

Универзитет у Београду

Физички Факултет

Владимир М. Лазовић

**Оптичке и флуоресцентне особине хитина и
хитинских микроструктура биолошког порекла**

Докторска дисертација

Београд, 2022.

University of Belgrade

Faculty of Physics

Vladimir M. Lazović

**Optical and fluorescent properties of chitin and
chitinous structures of biological origins**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022.

Ментор:

Др Дејан Пантелић, научни саветник, Институт за физику, Универзитет у Београду

Чланови комисије:

Проф. др Милорад Кураица, редовни професор, Физички факултет, Универзитет у Београду

Проф. др Братислав Обрадовић, редовни професор, Физички факултет, Универзитет у Београду

Др Бранко Коларић, научни саветник, Институт за физику, Универзитет у Београду

Датум одбране:

Ова докторска дисертација је урађена у Институту за физику, у Центру за фотонику којим руководи др Жељка Никитовић.

Изражавам велику захвалност свом ментору др Дејану Пантелићу, научном саветнику Института за физику, на непосредном руковођењу израде докторске дисертације, као и на изузетно корисним саветима и консултацијама у току писања дисертације. Захваљујем се и др Брани Јеленковићу на корисним саветима.

Захвалност дугујем професорима др Милораду Кураици, др Братиславу Обрадовићу и др Бранку Коларићу на прегледу и оцени ове докторске дисертације.

Највећу захвалност дугујем својој породици на великом разумевању и подршци.

Владимир Лазовић

Оптичке и флуоресцентне особине хитина и хитинских микроструктура биолошког порекла

Резиме

Предмет истраживања ове докторске дисертације су оптичке, флуоресцентне и термалне радијативне особине хитина и хитинских микро и наноструктура биолошког порекла. Хитин је, после целулозе, најзаступљенији полисахарид у природи и добија се прерадом одбачених љуштура морских шкољки и ракова, и има многобројне технолошке примене. Хитин је такође и главни састојак тела инсеката. Поједини делови тела ових инсеката су често структурисани на микро и нано нивоу па се могу анализирати као сложени оптички системи биолошког порекла и приликом интеракције упадне светлости са овим хитинским структурама испољавају се различити физички механизми (интерференција, дифракција, различите врсте расејања светлости) који синергијски дају значајан допринос рефлексији, трансмисији и апсорпцији светлости.

У оквиру ове докторске дисертације експериментално и теоријски су истражене поједине нелинеарне оптичке особине хемијски пречишћеног хитина применом двофотонски побуђене флуоресценције и генерисањем другог хармоника. Ови резултати су употребљени за анализу оптичких и флуоресцентних особина појединих хитинских микро и наноструктура биолошког порекла, и за истраживање контролисане модификације ових особина ласерском радијацијом. Анализиране су и термалне особине природне хитинске микроструктуре.

Добијени резултати су искоришћени за технолошку примену – сложене хитинске наноструктуре су, у изворној и ласерски модификованој форми, употребљене као варијабилни оптички елемент у заштити од фалсификовања докумената, хартија од вредности, новчаница итд. Показана је и примена у ентомологији, за високо-квалитетно површинско и дубинско осликавање делова тела организама који се доминантно састоје од хитина.

Кључне речи: иридесценција, дво-фотонски побуђена флуоресценција, хитин, природне хитинске наноструктуре, ласерска модификација хитинских наноструктура

Научна област: Физика

Ужа научна област: Биофотоника

УДК број:

Optical and fluorescent properties of chitin and chitinous structures of biological origins

Abstract

The main subject of this doctoral thesis are optical, fluorescent and thermal radiative properties of chitin and chitinous micro and nanostructures of biological origins. Chitin is the most prevalent polysaccharide after cellulose and it is made by processing of the dumped seashells and sea crawfish shells, and it has numerous technological applications. Chitin is also a main body ingredient of insects. Some body parts of these insects are often micro and nanostructured so that many of them represent complex optical systems of biological origins and many physical mechanisms (interference, diffraction, different forms of scattering) appear during the interaction of incident light with these chitinous structures. These physical mechanisms act in synergy and have significant contribution to the reflection, transmission and absorption of light.

In this doctoral thesis, nonlinear optical properties (two-photon excited fluorescence, second harmonic generation) of chemically purified chitin powder are experimentally and theoretically investigated. These results are used for the analysis of the optical and fluorescent properties of biological chitinous micro and nanostructures and for the investigation of the controlled modification of these properties by laser irradiation. Thermal properties of natural chitinous microstructure are also analyzed.

Results are used for technological application – complex chitinous nanostructures are used, in natural and laser-modified form, for variable optical element whose optical and fluorescent properties have central spot in its function, which is prevention of counterfeiting of documents, stocks, paper money etc. Additional application, in entomology, is demonstrated, for high quality surface and deep imaging of insect's body parts which are dominantly built of chitin.

Key words: iridescence, two-photon excited fluorescence, chitin, natural chitinous nanostructures, laser modification of chitinous nanostructures

Scientific field: Physics

Scientific subfield: Biophotonics

UDK number:

Садржај

1. Увод	1
1.1. Фотоника и биофотоника	1
1.1.1. Структурна и пигментна обојеност	2
1.1.2. Хитин и хитинске наноструктуре биолошког порекла.....	5
1.2. Природне фотонске наноструктуре	7
1.2.1. Периодичне природне фотонске наноструктуре	7
Танки филмови	7
Дводимензионе (2Д) природне фотонске наноструктуре	12
Тродимензионе (3Д) природне фотонске наноструктуре.....	17
1.2.2. Хиралне нано-структуре биолошког порекла	20
1.2.3. Неуређене природне фотонске наноструктуре.....	22
1.3. Флуоресценција и природне наноструктуре.....	28
2. Материјали и методе	30
2.1. Експериментални методи и уређаји	30
2.1.1. Оптичка микроанализа	30
2.1.2. Сканирајућа електронска микроскопија	30
"Double transfer" метод	31
2.1.3. Нелинеарни ласерски микроскоп.....	32
2.1.4. Streak камера	33
2.1.5. Компјутеризована микро-томографија	34
2.1.6. Радијативна термографија	35
2.1.7. Фурије трансформ инфр-црвена спектроскопија („FTIR“)	37
2.1.8. Усаглашавање индекса преламања.....	38
2.2. Математичко моделовање	39
2.2.1. Метод коначних елемената	39
2.2.2. Метод преносне матрице („Transfer matrix method“).....	40
2.2.3. Ray tracing метод	40
2.2.4. Фурије-Мелинова трансформација.....	41
2.3. Алгоритми и софтверски пакети.....	42
Алгоритам пројекције максималног интензитета	42
Запремински приказ	43
"Focus stacking" алгоритам	43

Софтверски пакети	44
2.4. Колориметрија	44
3. Нелинеарне оптичке особине хитина	45
3.1. Двофотонски побуђена флуоресценција.....	45
3.2. Двофотонски побуђена флуоресценција хитина.....	47
3.3. Други хармоник хитина	51
4. Оптичке особине хитинских нано-структура биолошког порекла и њихове примене.....	53
4.1. Оптичке особине и наноструктура крилних љуспица одабраних врста инсеката.....	54
4.2. Оптички модел крилних љуспица одабраних врста инсеката	58
4.3. Варијабилност и јединственост оптичког одзива крилних љуспица одабраних врста инсеката.....	66
4.4. Оптичка заштита са крилним љуспицама одабраних врста инсеката.....	68
4.5. Флуоресцентне особине крилних љуспица одабраних врста инсеката и ласерска обрада.....	71
4.6. Разматрање оптичко-заштитне функције крилних љуспица одабраних врста инсеката.....	76
5. Радијативне термалне особине хитинских наноструктура биолошког порекла.....	79
5.1. Радијативне особине наноструктуре инсекта <i>Morimus asper funereus</i>	84
5.2. Термални модел наноструктуре инсекта <i>Morimus asper funereus</i>	85
5.3. Хипер-униформност хитинских микроструктура.....	90
5.4. Завршна разматрања термалних особина анализираних хитинских микроструктура.....	96
6. Закључак.....	97
Литература.....	99
Прилог А.....	121
Биографија.....	134

1. Увод

1.1 Фотоника и биофотоника

Фотоника је област физике која проучава активну и пасивну контролу светлости кроз генерисање, детекцију и контролисање светлости самом светлошћу (нелинеарни ефекти) [1,2]. Фотоника највећим делом истражује радијацију из оптичког и блиско инфра-црвеног дела спектра. Настанку фотонице претходиле су прве практичне примене полупроводничких извора светлости, раних 1960.-их година, и развој оптичких влакана 1970.-их година. Биофотоника је огранак фотонице који проучава интеракцију светлости и биолошких система. Многи биолошки системи интерагују са светлошћу на веома сложен и још увек не у потпуности истражен начин. Ови системи често имају веома сложену структуру, на нанометарском нивоу. Због тога, приликом интеракције светлости са њима долази до различитих оптичких ефеката који настају комбинацијом интерференције, дифракције, различитих типова расејања светлости... Оптичке особине ових биолошких система – организама помажу и омогућавају организму да преживи. Са становишта оптике, они представљају сложене оптичке системе са сложеним оптичким одзивом. Због многобројних примена, биолошки системи се могу имитирати, и на различите начине модификовати, чиме се додатно повећава број оптичких механизма који одређују интеракцију светлости и ових система. Огранак биофотонице који се бави имитирањем, модификацијом и функционализацијом природних система се назива биомиметика.

Друга, такође значајна област биофотонице се бави развојем и применом оптичких техника, првенствено осликавања, са циљем проучавања биолошких молекула, ћелија и ткива [3]. У оквиру ове тезе, под осликавањем се подразумева микроскопско осликавање узорака биолошког порекла, применом различитих микроскопских техника. При томе, многе оптичке технике развијене у биофотоници не оштећују ткива и ћелије [4], што је значајна предност у односу на многе друге методе (флуоресцентна конфокална микроскопија, опто-акустичко осликавање, термографија...) које се користе у „живим наукама“. У овом смислу, биофотоника проучава апсорпцију, емисију, модификацију и детекцију радијације код биолошких материјала – ћелија, ткива, па и читавих организама. Ово има значајне примене у медицини, биологији, пољопривреди, примене као што су терапија и хирургија, где се радијација користи као преносилац енергије. Међутим, биофотоника се бави и дијагностиком ћелија и ткива, при чему радијација побуђује материју која онда приликом релаксације у основно стање „емитује“ одређену информацију о ткиву, у форми радијације измењених особина.

Почеци биофотонице као науке датирају још од времена Исака Њутна, који је, између осталог, проучавао и обојеност у живом свету и претпоставио да интензивна обојеност пауновог перја потиче од биолошког материјала који има форму танког филма [5]. На прелазу из 19.-ог у 20.-и век настављена су истраживања феномена структурне обојености [6-15]. У тим почетним истраживањима, један од најистраживанијих објеката су била крила иридесцентних лептира. Међутим, пошто тада није постојала електронска микроскопија, узрок иридесценције није било лако одредити. Теорије из тог времена се зато могу сврстати у следеће категорије [16]: 1) дифракција светлости на набораној површини природних структура, 2) интерференција светлости на танким филмовима, 3) расејање светлости, 4) селективна рефлексија светлости као у случају метала и обојених кристала.

Савремена биофотоника представља веома атрактивну научну дисциплину, како са аспекта фундаменталних истраживања физике и оптике природних фотонских микроструктура, тако и са аспекта многобројних технолошких примена. На пример, недавно је откривено да спољашњи хитински омотач (хитин је доминантни градивни елемент инсеката и о њему ће бити више речи у наставку ове дисертације, у подпоглављу 1.1.2.) инсекта *P. c. Pavonius* има структуру 3Д фотонског кристала са елементарном ћелијом „једноструког“ дијаманта (*single diamond network morphology*) [17]. О научном и технолошком значају оваквих природних 3Д фотонских наноструктура ће бити речи у наставку ове дисертације. Оно што оптику ове структуре разликује од осталих оваквих 3Д фотонских кристала откривених код инсеката је велика спектрална варијабилност рефлексије – у зависности од упадног угла светлости, рефлексија може да има максимум на било којој таласној дужини из оптичког дела спектра. Изузетна спектрална подесивост је омогућена структуром 3Д фотонског кристала који је изграђен од хитина и ваздушних шупљина, и у којој постоје адекватне варијације константе кристалне решетке и варијације односа запремине хитин/ваздух.

Настављају се истраживања нових биофотонских система, са акцентом на хитин-ваздух наноструктуре. Имитирање оваквих наноструктура вештачким материјалима са бољим оптичким и осталим особинама и адекватна модификација и функционализација оваквих структура представљају плодно тло за примене у биоинжењерству, соларним ћелијама, различитим сензорима, комуникационим технологијама, обради података [23]. Упоредо са тим, откривају се и нови физички и оптички механизми интеракције електро-магнетне радијације са сложеним хитинским наносистемама, који се заснивају на оптичкој синергији различитих хитинских микро и наноелемената.

Веома су активна и истраживања примене биофотонице у медицини, у развоју нових биомедицинских оптичких уређаја за осликавање, дијагнозу и терапију различитих обољења [18-22].

1.1.1. Структурна и пигментна обојеност

Обојеност у природи је најчешће последица присуства пигмената и она се назива пигментна обојеност. Међутим, поједини организми имају веома сложене, нано-структурисане делове тела. Приликом интеракције упадне светлости са овим структурама, долази до комбиновања низа оптичких ефеката (интерференција, дифракција, различите врсте расејања светлости...) који синергијски одређују оптичке особине оваквих структура. Оваква обојеност се назива структурна обојеност. Није редак случај да се пигменти налазе у сложеној природној нано-структури, и онда је рефлексија радијације са овакве структуре комбинација утицаја нано - структуре и пигмената. За разлику од пигментне обојености, структурна обојеност показује јаку угаону зависност. Дакле рефлексионни спектар се мења са променом угла посматрања или осветљавања структуре и ова појава се у биофотоници назива иридесценција. Структурне, иридесцентне боје су такође интензивније од пигментне обојености (рефлектована светлост има већу амплитуду), јер се не заснивају на селективној апсорпцији електро-магнетних таласа од стране пигментних молекула него на суперпозицији великог броја парцијално рефлектованих таласа.

Поред кохерентних процеса као што су интерференција и дифракција, за структурну обојеност је веома значајно и некохерентно, дифузно расејање светлости. Поједине природне структуре су оптимизоване за овај процес. Оне расејавају таласне дужине из одређеног подопсега оптичког дела спектра у пуном просторном углу и на тај начин елиминишу ове таласне дужине из кохерентне и високо-амплитудске иридесцентне рефлексије. Уколико је материјал транспарентан, расејана светлост се појављује и унутар материјала због чега се, захваљујући дифузном расејању, повећава време боравка ових фотона унутар материјала. Овде је у питању ефекат локалног таласовода који је праћен повећањем апсорпције светлости унутар материјала услед чега поново имамо елиминацију ових таласних дужина из иридесцентне, структуром узроковане рефлексије.

Постоје различите врсте расејања радијације у материјалној средини, у зависности од односа таласне дужине радијације и величине честица на којима се расејање одиграва. Рејлијево расејање се дешава када је пречник честице за ред величине (или више од тога) мањи од таласне дужине радијације. Ако се ради о радијацији из оптичког дела спектра, то значи да пречник честице треба да буде $\sim 50 \text{ nm}$ или мањи. Значајна особина овог расејања је да је интензитет расејања обрнуто пропорционалан четвртој степену таласне дужине радијације која се расејава ($I \sim 1/\lambda^4$), па се таласне дужине из „плавог дела спектра“ ($\lambda \sim 400\text{-}500 \text{ nm}$) расејавају веома интензивно у свим правцима, док је расејање преосталих таласних дужина из оптичког дела спектра скоро занемарљиво [24]. Лорд Рејли је дошао до израза за расејање које је добило назив по њему анализирајући расејање радијације на дипол-расејавачима чије су димензије бар за ред величине мање од таласне дужине радијације која се расејава:

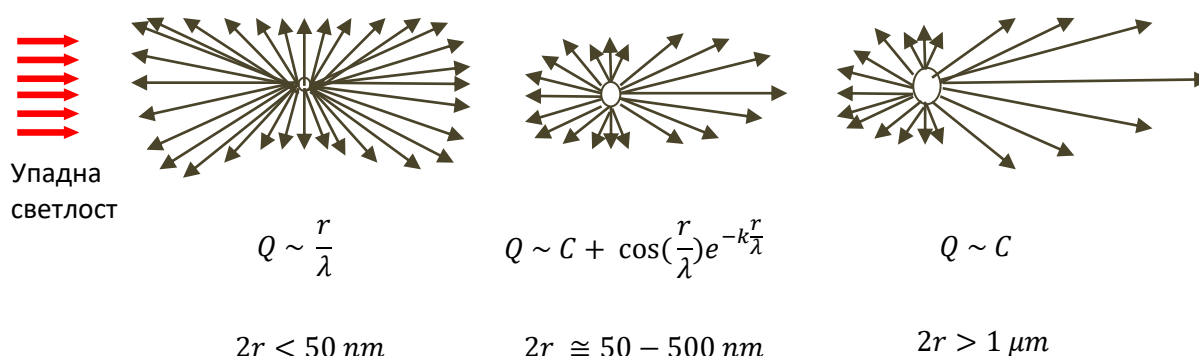
$$(1.1) \quad I = I_0 \frac{8\pi^4 N \alpha^2}{\lambda^4 R^2} (1 + \cos^2 \theta)$$

где је I - интензитет расејане радијације на дипол-расејавачу, I_0 - интензитет упадне радијације, N - број расејавача, α – поларизабилност, λ - таласне дужине радијације, R - растојање између расејавача и детектора радијације, θ - угао између правца упадне светлости и правца дуж кога се детектује расејана радијација. На пример, молекули O_2 и N_2 који су веома заступљени у Земљиној атмосфери имају ове димензије па се Рејлијевим расејањем може објаснити плава боја неба и наранџасто-црвена боја излазака и залазака Сунца [24]. Рејлијево расејање значајно утиче на оптичке особине многих биолошких система [25-28].

Широкопојасна рефлексија многих биофотонских система објашњава се Миеевим расејањем (слика 1.1) [142, 143, 153-155]. Оно се испољава на честицама чије димензије одговарају таласној дужини упадне светлости. Миеево расејање представља решење Максвелових једначина за расејање равнотелног електро-магнетног таласа на хомогеној сфери. Упадни равни талас, као и расејано поље, приказују се преко низа радијалних сферних векторских таласних функција. Електро-магнетно поље унутар честице се приказује преко низа регуларних сферних векторских таласних функција. Применом одговарајућих граничних услова на површини сфере, могу се израчунати коефицијенти пропагације расејаног електро-магнетног поља. Решење има облик бесконачног реда сферних парцијалних таласа. Ипак, не постоји горњи лимит за величину сфере, јер у случају веома великих честица Миеево решење конвергира ка решењу геометријске оптике [29].

Миево расејање је најинтензивније у правцу побудне светлости, јер су у овом правцу најмање релативне фазне разлике између радијације која је расејана са различитих делова честице. На пример, ово доприноси белој боји млека где се расејање дешава на капљицама масти унутар воде. Такође, облаци се састоје од капљица воде које су већих димензија од таласне дужине светлости и због тога се дешава Миево расејање – све таласне дужине из оптичког дела спектра се расејавају приближно једнако, што ствара утисак беле боје облака. Миево расејање је такође одговорно за белу боју шећера, соли, магле итд. Оно је заступљено и у нижим слојевима атмосфере, где се налазе сферичне честице чији су пречници приближно једнаки таласним дужинама упадне радијације [30].

Код појединих биолошких материјала заступљено је Тиндалово расејање [31, 32]. Оно је слично Рејлијевом расејању, јер је и овде интензитет расејане светлости обрнуто пропорционалан четвртој степену таласне дужине светлости, па се „плава“ светлост ($\lambda \sim 400\text{--}500\text{ nm}$) расејава знатно интензивније од „црвене“ светлости ($\lambda \sim 600\text{--}700\text{ nm}$), али се дешава на честицама већих димензија у односу на Рејлијево расејање (због чега се светлост интензивније расејава у случају Тиндаловог расејања). У оптички транспарентним срединама у којима се дешава Тиндалово расејање, веће таласне дужине се трансмићују кроз материјал, док се краће таласне дужине дифузно рефлектују због Тиндаловог расејања. Ово расејање се дешава када се у оптички транспарентној средини налазе честице пречника $\sim 500\text{--}900\text{ nm}$.



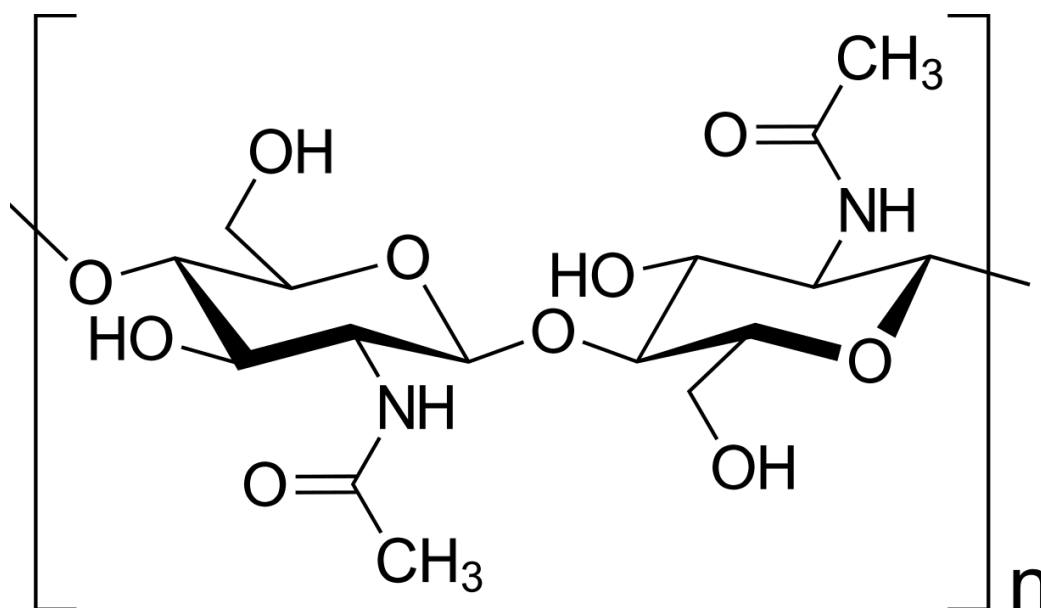
Слика 1.1. Различите врсте расејања светлости. С лева на десно: Рејлијево расејање, које се дешава када је пречник честице на којој се радијација расејава мањи од 50 nm (овој групи припадају, на пример, молекули O_2 и N_2 , веома заступљени у Земљиној атмосфери); Миево расејање: величина честице је 50 – 500 nm; Када је пречник честице већи од оптичких таласних дужина, Миево расејање конвергира ка решењу геометријске оптике за расејање светлости на крупним честицама. Q - коефицијент атенуације надлазеће светлости, r – полупречник честице на којој се светлост расејава, λ – таласна дужина светлости, C – константа.

У оквиру ове дисертације су проучаване оптичке, флуоресцентне и термалне особине сложених нано-структура инсеката. Доминантан градивни састојак ових структура је хитин.

1.1.2. Хитин и хитинске наноструктуре биолошког порекла

Постоје многи материјали који су свеprisутни у живом свету (ДНК, протеини, полисахариди...). Међу најзаступљенијима су полисахариди целулоза (градивни елемент биљака) и хитин (градивни елемент инсеката).

Хитин је полимер који се налази у егзоскелету и у унутрашњим структурама бескичмењака. То је други најзаступљенији полимер на Земљи, после целулозе [5]. Производи се од одбачених љуштура шкољки и морских ракова (љуштуре садрже 20 – 30% хитина) [33, 34]. Хитин је природно обилан и обновљив полимер са одличним особинама као што су: биоразградивост, биокompatibilност, нетоксичност.



Слика 1.2. Хемијска структура молекула хитина

Хитин је доминантан градивни елемент инсеката. Хитинске наноструктуре се налазе на крилима и другим деловима тела инсеката а истражују се због откривања нових оптичких механизма и због различитих примена као што су:

- сензори малих (нанометарских) помераја и деформација које могу бити различитог порекла: термалног, акустичког, механичког па чак и нуклеарног [35-39].
- текстилна индустрија – иридесцентна одећа [40].
- медицина – где се користе као повољна подлога за раст различитих ћелијских култура што доводи до примена у регенеративној медицини, инжењерингу ткива, контроли облика ћелија [41]...
- биохемија – анализа молекулских интеракција [42].

Због ових примена истражују се физичке и оптичке особине хитинских наноструктура у природном облику, проучавају се могућности њихове модификације и функционализације због побољшања ових особина, и развија се нова област чија је улога да имитира природне структуре вештачким материјалима ради побољшања њихових својстава (биомиметика).

Љуспице лептира, које биофотоника препознаје као сложене нано-структурисане оптичке микро-објекте, састоје се највећим делом од хитина и класификоване су у две основне категорије – щуспице чији је типичан представник „*Morpho*“ фамилија лептира и други тип щуспица чији је типичан представник „*Urania*“ фамилија лептира [65, 203], у зависности од тога да ли су равног облика или конвексне (облик щуспице утиче на оптичке ефекте). Обе категорије садрже одређени број подкатегија које се разликују у наноструктури [204]. Веома честа појава код оваких структура је иридесценција – промена рефлексионог спектра са променом угла посматрања или осветљавања щуспице. Љуспице се могу делимично преклапати, а код појединих врста инсеката постоје два слоја щуспица – базне и покровне, које су постављене једне преко других и могу имати исту или веома различиту нано-структуру и оптичке особине.

Због своје сложене нано-структуре и резултујућих оптичких особина, щуспице лептира имају многобројне технолошке примене. На пример, користе се као подлога за Раманову спектроскопију појачану површинском структуром („surface enhanced Raman scattering - SERS“) [205-207]. Такође, у развоју сензора малих (нанометарских) помераја и деформација које могу бити различитог порекла: термалног, механичког, акустичког, па чак и нуклеарног. Структурисање фото-анодe соларних ћелија по узору на щуспице лептира доводи до повећања ефикасности соларних ћелија [208]. Овде се примењују особине щуспица појединих врста лептира и мољаца да „заробљавају“ светлост [95]. У скорије време, локализована површинска плазмонска резонанца („localized surface plasmon resonance (LSPR)“) остварена је плазмонским ефектима на металима са површином нано-структурисаном по узору на горњу површину щуспица лептира [209]. Ово има потенцијалну примену у производњи водоника фотокатализом воде. У појединим применама, на пример у текстилној индустрији, предложено је да се щуспице лептира користе у изворном облику, уклоњене са крила инсекта. За сложеније примене („SERS“, „LSPR“, гасни, термални, механички сензори...) сложена нано-структура щуспица се имитира – од различитих метала и легура се генеришу копије щуспица, допирају се нано-честицама итд. Ове технике се примењују у биомиметици, области биофотонике која истражује могућности имитирања природних нано-структура другим материјалима, као и побољшање оптичких, механичких и других особина ових „копија“ контролисаном модификацијом и функционализацијом (придруживање нових елемената структури ради побољшања већ постојеће или додавања нове функције структури, на пример, поједини оптички апсорбери се функционализују допирањем карбонским наноцевима, чиме се значајно повећава њихова апсорпција у оптичком делу спектра) њихове наноструктуре [210-212, 238].

1.2. Природне фотонске наноструктуре

У природи постоји велика разноврсност сложених фотонских структура и оптичких ефеката који настају у интеракцији светлости са њима. Поједине структуре су периодичне и њихов период је реда величине таласне дужине радијације из оптичког дела спектра па се на њима испољавају кохерентни ефекти (као што су интерференција, дифракција...). Постоје и насумичне структуре чија је примарна оптичка функција расејање светлости из одређеног опсега таласних дужина у широком просторном углу, што има централно место у рефлексiji али може бити значајно и за апсорпцију светлости, што ће касније бити објашњено. Присутна је и псеудо-уређеност, где структуре биолошког порекла показују различит степен уређености на различитим физичким скалама – нпр. биолошки поликристал, материјал који се састоји од великог броја периодичних области, при чему је међусобна оријентација тих под-области насумична (тзв. „*short range order – long range disorder*“).

Природне структуре се могу састојати од два различита материјала код којих постоји разлика у индексу преламања потребна да се добију резултујући оптички ефекти. То су нпр. меланин и кератин код птица, гуанин и цитоплазма код водених организама...Али периодичност се у природи може постићи и у форми рељефа, као нпр. код инсеката где је периодичност обезбеђена хитином и ваздушним шупљинама унутар хитина, па су главне компоненте оваквих система хитин и ваздух. О свим поменутим структурама и оптичким механизмима интеракције светлости са њима биће речи у наставку овог поглавља, са посебним акцентом на хитинске фотонске структуре.

1.2.1. Периодичне природне фотонске нано-структуре

У зависности од броја просторних димензија у којима постоји периодичност, овакве структуре се могу поделити у 3 основне категорије: танки филмови (код којих периодичност постоји у једној просторној димензији), дифракционе решетке и фотонски кристали, где периодичност постоји у две и три просторне димензије, респективно.

Танки филмови

Танки филмови имају периодичну промену индекса преламања у једној димензији. Пошто је главна оптичка функција хитинских танких филмова до сада откривених у природи рефлексija (спектрално уско-појасна или широко-појасна, и угаоно-зависна рефлексija), они су познати и под називом вишеслојни рефлектори. Уколико се светлост простире кроз овакав материјал, на свакој граничној површини унутар материјала на којој постоји дисконтинуитет индекса преламања долази до рефлексije једног дела упадне светлости. Уколико је физичка дебљина слојева од којих се материјал састоји реда величине таласне дужине светлости, долази до интерференције парцијално рефлектованих таласа. Када два електро-магнетна таласа интерферирају, резултујући интензитет електро-магнетног поља је једнак:

$$I = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos \delta \quad (1.2)$$

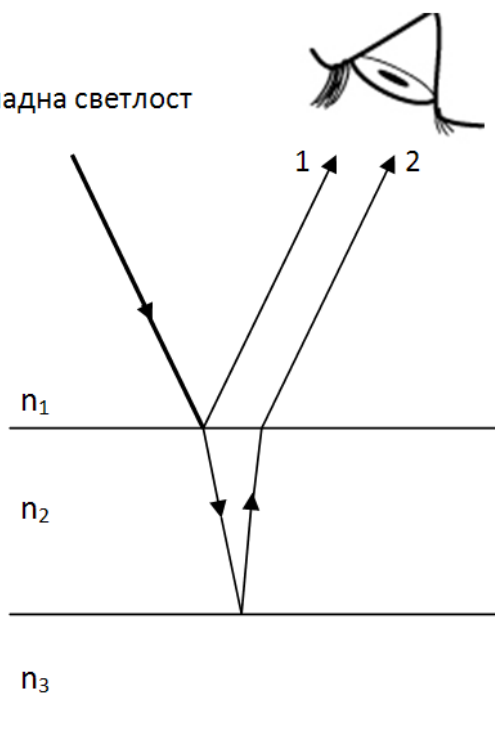
где су I_1 и I_2 интензитети појединачних електро-магнетних таласа а δ је њихова фазна разлика у одређеној тачки у простору.

У различитим тачкама у простору, резултујући интензитет I може да буде већи, мањи или једнак збиру $I_1 + I_2$, што зависи од вредности фазне разлике δ , а исти принцип важи и када у материјалу постоји већи број граничних површина, па због тога долази до интерференције већег броја парцијалних рефлектованих таласа, слика 1.3 б. У различитим областима у простору, електромагнетни таласи одређене таласне дужине слабе или се појачавају у различитој мери, у зависности од њихове фазне разлике у датој области. Из тог разлога, рефлексioni спектар једнодимензионих периодичних материјала се мења са променом угла посматрања (или угла осветљавања) материјала.

Слојеви од којих се састоји вишеслојни оптички рефлектор могу имати константну дебљину – сви слојеви индекса преламања n_1 имају исту физичку дебљину, а слојеви индекса преламања n_2 имају неку другу (или исту) вредност дебљине и тада овакав рефлектор рефлектује узак интервал таласних дужина које задовољавају услов за конструктивну интерференцију у рефлексiji. Овакви рефлектори се, због ширине њиховог рефлексionoг спектра, називају уско-појасно рефлектори. Међутим, рефлектори који имају велики број слојева, могу имати и варијабилну дебљину слојева. У том случају, повећава се број таласних дужина које испуњавају услов за конструктивну интерференцију у рефлексiji па због тога овакви рефлектори имају шири рефлексioni спектар од уско-појасних рефлектора и, уколико је он значајно шири, називају се широко-појасни рефлектори. Оптички механизми уско-појасне и широко-појасне рефлексije на хитинским 1Д вишеслојним рефлекторима откривени су у живом свету, код многобројних врста инсеката [49-60].

