Propriedades químicas</u>: hidrofilicidade, composição química, orientação molecular

Qual a origem das propriedades de superfícies?
A somatória de forças interatômicas, intermoleculares da matéria em um dado meio

Propriedades da superfície não necessariamente são as mesmas do "bulk"

Morfologia Rugosidade

Microscopias

Microscopia óptica (MO) Filmes ou soluções concentradas transparentes Limite de resolução ~ 200 nm (luz visível 400 nm a 700 nm)

MO de papel higiênico (fibras de celulose)

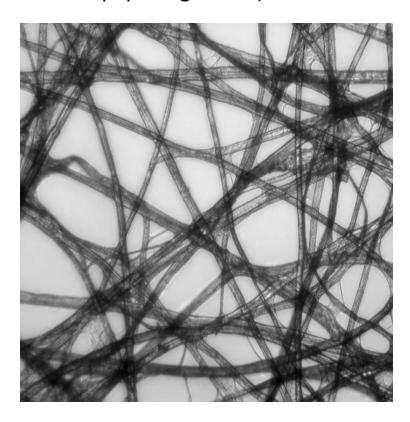


Imagem de campo claro:
a luz vem de baixo da amostra e a imagem é observada por cima



MO de papel higiênico (fibras de celulose)

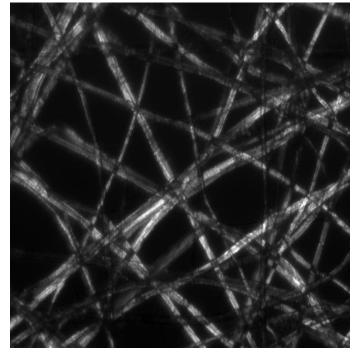
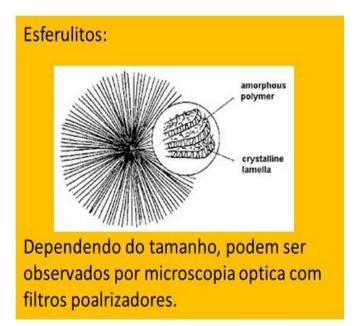
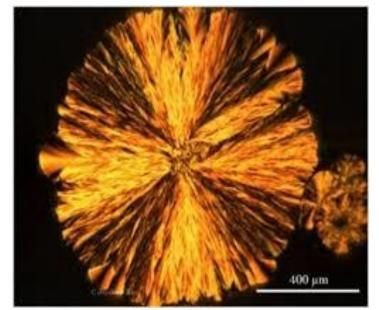


Imagem com luz polarizada: Contraste na imagem é originado da rotação da luz polarizada causada pela amostra.







Cruz de Malta

MO de papel higiênico (fibras de celulose)

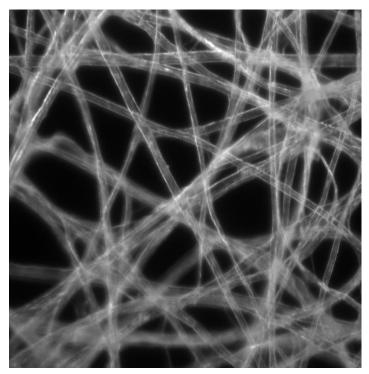


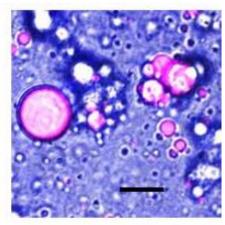
Imagem de campo escuro: A imagem é formada somente pela luz espalhada pela amostra.



Microscópio confocal com fluorescência (confocal laser scanning microscopy, CLSM).

Melhoria feita no MO:

Um pinhole foi montado no plano confocal das lentes para eliminar a luz fora de foco. Desta forma é possível obter imagens com diferentes profundidades de foco por vez; a reconstrução das diferentes imagens obtidas gera uma imagem 3D. Se os componentes da amostra puderem ser corados com diferentes corantes fluorescentes, é possível determinar a localização espacial de cada componente na amostra.



10 μm

Emulsão O/W estabilizada por nanocristais de celulose Celulose marcada com calcoflúor Gotas de óleo marcadas com vermelho do Nilo

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) Scanning electron microscopy (SEM)

O microscópio eletrônico (ME) tem resolução muito maior que a microscopia óptica (MO) porque a radiação incidente tem comprimento de onda (λ) muito menor.

 $MO \rightarrow \lambda$ faixa do visível

ME \rightarrow de Brooglie $\lambda = \frac{hc}{E}$, onde h é a constante de Planck, c é a velocidade da luz no vácuo e E é a energia do fóton

$$h = 6,62 \text{ x } 10^{-34} \text{ J.s}$$

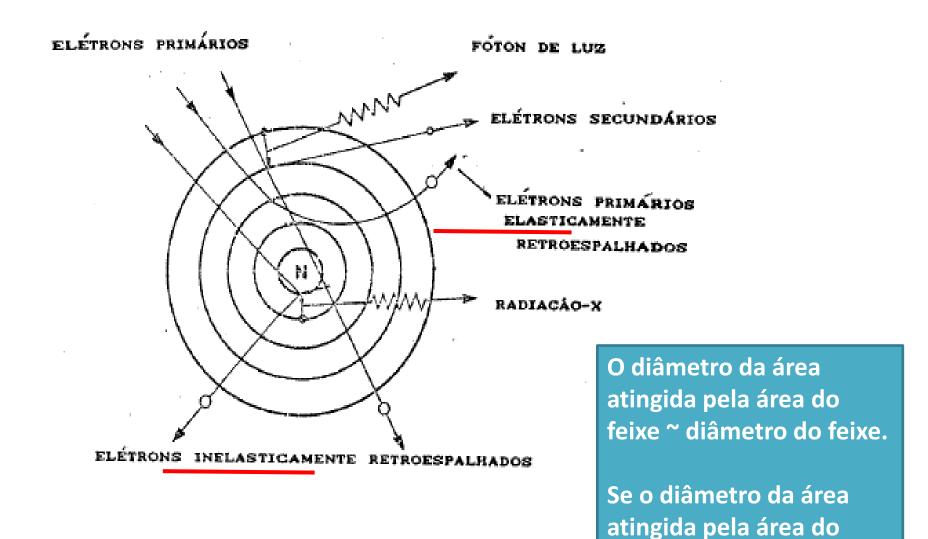
 $c = 3 \text{ x } 10^8 \text{ m/s}$
 $E = 1 \text{eV} = 1,6 \text{ x } 10^{-19} \text{ J}$

Um MEV comum pode operar com até 35 kV



 $\lambda = 0.36 \text{ Å}$

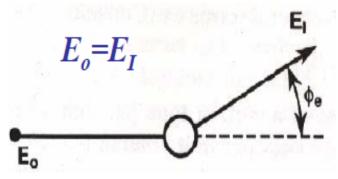
Interação entre feixe de elétrons e amostra

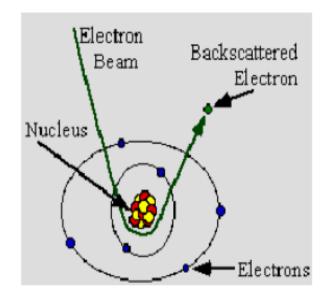


feixe ≠ diâmetro do feixe

→ espalhamento

In **elastic scattering**, the electron trajectory changes, but its kinetic energy and velocity remain essentially constant (due to large differences between the mass of the electron and nucleus). This process is known as electron backscattering (although later we will confine the term "**backscattered electrons**" to those scatter out of the sample).