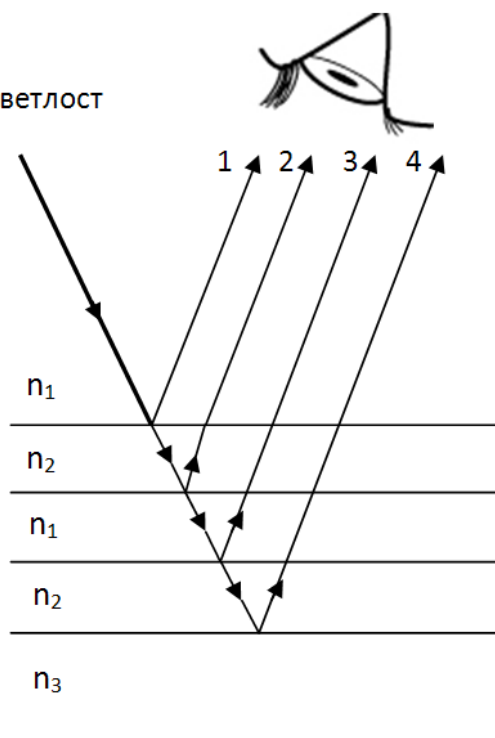
а)

Упадна светлост



б)

Упадна светлост



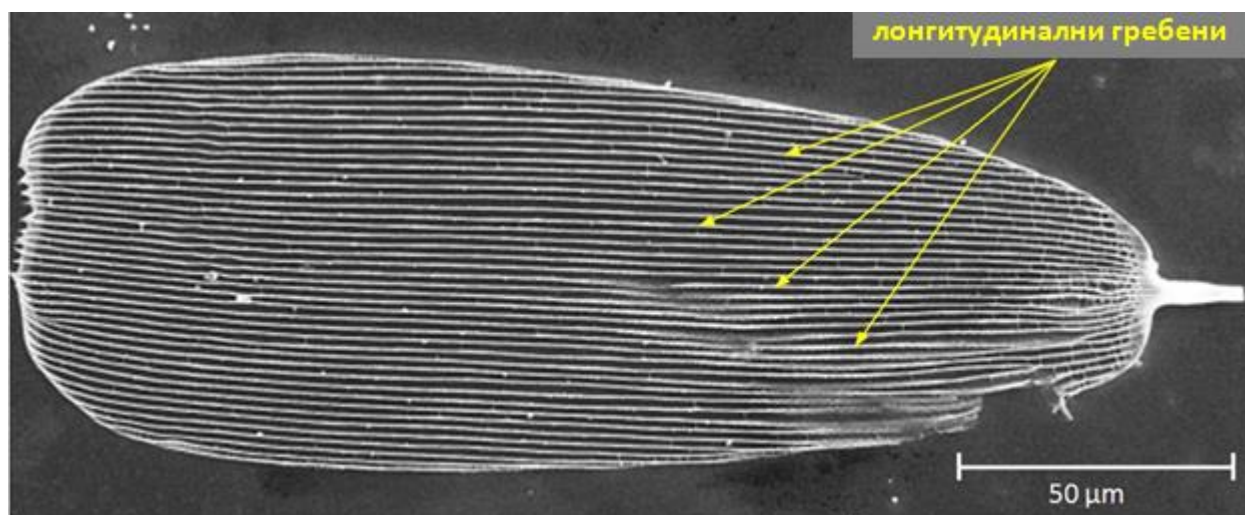
Слика 1.3. Интерференција светлости: а) Интерференција на танком слоју, два делимично рефлектована таласа (таласи означени бројевима 1 и 2) интерферирају. б) интерференција на вишеслојној структури са периодичном променом индекса преламања – већи број граничних површина узрокује већи број делимично рефлектованих таласа (на слици су означени бројевима 1, 2, 3 и 4) који интерферирају. Ради једноставности приказа, таласи су приказани правим линијама – зрацима.

Ускопојасни хитински 1Д рефлектори биолошког порекла

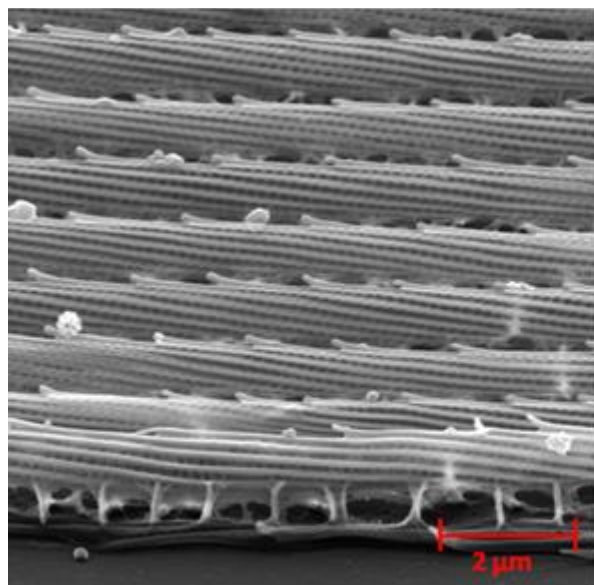
Уско-појасна рефлексија на хитинским 1Д вишеслојним рефлекторима откривена је у природи код различитих врста инсеката [43-54]. На пример, Вукушић и сарадници [55] истраживали су оптичке особине појединачних љуспица (микро-објекти којима су прекривена крила различитих врста инсеката, често имају сложену структуру и оптичку функцију) *Morpho rhetenor* лептира и показали да се ове љуспице могу успешно моделовати као 1Д вишеслојни рефлектори изузетних оптичких особина. Наиме, мерења су показала да је оптичка дебљина слојева оптимизована за интензивну рефлексију „плаве“ светлости ($\sim 400\text{-}500\text{ nm}$) – љуспице рефлектују 75% упадне плаве светлости и то у великом просторном углу што је далеко више него што се може постићи пигментацијом. Дакле, ови лептири су развили вишеслојне рефлекторе са довољним бројем слојева који им омогућавају веома интензивну рефлексију у поменутом спектралном опсегу, и који у комбинацији са другим компонентама овог сложеног биофотонског микро-система показују рефлексивност у широком просторном углу, поништавајући дакле, у одређеној мери, угловну зависност рефлексије карактеристичну за вишеслојне рефлекторе. Али не само то, него и друге оптичке особине као што су интензивна рефлексија у УВ области и различити поларизациони ефекти. Ништа од овога се не може постићи само пигментима.

Уско-појасна рефлексија је карактеристична и за хитинске 1Д вишеслојне рефлекторе који се налазе на дорзалној површини крила лептира *Morpho aega*, слика 1.4. Она је прекривена љуспицама просечних димензија $200 \times 75\text{ }\mu\text{m}$. Електронски микрограф типичне љуспице је приказан на слици 1.4а. Она се састоји од лонгитудиналних гребена, који се простиру целом дужином љуспице. Структура је отвореног типа, састоји се од слојева хитина између којих се налази празан простор испуњен ваздухом, просечна дебљина хитинских слојева је $\sim 700\text{ nm}$, а ваздушних шупљина $\sim 1\text{ }\mu\text{m}$. Дакле сваки лонгитудинални гребен представља вишеслојни рефлектор који се састоји од 5 слојева хитина и 5 ваздушних слојева (слика 1.4в). Захваљујући малом растојању између суседних гребенова, љуспица се може моделовати као вишеслојни рефлектор чији су компоненте хитин и ваздух (слика 1.5). Оваква љуспица представља природан оптички микро-систем чије су дебљине слојева оптимизоване за иридесценцију – интензивну рефлексију која показује угаону зависност. Код многих врста међутим, угаона зависност је значајно смањена услед „колективног ефекта“ (рефлексија је креирана од стране великог броја љуспица чије међусобне оријентације имају благе природне варијације што доводи до ширења резултујућег рефлексионог спектра крила инсекта и смањења његове угаоне зависности). Код појединих врста, изнад слоја иридесцентних љуспица, налази се слој транспарентних љуспица чија је оптичка функција дифракција светлости рефлектоване са иридесцентног слоја љуспица. Захваљујући дифракцији, може се значајно повећати просторни угао у коме се простире светлост рефлектована са иридесцентног слоја љуспица. Код оваквих сложених нано-

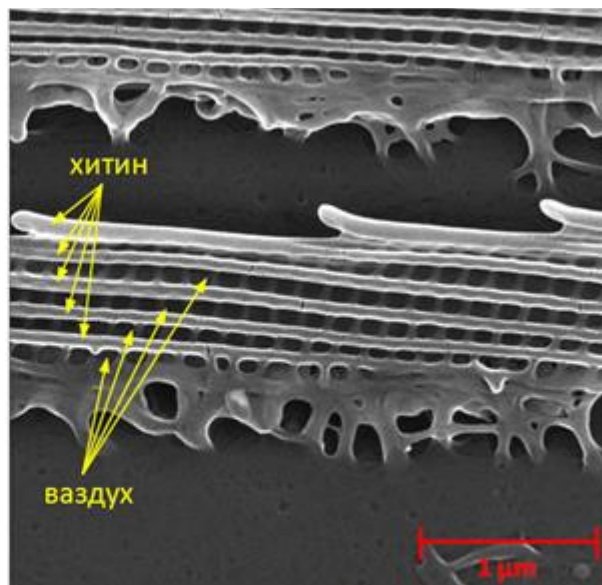
структурисаних система, сви природни оптички елементи (високо транспарентан горњи „дифракциони“ слој љуспица, нано-структурисан доњи иридесцентни слој љуспица, крилна мембрана испод љуспица богата пигментима који апсорбују радијацију која је прошла кроз горње слојеве љуспица...) синергијски утичу на рефлексioni спектар.



(a)

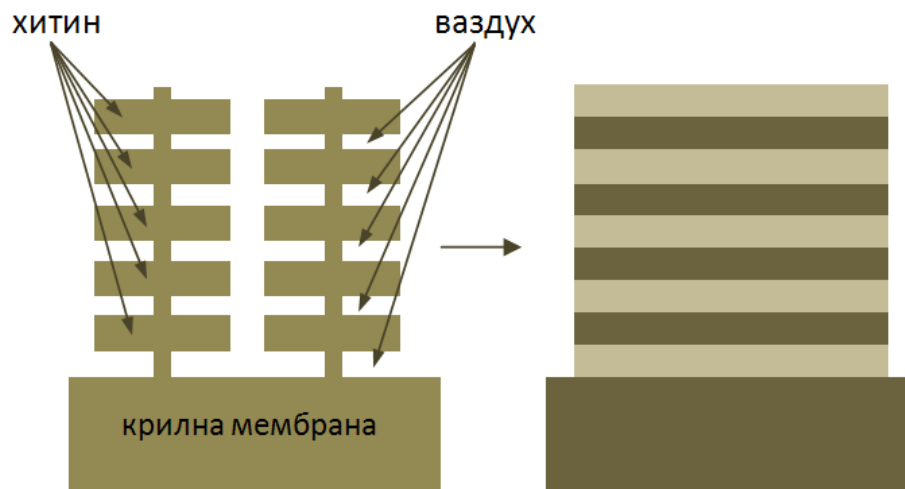


(б)



(в)

Слика 1.4. а) електронски микрограф љуспице *Morpho aega* лептира; б) бочни снимак љуспице при већем микроскопском увећању. Уочава се слојевита структура лонгитудиналних гребена.



Слика 1.5. *Растојање између лонгитудиналних гребена је код *Morpho aega* лептира довољно мало па се љуспица може моделовати као 1Д вишеслојни рефлектор применом теорије ефективне средине [56].*

Иридесценција услед вишеслојних рефлектора је откривена и код појединих припадника реда вилинских коњица (лат. *Odonata*) [57], као и код других копнених организама (нпр. паукова (који нису инсекти и спадају у класу *Arachnidae*) [58].

1Д периодичне нано-структуре су откривене и код водених организама. На пример, истраживањем високо-рефлексивних структура појединих риба и других водених организама откривено је да се оне састоје од наизменично поређаних слојева високог и ниског индекса преламања (код водених организама, то су гуанин и цитоплазма). Слојеви гуанина (један од четири главна састојка нуклеинских киселина ДНК и РНК) имају облик плочица, а између њих се налази течност – цитоплазма. Оптичка дебљина гуанинских плочица и цитоплазме је у опсегу 100 – 200 nm. Многе од ових рефлектујућих структура су интензивно обојене и код њих је откривена добра корелација између спектралног опсега који се најинтензивније рефлектује и дебљине слојева - структура тежи да буде идеалан рефлектор.

Широко-појасни 1Д рефлектори биолошког порекла

Међутим, код водених организама су откривене комплексније структуре и оптички механизми, као што су неидеалан систем – вишеслојни рефлектор где дебљина слојева показује значајно одступање од $\frac{1}{4}$ таласне дужине максимума рефлексије, или вишеслојни рефлектор са широко-појасном рефлексијом [59].

Јордан и сарадници анализирају поларизационо независну оптичку рефлексију откривену у широко-појасном „сребрном“ вишеслојном рефлектору код трију врста риба [60]. Овај природни механизам генерисања спектрално широко-појасне и неполаризоване рефлексије може имати примену у генерисању синтетичких оптичких компонената. Широко-појасни неполаризујући диелектрични вишеслојни рефлектори су важне оптичке компоненте и саставни су делови

оптичких фибера [61], диелектричних таласовода [62] и светлосно-емитујућих диода [63]. Високо двојно-преламајући полимери са индексима преламања сличним као код риба су већ коришћени у производњи вишеслојних огледала [64].

Ови рефлектори обезбеђују рибама камуфлажу тако што изједначавају сопствену рефлексију са зрачењем из спољашње средине [65]. Због адекватне камуфлаже, рефлектујуће структуре морају да генеришу спектрално широко-појасно, интензивно и неполаризовано (под овим се подразумева да рефлектор не мења поларизацију упадне светлости) зрачење за све упадне углове надлазеће радијације. На пример, неки водени предатори имају поларизационо осетљив вид, па овакве структуре не мењају поларизацију упадне светлости – дакле у великом интервалу упадних углова поларизација светлости је иста пре и после рефлексије.

Неполаризујући рефлектори су значајни зато што код њих не долази до опадања рефлексивности са приближавањем упадног угла светлости Брустеровом углу. Начин на који вишеслојни рефлектори код риба производе спектрално широко-појасну рефлексију су добро познати [66, 67]. То су насумична варијација у дебљини слојева и систематска варијација у дебљини слојева. Ово прво је биолошки аналогон неуређених синтетичких диелектричних огледала [68].

Дводимензионе (2Д) природне фотонске нано-структуре

За разлику од 1Д и 3Д периодичних фотонских система, биофотонски системи са периодичном варијацијом индекса преламања у две димензије су мање истраживани [69]. То су дифракционе решетке са периодичношћу у две просторне димензије.

Дифракционе решетке су оптичке компоненте које се састоје од периодичног низа структура (то су најчешће удубљења или испупчења) при чему је растојање између свака два суседна елемента константно и назива се периодом решетке. Ако је период дифракционе решетке упоредив са таласном дужином надлазеће радијације, решетка има способност да упадни снап радијације „подели“, дифрактује, на већи број снопова. Различите таласне дужине из упадног снопа се, после интеракције са решетком, простиру у различитим правцима. Угао под којим се, у односу на нормалу на решетку, простиру различите таласне дужине после рефлексије (или трансмисије) са решетке одређен је односом периода решетке и таласне дужине упадне радијације. Једначина која повезује ове параметре (упадни угао и таласну дужину надлазеће радијације, угао дифракције и период решетке) је једначина дифракционе решетке:

$$d(\sin \theta_i - \sin \theta_m) = m\lambda \quad (1.3)$$

где је d период решетке, θ_i је упадни угао радијације у односу на нормалу на решетку, θ_m је угао под којим се радијација таласне дужине λ простира после дифракције (ова радијација се назива и дифракциони максимум на таласној дужини λ), у односу на нормалу на решетку, а m је целобројна вредност – дифракциони ред. Ова једначина, када радијација долази у правцу нормале на решетку ($\theta_i = 0^\circ$), узима следећи облик:

$$d \sin \theta_m = m\lambda \quad (1.4)$$

На основу једначине (1.3) може се израчунати угао под којим се, после дифракције, у односу на нормалу на решетку, простира дифракциони максимум таласне дужине λ :

$$\theta_m = \arcsin(\theta_i - \frac{m\lambda}{d}) \quad (1.5)$$

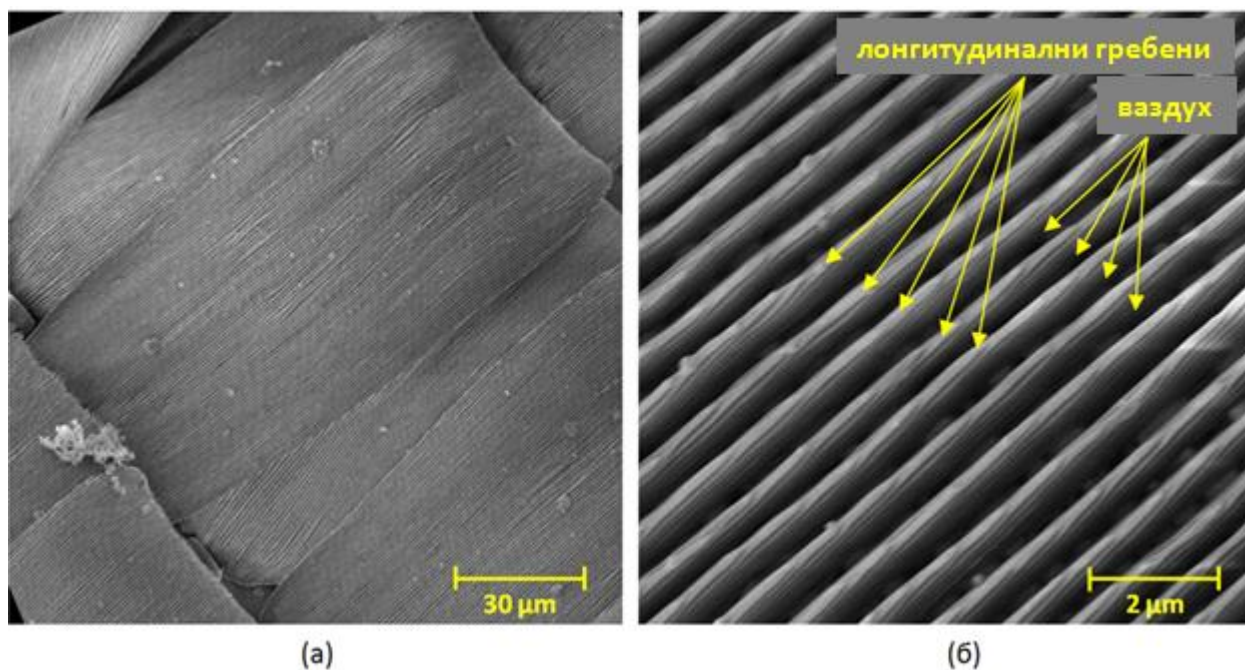
Пошто дифракциона решетка функционише као дисперзиони оптички елемент, она је саставни део појединих оптичких уређаја: спектрометара, монохроматора...

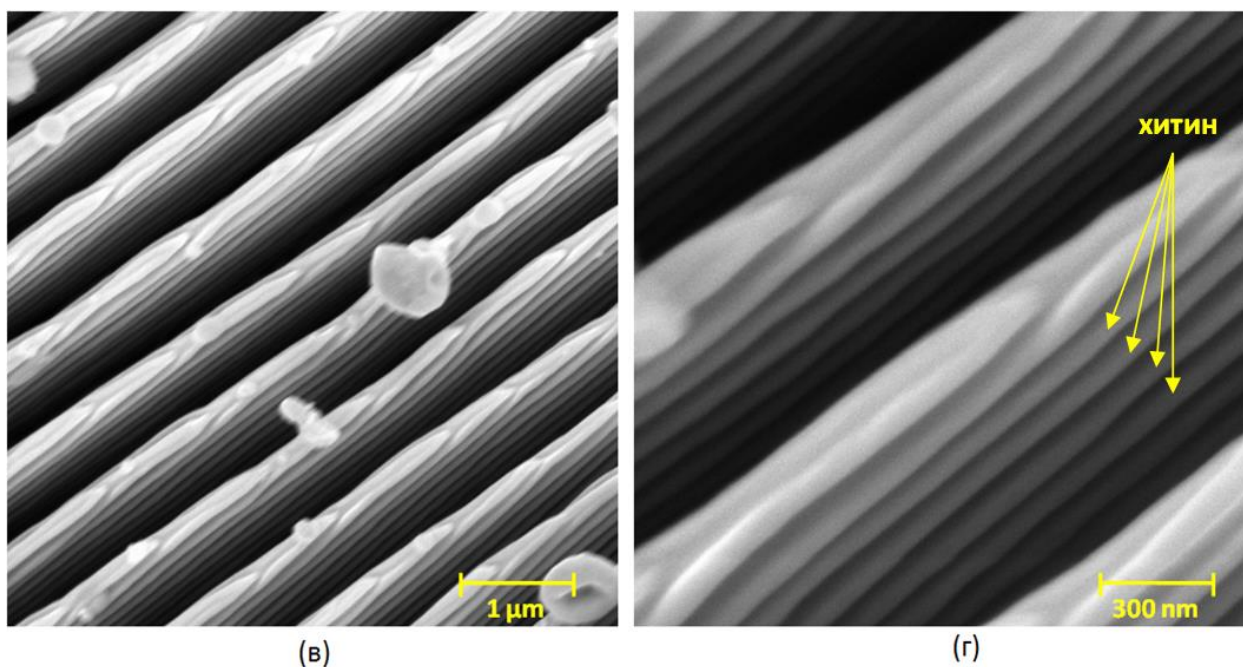
Постоје и дифракционе решетки чији је период значајно (за један ред величине или више) мањи од таласне дужине надлазеће радијације (енгл. „*subwavelength diffraction grating*“) [70]. Када се на ову ситуацију примени једначина дифракционе решетки за упад радијације у правцу нормале на решетку (једначина 1.4), показује се да је дифракција сузбијена за $m < \lambda$, јер је тада угао дифракције θ_m имагинаран број за сваки дифракциони ред m . Дакле, због малог периода, код оваквих решетки су немогући сви дифракциони редови осим основног, нултог реда који се односи на радијацију која се рефлектује и трансмитује у складу са Снеловим законом. Овакве решетки се могу теоријски третирати теоријом ефективне средине [56] или скаларном теоријом површинског расејања [231, 232] (која је примењена у овој дисертацији, погледати 4.2.). У складу са тим, оваква решетка се теоријски приказује као локална хомогена ефективна средина кроз коју се радијација простира и чије су оптичке особине одређене геометријом решетки. Овакве решетки су присутне на површинским деловима тела многих инсеката и тада су то најчешће хитинске „*subwavelength*“ дифракционе решетки које имају оптичку улогу дифузног расејача упадне светлости који у веома различитом степену расејава радијацију из различитих под-опсега оптичког дела спектра.

Услед постојања виших дифракционих редова светлост се са дифракционих решетки рефлектује у знатно ширем просторном углу у односу на обичну огледалску рефлексију са равних површина. Дифракцију светлости у широком просторном углу инсекти су развили због међусобне комуникације или камуфлаже. На пример, лептир *Saskia charonda* поседује на својим крилима лонгитудиналне гребене који се простиру целом дужином крила и који се састоје од већег броја хитинских и ваздушних слојева (слика 1.6). За разлику од поменутог *Morpho aega* лептира, овде се гребени не налазе на блиском међусобном растојању па се структура не може моделовати као 1Д вишеслојни рефлектор, већ се поред слојевите структуре појединачних гребена (која формира периодичност у једној димензији) мора узети у обзир и дифракциона решетка коју формирају гребени (то је периодичност у другој просторној димензији). Оптичка функција овакве дифракционе решетки је ширење просторног угла рефлексије иридесценте светлости која се рефлектује са вишеслојних рефлектора.

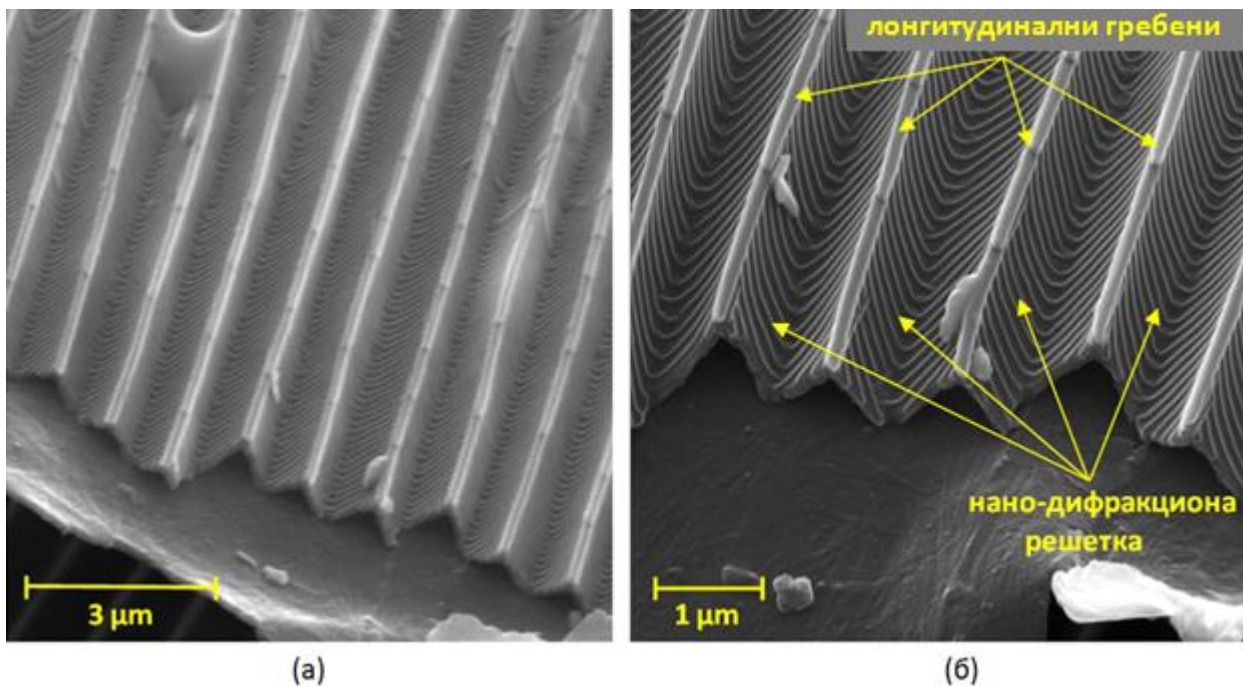
Код инсекта су откривене и дифракционе решетки изузетно велике моћи разлагања. На пример, паукови *Maratus robinsoni* и *M. chrysomelas* поседују нанодифракционе решетки (енгл. *subwavelength*) на конвексним испупчењима на површини свог тела. Спектрометар чији је саставни део оваква нанодифракциона решетка конвексног облика има 2 пута већу моћ разлагања од спектрометра са стандардном (планарном) дифракционом решетком истог периода. За разлику од иридесценције узроковане интеракцијом светлости са вишеслојним рефлекторима или 3Д фотонским кристалима, која обухвата узак регион оптичког дела спектра, у рефлексији са хитинских нанодифракционих решетки уочава се тзв. широкопојасна иридесценција: постепеном променом угла посматрања (или угла просветљавања) овакве структуре уочавају се све таласне дужине из оптичког дела спектра. Показано је да оваква

широкопојасна иридесценција има биолошку функцију сигнализирања. Комбинацијом одговарајућег периода решетке и текстуре на којој се она налази, што могу да буду микронска удубљења или испупчења адекватног облика, омогућена је велика моћ разлагања, велика спектрална чистоћа иридесценте светлости, па се разматра употреба оваквих дифракционих решетки у минијатурним супер-резулционим спектрометрима следеће генерације. На слици 1.7 су приказани електронски микрографи љуспица лептира *Autographa bractea* који такође има непланарну дифракциону решетку. У правцу нормале на њу, може се приметити додатна дифракциона решетка са периодом мањим од таласне дужине светлости (период ове решетке је ~ 200 nm), тзв. површинска дифракциона решетка. Површинске дифракционе решетке са периодом мањим од таласне дужине светлости су откривене на крилима појединих инсеката. Због малог периода, оне много интензивније расејавају краће таласне дужине („плави део“ спектра) из оптичког дела спектра и њихова оптичка функција је расејање тих таласних дужина у широком просторном углу.

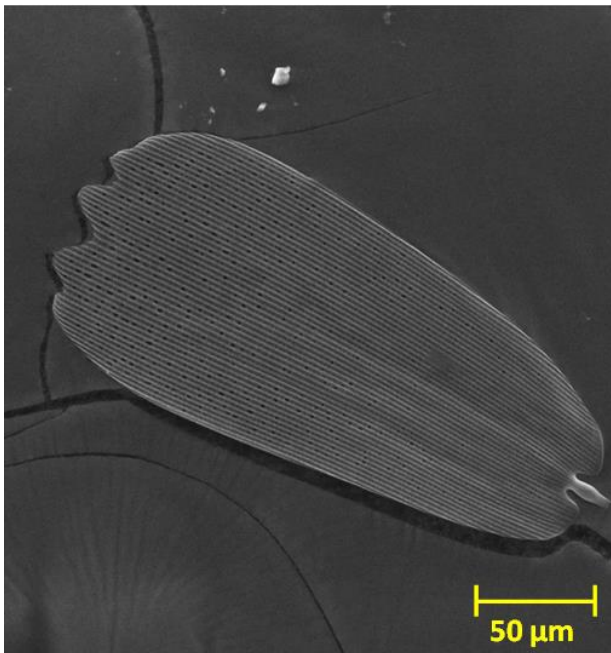




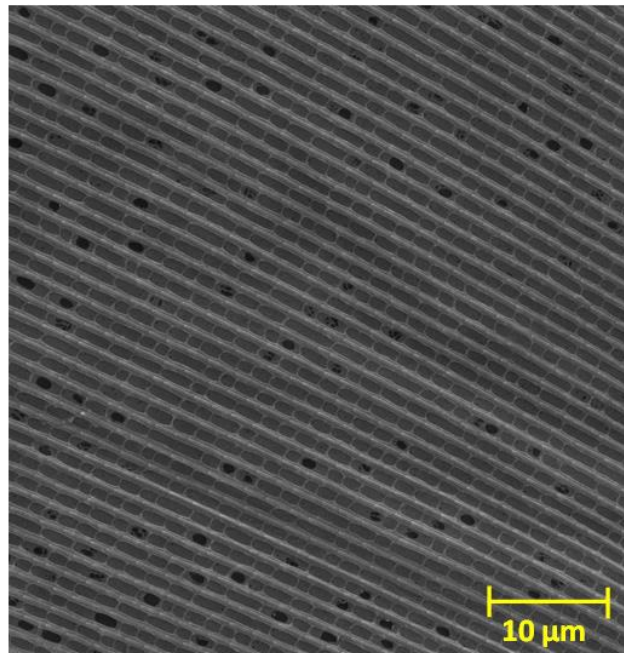
Слика 1.6. Електронски микрографи: а) љуспице на крилима лептира *Saskia charonda*, електронски микрограф; б) лонгитудинални гребени који се налазе на површини љуспице образују дифракциону решетку; в) при већим увећањима уочава се слојевита структура гребена; г) сваки гребен представља вишеслојни 1Д рефлектор чији су слојеви хитин и ваздух.



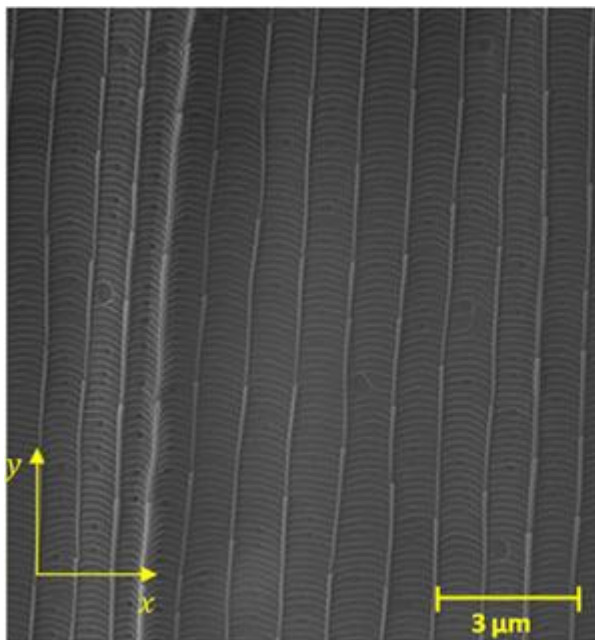
Слика 1.7. Електронски микрографи: љуспица лептира *Autographa bractea* је преломљена што омогућава осликавање њеног попречног пресека. Уочава се површинска дифракциона решетка периода $\sim 1 \mu\text{m}$, као и знатно ужа дифракциона решетка периода $\sim 200 \text{ nm}$.



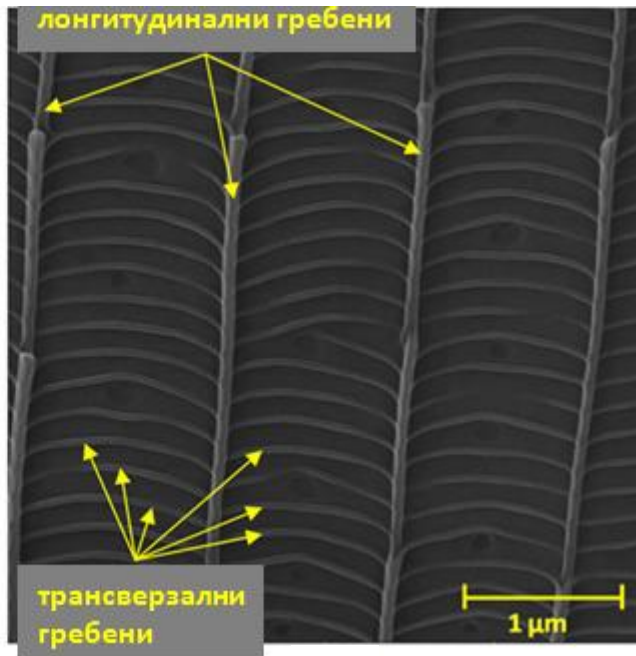
(a)



(б)



(в)



(г)

Слика 1.8. Електронски микрографи, љуспице мољца *Cydalima perspectalis* (у нашим крајевима познатог под називом шимширов мољац). Планарни 2Д систем са периодичношћу у правцу x и y осе.

Велики број откривених дифракционих решетки у природи је пронађен у перју птица. Ове наноструктуре су изграђене од цилиндричних гранула меланина распоређених у матрици од кератина. Дакле меланин и кератин су основне компоненте које овде обезбеђују периодичну варијацију индекса преламања. Меланин је назив групе пигмената браон или тамне боје који су

саставни део великог броја организама. Постоји 5 основних типова меланина [71]. Најчешћи је еумеланин који се јавља у два облика – браон и црни еумеланин. Меланин интензивно апсорбује УВ радијацију, а има значајну апсорпцију и у оптичком делу спектра. Он такође дисипира 99,9% апсорбоване УВ радијације [72]. Кератин је протеин и кључни састојак човекове косе и ноктију, перја птица, канци различитих животиња итд. Меланинске грануле могу бити на правилан начин распоређене у кератинској матрици, формирајући тако дифракциону решеку. Дифракција светлости која се одиграва на оваквим структурама је одговорна за обојеност пауновог перја. Код појединих организама димензије меланинских гранула (најчешће нешто краће од 800 nm) омогућавају Тиндалово расејање светлости на њима [75].

Пауново перје је један од најпознатијих примера структурне обојености у живом свету. Прво научно запажање оптике пауновог перја вероватно потиче од Исака Њутна који је у 18.-ом веку закључио да рефлексија светлости са пауновог перја показује значајну сличност са рефлексијом светлости са танких филмова [5]. Почетком 20.-ог века, Мејсон [73, 74] је истраживао обојеност перја многих птица и закључио да је та обојеност веома слична иридесцентним бојама танких филмова. Касније, истраживања уз помоћ електронске микроскопије су открила овакве фотонске нано-структуре у перју појединих врста птица: колибрија [75], свраке [76] итд. 2Д периодична сунђераста нано-структура је такође откривена код многих других птица и анализирана 2Д Фуријеовим трансформом [77-80].

До сада су у природи откривене хексагоналне [81, 82], правоугаоне [84, 75] и квадратне дифракционе решетке [83]. Решетке хексагоналног уређења су, осим код инсеката, откривене и код појединих водених организама [81, 84], као и код копнених сисара [85].

Тродимензионе (3Д) природне фотонске наноструктуре

Фотонски кристали су у различитим формама проучавани још од 1887. године [86], али термин *фотонски кристал* први пут је употребљен готово 100 година касније – када су објављена два пионирска рада на ту тему [87, 88]. Од тада, они су били предмет опсежних експерименталних и теоријских истраживања због својих погодних карактеристика [89-92].

Фотонски кристали су материјали који имају периодичну промену индекса преламања у три просторне димензије, и код којих је период промене индекса преламања упоредив са таласном дужином светлости [93, 94]. Периодична варијација индекса преламања утиче на простирање светлости кроз фотонски кристал на исти начин као што периодична варијација потенцијала утиче на пропагацију електрона кроз полупроводник. Кристална решетка полупроводника узокује постојање и одређује особине електронске забрањене зоне, док начин на који се индекс преламања мења у фотонским кристалу одређује особине фотонске забрањене зоне – оптичког еквивалента електронске забрањене зоне.

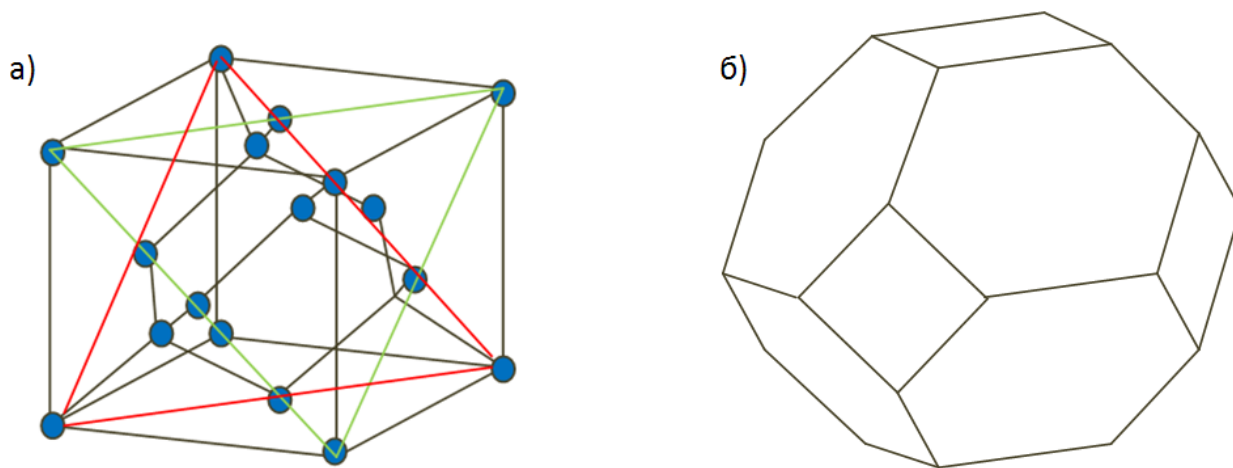
Фотонска забрањена зона је скуп фреквенција на којима је забрањено простирање светлости кроз фотонски кристал и због тога светлост на овим фреквенцијама бива рефлектована са фотонског кристала [93]. Постоје потпуна и делимична забрањена зона. Када је пропагација радијације забрањена за било који правац и поларизацију упадне светлости, забрањена зона је потпуна. Код делимичне забрањене зоне светлост може да се простира кроз фотонски кристал у одређеним правцима и за поједина поларизациона стања.

Постојање 3Д фотонских забрањених зона у периодичним структурама је предложио Јаблоневич 1987 [87], један век пошто је Рејлеј описао 1Д фотонску забрањену зону [96]. Ово је енергијски интервал у коме оптички модови, спонтана емисија, и флукуације нулте - тачке нису присутни [103]. Поједине оптичке примене захтевају забрањену зону која је широка и потпуна у одређеном спектралном опсегу [93, 97], а понекад је потребно и да фотонски кристал буде релативно великих физичких димензија [98]. Потпуна фотонска 3Д забрањена зона је изузетно важна за контролу светлост – материја интеракције и за многобројне примене: оптички и опто-електронски уређаји који раде на радио и оптичким фреквенцијама [93], високо – ефикасне соларне ћелије [99], контролисање локалне густине фотонских стања са циљем сузбијања спонтане емисије флуорофора [100-102], интерференциони рефлектори [94]...Да би фотонски кристали имали потпуну фотонску забрањену зону они морају имати велики контраст у индексу преламања између периодично постављених материјала који их сачињавају [93]. Ова особина је најважнија за фотонске кристале али има велику цену: ограничена величина узорка, скупа техника производње, потреба за материјалима ултра - високог индекса преламања, нанометраска резолуција (у производњи). Потпуне фотонске забрањене зоне највеће ширине су предвиђене за све потпуно-диелектричне 3Д фотонске кристале са структуром дијаманта [93]. Из тог разлога, ово је једна од најатрактивнијих структура за истраживање. Састоји се од две адекватно преклапајуће површински – центриране кубне Бравеове решетке [104].

Структура дијаманта има приближно сферичну прву Брилионову зону [105], слика 1.9. Генерално, површине прве Брилионове зоне задовољавају Брегов закон и због тога апроксимативно одређују таласну дужину максимума рефлектоване светлости или, прецизније, централну таласну дужину фотонске забрањене зоне [106]. Прва Брилионова зона представља примитивну ћелију 3Д фотонског кристала у инверзном простору и због тога је директно повезана са симетријом јединичне ћелије у основном простору [93]. Фотонски кристал са структуром дијаманта има површински центрирану кубну јединичну ћелију у реалном простору и због тога површине његове прве Брилионове зоне формирају окрњени октаедар који поседује осам хексагоналних и шест мањих квадратних површина са просторно – центрираном кубном симетријом.

Производња 3Д фотонских кристала са структуром дијаманта је веома компликована и неусавршена, али алтернативе се могу пронаћи у природи. На пример, комплексни 3Д распоред ваздушних шупљина и хитина у спољашњем омотачу тврдокрилца *Entimus imperialis* формира 3Д фотонски кристал са структуром дијаманта [107] и због тога представља идеалан модел за конструисање материјала са широком потпуном фотонском забрањеном зоном који рефлектује у видљивој области спектра.

Галуша и сарадници [92] су предложили коришћење кутикуларних структура врста *Papilionidae* и *Lycaenidae* као модела за производњу фотонских кристала са потпуном фотонском забрањеном зоном у оптичком делу спектра. Предлаже се и наношење материјала који има већи индекс преламања од хитина на овај биолошки модел што би довело до ширења потпуне фотонске забрањене зоне. Постојање оваквих природних фотонских кристала који су оперативни у оптичком делу спектра је веома значајно јер отвара могућности и за производњу напредних оптичких материјала путем имитирања (биомиметике) природних материјала [108].



Слика 1.9. а) елементарна ћелија дијаманта; б) прва Брилионова зона елементарне ћелије дијаманта

Многе примене фотонских кристала су на таласним дужинама у видљивом и ИЦ (инфрацрвеном) делу спектра. Због тога је веома важно, са становишта примена, откривање природних фотонских кристала са широком потпуном фотонском забрањеном зоном у видљивом или ИЦ делу спектра, који су погодни за масовну производњу.

У природним фотонским системима периодичност се може постићи специфичном запреминском структуром - такви системи се састоје од само једног материјала (нпр. хитин) који је испуњен одговарајућим шупљинама. Шупљине су испуњене ваздухом, па је он компонента која заједно са примарним материјалом омогућава периодичну модулацију индекса преламања и резултујуће оптичке ефекте. Међутим, постоје и структуре које комбинују два (или више) различита биолошка материјала (на пример, кератин и меланин код птица, гуанин и цитоплазма код риба) и на тај начин обезбеђују поменути периодичност. Постоје структуре које поред два различита биолошка материјала имају и ваздушне шупљине обезбеђујући тако још сложеније оптичке ефекте (код птица – меланин, кератин и ваздушни канали).

3Д фотонски кристали откривени у спољашњем омотачу инсеката су у потпуности изграђени од хитина испуњеног ваздушним шупљинама, и могу да имају различите структуре: структура минерала опала [109] и инверзна структура опала [110], жиرويدни хирални кристали [111-113], кристали са структуром дијаманта [114-117], фотонски кристали са тетрадарском структуром [93, 118]. Хитински фотонски кристали, откривени у спољашњем омотачу инсеката, у интеракцији са упадном светлошћу производе низ оптичких ефеката: иридесценција, угловно независна рефлексија, циркуларни дихроизам, поинтилистичко мешање таласних дужина [119]...

Термин поинтилизам је преузет из истоименог правца у сликарству, где се од мноштва малих области велике спектралне чистоће формира слика [120]. Поинтилистичко мешање таласних дужина у оптици је појава карактеристична за материјале који се састоје од великог броја насумично оријентисаних области – домена, који имају веома уређену структуру. Због уређене периодичне структуре, у овим областима долази до интерференције упадне светлости па се материјал састоји од великог броја области са високим интензитетом спектрално ускопојасне рефлексије, тзв. „интерференционих центара“. Интензитет и спектрални опсег рефлексије се разликују за различите интерференционе центре, услед њихове различите

оријентације у односу на детектор. Када се овакав материјал посматра, у оку долази до мешања таласних дужина рефлектованих са различитих интерференционих центара, што материјалу даје загасит, мат изглед. На пример, љуспице тврдокрилца *Pachyrrhynchus congestus pavonius* (Heller 1921) су по својој структури 3Д фотонски поликристали густо-пакованог хексагоналног уређења, веома слично структури минерала опала [121]. Овај природни фотонски кристал се састоји од великог броја различито и насумично оријентисаних кристалних домена - монокристала. Сваки монокристал има веома уређену, правилну кристалну решетку која приликом интеракције са упадном светлошћу показује иридесценцију - узак рефлексциони максимум високе амплитуде са јаком угаоном зависношћу од таласне дужине. Међутим, пошто се љуспица састоји од великог броја насумично оријентисаних монокристала, њихове појединачне рефлексије се сабирају што резултира значајним спектралним ширењем рефлексивног спектра уз задржавање његове високе амплитуде, и значајно смањење његове угаоне зависности. Овде дакле говоримо о феномену високе уређености на малом растојању и неуређености на великом растојању („short range order - long range disorder effect“). Донекле слично као код широко-појасних вишеслојних рефлектора, оптичка функција је елиминисање иридесценције уз задржавање високе амплитуде рефлексије. Код *Pachyrrhynchus* тврдокрилца монокристали у његовим љуспицама се састоје од правилно распоређених хитинских сфера (200 - 250 nm полупречника). Структура инверзна овој, сферичне шупљине у хитинској матрици, производи исти оптички ефекат. Галуша и сарадници [92] су овакву структуру описали као „хексагонално распоређени ваздушни цилиндри“. Код појединих инсеката, да би се смањио интензитет рефлектованог сигнала, високо уређена поликристална структура се појављује у комбинацији са неуређеним расејавајућим структурама, које интензивну рефлексију са поликристала расејавају у ширем просторном углу и тако смањују интензитет рефлексије у појединачним правцима. Биолошка функција оваквих оптичких механизма је најчешће камуфлажа.

1.2.2. Хиралне наноструктуре биолошког порекла

У природи су откривени и оптички активни рефлектори који утичу на стање поларизације упадне светлости – тз. хирални вишеслојни рефлектори. Хиралност је особина асиметричности материјала (или његове унутрашње структуре). Објекат је хиралан уколико не може бити мапиран на своју огледалску слику произвољним бројем ротација и транслагација [122]. Хиралност се дакле, може схватити као одсуство огледалске симетрије. Хирални кристали различито реагују на различита поларизациона стања упадне светлости. За њих су карактеристичне појаве као што су: ротација равни поларизације линеарно поларизоване светлости (појава позната под називом оптичка активност), линеарни и циркуларни дихроизам. Циркуларни дихроизам је појава која означава апсорпцију циркуларно поларизованог таласа једне оријентације и трансмисију (као и рефлексију) циркуларно поларизованог таласа супротне оријентације. Дакле, ако се лево циркуларно поларизован талас апсорбује, онда десно циркуларно поларизован талас може да се креће кроз материјал и да се рефлектује се њега. Узрок ове појаве је хирална микроструктура материјала.

Природни хитински хирални материјали, који су саставни делови тела појединих инсеката, су изложени упадној, неполаризованој Сунчевој светлости. Оваква, неполаризована светлост, може се приказати преко једнаких доприноса лево и десно кружно поларизоване светлости. Једна од ове две компоненте, чија је ротација електричног поља иста као оријентација хиралних структура, доводи до осциловања електронског омотача молекула и бива мање или више (у зависности од односа фреквенције електро-магнетне радијације и природне фреквенције осциловања електронског омотача датог молекула) апсорбована у материјалу, док се друга компонента неометано креће кроз хирални кристал и бива апсорбована по изласку из њега у унутрашњим органима инсекта [155]. Међутим, један део ове компоненте се такође и рефлектује са спољашњег хиралног омотача па је једна од оптичких особина оваквих материјала рефлексија циркуларно поларизоване светлости. Показано је да ови инсекти имају вид осетљив на циркуларну поларизацију светлости па се сматра да је примарна биолошка функција оваквих рефлектора сигнализација. У спољашњем хитинском омотачу појединих инсеката налазе се шупљине испуњене ваздухом. На свакој граничној површини хитин-ваздух долази до рефлексије и, ако су хитински и ваздушни слојеви адекватно распоређени и имају адекватне дебљине, долази до конструктивне интерференције парцијално рефлектованих таласа. Хитински слојеви могу да имају хиралну структуру услед чега се у рефлектованој светлости поред иридесценције уочавају и различити поларизациони ефекти (на пример, иридесцентна, угловно-зависна, циркуларно поларизована рефлексија) [123-126].

Хирални вишеслојни рефлектори су откривени код одређеног броја инсеката, углавном тврдокрилаца [127-140]. На пример, истраживање оптичких особина иридесцентног спољашњег омотача тврдокрилца *Plusiotis boucardi* показало је да спољашњи омотач има специфичну наноструктуру која одређује таласну дужину и поларизацију рефлектоване светлости [132].

Овај инсект се такође одликује и специфичном рефлексијом у широком просторном углу, која настаје због текстурисаности површине његовог спољашњег омотача. Ова особина је аналогна рефлексији светлости са низа сребрних сферних конкавних микро-огледала сличних димензија која су развијена за примене у фотоници [141]. Уколико се на овакав низ микро-огледала усмери сноп колимисане светлости, светлост се рефлектује у различитим правцима који зависе од тачке на закривљеној површини на коју светлост пада. Ово се такође дешава на конкавним удубљењима на елитри поменутог инсекта. Елитра је модификован предњи пар крила појединих редова инсеката (највећим делом тврдокрилаца), који представља својеврстан тврди оклоп. У овом случају дубинска микроструктура додатно доприноси комплексности рефлексије обезбеђујући зависност рефлексије од таласне дужине упадне светлости. Репликацијом овакве структуре могу се произвести хирална микро-огледала са ускопојасном рефлексијом која би омогућила контролу кружно-поларизоване светлости у различитим оптичким применама [132].

1.2.3. Неуређене природне фотонске наноструктуре

Оптичка широкопојасна рефлексивност

Интензивна бела боја на деловима тела различитих организама и биљака је структурна. У питању је некохерентно, дифузно и у свим правцима истоветно расејање свих таласних дужина из оптичког дела спектра које човек перцепира као белу боју. Овакво расејање се може објаснити Миевом теоријом, а настаје приликом интеракције светлости са специфичним, веома неуређеним нано-структурама које се најчешће састоје од мреже влакана одговарајућих димензија, уз одсуство апсорбујућих пигмената.

Вукушић и сарадници [142, 143] истраживали су изузетно интензивну широко-појасну рефлексiju тврдокрилца *Cyphochilus* spp. Откривено је да је су узрок овакве рефлексije љуспице микрометарских димензија које се налазе на површини тела овог инсекта. Љуспице целом својом запремином имају аморфну структуру – састоје се од неуређене мреже хитинских влакана чије су димензије оптимизоване за ресејање свих таласних дужина из оптичког дела спектра. Са становишта оптике, ове љуспице су широко-појасни дифузни рефлектор за оптички део спектра. Оно што је посебно фасцинантно и занимљиво са становишта примена је веома мала дебљина ових оптичких елемената којима се постиже интензивно расејање. Наиме, љуспице су дебеле само око 5 μm . Упоредивањем са синтетичким белим или сребрним материјалима које је човек направио, долази се до закључка да ове љуспице представљају знатно ефикаснији широко-појасни дифузни рефлектор. Веома сличне структуре су откривене и код других инсеката, као што је на пример вилински коњиц *Calopteryx splendens* (Harris, 1780). Овај инсект на својим крилима поседује светле и тамне регионе који су структурно идентичне високо-расејавајуће структуре, при чему тамни региони имају велику концентрацију апсорбујућег пигмента, слика 1.10.

Квалитет широкопојасне рефлексije (у даљем тексту: белине) и сјаја (интензитет рефлектоване оптичке радијације) љуспица тврдокрилца *Cyphochilus* spp је квантификован у складу са Интернационалном организацијом за стандардизацију (ISO). Белина и сјај су основне колориметријске карактеристике објеката. Колориметрија је наука која описује и квантификује човекову перцепцију боје [144]. Квалитет белине је квантификован у складу са ISO 11475, а квалитет сјаја у складу са ISO 2470 стандардом, употребом D65 осветљавача у фотоспектрометру калибрисаном у складу са ISO/IR3 стандардом. Белина и сјај су дефинисани су на следећи начин:

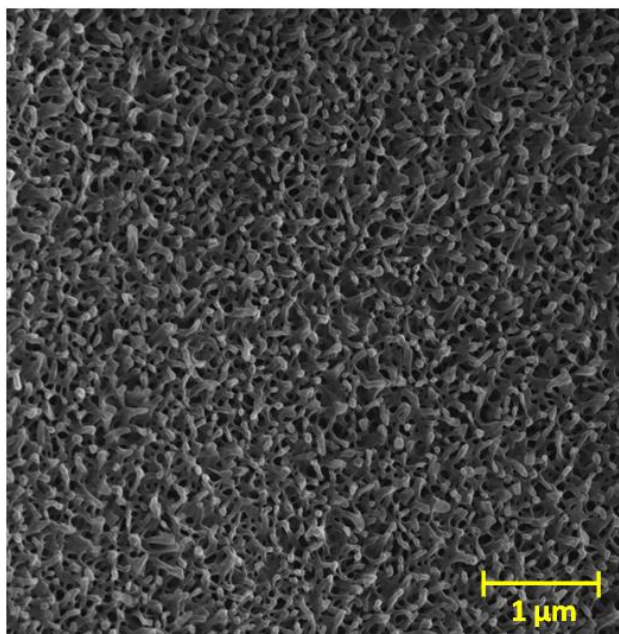
$$W_{CIE} = Y + 800(x_0 - x) + 1700(y_0 - y) \quad (1.6)$$

где је W_{CIE} белина, тј. оптичка широкопојасна рефлексивност објекта, Y је његов сјај, а x, y и x_0, y_0 су координате хроматичности објекта и осветљавача, респективно, у CIE 1964 простору боја (у Материјалима и Методама је дат опис колориметрије и CIE простора боја) [145, 146]. Сјај Y дефинисан је на следећи начин:

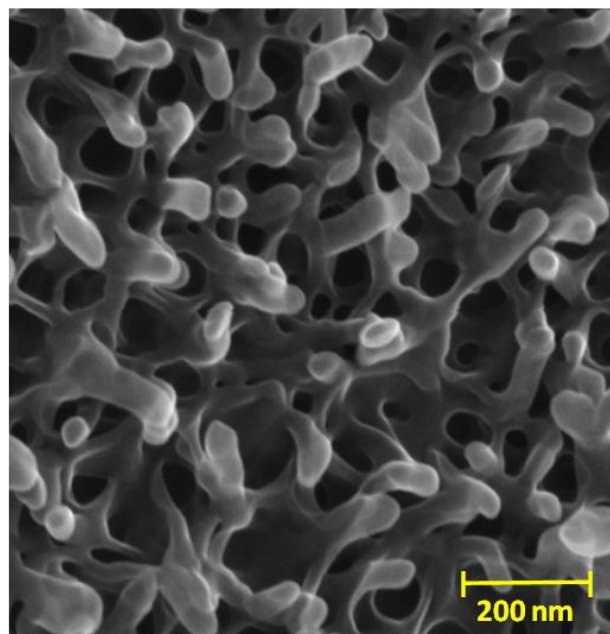
$$Y = 100 \frac{\int E_{\lambda} R_{\lambda} \bar{y}_{\lambda} d\lambda}{\int E_{\lambda} \bar{y}_{\lambda} d\lambda} \quad (1.7)$$

где је E_λ функција осветљивача (интензитет електричног поља радијације осветљивача-емитера, на таласној дужини λ), R_λ је рефлексијност посматраног објекта на таласној дужини λ , $\bar{y}_\lambda$ је луминозност на тал. дужини λ [147].

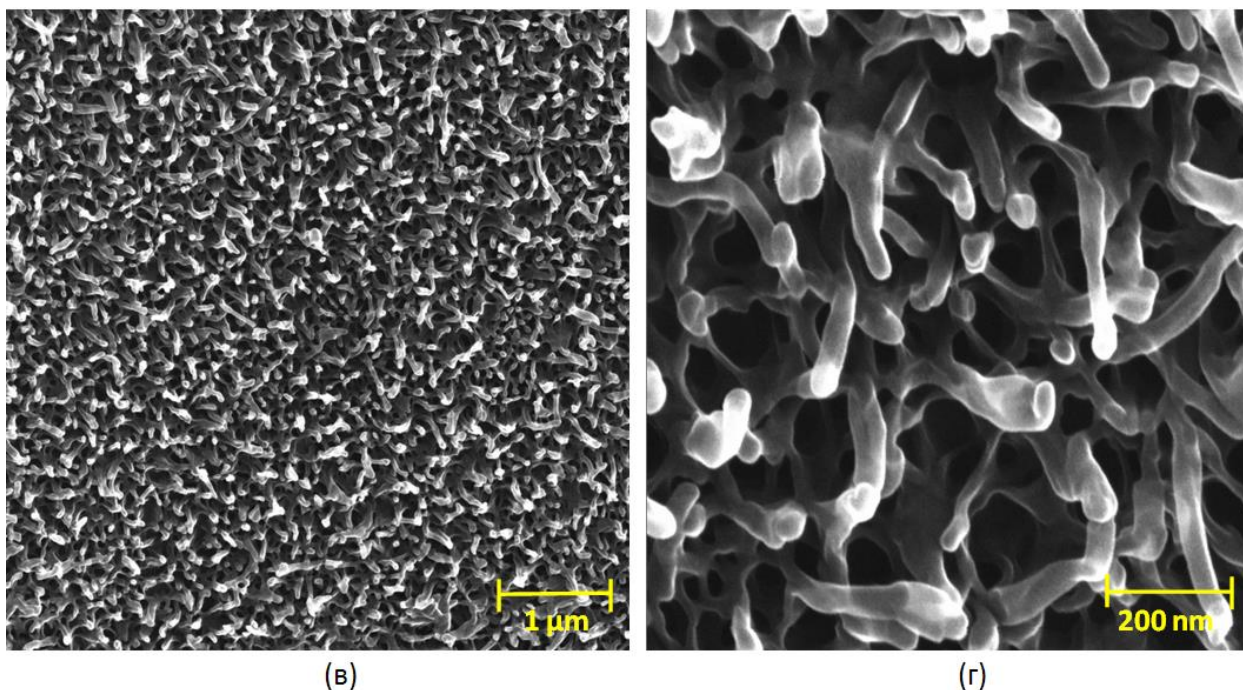
Широкопојасна рефлексијност и сјај просечне љуспице тврдокрилца *Cyphochilus* spp имају вредности 60 и 65, респективно [148] што указује на изузетан мулти-расејавајући (расејање се дешава у широком опсегу таласних дужина) систем чија је дебљина само 5 μm . Нпр. бели папир, који се састоји од насумичне мреже избелених влакана целулозе, је до 25 пута дебљи (дебљина му је око 100 μm [149]) од љуспица овог тврдокрилца а опет производи белу боју која је само 8% квалитетнија (има за 8% већи сјај). У процесу проиводње папира, да би се повећао квалитет његове беле боје, на површину папира се, у форми танког премаза, додају кристали калцијум карбоната и материјали који повећавају одсјај. Међутим, појединачни изоловани слој калцијум карбоната дебљине 5 μm има веома слаб сјај (40 - 50) у поређењу са љуспицама бубе а транспарентност му је толико велика да рачунање белине нема смисла. Даље, белина човекових зуба настаје због мулти-расејања светлости на напакованим кристалима хидрокси-апатита који се простиру до дубине од 2 mm унутар зуба. Њихова максимална природна вредност белине и сјаја су релативно мале: белина просечног човековог зуба је око 40 а ниво сјаја око 53 услед тога што материјали од којих се зуб састоји имају мали контраст у индексу преламања и велику апсорптивност у „плавом“ делу спектра [143].



(a)



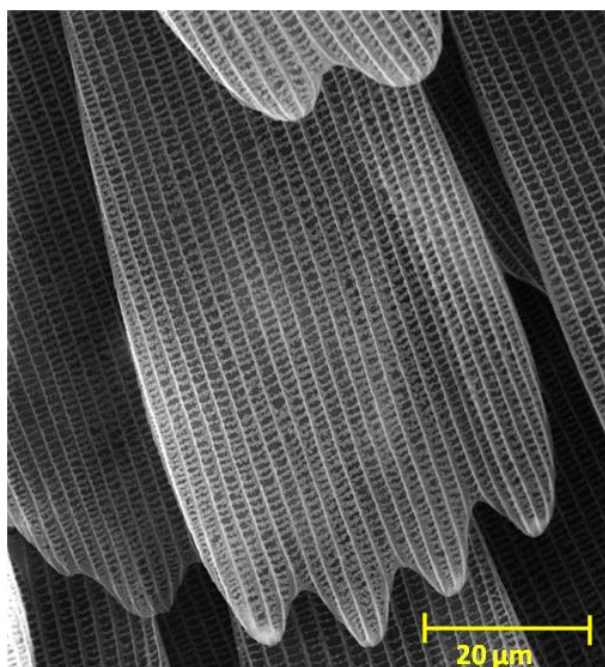
(б)



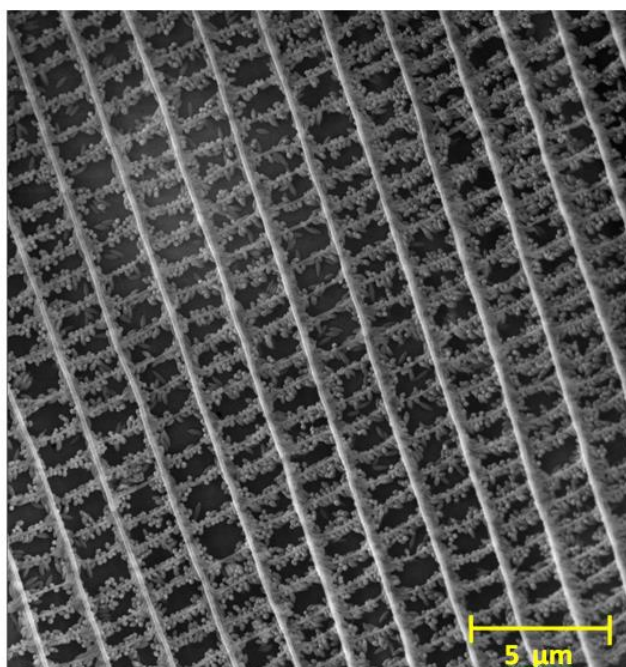
Слика 1.10. Електронски микрографи дорзалне стране љуспица *Calopteryx splendens m* (*Odonata*) инсекта, при великом микроскопском увећању (увећање на сликама а) и в) је 90 000 X, а на сликама б) и г) 216 000 X). Микрографи а) и б) су са светлог дела крила а микрографи в) и г) су са тамног дела крила. У оба случаја је уочљива високо-неуређена структура хитинских влакана чије су димензије оптималне за расејање светлости. Таман регион крила поседује велику концентрацију апсорбујућег пигмента меланина.

У многим оптичким системима, где је квалитет широкопојасне оптичке рефлексије важан, додавање фотонске нано-структуре коју поседују љуспице бубе *Cyphochilus* би довело до тога да бисмо имали незнатно, готово занемарљиво мало повећање у дебљини материјала а значајан пораст у квалитету широкопојасне рефлексије. Овај природни нано-фотонски систем се одликује и значајном хемијском пермеабилношћу и могао би да има примену у белим светлосно емитујућим диодама (ОЛЕД) велике површине и у контроли правца њихове емисије, као и различите друге технолошке примене [150-152].

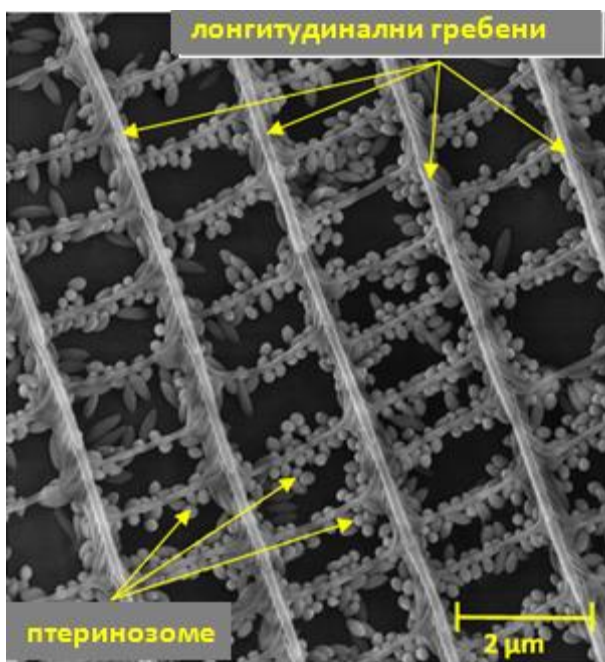
Високо-ефикасни широко-појасни дифузни рефлектори откривени су и код других врста инсеката [153-155], као и код биљака [29], и за све њих је карактеристича неуређена структура. На пример, код лептира *Pieridae* (фамилија лептира која садржи 1100 врста, домаћи назив: белци) постоје насумично распоређене шупље честице елипсоидног облика, ткз. птериномоме, чија је величина (неколико стотина нанометара) оптимизована за дифузно расејање светлости [153]. Оне дају највећи допринос широкопојасној оптичкој рефлексији крила овог лептира (слика 1.11).