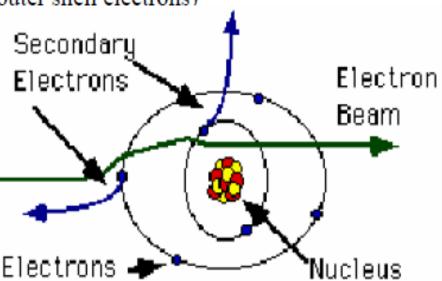


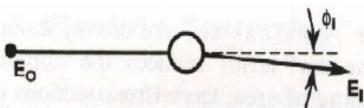


Backscattered electrons = elétrons retroespalhados

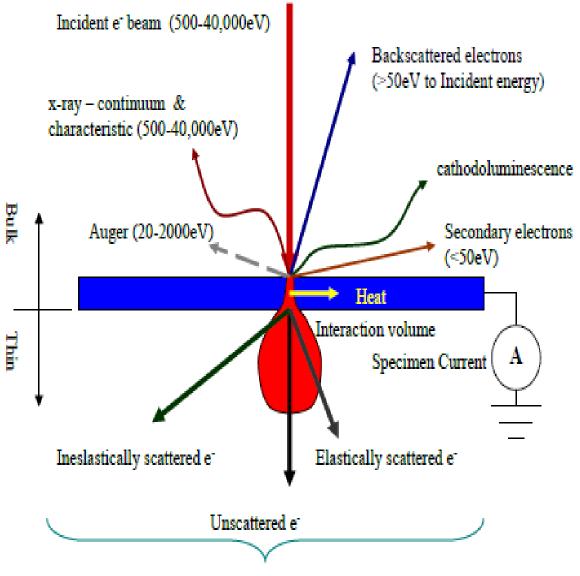
In inelastic scattering, the trajectory of the incident electron is only slightly perturbed, but energy is lost through interactions with the orbital electrons of the atoms in the specimen. Inelastic interactions produce diverse effect including:

- Secondary electrons
- phonon excitation (heating)
- •cathodoluminescence (visible light fluorescence)
- continuum radiation (bremsstrahlung or "braking" radiation)
- characteristic x-ray radiation
- plasmon production (secondary electrons)
- Auger electron production (ejection of outer shell electrons)





 $E_o > E_I$



Transmitted Electrons

Volume of Excitation

The size and shape of the interaction volume is limited by two factors:

- (1) energy loss through inelastic interactions
- (2) electron loss or backscattering through elastic interactions.

The resulting excitation volume is a hemispherical to jug-shaped region with the neck of jug at the specimen surface.

The depth of electron penetration of an electron beam and the volume of sample with which it interacts are a function of its <u>angle of incidence</u>, the magnitude of its <u>current</u>, the <u>accelerating voltage</u>, and the <u>average</u> atomic number (Z) of the sample.

Electron penetration generally ranges from 1-5 μ m with the beam incident perpendicular to the sample. The *depth of electron penetration* (x) is approximately (Potts, 1987, p.336):

The *width of the excited volume* (*y*) can be approximated by (Potts, 1987, p. 37):

Better results are obtained using Monte Carlo approximations

$$x (\mu m) = \frac{0.1 E_e^{1.5}}{\rho}$$

where E_o = accelerating voltage (keV), and ρ = density (g/cm³)

$$y (\mu m) = \frac{0.077 E_o^{1.5}}{\rho}$$

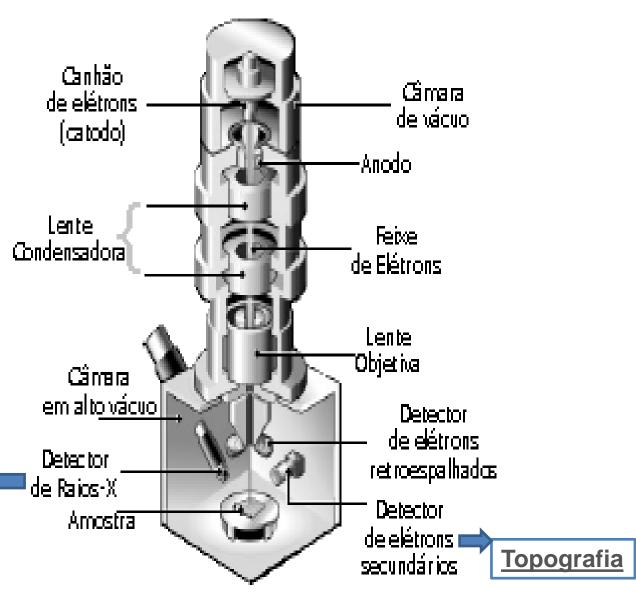
where E_o = accelerating voltage (keV), and ρ = density (g/cm³)

Fonte de radiação:

Filamento de tungstênio ou (it has the highest melting point and lowest vapor pressure of all metals, low cost.)

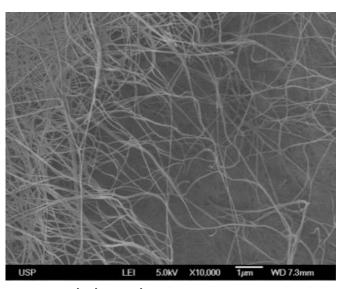
Monocristal de hexaboreto de lantânio (LaB₆) - Indicado para "field emission gun" (FEG)

Espectroscopia por Dispersão de Energia de Raios X (EDS):
Composição química

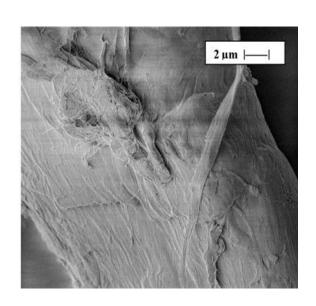


Preparo de amostras para MEV

- 1) Secar ou liofilizar as amostras para garantir que não vai contaminar o canhão de elétrons
- 2) Fraturar ou criofraturar a amostra, se quiser analisar a estrutura interna do material. Criofratura é a fratura do material imerso em N₂ líquido
- 3) Recobrir com uma camada de material condutor, se o material for isolante (todos polissacarídeos são isolantes). Geralmente através da evaporação de Au ou Pt ou "Sputtering" (com Au ou Pt).



Celulose bacteriana



Celulose de algodão

Gaseous SEM (Environmental SEM)

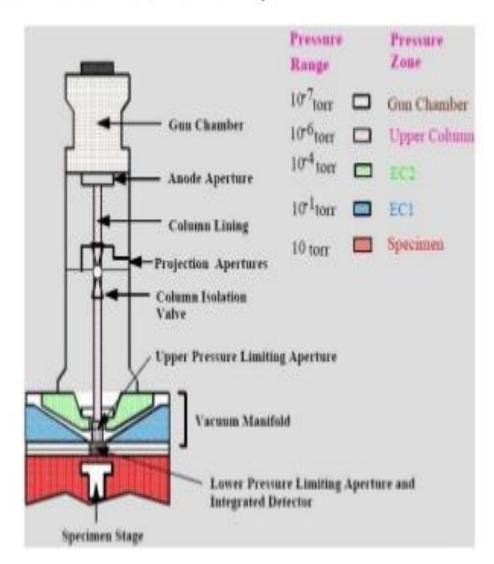
Works in:

- Air
- Low Vacuum
- High Pressure
- Variable Pressure

Gases Used Include:

- N₂
- · 0,
- Ar, He, H₂O...

http://www.phy.cam.ac.uk/research/research -groups-images/bss/images/esem.jpg



Microscopia eletrônica de transmissão (MET) transmission electron microscopy (TEM)

ME \Rightarrow de Brooglie $\lambda = \frac{hc}{E}$, onde h é a constante de Planck, c é a velocidade da luz no vácuo e E é a energia do fóton

$$h = 6,62 \text{ x } 10^{-34} \text{ J.s}$$

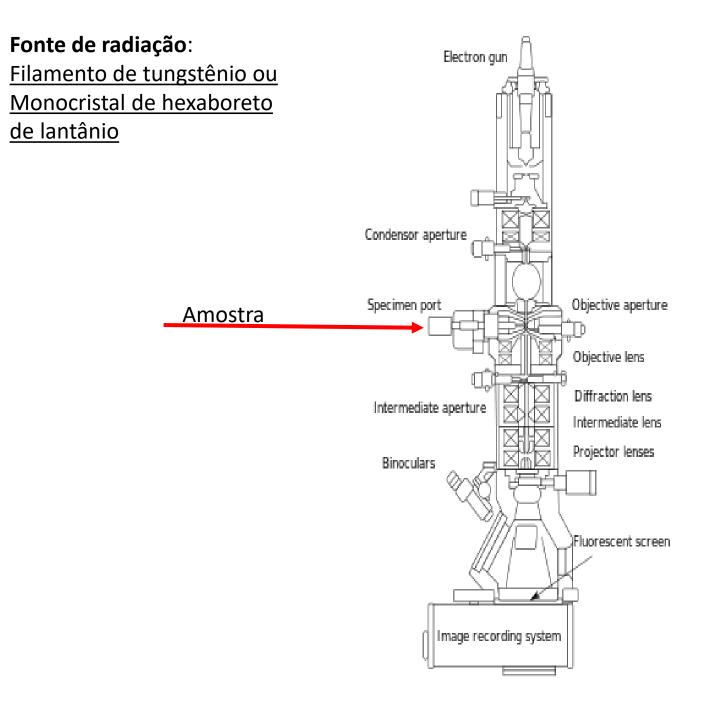
 $c = 3 \text{ x } 10^8 \text{ m/s}$
 $E = 1 \text{eV} = 1,6 \text{ x } 10^{-19} \text{ J}$



Um MET operando com 100 kV

$$\lambda = 0.097 \, \text{Å}$$

O feixe <u>atravessa</u> fatias muito finas (~ 100 nm de espessura) da amostra. A interação entre o feixe e a amostra permite conhecer a morfologia e composição elementar da amostra.



As diferenças de <u>espessura</u>, <u>densidade e número atômico (Z)</u> da amostra são responsáveis pelas regiões claras e escuras da imagem formada.

Quando o feixe atravessa a amostra alguns elétrons são espalhados elasticamente, outros inelasticamente e outros são transmitidos.

O diafragma da objetiva elimina os elétrons espalhados elasticamente, deixando passar somente os não espalhados e os inelásticos.

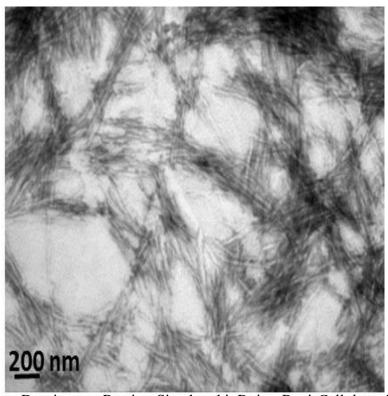
Amostras composta por átomos de Z alto, geram imagens com alto contraste devido ao forte espalhamento e pouca perda de energia. Amostras compostas por átomos de Z baixo, como polímeros, espalham muito pouco e, por isso, geram imagens com baixo contraste.

Preparo de amostra:

(Crio)ultramicrótomo para cortar fatias muito finas Coramento com OsO₄ ou RuO₄, no caso de polímeros



Nanocristais de celulose (eucalipto) corados com RuO₄



Domingues, Pereira, Sierakowki, Rojas, Petri Cellulose, 2016

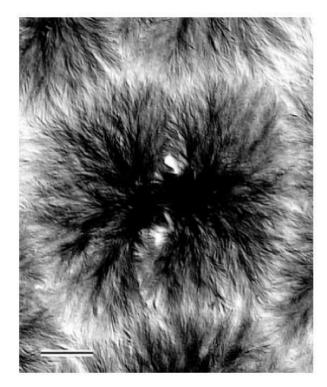
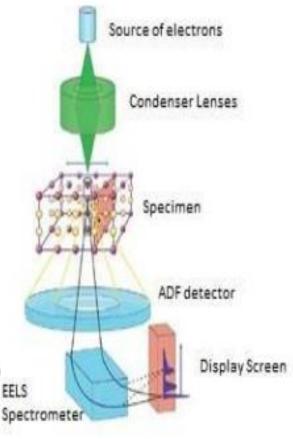


Figure 5.30. Electron micrography of a polyethylene spherulite at the beginning of growth. [Courtesy of B. Lotz, ICS-CNRS, Strasbourg (France).]

Quando há um espectrômetro que analisa a pedra de energia de elétrons (EELS) integrado à coluna óptica, os elétrons inelásticos que atravessam a amostra podem ser classificados com respeito às energias características de cada elemento da amostra. **EELS = electron energy loss spectroscopy**

Magnetic Spectrometer

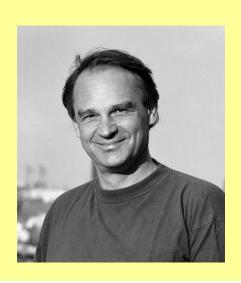
- Discriminates the energy loss electrons on the basis of their absolute energy.
- The signal from the electron energy loss spectrometer can be used to generate an EELS spectrum
- The spectrometer can be used to produce a compositional map

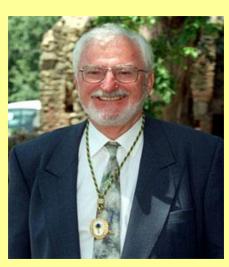


Microscópio de varredura de tunelamento (STM), 1981: o equipamento permitiu medir a corrente de tunelamento entre uma ponta de tungstênio e uma <u>superfície condutora</u>

1986 – Prêmio Nobel de Física Professor. Ernst Ruska, Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft, Berlin - TEM

Dr **Gerd Binnig** and Dr **Heinrich Rohrer**, IBM Research Laboratory, Zurich, Switzerland - **STM**





http://nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1986/binnig-lecture.pdf

STM → corrente de tunelamento AFM → forças de interação entre ponta e amostra

Microscopia eletrônica de varredura mostra vales e topos, mas não quantifica e ainda tem que recobrir com camada condutora Microscopia confocal, depende muito da amostra e difícil de quantificar

AFM surgiu como uma ferramenta para quantificar a topografia na amostra "in natura"

**Materiais não condutores (polímeros, proteínas, partículas virais, bactérias, DNA)



Tipo de interação	Potencial x Distância	Energia típica (kJ/mol)
Íon – íon	$\frac{(ze)_1(ze)_2}{4\pi\varepsilon(x)}$	250
Íon-dipolo permanente	$\frac{(ze)_1\mu_2\cos\theta}{4\pi\varepsilon(x^2)}$	15
Dipolo perman dipolo permanente (Keesom)	$-\frac{2(ze)_{1}\mu_{2}\cos\theta}{3(4\pi\varepsilon_{0})^{2}k_{B}\sqrt{x^{6}}}$	2
Dipolo perman dipolo induzido (Debye)	$-\frac{(\alpha_{01}\mu_{2}^{2}+\alpha_{02}\mu_{1}^{2})}{(4\pi\epsilon_{0})(x^{6})}$	2
Dipolo induzido -dipolo induzido (London)	$\frac{3h}{2} \frac{v_{1}v_{2}}{(v_{1}+v_{2})} \frac{(\alpha_{01}\alpha_{02})}{(4\pi\varepsilon_{0})(x^{6})}$	1 a 2