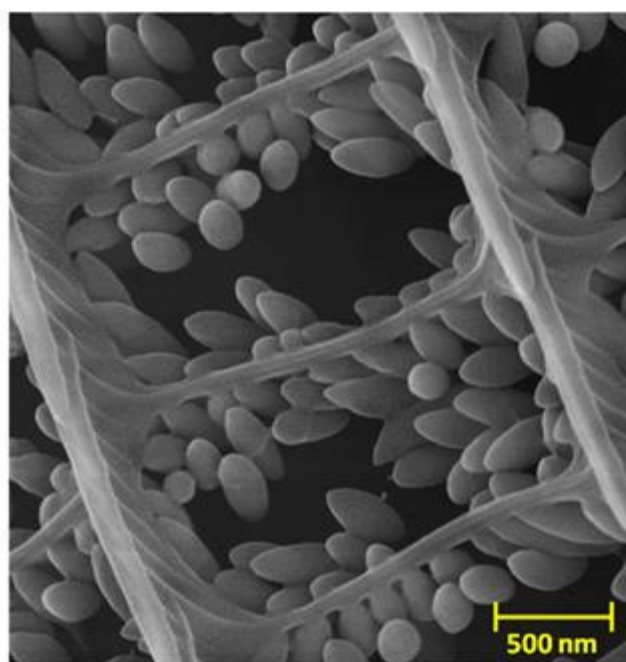
(a)



(б)



(в)



(г)

Слика 1.11. Електронски микрограф љуспице белог лептира *Pieris rapae*. У простору између лонгитудиналних гребена уочава се велики број насумично распоређених шупљих гранула – птеринозома (пречника неколико стотина нанометара) које омогућавају интензивно расејање радијације из оптичког дела спектра и омогућавају лептировим крилима његову белу обојеност.

Оптичка широкопојасна апсорптивност

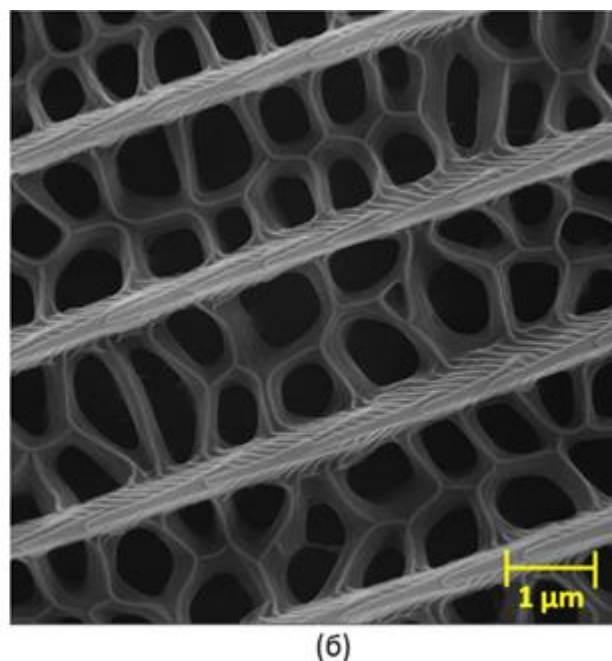
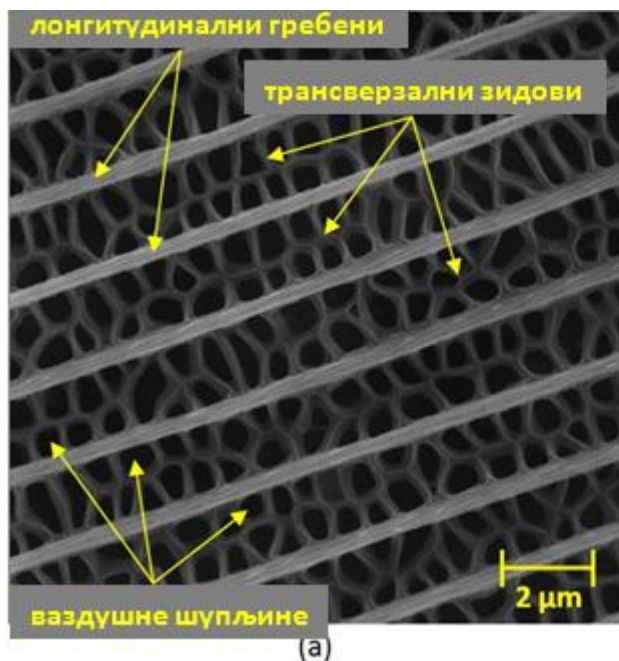
Широкопојасна апсорптивност, карактеристична за поједине природне материјале, је углавном објашњавана великом концентрацијом апсорбујућих пигмената. Међутим, у новије време је показано да поред апсорбујућих пигмената, и сложене нано-структуре значајно доприносе великој апсорптивности. Постоје природни оптички системи чија нано-структурисаност значајно повећава њихову апсорпцију. Њихова основна карактеристика је високо неуређена структура у којој су густо распоређени апсорбујући пигменти. Оптичка функција нано-структуре је расејање светлости и повећање времена боравка фотона у нано-структури услед чега се повећава вероватноћа да ће фотон наићи на пигмент и бити апсорбован. Поред оваквих, запреминских неуређених структура, постоје и површинске неуређене структуре. То су храпаве граничне површине између ваздуха и биолошког материјала (а то је хитин, код инсеката). На оваквој граничној површини хитин-ваздух долази до расејања упадне светлости чији један део пролази кроз овакву храпаву граничну површину, доспева у хитински слој и проводи унутар овог слоја више времена (средње време живота фотона је дуже) него у случају равне граничне површине, јер се фотони у просеку крећу дужом путањом (унутар хитинског слоја). Дакле, светлост има тенденцију да буде заробљена унутар хитинског слоја, слично као код текстурираних соларних ћелија [157]. Јаблонович је показао да када радијација пада на оптичке, транспарентне танке филмове са неравним површинама, као поседица дифузног расејања радијације са овакве површине у материјал, долази од пораста интензитета радијације унутар материјала за фактор $2n^2$, где је n индекс преламања материјала, и као последица повећања овог „локалног“ интензитета електро-магнетне радијације долази до повећања апсорпције за фактор $4n^2$ [158]. При томе, геометријске карактеристике храпаве површине нису важне, докле год површина има довољан ниво храпавости. До ових резултата дошао је статистичким приступом али је показао и да се исти резултат може добити и применом геометријске оптике уколико се поштују њена поједина ограничења. Ова теорија је превасходно развијена са циљем повећања ефикасности соларних ћелија заменом равних граничних површина силиконских танких слојева унутар ћелија храпавим површинама [158]. Међутим, теорија објашњава читав низ појава и у биофотоници [95].

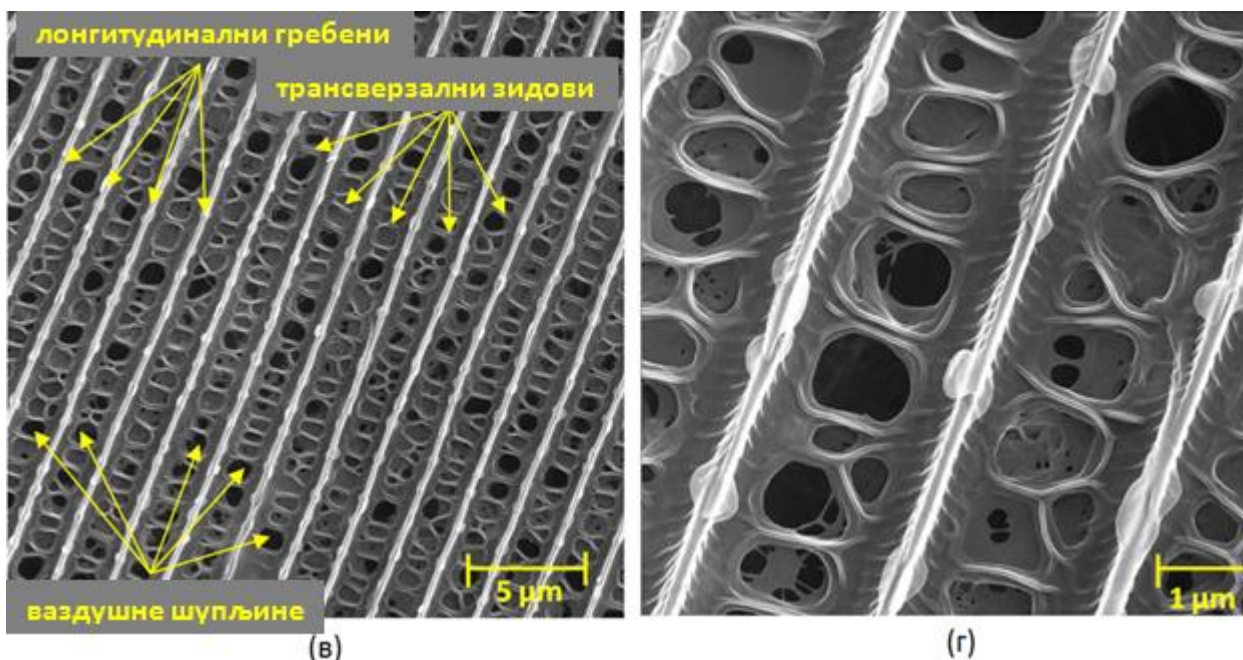
Један од примера запреминске неуређене биофотонске структуре је густа, неуређена мрежа апсорбујућих влакана. Поједини инсекти на површинским деловима тела (крила, елитра...) имају, из биолошких разлога, високо-специјализоване нано-структуре чија је оптичка функција иридесценција – генерисање високо амплитудске и спектрално уско-појасне рефлексије која, у зависности од осталих карактеристика нано-структуре, може али и не мора да показује угаону зависност. Апсорпција у површинским структурама је занемарљива и таласне дужине које се не рефлектују су трансмитоване дубље у тело инсекта. Испод слоја високо-рефлексивних нано-структура – љуспица, налази се слој тзв. тамних љуспица. Тамне љуспице су оптички елементи специјализовани за максималну апсорпцију одређених таласних дужина – апсорпција се максимизира њиховом нано-структуром (запреминска неуређена мрежа хитинских влакана нанометарског пречника, на којој се светлост интензивно расејава), унутар које се налазе апсорбујући пигменти (најчешће меланин). Дакле у питању су веома ефикасни широко-појасни апсорбери. Када слој тамних љуспица не би постојао, овај оптички систем би давао веома другачији одзив – таласне дужине које се апсорбују унутар тамних љуспица биле би расејане на унутрашњим деловима тела инсекта па би један део те радијације био враћен у спољашњу средину кроз горњи слој високо-рефлексивних љуспица. Рефлексиони спектар би био значајно проширен и овај оптички систем више не би представљао уско-појасни

рефлексиони филтер. На пример, Вукушић и сарадници су показали да веома тамним зонама на крилима *Papilio ulysses* лептира значајно доприносе љуспице високо специјализоване за апсорпцију светлости (слика 1.12) [156]. Ово истраживање је показало повезаност између структуре љуспица и високе оптичке апсорптивности, и како се адекватном нано-структуром љуспица значајно повећава ефикасност апсорпције.

Материјали велике апсорптивности су свеprisутни у живом свету. Могу имати различите биолошке функције. Нпр. контролисана апсорпција Сунчеве радијације је главни метод за терморегулацију код многих инсеката [159]. С обзиром да терморегулацију одређују закони апсорпције и емисије црног тела [24], квалитет апсорпције одређује температуру крила и тела инсекта. Поред утицаја на терморегулацију, апсорпција је веома важна и за изглед. На изглед многих интензивно обојених инсеката веома утичу тамне регије које се налазе око обојених. Нејасан прелаз између црних и обојених делова чини инсекта мање уочљивим за предаторе [160].

Оваква ултра-црна боја је технолошки јако значајна за оптичке инструменте (минимизација нежељене, паразитске рефлексије) а има и многе друге технолошке примене. У скорије време, имитирањем биофотонских система, произведене су нетранспарентне синтетичке површине које апсорбују 99,6 % упадне светлости [161].





Слика 1.12. Електронски микрографи: „Структурно црно“, лептир *Papilio ulysses*, а) и в) – електронски микрографи љуспица са црног и сивог региона крила, респективно. Између лонгитудиналних гребена, уочава се неуређен распоред зидова чија је оптичка функција расејање надоласеће радијације, и по том основу повећање времена боравка фотона унутар љуспице чиме се повећава вероватноћа за апсорпцију фотона од стране пигмената. „Црне“ љуспице имају мрежу веће густине што резултира интензивнијом апсорпцијом светлости. На микрографима б) и г) су приказане увећане зоне са микрографа а) и в), респективно.

1.3. Флуоресценција и природне наноструктуре

Флуоресценција означава екситацију атома или молекула апсорпцијом фотона одређене таласне дужине, а затим деекситацију на другој таласној дужини. Апсорпцијом фотона молекула прелази у побуђено стање и флуоресценција настаје уколико се повратак молекула у основно стање одиграва синглет – синглет електронском релаксацијом. Типично време живота побуђеног стања молекула (што одговара флуоресцентном одговору молекула у функцији времена) је реда величине наносекунди. Уколико се прелазак молекула из побуђеног у основно стање одиграва триплет – триплет електронском релаксацијом, та појава се назива фосфоресценција и типично време живота побуђеног триплетног стања молекула је реда величине микросекунди или дуже. У природи постоје молекули, флуоресцентни пигменти, који апсорбују радијацију из одређеног спектралног опсега и приликом релаксације емитују радијацију из неког другог дела спектра. Човек перцепира материјале богате оваквим пигментима као обојене, при чему боја зависи од емисионог флуоресцентног спектра пигмента.

Флуоресценција је веома присутна у живом свету. Досадашња истраживања показују да је код неких организама она само нуспроизвод структуре пигмената, а код неких има одређену биолошку функцију. На пример, папагај *Melopsittacus undulatus* има флуоресцентно перје. Показано је да ова флуоресценција има јасну биолошку функцију тј. да служи као сигнал у доба парења [162]. Биохемијски процес у коме настају флуоресцентни пигменти је веома комплексан и биолошки захтеван (што значи да у процесу формирања флуоресцентних пигмента организам

троши доста енергије и осталих ресурса). Из тог разлога, немају све јединке ове врсте пигменте а и оне које их поседују, не поседују их у једнаким количинама, па је присуство овог пигмента (које се детектује његовом флуоресценцијом) показатељ индивидуалног квалитета јединке. Флуоресцентно перје је откривено и код других врста птица [163-166], а флуоресценција је откривена и код инсеката [167], зглавкара [168]...

Ако се молекул пигмента налази у нано-структурисаном материјалу (при чему материјал има периодичну промену индекса преламања у једној или више просторних димензија), флуоресцентне особине пигмента могу бити веома измењене. Материјал – фотонски кристал може да утиче на време флуоресценције и на правац емитовања флуоресцентне светлости. Ако се таласна дужина максимума флуоресценције налази у забрањеној зони фотонског кристала онда долази до значајног повећања времена флуоресценције. Пошто фотонски кристал мења локалну густину оптичких стања, флуоресценција је сузбијена у једном правцу али је зато поспешена у другим правцима па се на овакав начин постиже и контрола правца флуоресценције – просторног угла флуоресценције. Овакве појаве су откривене у природи, код појединих организама, код којих се флуоресцентни пигменти налазе распоређени у нано-структурисаним биофотонским материјалима. На пример Вукушић и сарадници су описали природан фотонски систем у коме се налазе и пигменти чије су флуоресцентне особине веома измењене услед фотонске нано-структуре [167]. У питању су љуспице лептира *Swallowtail* (*Papilio*) које су по својој структури квази-периодични 2Д фотонски кристали.

Истраживања флуоресценције у биофотоници, а поготову модификоване и контролисане флуоресценције (у смислу контроле времена и правца-просторног угла флуоресценције) имају значајне технолошке примене. На пример, код појединих оптичких емитера као што су флуоресцентне светлосно-емитујуће диоде, велика количина светлости остаје заробљена у њиховој унутрашњости што значајно смањује њихову ефикасност. У скоријој прошлости развијени су ефикаснији уређаји који су нано-структурисани - користе 2Д фотонске кристале у сврху ефикасније екстракције светлости из уређаја а такође користе и Брегове рефлекторе за контролу правца емитовања флуоресцентне светлости, по узору на природне биофотонске системе [167].

2. Материјали и методе

2.1. Експерименталне методи и уређаји

2.1.1. Оптичка микроанализа

За оптичку микроскопску анализу хитинских објеката природног порекла коришћени су следећи оптички микроскопи:

Стерео микроскоп (STEBА600, Colo Lab Experts, Словенија) са максималним увећањем 180X, објективом 20X, 0.35 NA, помоћним објективом 2X, радним растојањем 100 mm. Микроскоп може да ради у рефлексном и трансмисионом моду.

Тринокуларни микроскоп (MET104, Colo Lab Experts, Словенија), максимално увећање 400X. Микроскоп поседује поларизациони мод. Објективи: Plan Achromatic POL Polarizing 10X, 0.25 NA, 20X, 0.4 NA, 40X, 0.65 NA.

Рефлексни и трансмисиони спектри хитинских наноструктура и макроскопских хитинских објеката измерени су оптичким фибер спектрометром (Ocean Optics, HR2000CG-UV-NIR) са пречником фибера од 400 μm . Као извор светлости је коришћена халогена лампа. Спектри су калибрисани помоћу стандардне беле површине.

2.1.2. Сканирајућа електронска микроскопија

Сканирајући електронски микроскоп (СЕМ) се користи за микроскопско снимање и карактеризацију површине узорака на великом увећању. Када се електронски сноп усмери на узорак, услед сударних процеса долази до емисије валентних електрона из електронског омотача атома који се налазе унутар узорка (ови електрони се у електронској микроскопији називају секундарни електрони). Поред секундарних електрона, приликом интеракције електронског снопа и узорка долази до емисије и Auger-ових електрона, X-зрака, катодолуминисценције. Ови процеси се такође могу користити за карактеризацију узорака, али у истраживањима у оквиру ове дисертације су претежно коришћени секундарни електрони. Топографија површине узорка се снима сканирањем површине узорка електронским снопом и аквизицијом слике добијене детектовањем секундарних електрона.

Основне компоненте стандардног СЕМ-а су електронско-оптички систем који управља електронским снопом, веома прецизан хуз координатни сто на који се монтира узорак, детектор секундарних електрона, јединица за приказ слике, операциони систем за извођење различитих операција и систем за обезбеђивање високог вакуума. Електронско-оптички систем се састоји од извора електрона, кондензаторског електронског сочива и објектива који производе електронски сноп и сканирајућих система који контролишу позицију електронског снопа на површини узорка [214]. Електронско-оптички систем и узорак се налазе у вакууму ($10^{-3} - 10^{-4}$ Pa). Извор

електрона је танко волфрамско влакно (пречника $\sim 0.1 \text{ nm}$). Загревањем овог влакна (до температуре од 2800 K) долази до емисије електрона (термо-електронска емисија). За формирање и контролу електронског снопа СЕМ користи магнетна сочива – пропуштањем електричне струје кроз (металне) калемове долази до формирања ротационо-симетричног електричног поља које функционише као сочиво за електронски сноп.

У оквиру ове дисертације, коришћен је „*field emission*“ СЕМ (FE – SEM, MIRA 3, TESCAN), са максималном резолуцијом од 1 nm . Пошто је пречник електронског снопа ~ 1000 пута мањи у односу на стандардан електронски микроскоп, квалитет слике је значајно бољи. Због овако уског електронског снопа „*field emission*“ микроскоп захтева високу вредност вакуума у колони ($10^{-5} - 10^{-6} \text{ Pa}$). Напон између катоде и аноде се може подешавати у опсегу $0.5 - 30 \text{ kV}$.

„*Double transfer*“ метод

Овај метод је развијен у оквиру експерименталног дела ове тезе, за припрему узорака за електронску микроскопију. Припрема узорака игра важну улогу у сканирајућој електронској микроскопији и од квалитета припреме узорака зависи квалитет осликавања узорка и максимално увећање. Метод је такође коришћен и у реализацији варијабилног оптичког елемента описаног у трећем делу ове дисертације.

Биофотонски објекти истраживани у оквиру ове дисертације су хитинске љуспице инсеката које су у природном стању кумулативно распоређене на деловима тела инсеката. Да би се испитале њихове оптичке и термалне особине и креирали одговарајући теоријски модели, потребно је имати детаљне податке о наноструктури објеката, и у ову сврху се користи сканирајућа електронска микроскопија. За анализу на СЕМ-у, објекте је потребно изоловати и при том не нарушити њихову нано-структуру, што није једноставно, имајући у виду да су ови објекти веома осетљиви.

„*Double transfer*“ метод омогућава да објекти у неизмењом стању и оријентацији (онако како су оријентисани на деловима тела инсеката) буду припремљени за анализу сканирајућом електронском микроскопијом.

Метод се састоји од одвајања љуспице са крила инсекта применом лепљиве траке мале површинске енергије после чега се љуспица пребацује директним контактом на лепљиву траку веће површинске енергије (нпр. то може бити лепљива карбонска трака која се у електронској микроскопији стандардно користи за фиксацију узорака). На овај начин, задржава се оригинална оријентација љуспице (иста оријентација као на крилу инсекта) а, ако се процедура обави пажљиво, очувана је наноструктура љуспице.

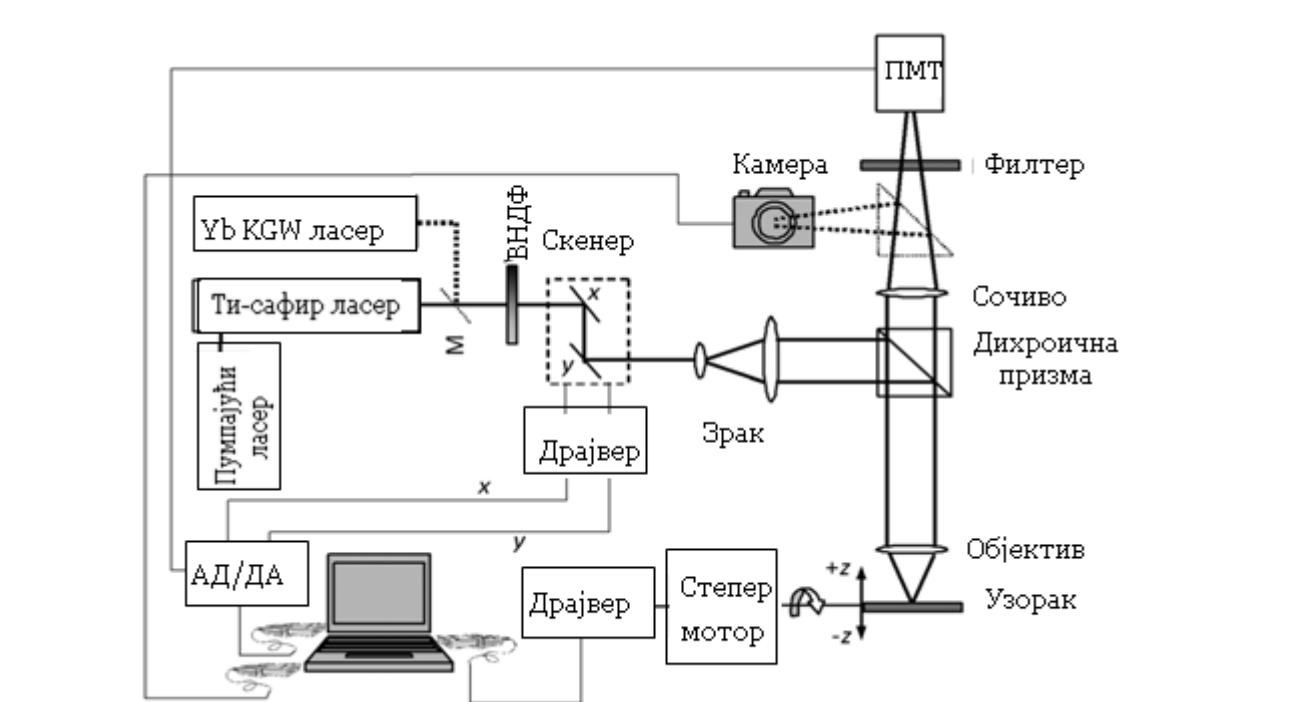
2.1.3. Нелинеарни ласерски микроскоп

Ласер креира високо-кохерентно зрачење које по изласку из ласера улази у оптички систем у коме се могу додатно подешавати поједини параметри ласерског зрачења (снага, поларизација...). Ласерски сноп затим доспева у микроскоп где је усмерен на узорак. Услед интеракције ласерског снопа и узорка долази до мулти-фотонских процеса (у оквиру ове дисертације истраживани су дво-фотонски побуђена флуоресценција и други хармоник хитина). Радијација која настаје као резултат ових процеса долази на детектор (фотомултипликатор) и рачунар затим обрађује сигнал и приказује слику узорка на екрану. Основне компоненте нелинеарног ласерског микроскопа су: побудни ласер, микроскоп, и детекторско – рачунарска систем. Истраживања у оквиру ове дисертације су урађена на нелинеарном ласерском микроскопу који је конструисан у Центру за Фотонику, у Институту за Физику у Београду. Шематски приказ је дат на слици 2.1.

Два фемто-секундна ласера су коришћена за генерисање дво-фотонски побуђене флуоресценције и другог хармоника на узорку. Један од њих је титанијум-сафир ласер Coherent Mira 900-F који је побуђиван Coherent Verdi V10 ласером који производи зрачење на 532 nm, снаге 10 W. Овај титанијум-сафирни ласер производи фемто-секундне импулсе (време трајања импулса је 160 fs) при репетицији од 76 MHz, у спектралном опсегу од 700-1000 nm. Други ласер који је коришћен за нелинеарну побуду узорака је Yb KGW фемто-секундни ласер (Time-Bandwidth Products AG, Yb GLX) који генерише зрачење на 1040 nm. Галванометарска сканирајућа огледала (Cambridge Technologies, 6215H) се користе за рестерско сканирање узорака ласерским снопом. Сноп је адекватно проширен да би попунио улазну пупилу микроскопског објектива. Дихроично огледало (Thorlabs, DMSP805) које пропушта таласне дужине < 805 nm а рефлектује таласне дужине > 805 nm усмерава ласерски сноп ка микроскопском објективу. Део операционог опсега побудног Титанијум - сафир ласера није могао да буде искоришћен због граничне таласне дужине дихроичног огледала. За детекцију флуоресценције и другог хармоника са узорка користи се фотомултипликатор (RCA, PF1006) у комбинацији са одговарајућим блокирајућим филтером. За детекцију дво-фотонски побуђене флуоресценције са узорка користи се и додатни филтер да би се редуковала паразитска ласерска светлост која пролази кроз дихроично огледало. Са фотомултипликатора сигнал се уводи у аквизициону карту (NI USB-6351, 1 Msample/s, National Instruments). Оптички део микроскопа је базиран на модификованом JENAVAL микроскопу (произвођач Carl Zeiss). Узорак се поставља на механичко постоље чије се померање контролише степер - мотором. Степер - мотор омогућава вертикално померање постоља (z-оса на слици) са кораком од 2 μm . Покретна призма омогућава скретање ласерског снопа и осликавање узорка у светлом пољу помоћу Canon EOS 50D дигиталне камере. Рачунар контролише цео инструмент и обраду слике. Vol View 3.4 слободан софтвер (Kitware, Inc.) омогућава формирање 3Д модела узорака на основу низа 2Д попречних пресека (тзв. „слајсова“), употребом алгоритма пројекције максималног интензитета или запреминским изоштравањем („*volume rendering*“).

За микроскоп су коришћени Carl Zeiss објективи: Planachromat, 40X, 0.65 NA (са видним пољем од 815 μm) и LD LCI Planapochromat 25X, 0.8 NA вода/глицерин имерзиони објектив. За узорке већих димензија коришћен је Carl Zeiss Planachromat, 25X, 0.5 NA, са видним пољем од 1200 μm . Попречна и осна резолуција нелинеарног микроскопа су одређене употребом флуоресцентних нанометаских гранула (Life Technologies, TetraSpeckTM флуоресцентне микросфере). За микроскопски објектив са увеличањем 40X, измерена је латерална резолуција

Корисноћа 2100 mm.



Слика 2.1. Шема нелинеарног сканирајућег ласерског микроскопа. ПМТ- фотомултипликатор који се користи за детекцију дво-фотонски побуђене флуоресценције и другог хармоника ВНДФ – варијабилни неутрални филтер за подешавање снаге ласерске радијације, АД/ДА – дигитална аквизициона карта, М – огледало које се уноси у систем због коришћења побудног ласерског снопа на 1040 nm из Yb KGW ласера. Путања ласерског снопа је приказано дебљаном линијом, електрични каблови су приказани танком линијом.

2.1.4. Streak камера

Streak камера је уређај који служи за временску и спектралну карактерizaciju ултра брзи светлосних импулса. Ова врста камере има најбољу резолуцију у поређењу са осталим уређајима који мере ултра брзе импулсе.

Светлост пролази кроз процеп на улазу у камеру и затим бива фокусирана на фото-катоду. Светлост се на фото-катоди конвертује у одрђени број електрона који је пропорционалан интензитету упадне светлости. Затим, електрони пролазе кроз пар убрзавајућих електрода, где долази до повећања њихове брзине и после тога доспевају на фосфоресцентни екран. До електрони, који су првобитно „настали“ интеракцијом светлосних импулса и фото-катоде пролазе кроз пар убрзавајућих електрода, на електроде се примењује висок напон који је временски синхронизован са упадним светлосним импулсима. Ово узрокује просторно размештање електрона. Током овог процеса, електрони, који доспевају у простор између убрзавајућих електрода у различитим временским тренуцима, излазе одатле под различитим угловима у вертикалном правцу и доспевају на мултипликатор електрона. Овде бивају

умножени неколико хиљада пута и затим доспевају на фосфорни екран, где се поново конвертују у светлост. На фосфоресцентном екрану, слике које одговарају различитим упадним светлосним импулсима се налазе на различитим вертикалним позицијама. Дакле, вертикална оса фосфоресцентног екрана служи као временска оса за разликовање оптичких импулса у времену. Сјај (*brightness*) различитих слика на фосфоресцентном екрану је пропорционалан интензитету одговарајућих улазних оптичких импулса.

На овај начин, Streak камера конвертује временску и просторну варијацију интензитета светлости у одговарајућу расподелу тачака различитог сјаја на фосфорном екрану. Информација о интензитету упадне светлости је корелисана са сјајем слике на фосфорном екрану, а време доласка (на Streak камеру) и позиција упадне светлости је корелисана са локацијом слике на фосфорном екрану.

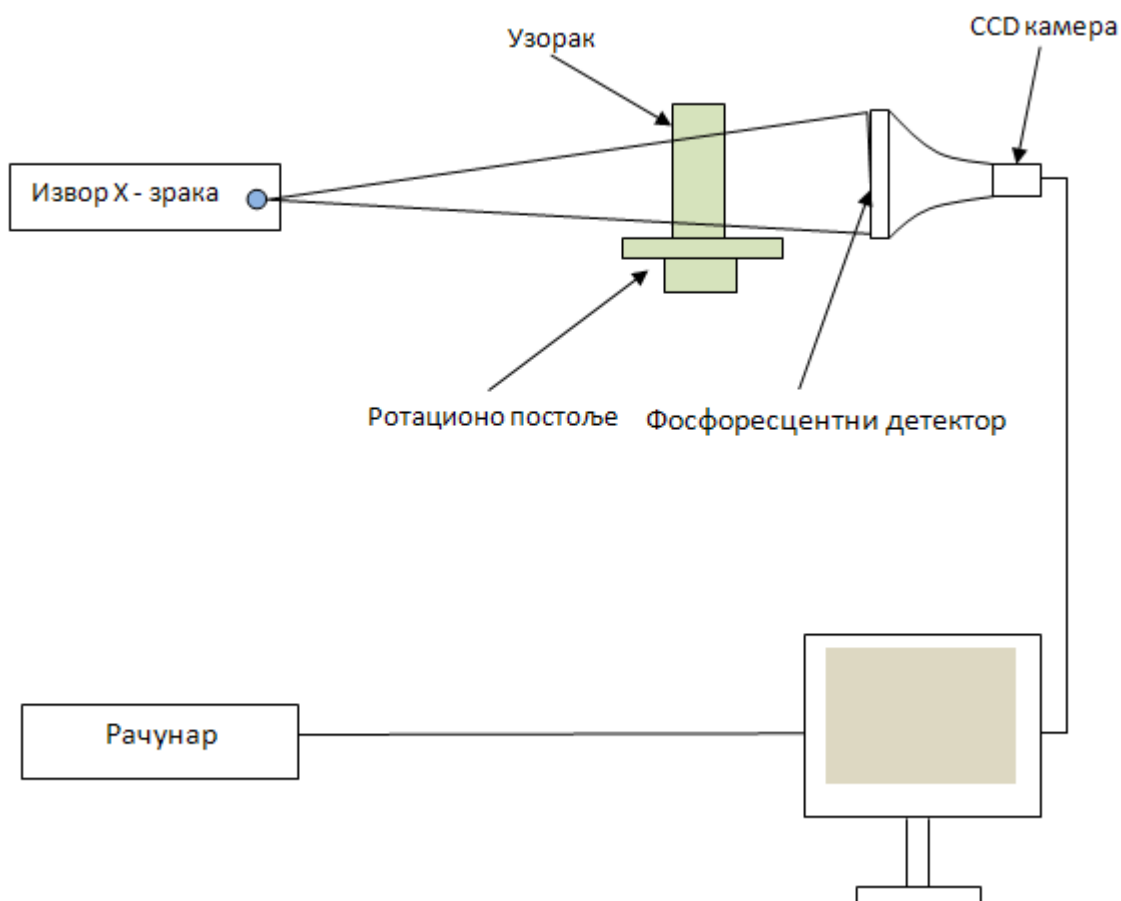
У комбинацији са спектроскопом Streak камера може да мери временску промену интензитета светлосног импулса на одређеним таласним дужинама (*time resolved spectroscopy*). На овај начин је, у оквиру ове дисертације, показано постојање другог хармоника хитина (поглавље 3.3). У комбинацији са одговарајућим оптичким системом могуће је мерити и временску зависност упадне светлости у зависности од позиције (*time and space-resolved measurement*).