Forças de van der Waals

Ligações de H: ~20 kJ/mol

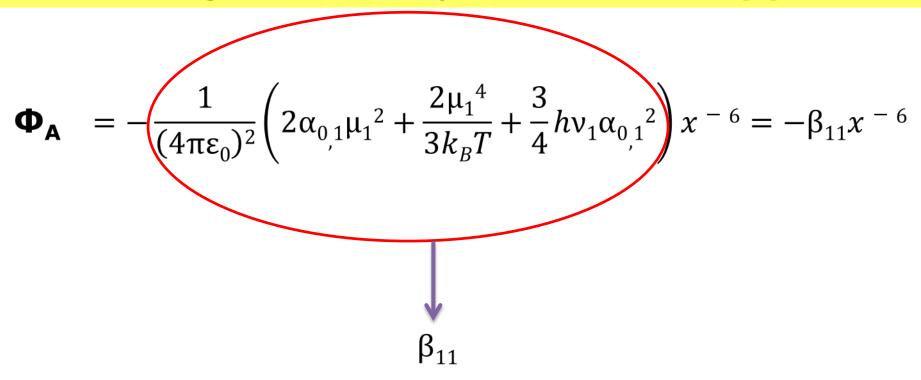
FORÇAS DE VAN DER WAALS

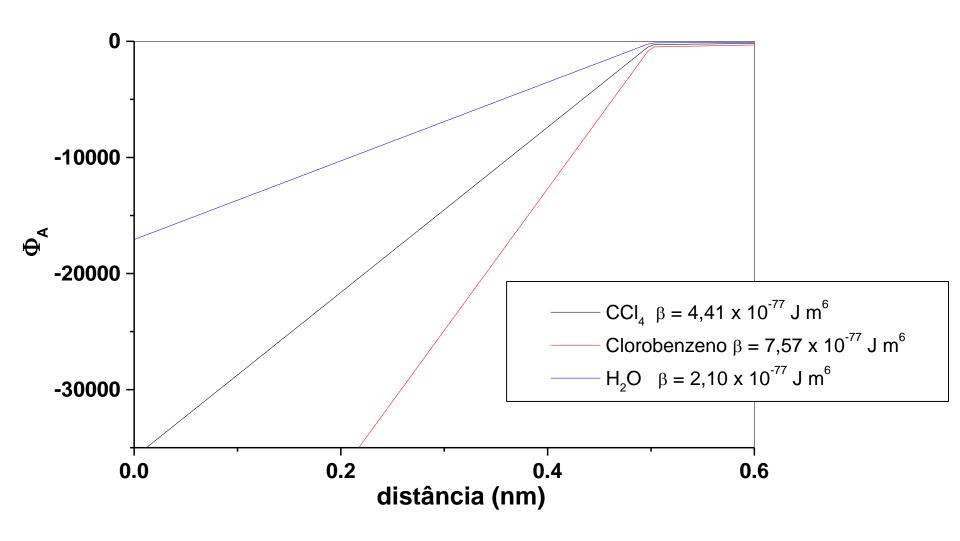
- SÃO INTERAÇÕES ENTRE DIPOLO-DIPOLO OU DIPOLO-DIPOLO INDUZIDO QUE GOVERNAM PROPRIEDADES MACROSCÓPICAS DA MATÉRIA (KEESOM + DEBYE + LONDON);
- SÃO SEMPRE INTERAÇÕES ATRATIVAS;
- -SÃO DE LONGO ALCANCE (DE 0,2 NM A 10 NM);
- -ESPECIAMENTE IMORTANTES PARA MOLÉCULAS ORGÂNICAS.

Implicações macroscópicas:

- -Calor de vaporização de líquidos
- -Viscosidade
- -Coesão ou adesão
- -Auto-associação
- -Estabilidade coloidal

Para calcular como varia o potencial de atração de van der Waals (Φ_A) com a distância entre 2 moléculas iguais em função da distância (x):



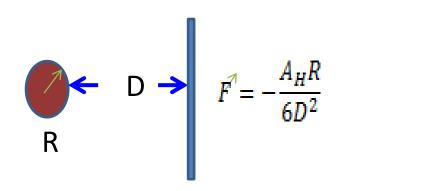


Forças de van der Waals entre 2 sólidos macroscópicos

$$F = -\frac{A_H}{6D^2} \cdot \frac{R_1 R_2}{R_1 + R_2}$$

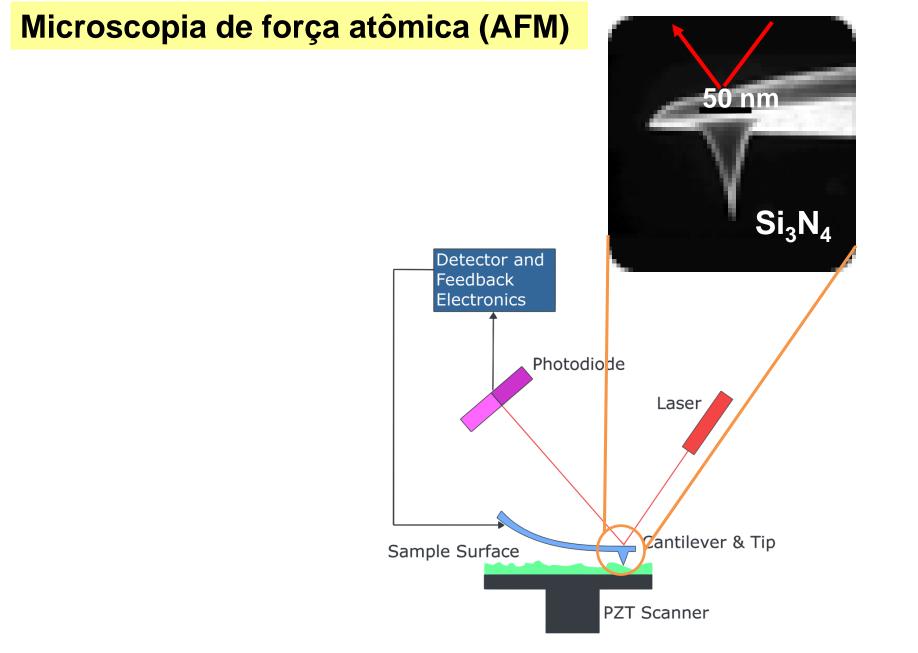
$$R_2$$

Constante de Hamaker



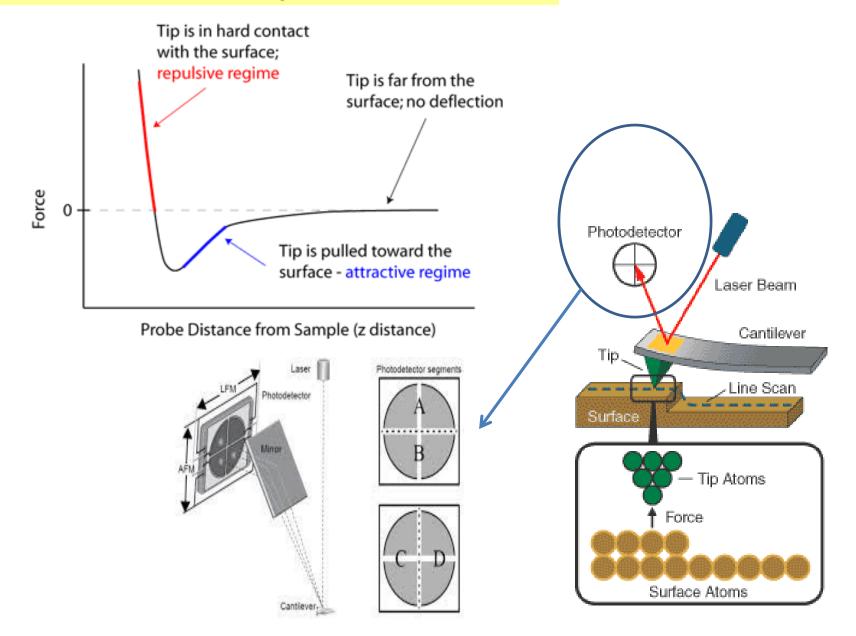
 $\sim 10^{-20} \, \mathrm{J}$

$$A_H = \pi^2 \beta_{12} \rho_1 \rho_2$$

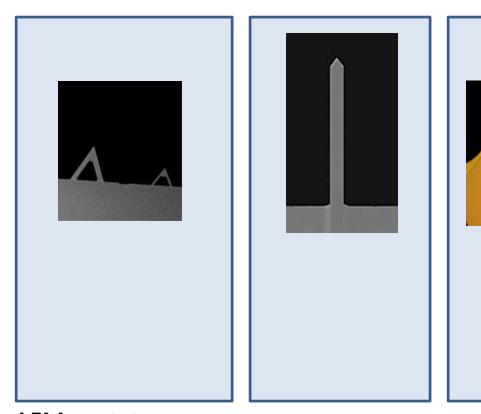


Referência: Hermann et al. Polímeros: Ciência e Tecnologia - Out/Dez - 97, pag. 51-61

Microscopia de força atômica (AFM)



Tipos de cantileveres comuns



AFM contato AFM não contato AFM colloidal probe

AFM contato intermitente

AFM colloidal probe Sensores nanomecânicos



Forças de adesão Condutividade elétrica ou magnética

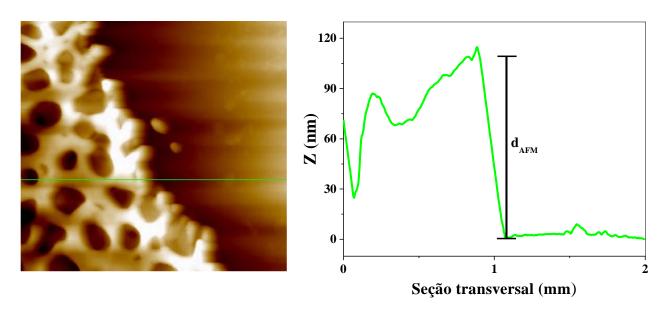


Figura 4. Ilustração da determinação da espessura dos filmes por AFM através da medição da distância pico-vale em uma micrografia (2x2) μm² obtida de um filme de éster de celulose *Tese de Doutorado de Leandro S. Blachechen, IQUSP, 2014*

In situ observation of streptavidin-biotin binding on an immunoassay well surface using an atomic force microscope

S. Allen^{a,*}, J. Davies^b, A.C. Dawkes^b, M.C. Davies^a, J.C. Edwards^b, M.C. Parker^a, C.J. Roberts^a, J. Sefton^b, S.J.B. Tendler^a, P.M. Williams^a

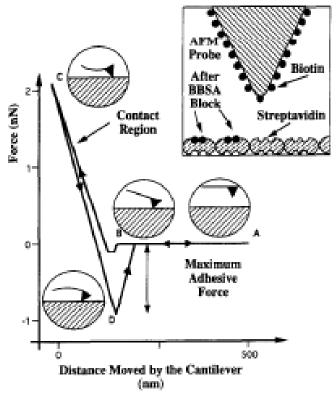
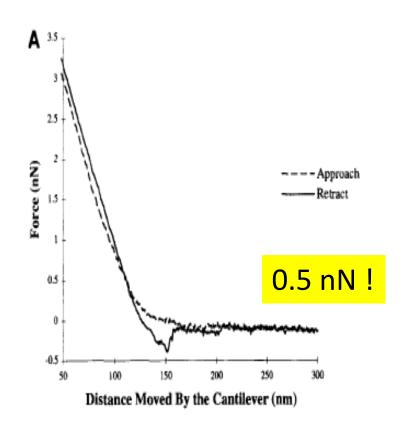


Fig. 1. (Main diagram) A schematic diagram of a typical force measurement cycle. The relative position of the AFM probe to the

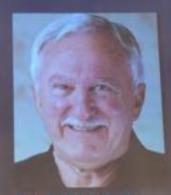


Nobelpriset i kemi 2015





Tomas Lindahl
Francis Crick Institute and
Clare Hall Laboratory,
Hertfordshire, UK



Paul Modrich
Howard Hughes Medical
Institute and Duke University
School of Medicine, Durham,
NC, USA



Aziz Sancar University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA

"för mekanistiska studier av DNA-reparation" "for mechanistic studies of DNA repair"

6 Kungl Vetenska

Review

Dano e reparo de DNA

Molecular Bengantion

Received: 17 June 2013.

Revised: 14 August 2013,

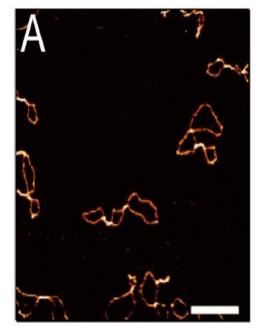
Accepted: 15 August 2013,

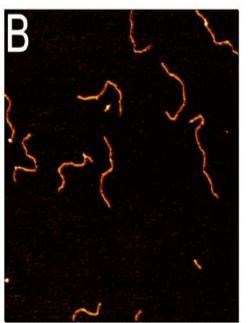
Published online in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com) DOI: 10:1002/jmr.2311

DNA substrate preparation for atomic force microscopy studies of protein–DNA interactions

Claudia N. Buechner and Ingrid Tessmer*





Plasmídeos de DNA circulares e lineares

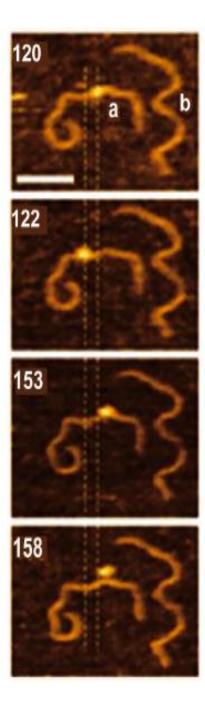
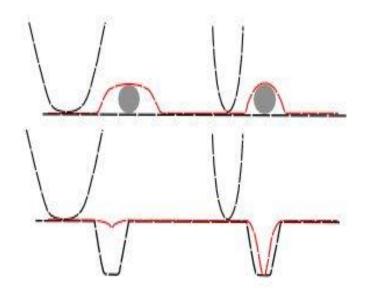


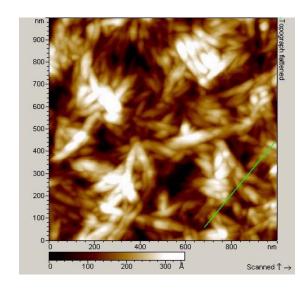
Figure 4. Atomic force microscopy time lapse series showing two DNA fragments, (a) and (b) and a single molecule of cytosine deaminase sliding on a ssDNA gap region within one of the dsDNA fragments (Shlyakhtenko et al., 2012a). The location of the gap in the DNA is indicated by the dashed lines. The protein dissociates upon reaching the single stranded/double stranded DNA junction. The numbers in the images indicate the frame number of the time series, collected with a time resolution of 720 ms/frame.