2.1.5. Компјутеризована микро – томографија

Компјутеризована микро-томографија је 3Д осликавајућа техника у којој се користе X-зраци за осликавање унутрашњости узорка [335]. Уз специфичне уређаје може се постићи резолуција од ~ 100 nm. Микро-томографијом се може направити серија 2Д планарних снимака унутрашњости објекта, и обрадом ових снимака добијају се 3Д модели ових објеката. У питању је неинванзивна техника која пружа информацију о унутрашњости објекта.

X-зраци пролазе кроз посматрани објекат и доспевају на детектор X-зрака, где бивају детектовани као 2Д пројекција („радиограф“). Узорак се тада заротира за веома мали угао ($< 1^\circ$) и у тој позицији се такође детектује 2Д пројекција X-зрака. Овај процес се понавља до укупног угла ротације од 180° или 360° , у зависности од врсте узорка. Применом Радонове трансформације добијају се фотографије различитих попречних пресека објекта. Од овог низа фотографија се може формирати 3Д модел узорка, а од њега се може направити физички модел узорка методом штампања.

Ова техника се може користити за проучавање унутрашње структуре узорака, без потребе за сечењем. Ово омогућава проучавање порозности, физичке дебљине, запремине, густине, анализу дефеката, одређивање величине честица унутар узорка, оријентацију влакана...



Слика 5.4. Скица експерименталне поставке за компјутерску микро-томографију

2.1.6. Радијативна термографија

За експерименталну карактеризацију термалних особина биофотонских структура користе се термометријске методе. Једна од тих метода је термално осликавање, које омогућавају савремене ИЦ камере [291]. Ово је неинванзивна и бесконтактна техника са применама у различитим областима науке [321]. ИЦ камере могу да детектују различите делове ИЦ спектра. Термалне камере су оне које могу да детектују радијацију у опсегу 8 – 10 μm , а неке су оперативне у опсегу 3 – 5 μm . Ови спектрални опсези одговарају, апроксимативно, термалним атмосферским прозорима (то су спектрални опсези у којима атмосферски гасови показују веома малу апсорпцију инфрацрвене радијације [322]).

Теоријска основа радијационе термографије је Планков закон зрачења црног тела који показује колики је интензитет електро-магнетног зрачења које емитује црно тело, у зависности од температуре црног тела и таласне дужине радијације (формула 2.1).

$$I(\lambda, T) = \frac{2hc^2}{\lambda^5} \frac{1}{e^{\frac{hc}{\lambda kT}} - 1} \quad (2.1)$$

где је I – интензитет електро-магнетне радијације таласне дужине λ коју црно тело на температури T , по јединици површине и у јединичном просторном углу, λ - таласна дужина емитоване радијације, T - температура црног тела, h - Планкова константа, c - брзина светлости, k - Болцманова константа.

Реални материјали емитују само део енергије коју зрачи црно тело, што је описано емисивношћу материјала ε . Емисивност је коефицијент којим се мери способност материјала да емитује енергију у форми термалне радијације. По дефиницији, за црно тело у термалној равнотежи важи $\varepsilon = 1$. Извор који има нижу емисивност се назива сиво тело [323]. Укупна енергија коју емитује сиво тело је једнака производу његове емисивности и енергије коју емитује црно тело на истој температури.

Сви објекти међусобно размењују топлотну енергију помоћу три механизма: конвекција, кондукција и радијација. ИЦ камера (позната и под називом термална камера) детектује и мери ИЦ радијацију коју посматрани објекат емитује, и конвертује ову радијацију у „термалну“ фотографију објекта на којој је приказана температура на површини објекта. ИЦ камера се састоји од оптичког система који фокусира ИЦ радијацију на детекторски чип (низ сензора) који се састоји од хиљада детекторских пиксела распоређених у растер. Сваки пиксел реагује на фокусирану ИЦ радијацију и производи електрични сигнал. Процесор ИЦ камере преузима сигнале од свих пиксела и математичким прорачуном креира термалну фотографију објекта. На термалној фотографији, различите температуре су приказане различитим бојама. За разлику од оптичких камера, сочива код ИЦ камере не могу да буду направљена од стакла зато што стакло има веома малу трансмисију у области $\lambda \sim > 4 \mu\text{m}$. Зато се користе други материјали: германијум, калцијум флуорид, кристални силицијум...Изузев калцијум флуорида, ови материјали имају висок индекс преламања (нпр, за германијум $n = 4$) што доводи до интензивне рефлексије ($> 30\%$ упадне радијације се рефлектује). Из овог разлога већина сочива за ИЦ камере има антирефлексионе слојеве.

У оквиру ове дисертације, емисија термалне радијације је анализирана следећим ИЦ камерама чији операциони опсези одговарају блиском ($\lambda = 3\text{-}5 \mu\text{m}$) и далеком ($\lambda = 8\text{-}14 \mu\text{m}$) атмосферском прозору:

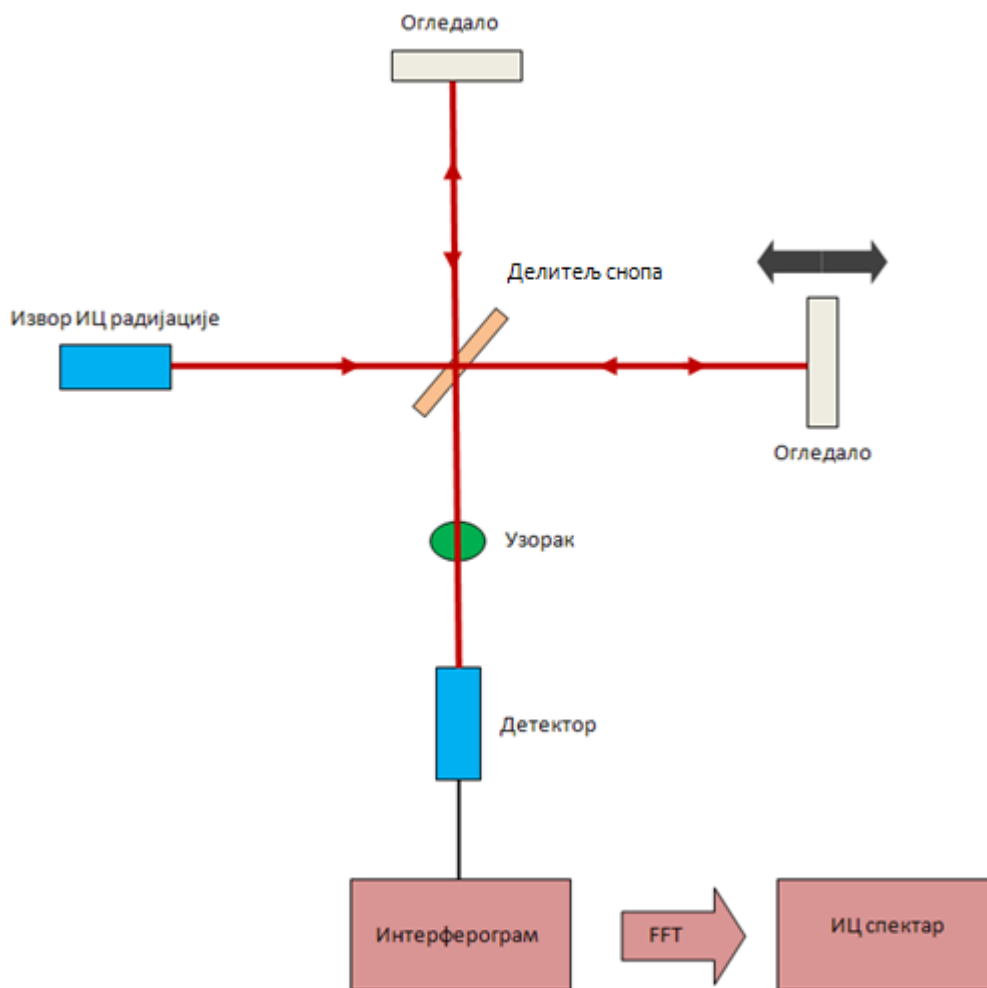
- 1) FLIR A65, USA, 640 x 512 пиксела, термална резолуција 50 mK, спектрални опсег 7.5-13 μm
- 2) FLIR SC7200, 320 x 256 пиксела, термална резолуција 20 mK, спектрални опсег 1.5 – 5.1 μm
- 3) FLIR SC620, 640 x 480 пиксела, термална резолуција 40 mK, спектрални опсег 7.5 – 13 μm

Због малих димензија инсекта, камера је позиционирана што је могуће ближе инсекту (на растојање 10-20 cm), а повремено је коришћено и додатно сочиво за додатно увећање. У оваквим условима постаје изражен „Narcissus“ ефекат (радијација коју емитује сама камера). Због тога су анализиране биофотонске структуре постављене изван термалног снопа који излази из објектива камере. Остатак камере је био прекривен алуминијумском фолијом.

Као референца за мерење термалне емисивности коришћена је алуминијумска шупљина на коју је нанесен апсорбујући материјал. Његова апсорптивност је теоријски израчуната и добијена је вредност од 0.996 [292].

2.1.7. Фурије трансформ инфра-црвена спектроскопија („FTIR“)

Када се инфрацрвена радијација усмери на узорак, један део те радијације се апсорбује у узорку, а други део пролази кроз узорак. FTIR је техника која захваљујући интеракцији ИЦ радијације са узорком омогућава мерење ИЦ спектра узорка [293]. FTIR спектрометар се састоји од извора ИЦ радијације, интерферометра, детектора ИЦ радијације, појачавача сигнала и рачунара (слика 2.2). Извор генерише ИЦ радијацију која пада на узорак претходно пролазећи кроз интерферометар са једним помичним огледалом и затим доспева на детектор. У детектору се сигнал појачава и конвертује у дигитални сигнал (интерферограм) аналогно-дигиталним конвертором. ИЦ спектар се добија применом брзог Фуријеовог трансформа на интерферограм [293].



Слика 2.2. Шематски приказ експерименталне поставке за Фурије трансформ инфра-црвену спектроскопију („FTIR“).

FTIR спектроскопија има многобројне примене: користи се у анализи различитих материјала са комплексним хемијским саставом [294-297]. FTIR је универзална алатка за карактеризацију материјала [298, 299] а посебно у идентификацији непознатих материјала [300]. FTIR техника је коришћена у идентификацији супстанци [301] и њихових мешавина [302], и

нечистоћа [303, 304]. Такође и у анализи структурних промена и у контроли процеса производње [304-306, 315], у анализи заразних болести [307-310], за карактеризацију структуре протеина [309]. Затим, у анализи полимера и биополимера: анализа процеса полимеризације, карактеризација структуре полимера, површине полимера, деградације и модификације полимера [309-311], анализа танких филмова [312], контрола квалитета прехранбених производа [313, 314].

FTIR спектар носи информацију о врсти хемијских веза, и о ротационим и вибрационим нивоима у комплексним молекулима [316-318].

FTIR спектроскопија је коришћена у анализи апсорпције инфрацрвеног зрачења сложених хитинских микроструктура инсекта *Rosalia Alpina*. Коришћен је систем Nicolet 6700 FT-IR, Thermo Scientific, USA.

2.1.8. Усаглашавање индекса преламања

У оптици, материјал који се користи у техници усаглашавања индекса преламања је супстанца (најчешће течност или гел) чији се индекс преламања веома мало разликује од индекса преламања неког другог објекта (сочиво, призма...).

У биофотоници, ова техника се користи да би се смањиле Френелове рефлексије на граници два материјала. Ови материјали могу имати сложену микро и нано-структуру која значајно утиче на њихове оптичке особине. Међутим, на оптичке особине материјала такође утичу и концентрација, просторни распоред и врста пигмената, уколико су пигменти присутни у материјалу. У том случају, оптичке особине су последица комбинованог утицаја пигмената присутних у материјалу и нано-структуре материјала. Сузбијањем Френелове рефлексије на граници различитих материјала техника усаглашавања индекса преламања смањује утицај наноструктуре и на тај начин омогућава раздвајање оптичких утицаја наноструктуре и пигмената.

Нано-структурисани биофотонски материјали чије су оптичке и термалне особине истраживане у оквиру ове дисертације се састоје од хитина и шупљина испуњених ваздухом. Пошто су ово структуре отвореног типа, техником усаглашавања индекса преламања се шупљине унутар материјала испуњавају течносту чији је индекс преламања једнак индексу преламања хитина. Овај поступак елиминише преламање и рефлексију светлости на граничним површинама хитин-ваздух и на тај начин омогућава да се елиминише утицај нано-структуре на оптичке особине материјала. На овакав начин се може истражити да ли су у материјалу присутни пигменти и, ако јесу, који је њихов допринос резултујућим оптичким особинама материјала. Процедура се састоји од мерења оптичког рефлексионог спектра истраживаног биофотонског материјала а затим се он ураћа у течност за усаглашавање индекса преламања и поново се мери рефлексиони спектар. У првом случају, ако су у материјалу присутни пигменти, рефлексија настаје комбинованим утицајем пигмената и микроструктуре материјала. У другом случају, поменута течност минимизира утицај микроструктуре (сузбијањем Френелових рефлексија на граничним површинама) па измерени рефлексиони спектар потиче од пигмената. Одузимањем „пигментног“ рефлексионог спектра од укупне рефлексије добија се „структурни“

рефлексионни спектар који је последица интеракције упадне светлости са микро и наноструктуром биофотонског материјала.

2.2. Математичко моделовање

2.2.1. Метод коначних елемената

Метод коначних елемената је нумерички метод за решавање проблема који се могу описати скупом парцијалних диференцијалних једначина. Заснива се на подели моделованог система на већи број мањих, једноставнијих делова, дискретизацијом простора. Ово се постиже креирањем тзв. „мреже“ објекта. Дискретизацијом диференцијалних једначина на целокупну „мрежу“ објекта добија се систем алгебарских једначина. На овај начин, метод апроксимира непознату функцију која описује проблем [319]. Процедура примене овог нумеричког метода се састоји од следећих корака:

- 1) *Дискретизација континуума.* У овој фази, посматрани проблем се дели на већи број елемената. Ови елементи су, због погодности, једноставни геометријски облици (као што су нпр. четвороугао или троугао у случају 2Д моделирања. У 3Д случају, то су призме, тетраедри...). На овај начин, посматрани објекат се трансформише у „мрежу“ (енгл. „mesh“).
- 2) *Избор интерполационих функција.* Интерполационе функције се користе за интерполацију варијабли физичког поља по површини коначних елемената. Најчешће се користе полиноми, где степен полинома зависи од броја чворова додељених елементу.
- 3) *Одређивање особина коначних елемената.* У овој фази се формира матрична једначина за коначни елемент и она повезује нодалне вредности непознате функције (вредности функције у чворовима локалног коначног елемента) са осталим параметрима.
- 4) *Формирање скупа једначина коначних елемената.* Од свих једначина којима се описују сви коначни елементи формира се глобални систем једначина који описује цео проблем. Другим речима, комбинују се једначине свих локалних елемената којима је проблем дискретизован. У овој фази се задају и гранични услови (који се не налазе у једначинама локалних коначних елемената).
- 5) *Решавање глобалног система једначина.* Примењују се директне или итеративне методе. Решења глобалног система једначина су нодалне вредности непознате функције која описује цео проблем.
- 6) *Прорачун додатних резултата.* У многим случајевима потребно је израчунати додатне параметре. На пример, код решавања механичких проблема, поред прорачуна помераја, често је важно израчунати и механичка напрезања.

У оквиру ове дисертације метод коначних елемената је коришћен за анализу простирања упадне термалне ИЦ радијације (у спектралним опсезима који одговарају атмосферским прозорима 3-5 μm и 8-12 μm) кроз хитински, микро-структурисани омотач *Morimus asper funereus* инсекта.

2.2.2. Метод преносне матрице („Transfer matrix method“)

Овај метод се користи у оптици и акустици за анализу простирања електро-магнетних и акустичних таласа у вишеслојним срединама [320]. На пример, овај метод се користи у дизајну анти-рефлексионих слојева и диелектричних огледала.

Рефлексија и трансмисија електро-магнетне радијације на граничној површини између две материјалне средине је описана Френеловим једначинама. Када се материјал састоји од већег броја слојева, онда постоји већи број граничних површина на које радијација наилази (под условом да радијација може да се простире кроз дати материјал). На свакој граничној површини између слојева долази до рефлексије и трансмисије радијације. У зависности од односа између таласне дужине радијације и дужине путање радијације између две узастопне рефлексије, рефлектована радијација (тзв. парцијални рефлектовани таласи) може да интерферира. Укупна, резултујућа рефлексија вишеслојног објекта је збир коначног броја парцијалних рефлексија са свих граничних површина на које је радијација наишла приликом простирања кроз објекат.

Метод преносне матрице се базира на чињеници да, у складу са Максвеловим једначинама, постоје гранични услови за понашање електричног поља на граничној површини између две материјалне средине. Приликом пропагације електро-магнетне радијације кроз вишеслојни материјал, ако је електрично поље познато на улазу у слој, онда поље на излазу из датог слоја, може да буде израчунато једноставном матричном операцијом. Вишеслојни материјал се може приказати преко система матрица, где сваком слоју одговара по једна матрица, и резултујућа рефлексија и трансмисија материјала се одређују множењем матрица појединачних слојева. Ово омогућава да се одреде коефицијенти рефлексије и трансмисије вишеслојног материјала.

У оквиру ове дисертације, метод преносне матрице је коришћен за анализу иридесцентне рефлексије светлости са љуспица лептира *Issoria lathonia*, која је описана у трећем делу дисертације. Метод је претходно модификован применом скаларне теорије површинског расејања, да би се узео у обзир ефекат расејања светлости на неравним површинама.

2.2.3. Ray tracing метод

Ray tracing метод се користи за прорачун путање простирања електро-магнетне радијације и базира се на апроксимацији решења Максвелових једначина која је исправна докле год је таласна дужина радијације много мања од физичких димензија објекта кроз које се радијација простире па се могу занемарити дифракциони ефекти [323]. Дакле, овај метод се заснива на геометријској оптици и Снеловом закону преламања и не може се примењивати на таласне феномене као што су на пример интерференција и дифракција (где фаза електро-магнетне радијације постаје важан параметар). С тим у вези, *Ray tracing* метод представља добру прву апроксимацију путање простирања електро-магнетне радијације кроз материјалну средину која има градијент индекса преламања, различитих апсорпционих особина и која такође садржи и дисконтинуитете у индексу преламања на којима долази до рефлексије. У оваквим условима,

радијација се рефлектује на дисконтинуитетима индекса преламања унутар материјала, или може континуално да мења правац свог простирања (одступање од праволинијске путање).

У оквиру ове дисертације, *Ray tracing* метод је коришћен као прва апроксимација простирања ИЦ радијације (у атмосферским прозорима 3-5 μm и 8-12 μm) кроз спољашњи, микро-структурисани омотач *Morimus asper funereus* инсекта.

2.2.4. Фурије-Мелинова трансформација

Ова трансформација представља комбинацију Фуријеове и Мелинове трансформације, и инваријантна је на транслацију и ротацију. Фуријеов трансформ функције $f(x)$, $x \in R$, дат је следећом једначином:

$$z(w) = \int_{-\infty}^{\infty} f(x) e^{-2\pi i w x} dx \quad (2.2)$$

Модуо Фуријеове трансформације $z(w)$ у било којој тачки w је инваријантан на транслацију функције $f(x)$. Такође, постоји и циркуларна Фуријеова трансформација [241], дефинисана за периодичну функцију $f(r, \theta)$, изражена у поларним координатама r и θ са периодом 2π :

$$f_l(r) = \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} f(r, \theta) e^{-il\theta} d\theta \quad (2.3)$$

Модуо циркуларне трансформације је инваријантан на транслацију функције $f(r, \theta)$, што је у овом случају заправо ротација функције за угао θ .

Мелинова трансформација [243-245] функције $f(x)$, $x \in R$, је дата следећом једначином:

$$z(u) = \int_0^{\infty} f(x) x^{u-1} dx \quad (2.4)$$

где је u комплексан број ($u \in C$). Када је u имагинаран број ($u = iw$), једначина 2.4 постаје [69,73]:

$$z(w) = \int_0^{\infty} f(x) x^{iw-1} dx \quad (2.5)$$

где је $w \in R$. Уколико се у једначини 2.5 изврши замена променљиве x променљивом a тако да важи: $x = e^{-2\pi a}$, ова једначина добија следећи облик:

$$z(w) = \int_0^{\infty} f_1(a) e^{-2\pi i a w} da \quad (2.6)$$

где је $f_1(a) = -2\pi f(e^{-2\pi a})$. Дакле, овакво мапирање координата трансформише Мелинову трансформацију у Фуријеову трансформацију и у овом случају може се рећи да Мелинова трансформација представља Фуријеову трансформацију примењену на експоненцијалној скали [249]. Примена скалирајућег фактора K на функцију f , у случају описаног мапирања координата, резултира транслацијом функције f_1 за вредност пропорционалну $\ln K$. Ово за последицу има инваријантност на транслацију овог облика Мелинове трансформације у тачки w , на основу инваријантности Фуријеове трансформације на транслацију функције f [250, 251]. Мелинова трансформација функције двају променљивих $f(x_1, x_2)$ [233] дат је једначином:

$$z(w_1, w_2) = \int_0^\infty \int_0^\infty f(x_1, x_2) x_1^{iw_1-1} x_2^{iw_2-1} dx_1 dx_2 \quad (2.7)$$

где је $w_1 \in R$ и $w_2 \in R$. Мапирањем координата $x_1 = e^{-2\pi a_1}$, $x_2 = e^{-2\pi a_2}$ поново се добија Фуријеова трансформација. Магнитуда 2Д Мелинове трансформације је дакле инваријантна на скалирање функције f по једној оси.

Нека је $f(r, \theta)$ функција у 2Д равни, изражена у поларним координатама. Ако на њену циркуларну Фуријеову трансформацију применимо Мелинову трансформацију у облику који је дат једначином 2.7, добијамо Фурије-Мелинову трансформацију:

$$z(l, w) = \frac{1}{2\pi} \int_0^\infty \int_0^{2\pi} f(r, \theta) e^{-il\theta} r^{iw-1} d\theta dr \quad (2.8)$$

Логаритамско-поларним мапирањем координата $(r, \theta) \rightarrow (\ln r, \theta)$ ова трансформација добија облик 2Д Фуријеове трансформације. Модуо Фурије-Мелинове трансформације је дакле инваријантан и на ротацију и на транслацију функције [248, 252-255].

У оквиру ове дисертације, Фурије-Мелинова трансформација је коришћена у реализацији технолошке примене оптичких особина љуспица *Issoria lathonia* лептира (поглавље 4, подпоглавље 4.4).

2.3. Алгоритми и софтверски пакети

Алгоритам пројекције максималног интензитета

Алгоритам пројекције максималног интензитета се заснива на пројекцији воксела са највећом вредношћу сигнала, по свакој праволинијској путањи дубинског (вертикалног) сканирања узорка, на 2Д слику [337]. Назив воксел (енгл. *voxel*) је настао комбиновањем две енглеске речи: „*volume*“ и „*element*“ и означава 3Д еквивалент пиксела. Он представља појединачни елемент 3Д матрице која представља дискретизацију простора. Применом алгоритма пројекције максималног интензитета, свака ХУ координата 2Д слике представља пиксел који показује највећу вредност сигнала по Z оси (која одговара датој ХУ координати, тј. у геометријском смислу, пролази кроз тачку са датом ХУ координатом). Овај алгоритам омогућава да се на основу низа 2Д слика (хоризонтални пресеци објекта са константним растојањем између свака 2 узастопна пресека) формира 3Д модел објекта.

У оквиру ове дисертације, алгоритам пројекције максималног интензитета је коришћен у склопу VolView 3.4 софтверског пакета за 3Д визуализацију објеката осликаних на нелинеарном ласерском микроскопу. На тај начин је показана примена нелинеарних оптичких особина хитина (поглавље 3) у високо-квалитетном осликавању објекта биолошког порекла чији је доминантан састојак хитин.

Запремински приказ

Запремински приказ (енгл. *volume rendering*) је назив за методе које се користе у визуализацији и компјутерској графици за приказ 2Д пројекције 3Д објекта (један од тих метода је алгоритам пројекције максималног интензитета, описан на претходној страни). 3Д објекат се осликава употребом скупа 2Д хоризонталних пресека објекта (ткз. „слајсова“, енгл. *slice*). Ово може бити урађено техникама попут компјутеризоване томографије, магнетне резонанце, микротомографије X зрацима. У оквиру ове дисертације су коришћене технике нелинеарне ласерске микроскопије које се заснивају на двофотонски побуђеној флуоресценцији хитина и генерисању другог хармоника. Формирани су 2Д пресеци објекта (нпр. један 2Д пресек за сваки милиметар дуж вертикалне осе објекта) и број пиксела свих осликаних 2Д пресека је константан. Овакав скуп 2Д пресека представља регуларну запреминску решетку где је сваки запремински елемент представљен бројном вредношћу која се добија узорковањем запремине коју дати елемент обухвата.

Да би се реализовала 2Д пројекција 3Д објекта, прво је потребно дефинисати позицију камере (детектора сигнала) у односу на објекат који се осликава. Затим се дефинише непрозирност (величина којом се мери немогућност простирања електро-магнетне радијације кроз елемент запремине, ова величине описује апсорпцију и расејање радијације) и боја сваког воксела употребом *RGBA* трансфер функције (*RGBA* је назив модела који се у компјутерској графици користи за приказ боје и састоји се од 4 канала: *red* (*R*), *green* (*G*), *blue* (*B*) и *alpha* (*A*), где *R*, *G* и *B* канали означавају количину радијације из „црвеног“ ($\lambda \sim 600\text{-}700\text{ nm}$), „зеленог“ ($\lambda \sim 500\text{-}600\text{ nm}$) и „плавог“ појаса ($\lambda \sim 400\text{-}500\text{ nm}$ оптичког дела спектра, а *alpha* канал означава непрозирност пиксела). Ова трансфер функција придружује *RGBA* бројну вредност сваком вокселу. Када је сваком вокселу у 3Д репрезентацији осликаног објекта придружена *RGBA* вредност, употребљава се један од неколико нумеричких метода којима се од овакве 3Д репрезентације објекта креира његова 2Д пројекција.

У оквиру ове дисертације, запреминским приказом су формиран 3Д модели хитинских објеката осликаних на нелинеарном ласерском микроскопу.

„*Focus stacking*“ алгоритам

„*Focus stacking*“ алгоритам, познат и под називима „*focal plane merging*“ и „*z-stacking*“ [210] алгоритам, се користи у дигиталној обради слике. Заснива се на комбиновању неколико фотографија које су снимљене при различитим фокалним растојањима у једну фотографију. На различитим фокалним растојањима различити делови фотографисаног објекта се налазе у фокусу. Овим алгоритмом се најбоље изфокусирани делови фотографија спајају у једну фотографију која онда има већу дубину фокуса од појединачних фотографија од којих је формирана [206, 207].

Алгоритам је коришћен у оквиру *Picolay* слободног софтвера, у четвртом поглављу ове дисертације (под-поглавље 4.4) за квалитетно осликавање хитинских љуспица. Алгоритам је било потербно користити јер су хитинске љуспице у природном стању неравног облика и имају запреминску структуру.

Софтверски пакети

Софтверски пакети који су коришћени у изради ове дисертације: COMSOL, VolView 3.4, Picolay, Blender.

2.4. Колориметрија

Колориметрија описује квантитавну и квалитативну повезаност између расподеле таласних дужина радијације у оптичком делу спектра и човекове физиолошке перцепције боје [219,220]. CIE дијаграм приказује човекову перцепцију спектра светлости на релативно једноставан и визуелно схватљив начин. Њиме се читав комплексни спектар приказује једном тачком. Ово је у већој мери метод упоређивања спектра и доношења квалитативних закључака о њиховој међусобној различитости, него што је егзактан приказ. Овакав приступ, помоћу CIE дијаграма, се користи и за спектралне прорачуне и приказ свих боја на екранима рачунара, мобилних телефона као и код камера и мерних уређаја.

У основи колориметрије су човекови рецептори за вид који могу бити три врсте ћелија које се налазе у очима и свака од ових врста ћелија има максималну осетљивост у одређеном спектралном опсегу из оптичког дела спектра (ти опсези су: 420-440 nm, 530-540 nm, 560-580 nm). Човекова перцепција боје се заснива на комбинованом одговору ових трију врста рецептора на спољашњи надражај (светлост која је емитована из извора или рефлектована са објекта). У математичком смислу, свакој од трију врста ћелија се придружује функција осетљивости која показује колика је осетљивост ћелије за сваку таласну дужину из оптичког дела спектра и одговор човековог видног апарата на спољашњу побуду (тј. боја коју човек региструје посматрајући спољашњи објекат) је дат комбинованим дејством ових трију функција, при чему, ако је позната вредност двају функција осетљивости, онда вредност коју има трећа функција може да буде једнозначно одређена. Из тог разлога, у CIE дијаграму се користе три координате за квантитавно и квалитативно одређивање боје коју просечно људско око детектује: две координате боје x и y које дефинишу спектрални одзив човекових трију рецептора за вид и луминанса Y која се односи на интензитет радијације која доспева у човеков апарат за вид. Ове три координате једнозначно дефинишу тачку на CIE дијаграму и на тај начин се читав комплексни оптички спектар може приказати једном тачком. CIE дијаграм је у истраживањима у оквиру ове дисертације коришћен у приказу и моделовању рефлексионих спектра сложених биофотонских наноструктура – љуспица лептира *Issoria lathonia*.

У наредна три поглавља су представљени научни резултати у оквиру ове дисертације.

3. Нелинеарне оптичке особине хитина

У овом делу истраживања су испитане нелинеарне оптичке особине хемијски пречишћеног хитина и хитинских структура два пећинска инсекта. За хемијски чист хитин, истражене су ефикасност дво-фотонске побуде, флуоресцентни спектар за дво-фотонску побуду, степен фото-избелјивања и поларизациона осетљивост дво-фотонске побуде. Потврђено је генерисање другог хароника. Мерења су извршена на нелинеарном ласерском микроскопу конструисаном у Институту за физику у Београду, Центар за фотонику. Коришћен је комерцијално доступан хитин (поли – N – ацетил – 1,4-β-D-глукопираносамин) добијен из одбачених шкољки ракова (Sigma Aldrich, practical grade powder), без додатног пречишћавања. Резултати су омогућили да се у наредном делу дисертације изврши карактеризација и контролисана модификација оптичких и флуоресцентних особина фотонских структура биолошког порекла.

3.1. Двофотонски побуђена флуоресценција

Двофотонски побуђена флуоресценција означава побуду атома или молекула приближно симултаном (10^{-16} s) апсорпцијом два фотона, а затим релаксацију атома или молекула емисијом фотона на другој таласној дужини [169]. Први фотон побуђује молекул на виртуелно стање док други фотон доводи до прелаза са виртуелног стања на побуђено стање. Било која комбинација два фотона чији је збир енергија једнак разлици енергија основног и побуђеног стања молекула може да изврши двофотонску побуду молекула. Из практичних разлога најчешће се користе фотони једнаких енергија при чему сваки од два фотона има приближно половину енергије и двоструко већу таласну дужину од фотона потребног за једнофотонску побуду датог молекула. На пример, два фотона у црвеном делу спектра (≈ 700 nm) могу да се удруже и да побуде молекул који их апсорбује као да је у питању један фотон у ултраљубичастом делу спектра (≈ 350 nm).

Оптималне таласне дужине за двофотонску побуду не могу се одредити простим скалирањем таласних дужина на којима су максимуми за једнофотонску апсорпцију, јер се квантно механичка селекциона правила разликују за једнофотонску и двофотонску апсорпцију [169-171].