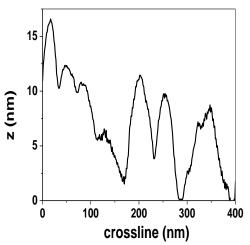
Efeitos de convolução da ponta na largura dos objetos



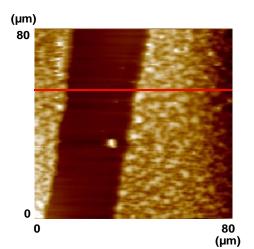
A altura ou profundidade são informações confiáveis, a largura não

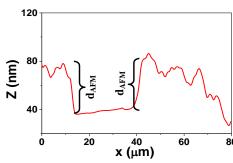
Para corrigir precisa conhecer o raio da ponta





Espessura dos nanocristais de celulose





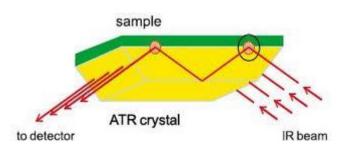
Espessura de filme de acetato propionato de celulose (CAP)

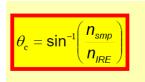
Composição química Orientação molecular

Técnicas espectroscópicas

Espectroscopia na região do infravermelho – métodos de refletância

Refletância total atenuada (ATR)





Cristal de Ge n_{IRE} = 4.0 (1000 cm⁻¹)

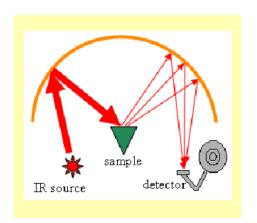
Depth of penetration (pathlength) of the infrared beam into the sample **depends on** λ , $n_{\rm smp}$, $n_{\rm IRE}$, θ

$$dp = \frac{\lambda}{2 \pi n_{\text{IRE}} \sqrt{\sin^2 \theta - (n_{\text{smp}}/n_{\text{IRE}})^2}} \qquad d_P$$

 d_p typically < 10 μ m

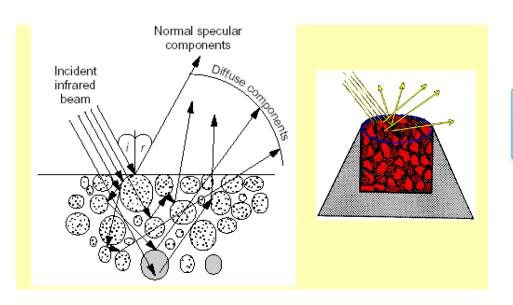
Informação de composição química com alguns (até 100 µm) de profundidade

<u>Espectroscopia na região do infravermelho – métodos de refletância</u> <u>Refletância difusa (DRIFT) para pós e superfícies rugosas</u>



*DRIFT (Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform): energia retroespalhada a altos ângulos

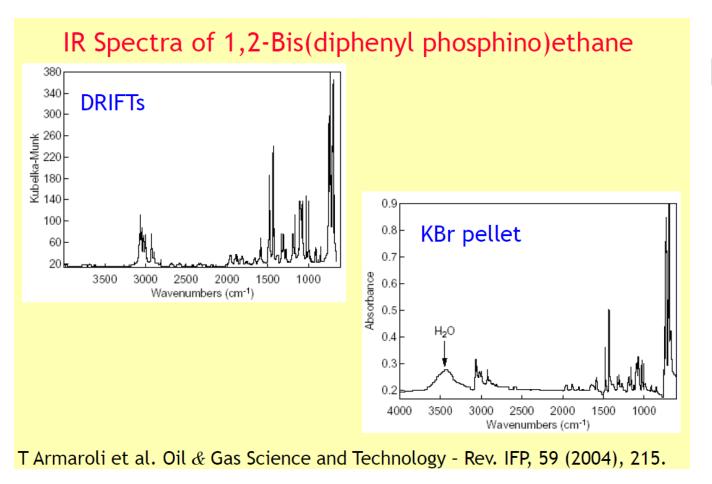
<u>Variáveis importantes</u>: índice de refração da amostra, homogeneidade no tamanho das partículas, superfície das partículas (lisa ou rugosa)



Informação de composição química com alguns µm de profundidade

Espectroscopia na região do infravermelho – métodos de refletância

Refletância difusa (DRIFT) para pós e superfícies rugosas



Espectroscopia Raman ou Espalhamento Raman

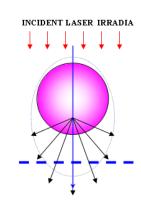
Quando uma radiação interage com a matéria, parte da radiação será espalhada.

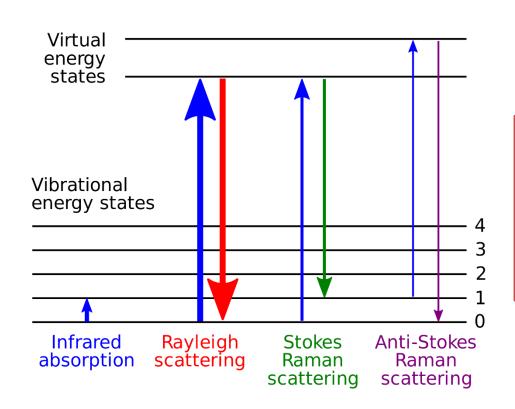
Espalhamanto elástico (Rayleigh): $v_{inc} = v_{espalhada}$

Espalhamanto inelástico (Raman):

 $\underline{Stokes} \ v_{inc} > v_{stokes}$

<u>Anti- Stokes</u> $v_{inc} < v_{anti-stokes}$

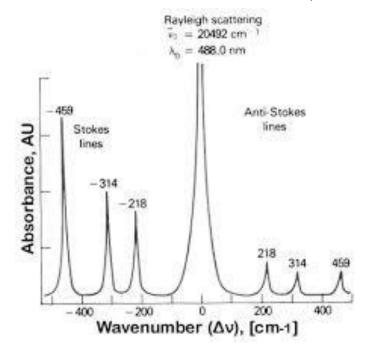




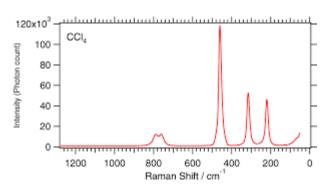
A radiação incidente causa excitação a um extado excitado virtual, subsequentemente ocorre a re-emisão de um fóton de energia igual (Rayleigh), de energia menor (Stokes) ou de energia maior (Anti-Stokes)

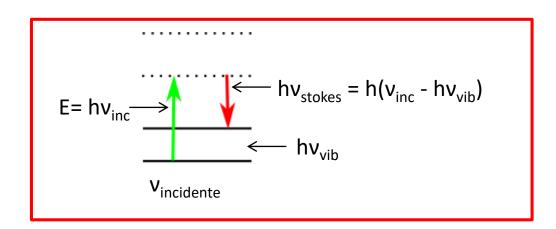
Espectroscopia Raman ou Espalhamento Raman

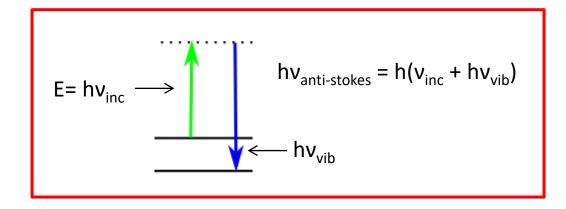
Excitação com laser de Ar - CCl₄



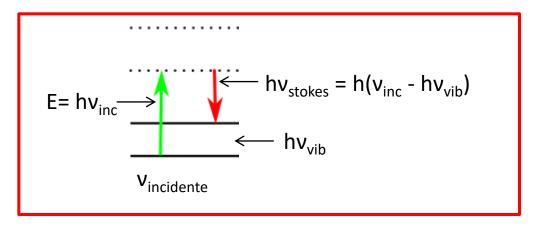
Deslocamento Raman, cm⁻¹

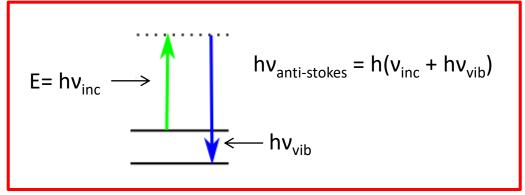






Anti-stokes são de intensidade menor, por isso muitas vezes são mostradas somente as stokes



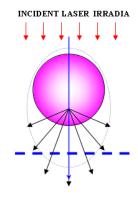


Δν corresponde à frequência de vibração dos átomos presentes na amostra.



Informação sobre a geometria molecular, sobre como as espécies químicas presentes interagem entre si e com o ambiente.

Condição para ocorrer espalhamento Raman: As moléculas devem ser polarizáveis $(\partial \alpha / \partial r) \neq 0$





Campo elétrico

Polarizabilidade da ligação

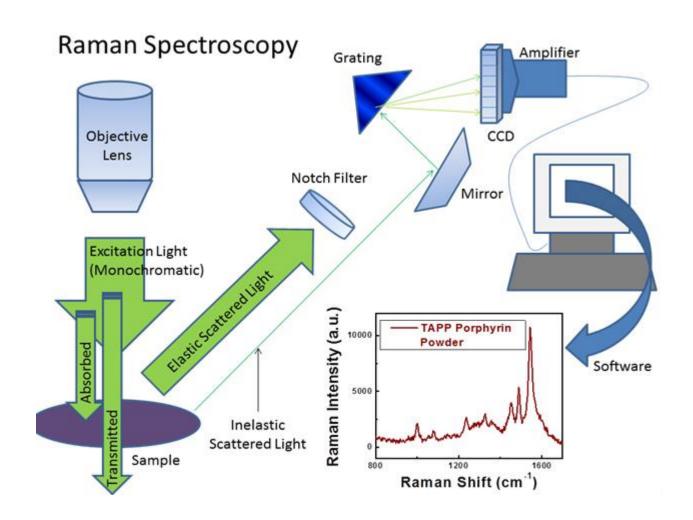
Momento dipolar

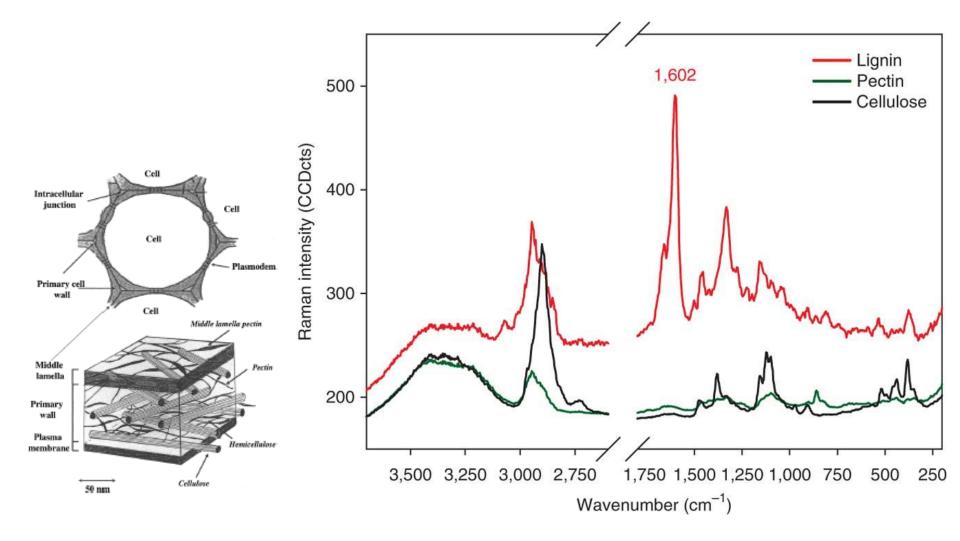
$$\alpha = \alpha_0 + (r-r_{eq}) (\partial \alpha / \partial r)$$

$$(r-r_{eq}) = r_{max} \cos(2\pi v_{vib}t)$$

$$M = \alpha_0 E_0 \cos (2\pi v_{inc}t) + \alpha_0 (E_0/2) r_{max} (\partial \alpha / \partial r) \cos [2\pi (v_{inc}-v_{vib})t] + \frac{\text{Rayleigh}}{\alpha_0 (E_0/2) r_{max} (\partial \alpha / \partial r) \cos [2\pi (v_{inc}-v_{vib})t]} + \frac{\text{Stokes}}{\alpha_0 (E_0/2) r_{max} (\partial \alpha / \partial r) \cos [2\pi (v_{inc}+v_{vib})t]}$$

$$Anti-Stokes$$





IR spectroscopy, the exchange of energy between the molecules and the exciting field is dependent on the presence of an oscillating permanent dipole.

In <u>Raman spectroscopy</u>, in contrast, the exciting field induces a dipole moment in the molecule and the induced moment then becomes the basis for exchange of energy with the exciting field.

Examples:

O₂ and N₂, which are homonuclear and without permanent dipoles, have very intense Raman spectra although they are inactive in infrared absorption

H₂O, with a high permanent dipole moment, is a very strong absorber in the infrared but a very weak Raman scatterer.

Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície (SERS)

Técnica sensitiva de superfície que resulta na ampliação do espalhamento Raman por absorção de moléculas sobre superfície. O fator de amplificação pode ser da ordem de 10¹⁴-10¹⁵, o que permite que a técnica seja suficientemente sensível para detectar moléculas isoladas.

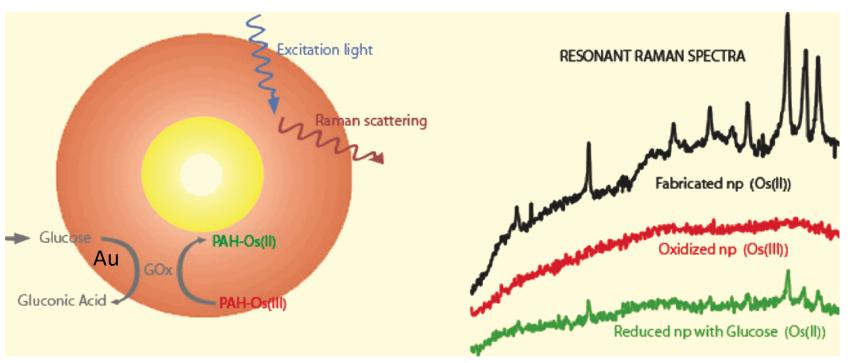
Modelo eletromagnético:

Dipolo elétrico intrínseco da molécula adsorvida induz o surgimento de um dipolo na superfície metálica. A soma vetorial dos dois dipolos gera um dipolo maior quando estiverem orientados perpendicularmente à superfície.