Једначина која описује слабљење интензитета светлосног снопа услед апсорпције, приликом простирања светлости кроз материјал, је:

$$\frac{\partial I}{\partial z} = -\alpha_1 I - \alpha_2 I^2 - \dots - \alpha_n I^n \quad (3.1)$$

где је I интензитет светлости, z је дужина пређеног пута који је светлост прешла у материјалу, α_n је апсорпциони коефицијент за симултану апсорпцију n фотона. У класичним условима осветљења, као што су Сунчева светлост или светлост лампе, само α_1 , коефицијент за апсорпцију једног фотона је незанемарљив, и доминантан процес је једнофотонска апсорпција. Међутим, при већим густинама фотонског флукса, које су могуће са ласерском радијацијом, и остали

коэффициенти постају незанемарљиви и тада до изражаја долазе мултифотонски процеси апсорпције. Апсорпциони коэффициент за симултану апсорпцију 2 фотона је

$$\alpha_2 = \sigma_2 N_0 \quad (3.2)$$

где је σ_2 ефикасни пресек за двофотонску апсорпцију, а N_0 је густина популације молекула у основном стању. Уколико побуђени молекул може само радијативним прелазом (флуоресценцијом) да се врати у основно стање, онда је интензитет двофотонски побуђене флуоресценције једнак:

$$I_{2PEF} = \alpha_2 I^2 = \sigma_2 N_0 I^2 \quad (3.3)$$

Дакле, интензитет двофотонски побуђене флуоресценције се карактерише квадратном зависношћу од интензитета побудне ласерске радијације. У процесу двофотонске побуде флуорофора апсорбује два фотона и прелази из основног у побуђено стање. Пошто су два фотона потребна за сваку двофотонску побуду, вероватноћа да флуорофора апсорбује фотонски пар је пропорционална квадрату интензитета светлости. Из тог разлога, уколико локални фотонски флукс није веома велики, вероватноћа за двофотонску апсорпцију је веома мала. Адекватан фотонски флукс се постиже конценрисањем фотона временски користећи фемтосекундне импулсе и просторно фокусирајући светлост кроз објектив микроскопа. На тај начин се у фокалној запремини постиже довољан број фотона који могу симултано да интерагују са флуорофором и добије се значајна количина двофотонске побуде. Изван фокалне запремине, густина фотона није довољно велика да омогући симултану апсорпцију фотонског пара и не долази до побуде, што је значајна разлика у односу на стандардну конфокалну флуоресцентну микроскопију (која се заснива на једнофотонској побуди узорка).

Вероватноћа за двофотонску апсорпцију од стране молекула је изузетно мала, о томе сведочи следећи пример. При Сунчевој светлости флуоресцентни молекул Родамин Б апсорбује просечно један фотон за једну секунду једнофотонским процесом апсорпције. Међутим, исти молекул апсорбује фотонски пар (процесом двофотонске апсорпције) једном у десет милиона година [169]. Из тог разлога, иако је двофотонску апсорпцију предвидела Maria Göppert - Mayer у својој докторској дисертацији још 1931.-е године [170], први експериментални рад на овом феномену је омогућен тек појавом ласера као извора довољно светлости велике снаге. Данас се углавном импулсни ласери користе за ефикасну двофотонску побуду. Титанијум-сафирни ласер је стандардан избор [171].

Нелинеарна ласерска микроскопија која се заснива на двофотонски побуђеној флуоресценцији има значајне предности у односу на више коришћену конфокалну флуоресцентну микроскопију (која се заснива на једнофотонској побуди молекула):

- већа дубина продирања побудне ласерске радијације због веће таласне дужине и мањег расејања [172, 173]
- ефикаснија детекција флуоресцентног сигнала јер се таласне дужине побуде и сигнала значајно разликују [173-175]
- мање оштећење узорка због ниже енергије побудне радијације [176]
- одсуство паразитске (изван-фокусне) флуоресценције, јер се двофотонска побуда одиграва само у фокалној запремини унутар узорка [174, 177]
- бољи контраст услед смањеног расејања побудне радијације [178]

- нема потребе за употребом више од једног ласера када се ради мулти-модално флуоресцентно осликавање (симултана побуда већег броја флуорофора које имају различит апсорпциони спектар) [179,180]

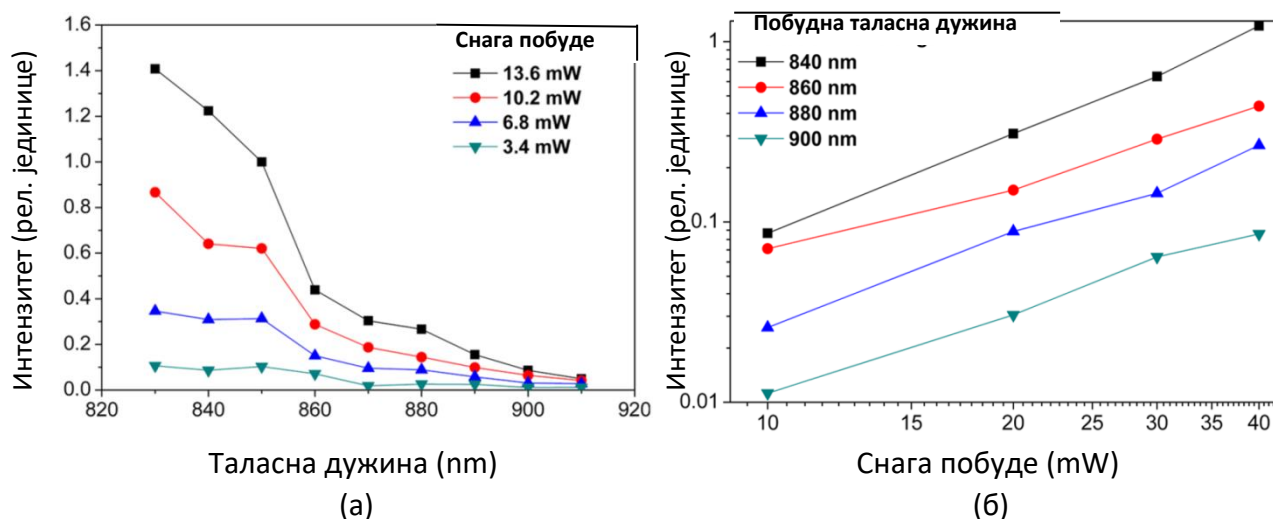
Због ових предности, ова метода има многобројне примене у: медицини (за снимање попречног пресека ћелија) [181, 182], биологији [183, 184], фармацији [185-188], хемији (за одређивање оријентације молекула) [189]... У наставку ове дисертације, биће показане примене у биофотоници, за карактеризацију и контролисану модификацију хитинских структура.

3.2. Двофотонски побуђена флуоресценција хитина

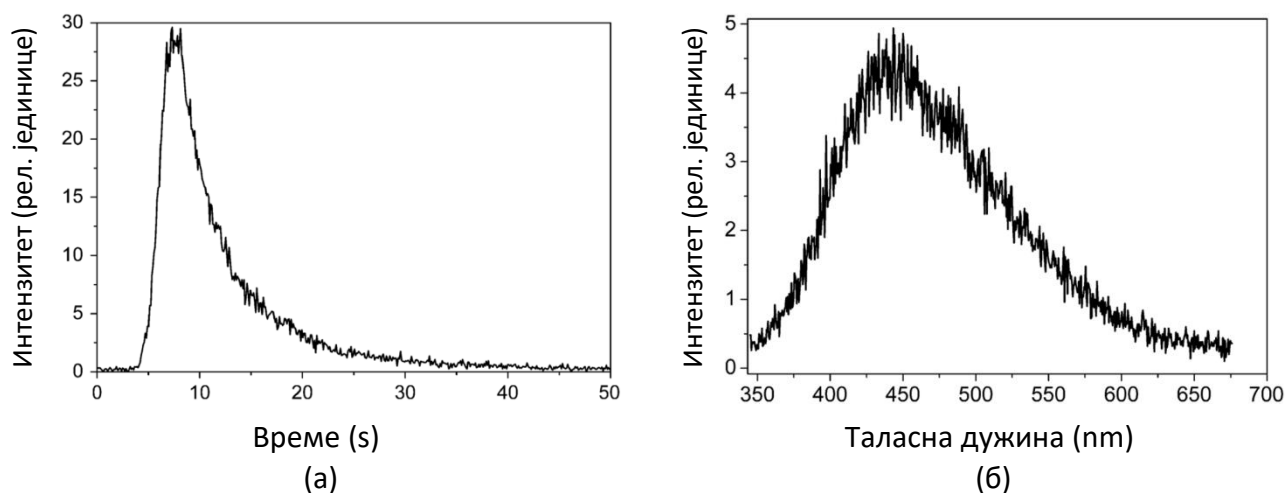
У почетном делу истраживања, измерен је интензитет двофотонски побуђене флуоресценције хитина у функцији таласне дужине (у опсегу 830 – 930 nm) и средње снаге побудног фемтосекундног ласерског зрачења (у опсегу 3,4 – 13,6 mW), добијеног из Ti-Sapphire ласера (Coherent Mira 900-F). Мале вредности снаге су изабране да би се минимизирало фото-оштећење узорка. Резултати показују да интензитет двофотонски побуђене флуоресценције опада са порастом таласне дужине побудне ласерске радијације у поменутом опсегу и да флуоресценција има максималан интензитет када је побудна таласна дужина ~ 830 nm (слика 3.1a).

Зависност интензитета дво-фотонски побуђене флуоресценције од снаге побудног ласерског зрачења је приказана на слици 3.1б. Да би се нагласила квадратна зависност, обе осе су приказане у логаритамској скали. Коефицијент зависности дво-фотонски побуђене флуоресценције од интензитета побудне радијације је 1.88 ± 0.05 . Мало одступање сигнала од строге квадратне зависности објашњава се релативно slabим сигналом и усредњавањем сигнала преко велике површине узорка. При већим интензитетима побуде долази и до већег фотоизбељивања (фотохемијска реакција услед које молекул флуорофоре трајно губи способност флуоресцирања. Ово је изазвано цепањем ковалентних веза и хемијским реакцијама између флуорофоре и околних молекула [324, 325]) што такође доприноси одступању сигнала од строге квадратне зависности.

За мерење једно-фотонски побуђеног флуоресцентног спектра и средњег времена флуоресценције коришћена је једно-фотонска побуда са ОПО („optical parametric oscillator“) - ласера и “streak“ камера (уређај који мери временску и спектралну зависност интензитета ултра – брзих светлосних импулса [190, 336], у Материјалима и Методама дат је детаљан опис уређаја) са спектрографом. Измерен је флуоресцентни одговор чистог хитина у функцији времена (што представља средње време побуђеног стања молекула) и добијена вредност од 5,2 ns (слика 3.2a). Флуоресцентни спектар показује максимум на 440 nm и спектралну ширину од 120 nm (слика 3.2б).

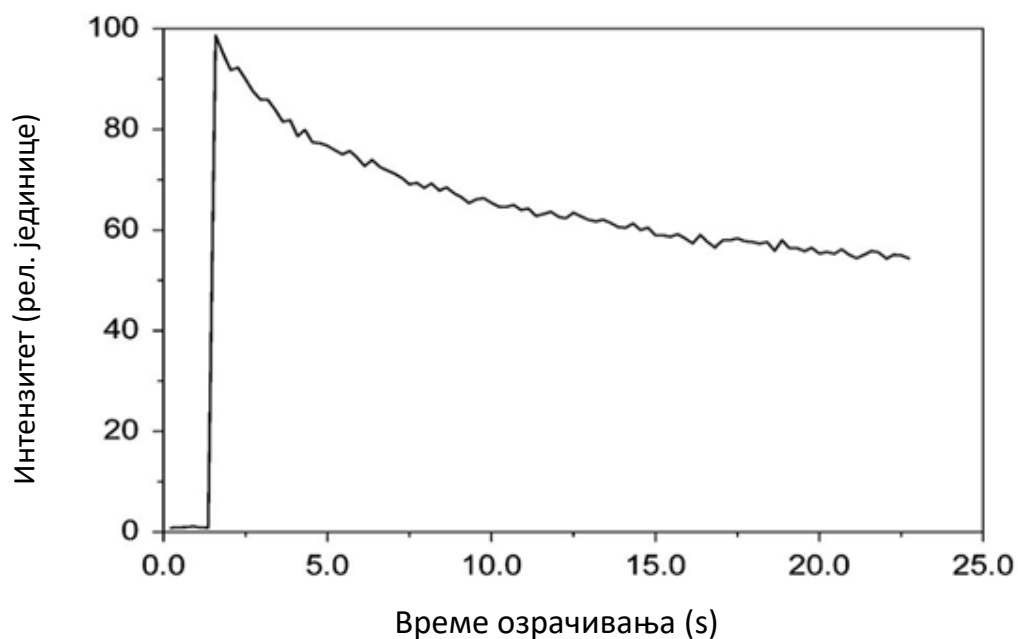


Слика 3.1. Интензитет двофотонски побуђене флуоресценције хемијски чистог хитина у функцији (а) таласне дужине побудног зрачења и снаге побудног зрачења као параметра; и (б) снаге побудног зрачења (приказане у $\log\text{-}\log$ скали) и таласне дужине побудног зрачења као параметра.

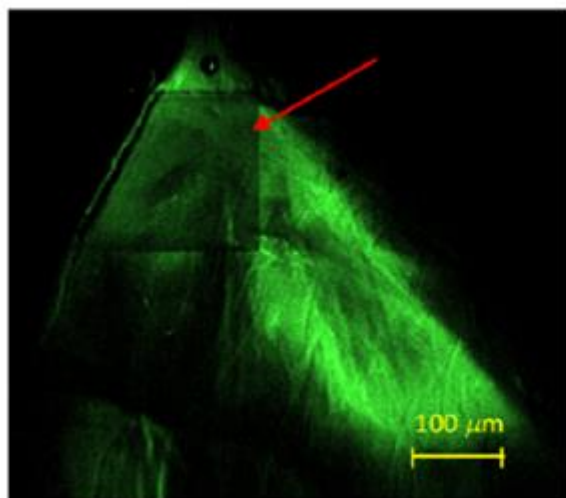


Слика 3.2. а) Флуоресцентни одговор хемијски чистог хитина у функцији времена; б) флуоресцентни спектар хемијски чистог хитина.

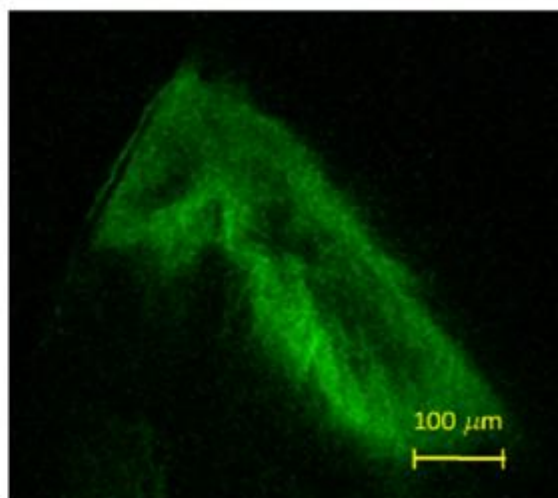
Због истраживања описаних у наставку ове дисертације, анализирани су и ефекти фото-избељивања који настају услед продуженог озрачивања хитина ласерским зрачењем. Опадање интензитета сигнала је приказано на слици 3.3а. Ови ефекти су истражени на хемијски чистом хитину и на хитину из кутикуле (спољашњи тврд омотач) пећинских инсеката. Фокусирани ласерски сноп озрачува место на узорку и мери се повратни сигнал. Средња снага ласера је 70 mW, а одговарајућа густина снаге $5,3 \text{ mW/cm}^2$.



(a)



(б)



(в)

Слика 3.3. а) опадање дво-фотонски побуђене флуоресценције хемијски чистог хитина услед фото-избељивања (густина снаге ласерског зрачења од $5,3 \text{ mW/cm}^2$, $\lambda = 840 \text{ nm}$); б) 2PEF слика једне грануле од хитина – продужено ласерско озрачивање хитина производи квадратни регион са смањеним интензитетом флуоресценције (означен црвеном стрелицом); в) “избељени” регион није уочљив приликом осликавања узорка помоћу другог хармоника. За обе слике је коришћен 40X / 0.65 микроскопски објектив. Сlike су добијене при једнакој побудној снази ласера (70 mW), на слици в) се уочава слабији интензитет другог хармоника хитина у односу на двофотонски побуђену флуоресценцију (слика 3.3 б).

Ефекат фото-избељивања је веома уочљив. На слици 3.3б, прво је ласерском радијацијом озрачен цео узорак хитина (који се види на слици, у зеленој боји) а затим је при непромењеном интензитету ласерске радијације озрачен само део првобитног узорка. Густина радијације је већа на том делу узорка, и довољна да изазове процес фото-избељивања. Услед тога, када се цео узорак поново третира ласерском радијацијом (њена снага је током целог експеримента константна) део узорка на коме је изазвано делимично фото-избељивање слабије флуоресцира, што се може приметити као потамнели квадрат на слици 3.3б. Када се исти узорак снима користећи други хармоник као сигнал (уз помоћ ускопојасног пропусног филтера који се поставља у детекциону грану микроскопа, и који пропушта зрачење на 420 nm, јер је побудна таласна дужина у овом експерименту 840 nm), тамни квадрат је неуочљив. С обзиром да други хармоник постоји само код материјала са нецентросиметричном симетријом, ово је доказ да хитин није оштећен ласерским зрачењем, само је његова унутрашња структура перманентно промењена тако да умањује интензитет флуоресценције. Пажљивом контролом интензитета побуде ефекти фото-избељивања су мали и не утичу на висок квалитет слике. Узорак се осликава контролисаним померањем ласерског снопа по површини узорка (сканирање узорка ласерским снопом), или унутар узорка (када се осликавају дубинске структуре материјала или биолошких организама). Контрола померања ласерског снопа на узорку обавља се галванометарским огледалима у склопу нелинеарног ласерског микроскопа (погледати Матријале и Методе за детаљно објашњење принципа функционисања нелинеарног ласерског микроскопа). Изнад одређеног нивоа снаге побудног зрачења долази до уништавања узорка, и формирања плазме. Уништавање узорка је веома локализовано и може се користити као алтернативни модалитет осликавања, што је један од праваца будућих истраживања.

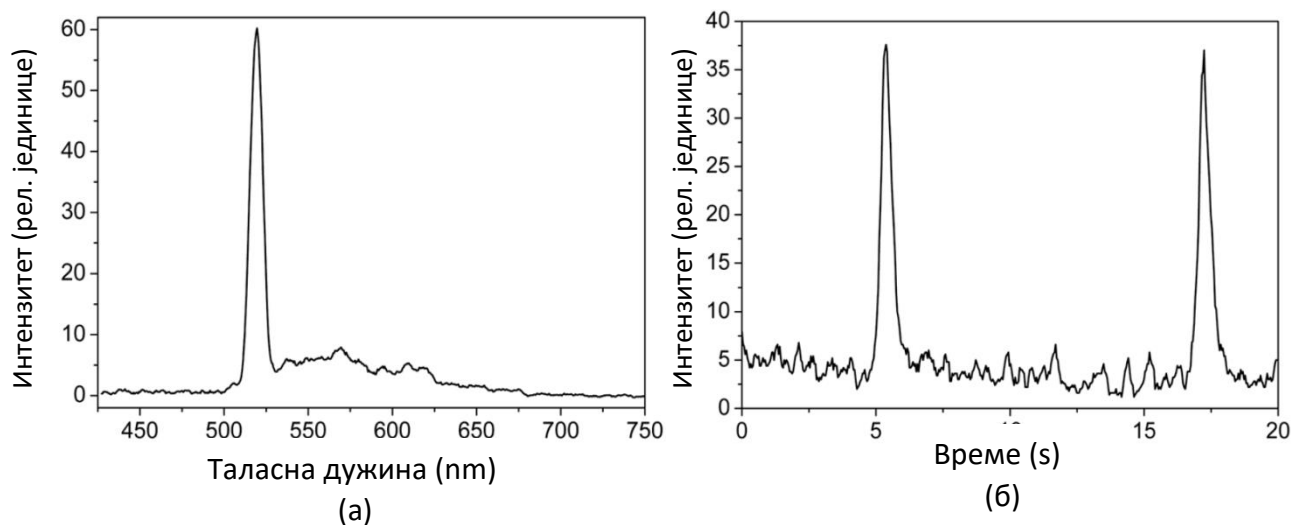
На свим побудним таласним дужинама, у свим експериментима који су у вези са нелинеарним оптичким особинама хитина, спектрална ширина ласерског импулса је максимизирана, чиме је обезбеђена минимална временска ширина импулса за све побудне таласне дужине. Дисперзионо ширење унутар оптичког система је константно и занемарљиво у датом спектралном опсегу, у поређењу са почетном ширином импулса [191].

У овом делу истраживања одређени су, дакле, оптимални параметри за употребу нелинеарне ласерске микроскопије у истраживању хитинских структура, које су веома присутне код великог броја организама. У наставку ове дисертације је истражена, између осталог, и двофотонски побуђена флуоресценција нано-структурисаних хитинских микро-објеката биолошког порекла. Ови микро-објекти, због своје нано-структуре, имају сложене оптичке особине. У интеракцији са упадном светлошћу, они испољавају низ оптичких механизма који синергијски формирају сложен оптички одзив. Нелинеарна ласерска микроскопија омогућава осликавање оваквих структура коришћењем двофотонски побуђене флуоресценције хитина и затим модификацију њихових оптичких особина ласерском модификацијом структуре (контролисано ласерско сечење и бушење структуре). Такође, може се контролисано мењати и њихова флуоресценција. Као што ће бити показано, ово има значајне примене. На тај начин демонстрирана је примена нелинеарне ласерске микроскопије и анализираних нелинеарних оптичких особина хитина у биофотоници.

3.3. Други хармоник хитина

Минималном модификацијом нелинеарног ласерског микроскопа омогућено је и истраживање другог хармоника хитина. Приликом истраживања способности хитина да генерише други хармоник, хитин је озрачиван ултра кратким ласерским импулсима таласне дужине 1040 nm и репетиције 83 MHz који су добијени из Yb-KGW ласера. Ова таласна дужина је коришћена да би се минимизирала дво-фотонски побуђена флуоресценција хитина. Детекциони систем се састоји од „streak“ камере и спектрографа (као што је описано у Материјалима и Методама).

Спектар другог хармоника хемијски чистог хитина показује оштар максимум на 520 nm, што је тачно једна половина од побудне таласне дужине (слика 3.4a). Измерен је и временски одзив сигнала на 520 nm (слика 3.4б) и показало се да је знатно краћи у односу на време флуоресценције хитина (5.2 ns, слика 3.2a) и близак је времену одзива детектора (приближно 260 ps). Ово је додатан доказ постојања другог хармоника за хемијски чист хитин. Два узастопна импулса другог хармоника су приказана на слици 3.4б, време између побудних ласерских импулса је 12 ns. Други хармоник хемијски чистог хитина има знатно мањи интензитет у односу на двофотонски побуђену флуоресценцију.



Слика 3.4. (a) спектралне и (б) временске карактеристике другог хармоника хитина. Таласна дужина побудне ласерске радијације је 1040 nm, а репетиција 83 MHz.

Други хармоник настаје услед површинске или запреминске нелинеарности другог реда, мада ова два фактора могу и симулатано да делују ако су оба присутна у материјалу. Запреминска нелинеарност је повезана са симетричношћу материјала и посебно је изражена у нецентросиметричним материјалима који показују одсуство инверзионе симетрије. У центросиметричним материјалима, запреминска нелинеарност другог реда није присутна у дипол апроксимацији, и само чланови виших редова мултипол апроксимације доприносе настанку другог хармоника.

Површинска нелинеарност другог реда настаје на граничној површини материјала услед дисконтинуитета у структури и у нормалној компоненти електричног поља упадне електромагнетне радијације, што доводи до великог градијента електричног поља по површини материјала. Чак и у центросиметричним материјалима, инверзиона симетрија је нарушена на граничној површини материјал – спољашња средина, што доводи до изражене дипол нелинеарности другог реда. Због овога, површинско генерисање другог хармоника је доминантно у нелинерном одзиву центросиметричних материјала, што се може употребити за осликавање и наализу површине оваквих материјала.

Детекцијом другог хармоника су у овом делу истраживања добијени резултати који одговарају полимерној структури хитина која није центросиметрична. Такође, у наредном делу истраживања је показана примена нелинерне ласерске микроскопије у осликавању хитинских структура природног порекла. За ову примену су кључне нелинеарне оптичке особине хитина. Експериментално је утврђено да употреба двофотонски побуђене флуоресценције и употреба другог хармоника хитина представљају комплементарне технике осликавања – када се као сигнал користи двофотонски побуђена флуоресценција, унутрашњост објекта је осликана са већим квалитетом у односу на ивице објекта, док је ситуација обрнута када се као сигнал користи други хармоник (погледати на пример, слику 3.13). Дакле, комбиновање ове две технике омогућава да се добију микроскопске фотографије са потпунијом информацијом.

4. Оптичке особине хитинских наноструктура биолошког порекла и њихове примене

Инсекти су доста коришћени у технологији, на пример у производњи свиле, меда, кармина (пигмент). Међутим, и многи принципи еволутивно развијени код инсеката могу наћи своју примену. Поједине врсте које припадају фамилији *Cicadoidea* (ови инсекти имају дугачка транспарентна крила, налик на домаћу мушицу) поседују природан звучник који им служи за појачање звука који њихова крила производе током летења [192]. Лептири са „стакленим“ крилима (*glasswing butterflies*) имају готово потпуно транспарентна крила што ствара утисак невидљивости [193, 194]. Поједини инсекти имају специфичну структуру на површинским деловима својих тела која их чини супер-хидрофобним [195-197]. Инсект *Melanophila acuminata* полаже своја јајашца у остацима од спаљених стабала, после шумских пожара. Овом инсекту је веома важно да може благовремено и на великој удаљености да детектује шумски пожар, и он због тога поседује сензор за инфра-црвену радијацију који може да детектује пожар до на удаљеност од 5 km [198, 199].

Лептири и мољци (ред: *Leptodoptera*) су посебно занимљиви због веома великог броја врста (око 180 000) [200] и јединствених оптичких особина њихових крила која су прекривена великим бројем (500-1000 по mm^2) минијатурних елемената – тзв. љуспица [201, 202]. Љуспице имају корен у крилној мембрани, постављене су хоризонтално уз крило, често прекривају целу површину крила густо прибијене једна уз другу, слика 4.16. Њихов доминантан градивни састојак је хитин. Могу бити различитог облика који се разликује од врсте до врсте. Просечне димензије љуспица су 50 X 100 μm , са веома малом дебљином од 1 – 2 μm .

Стандардна љуспица лептира или мољца се састоји од две паралелне плоче које су повезане микростубовима – тзв. трабекулама. Доња плоча, која лежи директно на крилној мембрани је равна, док горња хитинска плоча има сложену микро и нано-структуру (слика 4.26). Она се састоји од лонгитудиналних гребена који су повезани трансверзалним микро-гребенима и на овај начин је формирана мрежа правоугаоних отвора који повезују спољашњу средину са унутрашњошћу љуспице. Код различитих врста лептира и мољаца, делови љуспице (горња хитинска плоча, уздужни и попречни гребени...) могу бити различито нано-структурисани – високо специјализовани за различите оптичке (али такође и УВ и ИЦ) ефекте који настају у интеракцији упадне радијације са овим структурама. На пример, лонгитудинални гребени на горњој површини горње хитинске плоче се могу састојати од већег или мањег броја делимично или потпуно преклапајућих ламела (на пример, слике 1.3 и 1.5). У зависности од броја ламела, степена и начина преклапања ламела и међусобног растојања између суседних лонгитудиналних гребена, може се фаворизовати интерференција или дифракција упадне радијације (оптички одзив оваквих структура је најчешће комбинација интерференције, дифракције, и других оптичких ефеката), уз присуство различитих поларизационих ефеката, при чему структура може имати различите особине у оптичком, УВ и ИЦ делу спектра. Код појединих врста унутрашњост љуспице (простор између горње и доње хитинске плоче) није шупља већ је испуњена уређеним (фотонски кристал) или неуређеним хитинским структурама.

Љуспице могу имати различите улоге у опстанку организма, а једна од њих је оптичка функција – њихова сложена нано-структура узрокује њихову структурну обојеност [204] – рефлексија радијације са љуспица није узрокована пигментима већ је последица различитих

оптичких механизма којима упадна светлост интерагује са њима: интерференција, дифракција, различите врсте расејања светлости, поларизациони ефекти, мешање таласних дужина, локални таласоводи са функцијом повећања апсорпције...Доказано је да лептири имају поларизационо осетљив вид, и да могу да детектују и радијацију из УВ дела спектра, за разлику од човека, па се код појединих врста ефекти присутни у оптичком, УВ и ИЦ делу спектра међусобно разликују. Код појединих врста су присутни и пигменти, па је рефлексија комбинација доприноса пигмената и сложене нано-структуре.

У овом делу истраживања је експериментално и теоријски анализирана наноструктура иридесцентних љуспица лептира *Issoria lathonia*, (Linnaeus, 1758), оптички механизми којима оне интерагују са упадном светлошћу, варијабилност и јединственост њиховог оптичког одзива (у овом истраживању, оптички одзив је рефлексиони оптички спектар). Ова врста је истраживана због специфичног рефлексионог спектра појединачних љуспица, које се састоје од великог броја иридесцентних региона различитог спектралног садржаја насумично распоређених по површини љуспице (слике 4.1б и 4.2а). Показано је да љуспице поседују адекватне оптичке особине које их квалификују као потенцијалне оптички варијабилне елементе (сличне холограмима). Истражене су и могућности контролисане промене оптичких и флуоресцентних особина љуспица и уписивања додатних криптографских информација на љуспице, применом ласерске технологије. Истраживање флуоресцентних особина љуспица и могућности њихове модификације, због технолошких примена, обухватило је још три врсте лептира: *Argynnis adippe*, *Argynnis paphia*, *Argynnis aglaja*. Нано-структура њихових љуспица је слична нано-структури љуспица *Issoria lathonia*, љуспице су иридесцентне и у рефлексији у блиском пољу показују велики број области са независним спектралним садржајем. Услед сличности у структури и у резултујућим оптичким ефектима који су од кључног значаја за потенцијалну технолошку примену, љуспице ових трију врста су такође анализирани да би се утврдило која врста је најпогоднија за ласерску обраду и технолошку примену. Резултати истраживања су искоришћени за реализацију варијабилног оптичког елемента који је базиран на хитинским љуспицама.