Modelo químico:

As interações entre as moléculas adsorvidas e a superfície metálica leva a mudanças de polarizabilidade, que leva à intensificação do sinal.

Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície (SERS)



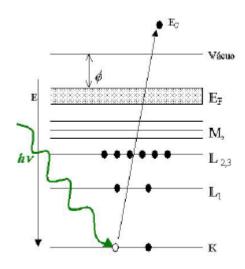
The enzymatic reduction of FAD by glucose and further reduction of the Raman silent Os(III) by FADH₂ yields a characteristic enzyme–substrate calibration curve in the millimolar range.

Wired-Enzyme Core-Shell Au Nanoparticle Biosensor

P. Scodeller, V. Flexer, R. Szamocki, E. J. Calvo, N. Tognalli, H. Troiani, A. Fainstein J. Am. Chem. Soc., 2008, 130 (38), pp 12690–12697

Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS) ou por UV (UPS)

Quando uma superfície é irradiada com raios X de energia hv, fotoelétrons são emitidos com energia cinética dada pela equação 3.2. Para que ocorra a fotoemissão a energia do elétron que será ejetado de um sólido deve ser maior que a barreira de potencial da superfície, que é dada pela função trabalho φ.



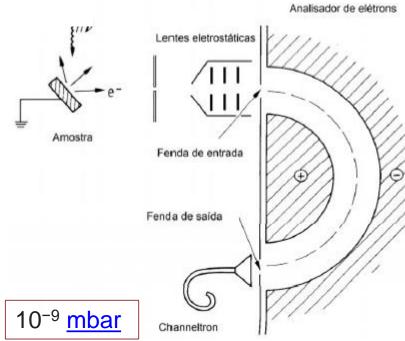
$$E_k = hv - |E_B| - \varphi$$

Ek: energia cinética do fotoelétron;

hu: energia do fóton;

E_B: energia de ligação de um dado nível eletrônico;

φ = função trabalho do material.



ios-X

Composição química quantitativa Níveis eletrônicos Estados de oxidação Profundidade < 6 nm

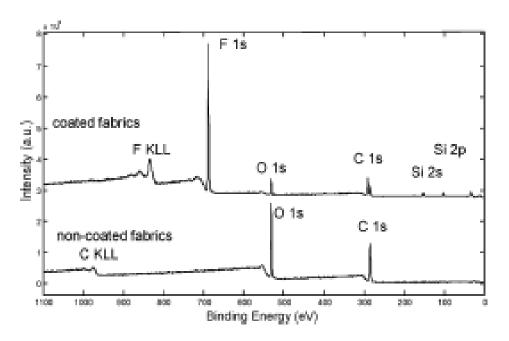


Figure 1: XPS survey spectra obtained on the surface of the non-treated cotton fabrics (lower) and on fabrics treated with fluoro-alkylsilane (upper).

Ma Eriali in tehnologije / Ma Erials and technology 45 (2011) 3, 191-197.

SURFACE CHARACTERIZATION OF POLYMERS BY XPS AND SIMS TECHNIQUES

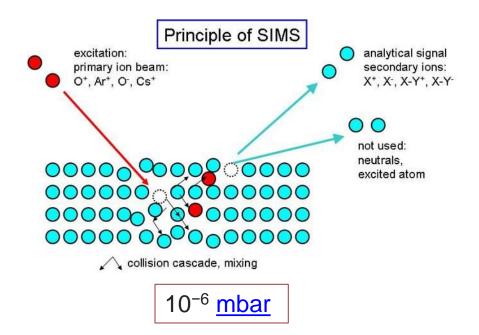
ANALIZA POVRŠINE POLIMEROV Z METODAMA XPS IN SIMS

Janez Kovač

Center of Excellence for Polymer Materials and Technologies, Tehnološki park 24, 1000 Ljubljana, Slovenia. janez.kovao@ijs si

Espectroscopia de massa de íons secundários (secondary ion mass spectroscopy, SIMS)

<u>Princípio</u>: a superfície é bombardeada com um feixe de íons (**1-30 keV**). Da interação deste feixe de íons com a superfície são ejetados íons secundários, que são coletados e analisados. A relação massa/carga destes íons secundários é analisada com um espectrômetro de massa para determinar a composição elementar, isotópica ou molecular da superfície com profundidade típica de 1 a 2 nm. Ultra alto vácuo.



Informação <u>qualitativa sobre</u> <u>composição química</u>, embora análise quantitativa seja possível desde que se use padrões

Espectroscopia de massa de íons secundários (secondary ion mass spectroscopy, SIMS)

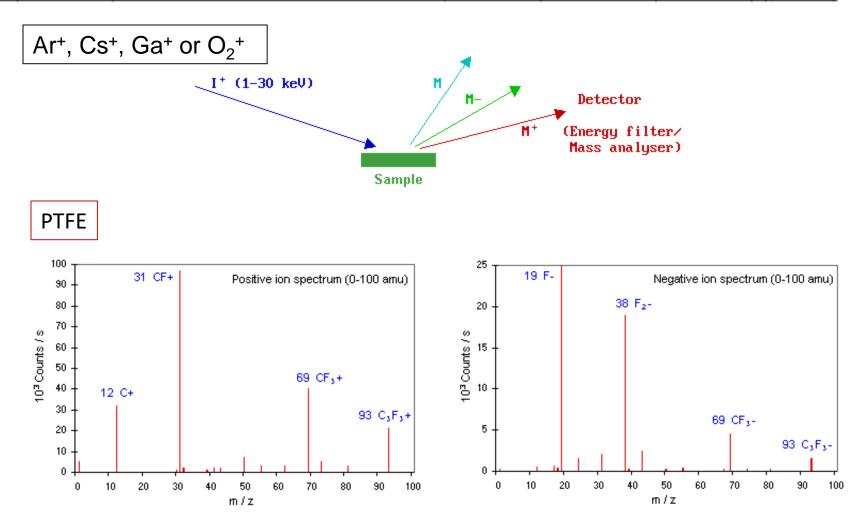


Table 1: Comparison of main features of two surface analytical techniques XPS and SIMS Tabela 1: Primerjava glavnih značilnosti dveh površinsko občutljivih lehnik: XPS in SIMS

Feature	XPS	SIMS
Main information	Elemental composition and type of chemical bonds of surface atoms	Type of atoms, molecules and pendant groups at surface
Surface sensitivity *	From 3–6 nm for polymers	1-2 uppermost monolayers (1 nm)
Sensitivity for elements	All, except H and He	All
Need for ultra-high vacuum ambient	Yes	Yes
Spatial resolution *	1–100 μm	Less than 1 µm
In-depth information for thin films	Yes	Yes
faautoImaging	Limited	Yes with high resolution and sensitivity
3D analysis *	No	Yes with high resolution and sensitivity
Quantification	Yes	Limited
Typical acquisition time for high resolution spectrum	1-3 min	5–15 min
Required expertise for data interpretation	High	High

Ma Eriali in tehnologije / Ma Erials and technology 45 (2011) 3, 191–197.

SURFACE CHARACTERIZATION OF POLYMERS BY XPS AND SIMS TECHNIQUES

ANALIZA POVRŠINE POLIMEROV Z METODAMA XPS IN SIMS

Janez Kovač

Center of Excellence for Polymer Materials and Technologies, Tehnolofiki park 24, 1000 Ljubljana, Slovenia. janez.hovao@ijs si