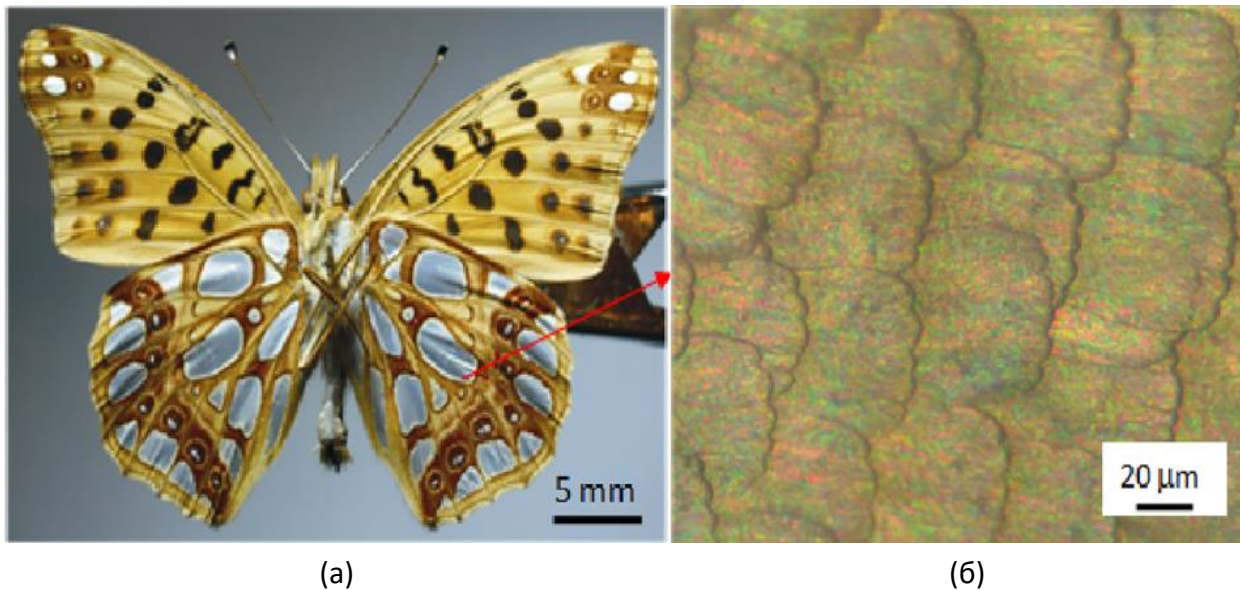
4.1. Оптичке особине и наноструктура крилних љуспица одабраних врста инсеката

У почетном делу истраживања урађена је анализа оптичких и морфолошких особина љуспица са сребрних дорзалних делова на крилима лептира *Issoria lathonia*, (Linnaeus, 1758) који је приказан на слици 4.1. Сребрнасте зоне су изабране зато што љуспице са ових делова крила имају сложену нано-структуру и њихов резултујући рефлексиони спектар настаје приликом интеракције упадне светлости са оваквом структуром. Други делови крила, као и љуспице које се налазе на вентралној страни крила, су пигментисани, што значајно смањује интерференционе ефекте. Из тог разлога они нису били предмет овог истраживања. Оптичке особине лептирових крила и љуспица су анализирани оптичким трансмисионим и рефлексионим микроскопом и нелинеарним ласерским микроскопом. Слика љуспица у оптичкој рефлексији се добија при ортогоналном осветљењу, директно кроз објектив микроскопа. Йуспице су ручно уклоњене са крила и причвршћене на стаклени супстрат. Оне су неравне површине и поседују запреминску структуру што захтева снимање више фотографија на различитим позицијама фокуса, уз каснију рачунарску обраду („focus stacking“ алгоритам, објашњен у Материјалима и Методама), да би се добила јасна микроскопска слика. Проблем фокусираности се може решити

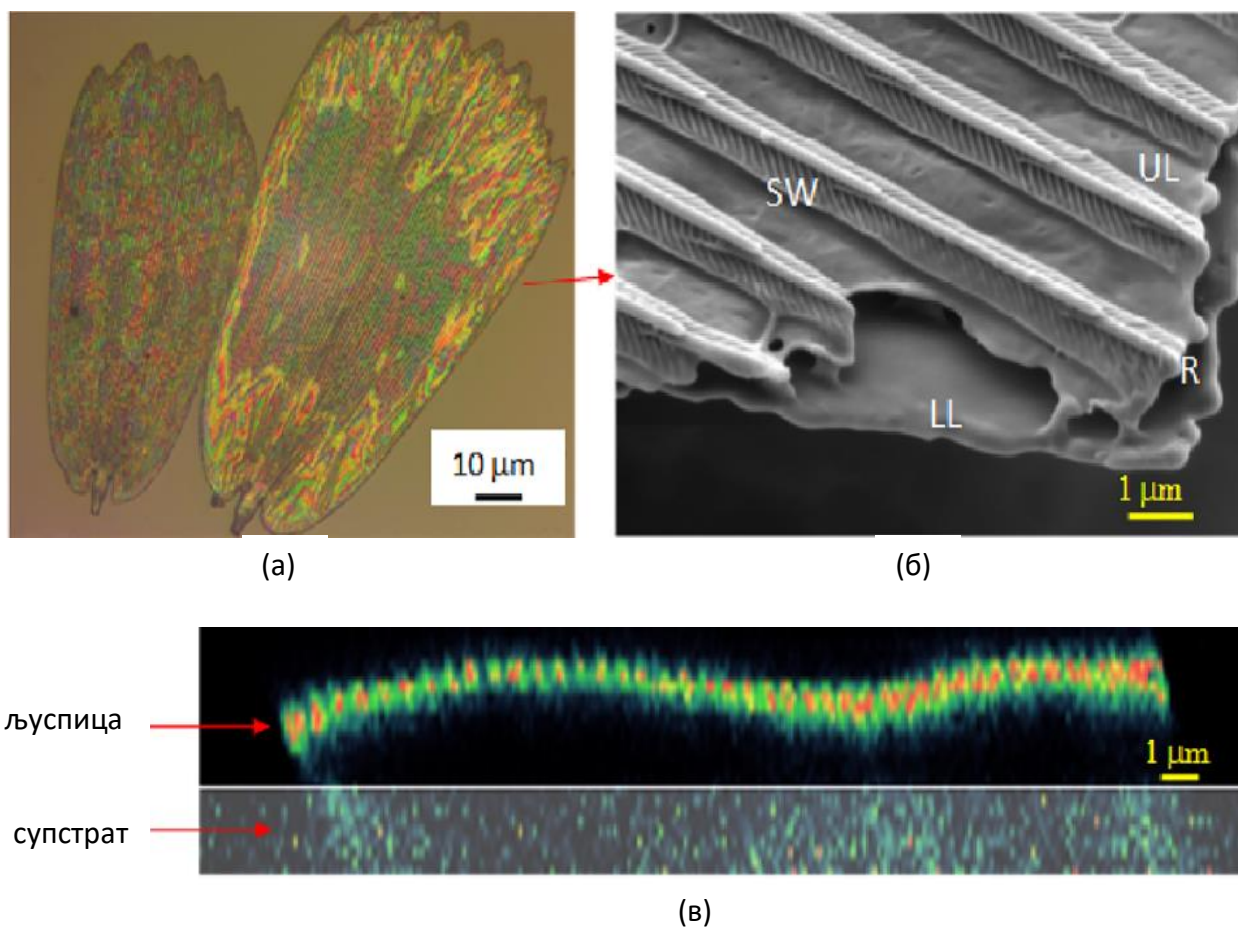
и кондензацијом водене паре која се поставља између љуспице и супстрата услед чега долази до поравњања љуспице због површинског напона. После испаравања водене паре, љуспица остаје равна и причвршћена целом својом доњом површином за супстрат услед адхезивних сила.

Лептир *Issoria lathonia* (као и остали испитивани лептири: *Argynnis adippe*, *Argynnis raphia*, *Argynis aglaja*) поседује два слоја љуспица (тзв. базне и покровне љуспице) на дорзалној површини крила. Анализиране су љуспице из оба слоја, иако не постоје значајне разлике у њиховој структури. Поједини региони љуспице имају висок интензитет рефлексије која настаје у интеракцији (интерференција, дифракција, расејање) упадне светлости са сложенем наноструктуром љуспице. Љуспице су иридесцентне, рефлексиони спектар појединачних региона, као и целе љуспице, интензивно се мења са променом угла посматрања или осветљења. Резултујућа сребрна боја крила лептира се добија ефектом локалног спектралног мешања [213].

Детаљна, нанометарска структура љуспица је анализирана сканирајућим електронским микроскопом (Mira3, Tescan). Љуспице су пажљиво одвојене од крила и постављене на микроскопско стакло које је затим залепљено за микроскопски носач узорка. Пошто су љуспице веома фрагилне, понекад је у току процеса одвајања љуспица од крила долазило до насумичних прелома љуспица што се показало као одлична прилика да се истражи њихова унутрашња структура и попречни пресек. Други, много контролисанији, прецизнији и поузданији начин да се ово уради је употребом ласера, у оквиру нелинеарног ласерског микроскопа – уколико се ласерски сноп помера по узорку на адекватан, контролисан начин, долази до сечења узорка и откривања његове унутрашње структуре.



Слика 4.1. а) лептир *Issoria lathonia*, дорзална страна, б) фотографија сребрног региона на рефлексионом оптичком микроскопу (објектив 10X / 0.25). Уочава се слој покровних љуспица са областима различитог спектралног садржаја. Сребрна боја на слици а) настаје ефектом локалног спектралног мешања.

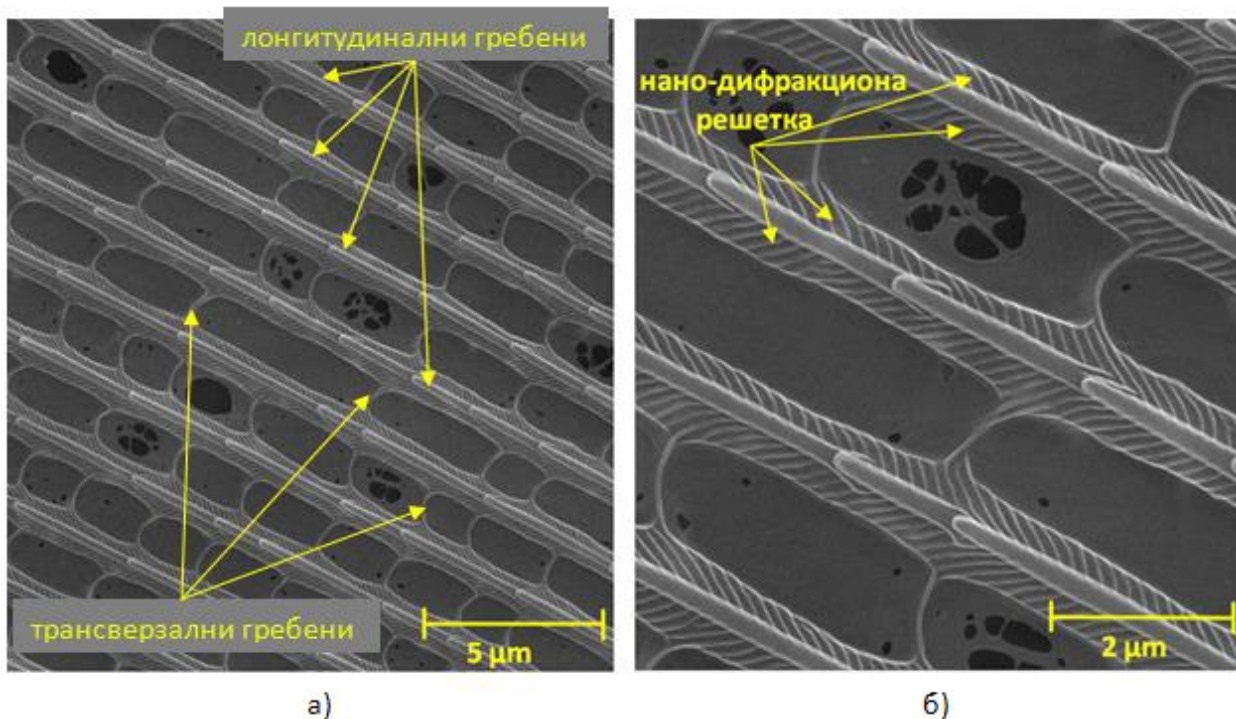


Слика 4.2. а) фотографија две љуспице *Issoria lathonia* лептира на оптичком рефлексионом микроскопу (објектив 20X / 0.4). Љуспице су изоловане са дорзалне површине крила (слика 4.1б). Уочава се насумичан распоред области са различитим спектралним садржајем, б) слика покровне љуспице *Issoria lathonia* лептира, са сканирајућег електронског микроскопа; LL – доња хитинска плоча, UL – горња хитинска плоча, R –лонгитудинални гребен, SW – дифракциона решетка са периодом мањим од таласне дужине светлости, у облику „рибље кости“, в) профил љуспице на нелинеарном сканирајућем микроскопу, уочава се таласаст облик љуспице.

Електронски микрограф љуспице лептира *Issoria lathonia* је приказан на слици 4.2б. Љуспица је делимично преломљена, што омогућава да се види и њена унутрашња, запреминска структура. Љуспица се састоји од две паралелне хитинске плоче, које се налазе једна изнад друге и спојене су стубовима – тзв. трабекулама. Доња плоча има равну горњу и доњу површину. Горња плоча такође има равну доњу површину, али њена горња површина (која је окренута ка спољашњој средини и на коју долази светлост из спољашње средине) има сложену нано-структуру и на њој се уочавају три дифракционе решетке: запреминска решетка која се састоји од лонгитудиналних гребена (који се простиру целом дужином љуспице) и површинска решетка која се састоји од трансверзалних гребена (који повезују лонгитудиналне гребене). Трећа дифракциона решетка, са периодом мањим од таласне дужине светлости (њен период је ~ 150 nm), у облику ребље кости, налази се на површини сваког лонгитудиналног гребена. Ово је уочљиво и на електронским микрографима љуспице који су приказани на сликама 4.2б и 4.3б. Међусобна удаљеност лонгитудиналних гребена је око $1.5 \mu\text{m}$. Код *Issoria lathonia* лептира,

број ламела од којих се лонгитудинални гребени састоје је мали и степен преклапања ламела је занемарљив, па због тога нису изражени оптички ефекти запреминске (Брагове) дифракционе решетке. Ово је значајна разлика у односу на поједине друге врсте лептирова код којих су лонгитудинални гребенови знатно „згуснутији“ (растојање између њих је знатно мање од $1,5 \mu\text{m}$) и са већим бројем слојева (већи број ламела са значајним степеном преклапања ламела – оне стоје једне изнад других и њихове дебљине су приближно једнаке), што омогућава моделовање гребенова као вишеслојних уско-појасних 1Д рефлектора (на пример, љуспице *Morpho rhetenor* и *Morpho aega* лептирова, о којима је било речи у уводном делу ове дисертације). Унутрашњост љуспице је шупља, испуњена ваздухом, и у њој се налазе само нано-стубови који повезују доњу и горњу плочу љуспице.

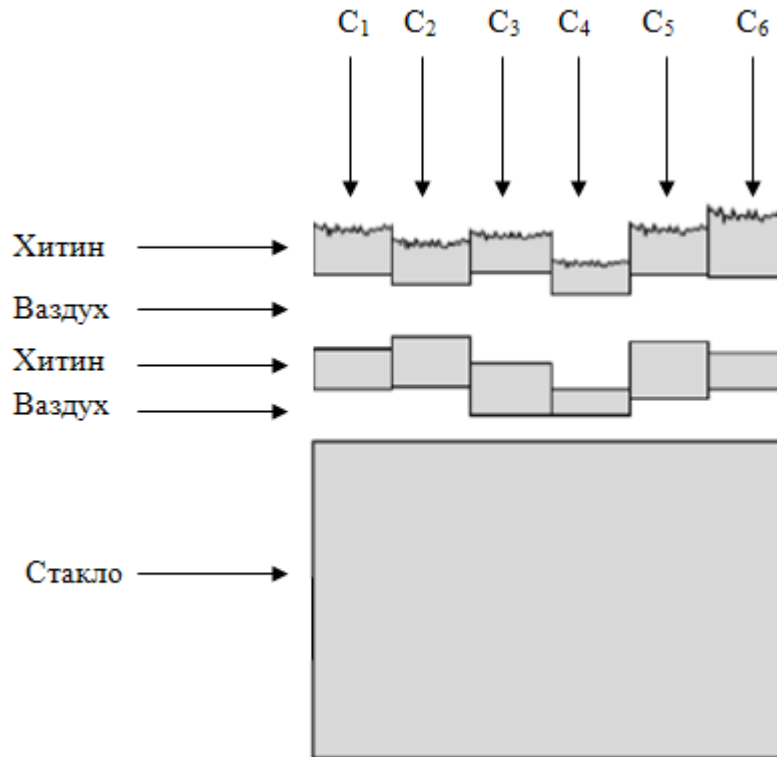
Доминантан састојак љуспица *Issoria lathonia* лептира је хитин [326]. Резултати истраживања описаног у претходном делу ове дисертације, који се односи на нелинеарне оптичке особине хитина, омогућили су да љуспице лептира *I.Lathonia* буду осликане, анализиране а затим и ласерски обрађене нелинеарном ласерском микроскопијом. Захваљујући дво-фотонској флуоресценцији хитина, нелинеарним ласерским микроскопом је потврђено је да љуспица има нерегуларан таласати облик (слика 4.2в). Ова особина веома доприноси варијабилности иридесцентног оптичког одзива, у комбинацији са варијацијама у дебљини горње и доње ламеле, варијацијама у њиховој међусобној удаљености, и осталим параметрима, што ће бити показано у теоријском моделу љуспице.



Слика 4.3. Електронски микрографи љуспице лептира *Issoria lathonia*. На слици а) се виде лонгитудинални и трансверзални гребени; б) сваки лонгитудинални гребен представља осу симетрије за нано-дифракционе решетке периода $\sim 150 \text{ nm}$.

4.2. Оптички модел крилних љуспица одабраних врста инсеката

У овом делу је истражена повезаност између нано-структуре љуспица и њиховог оптичког одзива – рефлексије. Са тим циљем је направљен теоријски модел, који омогућава да се израчуна рефлексиони спектар појединачне љуспице, уклоњене са крила лептира и причвршћене на транспарентан супстрат. Основни елемент модела је приказан на слици 4.4.



Слика 4.4. Модел покровне љуспице *Issoria lathonia* лептира. Приказан је само део модела који се састоји од 6 вертикалних региона. Цео модел се састојао од 500 региона. У даљем тексту је показано да су спектрални садржаји региона некорелисани. $C_1, C_2, \dots, C_6$ – вертикални региони хитинске љуспице. Модел је објашњен у даљем тексту.

Да би се симулирао таласаст облик љуспице, прво је узето у обзир да је, приликом експерименталног мерења рефлексионог спектра на оптичком микроскопу, љуспица постављена на стаклени супстрат и да је због њеног облика дебљина ваздушног слоја између љуспице и супстрата варијабилна. Електронском микроскопијом је утврђено да се љуспица састоји од две хитинске плоче између којих се налази слој ваздуха. Доња плоча има равну горњу и доњу површину. Горња плоча има равну доњу (унутрашњу) површину, али њена горња површина (окренута ка спољашњој средини, и ова површина је први део љуспице са којим се сусреће упадна радијација) је, услед сложене структуре, моделована као неравна површина одређеног степена храпавости. Ова површина, дакле, улази у модел као расејавајућа структура и на тај начин се узима у обзир њена сложена микро и наноструктура која се састоји од лонгитудиналних и трансверзалних гребена и дифракционе решетке са периодом мањим од

таласне дужине светлости која се налази на површини сваког од лонгитудиналних гребена. Претпоставка је да дифракционе решетке које чине лонгитудинални и трансверзални гребени не дају значајан допринос оптичкој рефлексији, с обзиром на њихов период (период лонгитудиналне решетке је $\sim 1.5 \mu\text{m}$, а растојање између трансверзалних гребена је веома варијабилно, у опсегу $3\text{--}5 \mu\text{m}$). Међутим, дифракциона решетка са периодом мањим од таласне дужине светлости (период ове решетке је $\sim 150 \text{ nm}$) би могла да делује као високо расејавајућа структура која дифузно расејава краће таласне дужине из оптичког дела спектра. На основу оваквих разматрања, љуспица је моделована одређеним бројем вертикалних региона, слика 4.4. Сваки регион се састоји од два хитинска и два ваздушна слоја и стакленог слоја супстрата константне дебљине. Горња хитинска плоча је први хитински слој, затим следи: слој ваздуха између горње и доње хитинске плоче, доња хитинска плоча, слој ваздуха између доње хитинске плоче и стакленог супстрата, и последњи слој је стаклени супстрат (микроскопско стакло) на коме се љуспица налази током микроскопске анализе на оптичком микроскопу. Електронском микроскопијом је утврђено да различити региони имају различите дебљине хитинских и ваздушних слојева. Узимајући у обзир природан таласаст облик љуспице, као и насумичну расподелу региона различитог спектралног садржаја (што је уочљиво на оптичким микрографима, слике 4.1б, 4.2а и 4.8а), претпоставка је да су дебљине хитинских слојева различитих региона потпуно накорелисане (а биолошки узрок насумичних варијација дебљине слојева би могао да буде ћелијски шум, што ће касније бити објашњено).

За теоријски модел је изабрано да се симулира део љуспице који се састоји од 500 вертикалних региона (на слици 4.4 је приказано 6 региона). Рефлексиони спектар сваког вертикалног региона у моделу је израчунат методом преносне матрице („*transfer matrix*“ метод, који је објашњен у Материјалима и Методама), који је модификован да би се узели у обзир ефекти расејања светлости на горњој (спољашњој) површини горње хитинске плоче [213]. С обзиром да је таласна дужина упадне светлости знатно већа од храпавости горње површине љуспице (са електронских микрографа је средње квадратно одступање храпавости горње површине љуспице процењено на $50 - 70 \text{ nm}$), понашање упадне светлости на овој површини се може објаснити применом скаларне теорије површинског расејања [217, 218]: светлост се на храпавој граничној површини дели на две компоненте. Једна компонента се простире као да је гранична површина идеално равна, а друга компонента („одбљесак“ – енгл. *haze*) се дифузно расејава у великом просторном углу. Обе компоненте се квантитативно дефинишу у односу на трансмитивност T_0 и рефлексивност $R_0 = 1 - T_0$ идеално равне површине, где важе Френелове једначине. Дифузна трансмитивност $T_H(\lambda)$ и дифузна рефлексивност $R_H(\lambda)$ су, у складу са скаларном теоријом површинског расејања, дефинисане на следећи начин [217]:

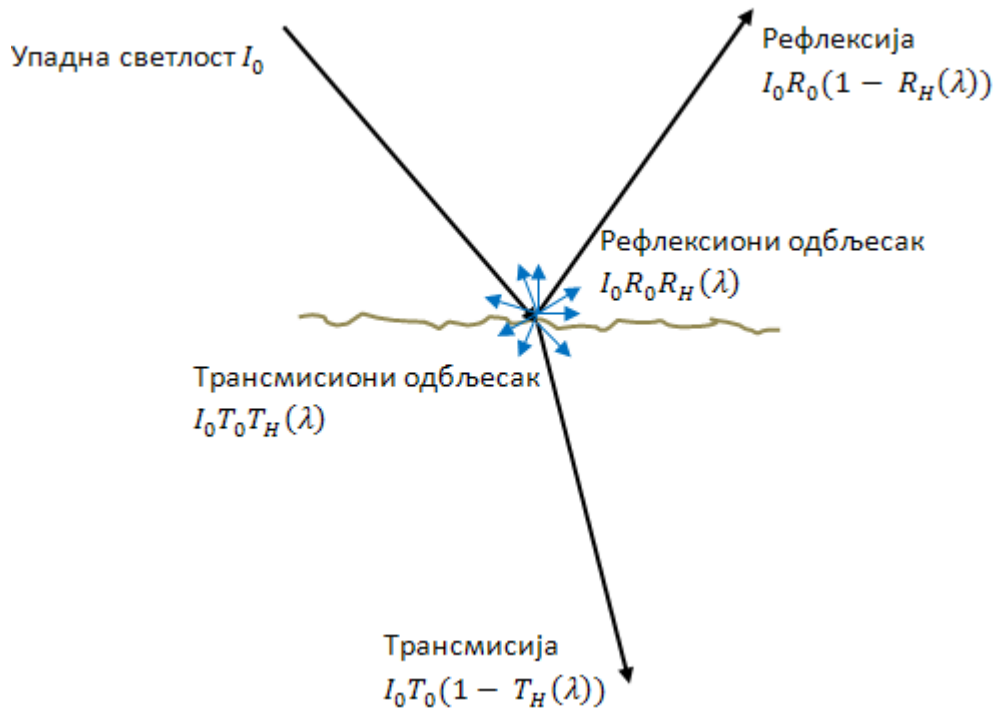
$$T_H(\lambda) = T_0 \left(1 - \exp \left\{ - \left[\frac{2\pi\sigma}{\lambda} (n_i \cos \phi_i - n_t \cos \phi_t) \right]^2 \right\} \right) \quad (4.1)$$

$$R_H(\lambda) = R_0 \left\{ 1 - \exp \left[- \left(\frac{4\pi\sigma}{\lambda} (n_i \cos \phi_i)^2 \right) \right] \right\} \quad (4.2)$$

где су T_0 и R_0 трансмитивност и рефлексивност идеално равне површине, респективно; λ је таласна дужина светлости у вакууму; ϕ_i и ϕ_t су упадни угао светлости и угао преламања, n_i и n_t су одговарајући индекси преламања; σ је храпавост површине (средње квадратно одступање од

идеално равне површине). Понашање светлости на хрпавој граничној површини приказано је на слици 4.5.

На основу оваквих разматрања, формиран је оптички модел појединачног вертикалног региона хитинске љуспице приказаног на слици 4.6. На равним граничним површинама, рачуна се Френелова трансмисија и рефлексија. На хрпавој граничној површини (горња површина горње плоче љуспице), узима се у обзир и дифузно расејана светлост у рефлексији и трансмисији, која је описана коефицијентима $R_H(\lambda)$ и $T_H(\lambda)$, респективно, у складу са скаларном теоријом површинског расејања, као што је шематски приказано на слици 4.5. Ово доводи до умањења Френелових коефицијената R_0 и T_0 за $R_0 R_H(\lambda)$ и $T_0 T_H(\lambda)$, респективно.



Слика 4.5. Рефлексија и трансмисија на хрпавој граничној површини, упадна светлост I_0 је подељена на 4 компоненте: Френелова рефлексија (R_0), Френелова трансмисија (T_0) рефлексиони „одбљесак“ – дифузно расејана светлост у рефлексији (R_H), и трансмисиони „одбљесак“ – дифузно расејана светлост у трансмисији (T_H).

Дакле, резултујући рефлексиони и трансмисиони коефицијенти на хрпавој површини, R_s и T_s , респективно, су једнаки:

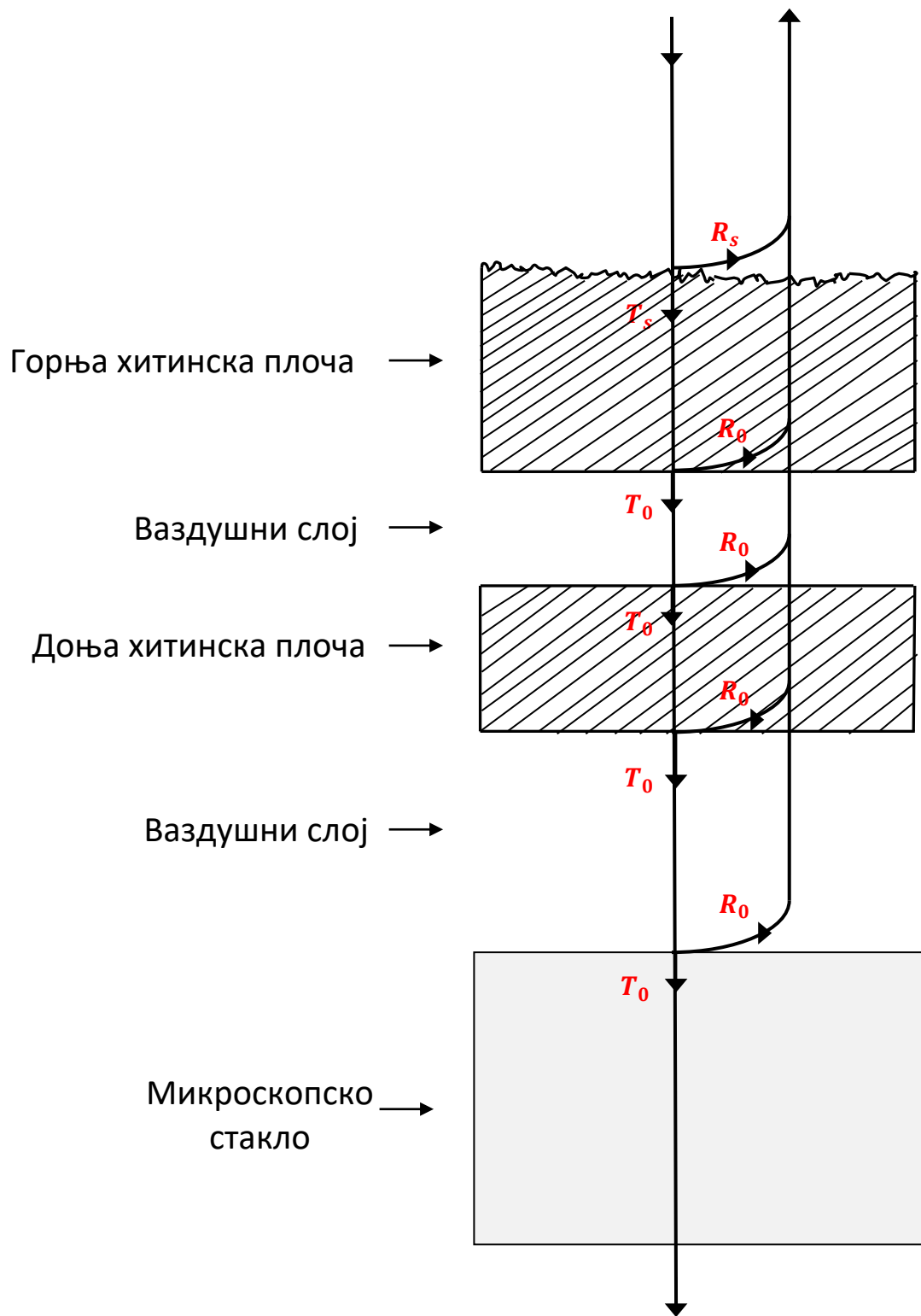
$$R_s = R_0 - R_0 R_H(\lambda) \qquad T_s = T_0 - T_0 T_H(\lambda) \qquad (4.3)$$

Френелове рефлексије и трансмисије на свим граничним површинама интерферирају међусобно као кохерентни таласи, и третиране су трансфер матрице методом. Светлост која је дифузно расејана (и у рефлексији и у трансмисији, окарактерисана коефицијентима R_s и T_s , респективно)

на хрпавој горњој површини љуспице није узета у обзир у трансфер матрице прорачуну, јер ове компоненте због своје стохастичке природе слабо утичу на интерференционо појачање и слабљење светлости. На тај начин, израчунат је рефлексиони спектар појединачног вертикалног региона хитинске љуспице.

На слици 4.4 је приказан део оптичког модела љуспице који се састоји од 6 вертикалних региона. У табели 1 су приказане вредности параметара оптичког модела, при чему су средње вредности дебљине хитинских и ваздушних слојева добијене усредњавањем скупа од 1000 вредности: љуспица је моделована са 500 вертикалних региона, у оквиру сваког региона постоје два хитинска слоја и два ваздушна слоја. Дебљине слојева су стохастички вариране, у складу са нормалном дистрибуцијом, са унапред дефинисаном стандардном девијацијом од 15 nm, а централне вредности за дебљине хитинских и ваздушних слојева су процењене са електронских микрографа – за хитинске слојеве то је 100 nm а за ваздушне 1000 nm. Вредности за средње квадратно одступање хрпавости материјала (мисли се на горњу, нано-структурисану површину љуспице) су процењене са електронских микрографа, и подешене у моделу. Индекс преламања хитина је преузет из литературе [327] и та бројна вредност је потврђена ураћањем љуспице у течност са истим таквим индексом преламања (метод усаглашавања индекса преламања, објашњен у Материјалима и Методама).

За сваки вертикални регион симулиране љуспице, на основу израчунатог рефлексионог спектра, израчуната је боја и x, y координате боје које су приказане као тачка на CIE (скраћеница од француског израза Commission internationale de l'éclairage) 1931 дијаграму. Овај дијаграм је дизајниран да се блиско поклапа са човековом перцепцијом боје и описује квантитавну и квалитативну повезаност између расподеле таласних дужина радијације у оптичком делу спектра и човекове физиолошке перцепције боје [219, 220] (детаљније информације се налазе у Материјалима и Методама). Овакав приступ, који подразумева употребу CIE дијаграма, изабран је јер CIE дијаграм приказује спектар на једноставан и визуелно схватљив начин. Тиме се читав комплексни спектар приказује једном тачком. CIE дијаграм је значајан и због тога што ће се у технолошким применама користити камере које користе координате са овог дијаграма. На тај начин добијена је матрица правоугаоника одговарајућих боја, где сваком региону - правоугаонику одговара по једна тачка на CIE 1931 дијаграму. Боја правоугаоника је боја коју представља одговарајућа тачка на дијаграму. Та матрица, као и резултујућа расподела на CIE 1931 дијаграму, представљају један од резулата симулације дела љуспице који је приказан на слици 4.7б.



Слика 4.6. Оптички модел појединачног вертикалног региона љуспице *Issoria lathonia* лептира. R_0 , T_0 – Френелови коефицијенти рефлексije и трансмисије; R_s , T_s – коефицијенти рефлексije и трансмисије светлости на храпавој површини, израчунати корекцијом Френелових коефицијената у складу са скаларном теоријом површинског расејања.

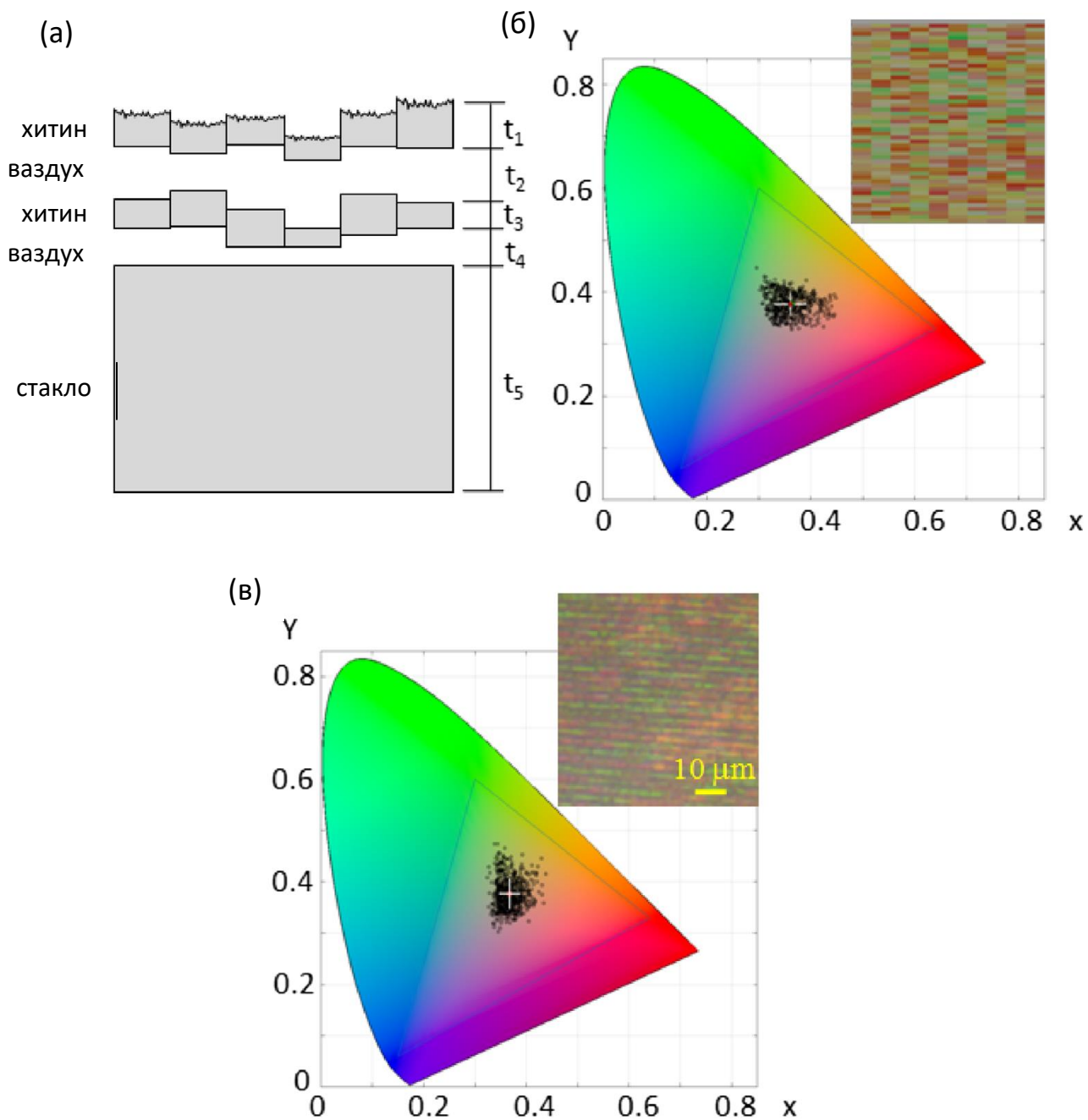
Табела 1. Параметри модела љуспице *Issoria lathonia* лептира.

Индекс преламања материјала (хитин)	1.57
Индекс преламања ваздуха	1
Средња вредност дебљине материјала (хитин)	108 нм
Средња вредност ваздушног слоја	969 нм
Средње квадратно одступање храпавости материјала	59 нм
Природна варијабилност дебљине слојева	± 15 нм
Варијабилност упадног угла светлости	$\pm 3^0$

Због упоређивања експеримента и теоријског модела на CIE 1931 дијаграму је такође приказан и експериментални резултат – произвољна љуспица је камером фотографисана у рефлексији, на оптичком рефлексионом микроскопу, у правцу нормалном на површину љуспице. Анализирана је рефлексија са квадратног дела љуспице, слика 4.7в. На њему се види насумичан распоред региона различитог спектралног садржаја. РГБ вредност сваког пиксела са фотографије овог дела љуспице је приказана у CIE 1931 дијаграму. На слици 4.7в видимо скуп тачака које представљају РГБ вредности појединачних пиксела, као и њихову средњу вредност.

Није могуће добити потпуно поклапање CIE 1931 дијаграма симулације и експерименталног резултата тј. поклапање спектралног садржаја појединачних иридесцентних области на уметцима слика 4.7б и 4.7в, али је остварено поклапање средње вредности координате боје за теоријски модел и фотографију љуспице у оптичкој рефлексији (средња вредност координате боје је важна јер представља „колективни ефекат“ – спектрални садржаји појединачних иридесцентних области се мешају ефектом локалног спектралног мешања и тако настаје резултујући рефлексиони спектар који се детектује и који представља средњу вредност појединачних спектра). Облик расподеле координата боје је различит за симулацију и експеримент али су стандардне девијације сличне.

Претпоставља се да је ово природна последица ћелијског шума [223], познате чињенице у биологији која резултира недетерминистичком везом генотипа и фенотипа (генотип је генетска конституција организма, у овом случају појединачне ћелије од које настаје љуспица лептира. Фенотип је скуп свих морфолошких и физиолошких својстава по којима се препознаје неки организам и по чему се он разликује од других организама исте врсте).



Слика 4.7. а) скица теоријског модела љуснице на стакленом супстрату, б) координате боје моделоване љуснице, приказане на CIE 1931 дијаграму, уметак: моделован образац боје љуснице, в) координате боје љуснице *Issoria lathonia* лептира, приказане на CIE 1931 дијаграму. Уметак: део љуснице, фотографија у оптичкој рефлексији, чије су координате боје приказане на CIE 1931 дијаграму. На CIE 1931 дијаграмима приказане су и средње вредности координата боја.

Ћелијски шум је појава која узрокује одређени степен насумичности параметара који одређују раст и развој ћелије, што узрокује јединственост сваке ћелије, без обзира на њену генетичку идентичност са осталим ћелијама из истог ткива. У ћелијама се одиграва мноштво биохемијских процеса, који су сви подложни термодинамичким флукуацијама. Иако су две ћелије генетички идентичне, и налазе се у истом ткиву, оне ће имати различите физичке

димензије и различите нивое експресије протеина [224, 225], што за последицу има постојање малих стохастичких разлика између генетички идентичних ћелија. Ове насумичне разлике између ћелија имају важне последице у биологији [221] и медицини [222], а у оквиру ове дисертације је показана и „оптичка“ последица у биофотоници (и њена технолошка примена, о чему ће бити речи касније, па означи овде редни број под-поглавља у коме говориш о примени): наиме, љуспица лептира је неживи, отврднути остатак ћелије, и због тога свака љуспица “замрзава” ћелијски шум у стању у ком је био када је ћелија умрла. Самим тим, мале варијације у дебљинама физичких елемената љуспице (варијације у дебљини горње и доње хитинске плоче љуспице, варијације у дебљинама ламела које су саставни део сваког лонгитудиналног гребена, таласаст облик љуспице итд.), које узрокују варијације у оптичком одзиву, су последица ћелијског шума и као такве су потпуно насумичне. Свака љуспица је дакле, физички јединствена - све љуспице имају исти тип наноструктуре (две хитинске ламеле и слој ваздуха измеђи њих, сложену наноструктурисану горњу површину горње хитинске ламеле...), али вредности дебљине хитинских ламела, које су значајне за оптички одзив, варирају насумично код сваке љуспице. Из физичке јединствености сваке љуспице произилази јединственост њених структуром одређених оптичких особина (свака љуспица је у оптичком смислу иридесцентна, али је распоред иридесцентних области насумичан и различит за различите љуспице, ово је описано у делу 4.3), односно немогућност да се две физички идентичне љуспице генеришу природним путем. Ћелијски шум је универзална појава, и присутан је код свих ћелија. У том смислу, исти ниво јединствености се очекује и код свих осталих љуспица свих врста лептира [227], укључујући и оне код *I.lathonia* врсте.

Важан резултат симулације љуспице је и да дифракциона решетка са периодом мањим од таласне дужине светлости игра улогу оптичког дифузног рефлектора, јер „плави“ део спектра ($\lambda \sim 400-500 \text{ nm}$) враћа у спољашњу средину расејавајући те таласне дужине у великом просторном углу. На овај начин, „плави“ део спектра је ефикасно елиминисан из иридесцентне рефлексије упадне светлости са крила и објашњено је одсуство „плаве“ компоненте из оптичке рефлексије (на сликама са оптичког рефлексионог микроскопа, слика 4.2а, уметак на слици 4.7в и слика 4.9а, уочава се одсуство „плавог“ дела спектра у иридесцентној рефлексији љуспице). Ово ће бити значајно код технолошке примене ових хитинских љуспица, о чему ће бити речи у под-поглављу 4.4. Поменуто расејање је донекле слично Рејлијевом расејању имајући у виду да дифракциона решетка се периодом мањим од таласне дужине светлости расејава „плави“ део спектра знатно интензивније од осталих оптичких таласних дужина. Међутим, за разлику од Рејлијевог расејања, које се дешава на честицама, овде имамо расејање на храпавој површини.

Због технолошке примене хитинских љуспица у заштити докумената, потребно је да оне испуњавају три услова који се тичу њихове нано-структуре и оптичких особина које њихова структура узрокује. Прво, свака љуспица треба да, у оптичком смислу, буде јединствена – њен оптички одзив треба да се разликује од оптичког одзива било које друге љуспице која постоји у природи. Ова особина онемогућава фалсификовање докумената коришћењем природног „дупликата“ аутентичне љуспице. Друго, потребно је да обрнути инжењеринг љуспице буде изузетно компликован, што спречава репликацију љуспице технологијом данашњице. Ово значи да нано-структура љуспице мора да буде довољно комплексна. Треће, потребно је да оптички одзив појединачне љуспице буде веома варијабилан, што онемогућава репликацију оптичког одзива једноставним колор или ласерским штампањем. У овом истраживању, за оптички одзив је изабрана иридесценција светлости са љуспице. Под варијабилношћу оптичког одзива се подразумева постојање довољно великог броја различитих иридесцентних области на хитинској љуспици – иридесцентне области са различитим спектралним садржајем, различитом угаоном и

поларизационом зависношћу спектралног садржаја итд. Јединственост и варијабилност оптичког одзива љуспица су анализиране у наредном делу истраживања.

4.3. Варијабилност и јединственост оптичког одзива крилних љуспица

Љуспице лептира имају довољан број степени слободе (дебљине хитинских слојева, таласаст облик љуспице, нано-структура на горњој површини љуспице, положаји лонгитудиналних гребена и њихова међусобна удаљеност и структурисаност...) који омогућава значајну варијабилност структуре а самим тим и варијабилност оптичког одзива појединачне љуспице. Варијабилност, веома важна са аспекта технолошке примене, се може дефинисати бројем степени слободе оптичког одзива љуспице на дефинисаном увећању [215, 216]. Пожељно је да број степени слободе буде што већи [226].

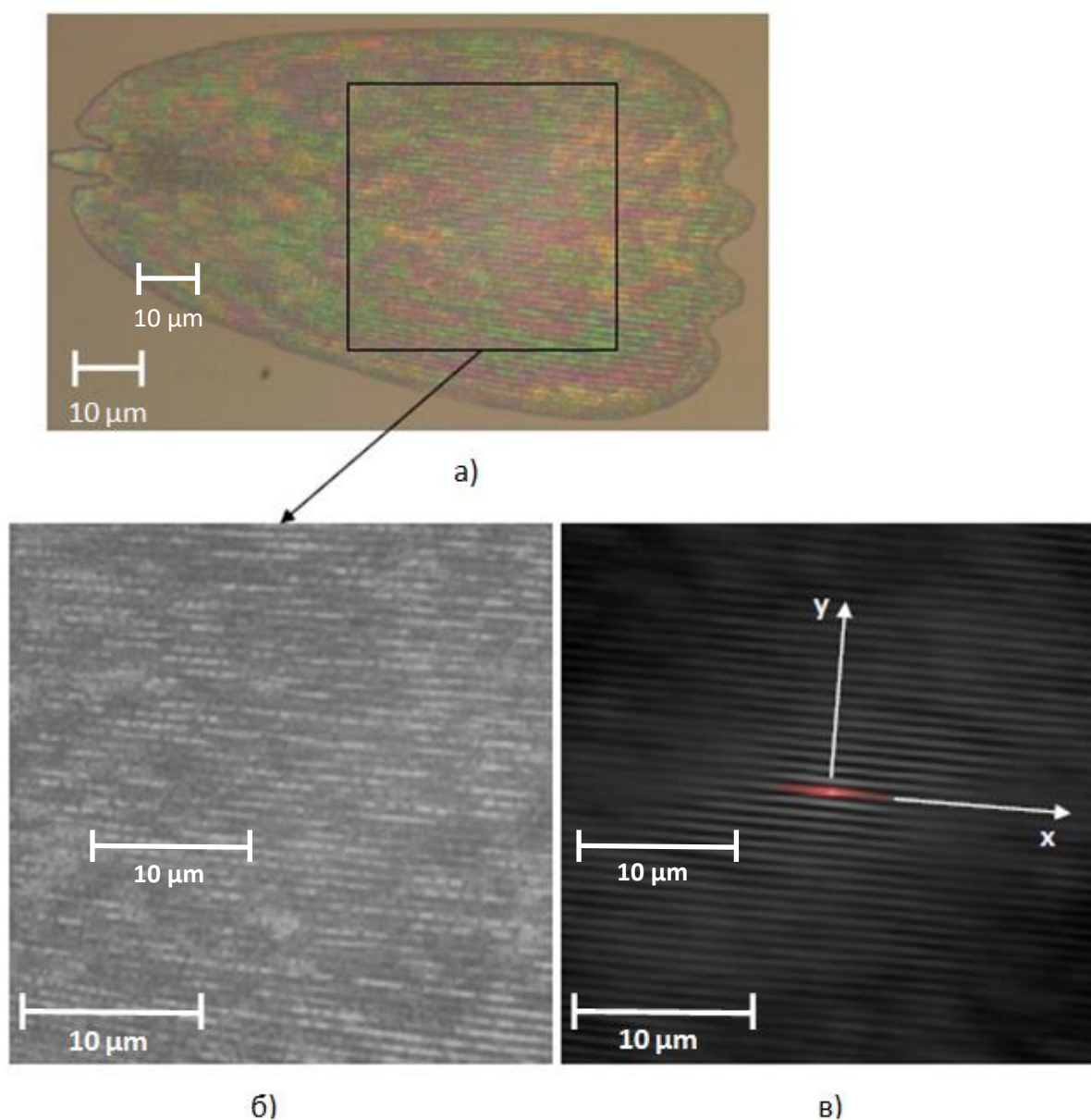
Природне варијације у нано-структури љуспице узрокују варијације у њеном оптичким одзиву. На увећаној фотографији љуспице са рефлексионог оптичког микроскопа уочава се одређени број малих светлих области различитог спектралног садржаја и високог интензитета рефлексије. Њихова позиција, оптички рефлексиони спектар и интензитет рефлектоване светлости су непредвидиви и они дефинишу степене слободе. Њихов број N је искоришћен за мерење варијабилности. Овај број се може проценити дељењем површине љуспице (горња површина љуспице (S), која је у природном положају на телу инсекта окренута ка спољашњој средини) која се може израчунати са микрографије и просечне димензије појединачне иридесцентне области Δx (иридесцентне области различитог спектралног садржаја су уочљиве на микрографијама 4.1б, 4.2а и 4.9а, снимљеним у оптичкој рефлексији).

У наредном делу истраживања показана је оптичка јединственост љуспице, односно колико је тешко пронаћи у природи две љуспице са идентичним оптичким одзивом.

За параметар који се користи за одређивање јединствености љуспице, изабрана је расподела интензитета иридесцентне рефлектоване светлости у блиском пољу. Различите области љуспице рефлектују различит интензитет и спектрални садржај светлости. Фотографија лептирове љуспице (слика 4.9а) је искоришћена за анализу статистичких особина коришћењем РГБ компоненти фотографије. Анализа је извршена не узимајући у обзир облик љуспице. Из тог разлога, за анализу је употребљен означени правоугаони део са фотографије љуспице (слика 4.9а). Израчуната је 2Д аутокореелациона функција интензитета рефлектоване светлости по једном каналу боје и резултат је приказан на слици 3.8в. Пошто је степен корелације спектралних садржаја различитих области љуспице веома низак, очекује се да резултати статистичке анализе за сва три канала боје (црвени, зелени и плави канал) буду исти, па је зато анализа извршена узимајући у обзир само један од канала боје (слика 4.9б).

Аутокореелациона функција осцилује у правцу у осе и опада знатно спорије у правцу x осе. Претпостављено је да су интензитети рефлексије за две различите области љуспице статистички независни ако аутокореелација интензитета има вредност мању од 0,2. Област у којој аутокореелациона функција има ове вредности је означена црвеном бојом на слици 4.9в. Њена дужина у правцу x осе је $\sim 30 \mu\text{m}$ а у правцу у осе $\sim 1.5 \mu\text{m}$.

Узимајући у обзир да су просечне димензије љуспице $50 \times 100 \mu\text{m}$, може се проценити да постоји приближно $[50/1.5] \times [100/30] = 99$ региона са статистички независним спектралним садржајем на површини љуспице. Интензитет светлости по једном каналу боје може се приказати на барем 10 различитих нивоа - то је доступно на било којој јефтиној камери или камери са мобилног телефона. Дакле, може се проценити да постоји 10^{99} љуспица са различитом расподелом интензитета светлости по сваком каналу боје. Са практичне тачке гледишта, пронаћи две љуспице са идентичним оптичким одзивом (са идентичном спектралном и амплитудском расподелом рефлектоване иридесцентне светлости у блиском пољу) је дакле потпуно немогуће.



Слика 4.9. а) фотографија љуспице *Issoria lathonia* лептира, снимљена на оптичком рефлексионом микроскопу. Део означен црним квадратом је изолован и приказана је његова зелена компонента боје, б) је употребљена за статистичку анализу; в) 2Д ауто-корелациона

функција расподеле интензитета светлости са слике б, црвена област означава регион у коме је вредност ауто-корелације већа од 0.2.

4.4. Оптичка заштита са крилним љуспицама инсеката

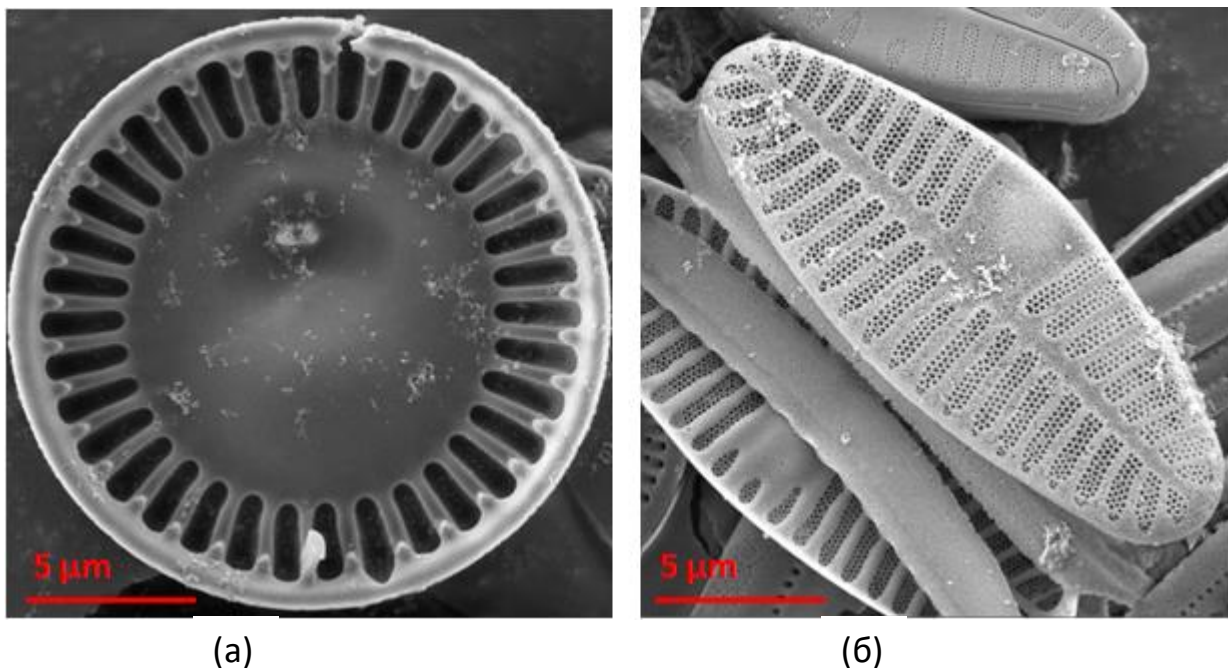
У 18.-ом веку, Бенџамин Франклин је репродуковао комплексне природне структуре са циљем заштите докумената. Његова идеја је била да распоред улегнућа и испупчења са листова биљака утисне на новчанице да би се спречило њихово фалсификовање [235, 236]. Са напретком технологије, Франклинов метод застарева и бива замењен различитим штампарским техникама као што су: дубока штампа, водени жиг, холограми итд. У данашње време, ову функцију обављају оптички варијабилни уређаји – који имају способност да мењају свој изглед са променом угла под којим се посматрају или осветљавају [237]. То могу бити различите врсте дифракционих решетки или холографских оптичких нано-структура. Они се користе због њихове инхерентне комплексне нано-структуре, сложеног оптичког одзива и могућности масовне производње, као и немогућности њиховог реплицирања фотокопирањем и сканирајућим техникама. Међутим, овакав приступ има озбиљан недостатак: велики број документа је заштићен идентичним оптичким варијабилним елементом. Дакле, ако се фалсификује заштитни оптички елемент, онда се може фалсификовати и заштићени документ и то у великим количинама. Решење за тај проблем је у индивидуализацији заштите, тако да сваки произведени заштитни елемент буде јединствен и тежак за фалсификовање. Оптички варијабилни елементи који се у данашње време користе као заштитни елементи нису погодни за индивидуализацију због тога што би онда цена њихове производње била знатно већа. Из тог разлога, важно је направити безбедносни медијум који би омогућио јединствену индивидуалну заштиту за сваки документ.

Варијабилни оптички елемент треба да буде интегрисан у безбедносни систем који се базира на три нивоа контроле [207]: први ниво је отвореног типа што значи да се контрола обавља визуелним путем, други ниво је полу-затвореног типа и подразумева примену одговарајуће контролне машине док је трећи ниво затвореног типа и базира се на форензичкој контроли високо-специјализованом опремом.

Потребно је да оптички ефекти буду локализовани, варијабилни, јединствени (овај фактор је веома карактеристичан за биолошке системе који имају потенцијал да се користе као заштитни оптички елементи, и подразумева да је готово немогуће наћи два идентична биолошка објекта у природи) и да буду последица интерференције, дифракције и расејања (укључујући поларизациону и угаону зависност) светлости са комплексне 3Д нано-структуре. Заштитни оптички елементи треба да испуњавају следеће особине: веома сложена и јединствена микро и нано-структура, да буду трајни, тежак обрнути инжењеринг и да их је веома тешко имитирати. Овакви објекти су познати под називом физичке једносмерне функције (*Physical One-Way functions*, а алтернативно се користи и назив *Physically Unclonable Functions*) [237]. То су физички објекти које је једноставно направити, али су изузетно компликовани за обрнути инжењеринг и копирање. На пример, овакви објекти се могу произвести уношењем насумично распоређених, микрометарских пластичних сфера у транспарентан материјал и детектовањем светлости расејане на оваквој структури [239]. Овакав систем има јединствене оптичке особине и његов оптички одзив је веома завистан од правца осветљења. Међутим, предложени метод је

ограничен физичким захтевима за мезоскопско расејање светлости јер заштитни оптички елемент треба да буде димензија 10 mm X 10 mm, са дебљином од 2,5 mm, што га чини непогодним за савремене безбедносне примене. Такође, расејавајуће честица су веома велике, пречника 500 – 800 μm , уз просечно међусобно растојање од 100 μm , што омогућава да се овај гломазан систем анализира техникама као што је микротомографија. Други пример физичких једносмерних функција је насумично расејање светлости на структурама сличним белом папиру – он се састоји од насумично испреплетаних избељених влакана целулозе, одговарајућих пречника и индекса преламања, на којима долази до расејања упадне светлости [240]. Ласерски сноп је расејаван на таквој структури и мерене су његове карактеристике. Међутим, ово захтева скенирање велике површине објекта ласерским снопом, што је спор процес, и такође услед свакодневне употребе може доћи до значајних промена на мрежи влакана које затим могу узроковати промене у оптичком одзиву структуре.

Имитирање природних структура у сврху заштите докумената предложено је од стране Hamm-Dubischar-a [242], Biermann-a и Rauhe-a [243], и Rauhe-a [244], који су представили идеју заштите докумената уз помоћ био-минерализованих љуштура радиоларија и диатома. Ово су морски једноћелијски организми са минералном љуштуром, слика 4.10. Заштитна функција се базира на комплексности њихове структуре. Главни проблем је што оптички ефекти нису довољно изражени, и што се комплексност оваквих структура може испитивати само на морфолошком нивоу уз помоћ електронске микроскопије. Додатни проблем су мале варијације у структури љуштуре код припадника исте врсте.



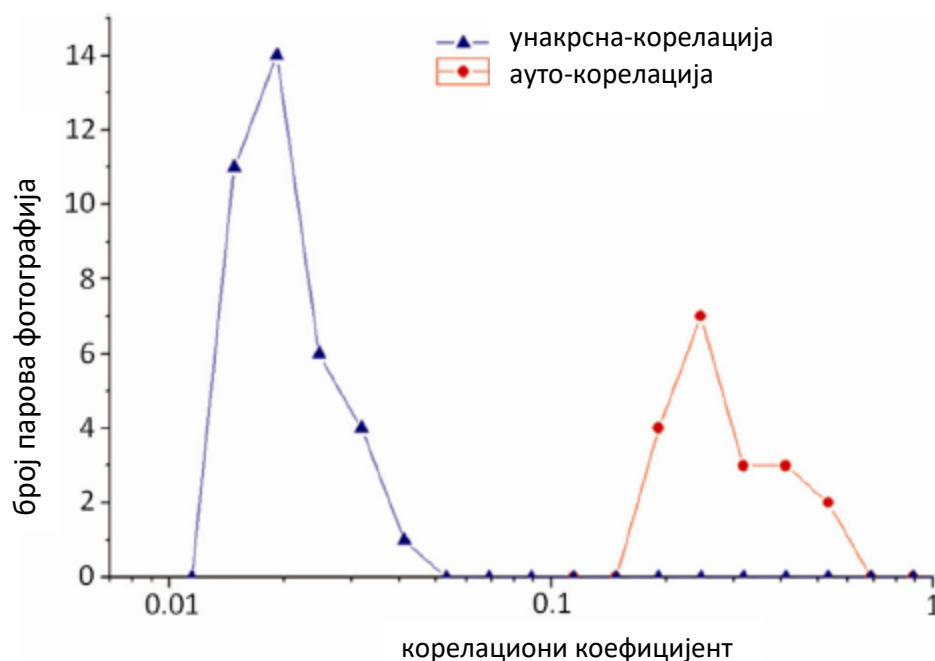
Слика 4.10. Електронски микрографи двају врста диатома, морских организама са минералном љуштуром.

У овој дисертацији је предложено коришћење хитинских структура инсеката за заштиту докумената. Са аспекта примена у заштити докумената, најзначајнији резултат теоријског моделовања љуспица лептира описаног у делу 4.2 ове дисертације је да варијације у дебљини слојева од само ± 15 nm узокују експериментално детектибилну промену у рефлексионом оптичком одзиву. Дакле, да би се имитирао оптички одзив овакве нано-структуре, потребно је направити копију структуре која би имала сличност са оригиналом до на приближно 1,5 nm (ред величине мање у односу на поменутих 15 nm који доводе до оптичке промене која се може регистровати). Ово далеко превазилази могућности данашње технологије, а ћелијски шум онемогућава репликацију идентичне љуспице природним путем, па љуспица лептира представља физички једносмерну функцију.

Предложено је да се за технолошку примену употреби спектрална и амплитудска расподела иридесцентне рефлектоване светлости у блиском пољу која се читава оптичким микроскопом, а истражена је и могућност употребе и модификације флуоресцентних особина љуспица, о чему ће бити речи у наредном делу ове дисертације. Неколико практичних, експерименталних проблема је решено. Један од њих је немогућност постављања документа у идентичну позицију и оријентацију приликом сваког читавања. Ово захтева позиционо и ротационо инваријантан алгоритам за читавање рефлексионог оптичког одзива. Изабран је алгоритам који се базира на Фурије-Мелиновој трансформацији (ФМТ), која задовољава поменуте услове (алгоритам је објашњен у Материјалима и Методама) [246, 247].

Девет љуспица *I.latnonia* лептира је постављено на стаклени супстрат и направљене су њихове фотографије на оптичком рефлексионом микроскопу, у неколико различитих позиција и оријентација љуспица (укупно 55 фотографија). Документоване слике су разложене на РГБ компоненте и зелена (Г) компонента је трансформисана ФМТ-ом. Корелације између одговарајућих ФМТ парова и статистичка расподела су приказани на слици 4.11. Корелациони коефицијент, који одговара љуспици постављеној на различитим позицијама, има вредности око 0.4 и његова вредност никада не пада испод 0.1. Најчешће вредности корелационог коефицијента за две различите љуспице су око 0.02 и никад нису биле веће од 0.06. Дакле, постављањем границе за валидност на вредност 0.08, загарантована је правилна дискриминација различитих љуспица.

Да би се кориговала дефокусираност фотографије, љуспице су фотографисане на 3-4 веома блиске фокалне позиције. Затим је употребљен алгоритам за уоштавање слике по слојевима („*focus stacking*“ у оквиру Picalay слободног софтвера да се издвоје добро фокусирани делови из сваке слике а затим су ти делови спојени у јединствену слику.



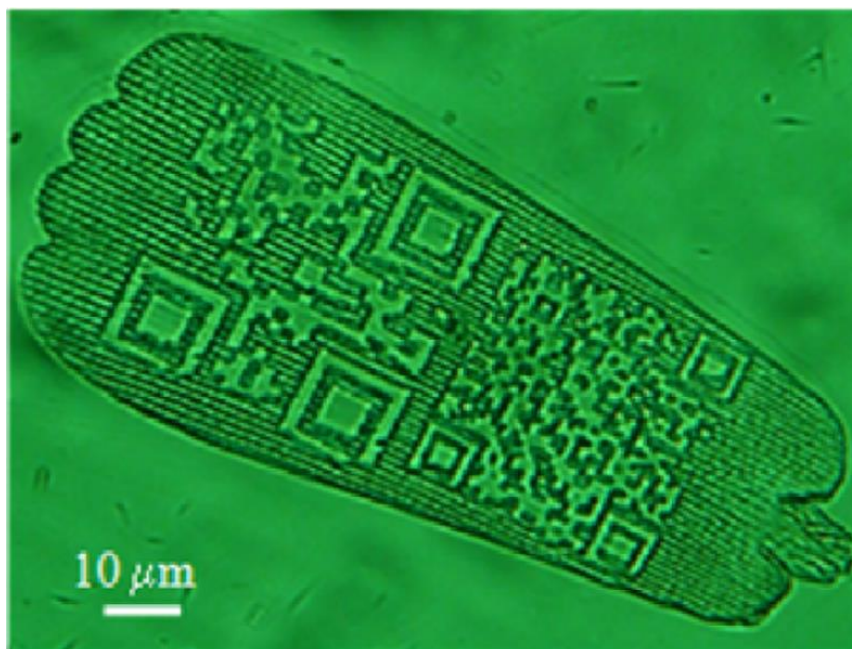
Слика 4.11. Унакрсна и ауто-корелација 55 парова фотографија љуспица *Issoria lathonia* лептира. На графику је приказан број парова фотографија и одговарајући коефицијент корелације. Максимални коефицијент унакрсне корелације је 0.02, док је ауто-корелациони коефицијент увек већи од 0.2

4.5. Флуоресцентне особине крилних љуспица одабраних врста инсеката и ласерска обрада

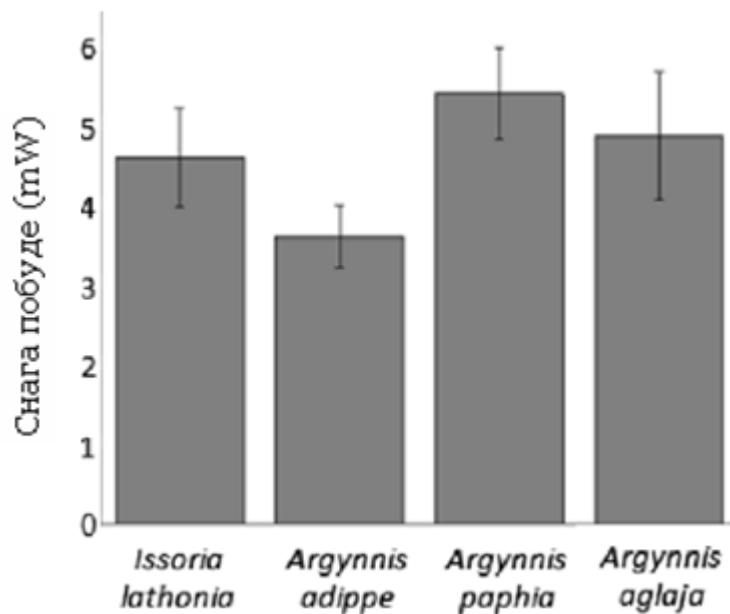
Да би се изградио квалитетан заштитно-оптички систем, потребно је заштити се од покушаја употребе произвољне љуспице лептира. Да би се ово постигло, може се направити само-проверавајући документ уз помоћ дигиталног потписа издаваоца документа, у оквиру система јавног кључа. У овом делу дисертације је показано да се неопходна информација о аутентичности може записати директно на љуспицу, фемтосекундним ласером. Ласерска обрада љуспица фемтосекундним ласером омогућава контролисану модификацију физичких и оптичких особина љуспица и њихову потенцијалну примену као “write-only” меморије. У ту сврху је модификован нелинеарни ласерски микроскоп, чији је детаљан опис дат у Материјалима и Методама, а искоришћено је и знање о нелинеарним оптичким особина хитина, главног градивног састојка љуспица. Ове особине су истражене у претходном делу ове дисертације. Сlike су добијене при снагама ласерске радијације мањим од 1 mW и са максималном попречном и осном резолуцијом од 0.7 μm и 2.1 μm , респективно. Због упоређивања оптичког и флуоресцентног сигнала, љуспице су фотографисане и у светлом пољу, Canon EOS 50D дигиталном камером.

Информација се може уписати физичким модификовањем љуспице (ласерско сечење или бушење) или поништавањем њене флуоресценције (фото-избељивање). Физичко модификовање мења иридесценцију љуспице, док фото-избељивање мења њен флуоресцентни профил при чему иридесценција љуспице и њене остале оптичке особине остају непромењене па се због тога овај процес може искористити да се на љуспицу запише додатна, прикривена информација у форми сиве слике („gray scale“ – слике са више нивоа дискретизације) (што ће касније бити показано). Позиције два галванометарска огледала у склопу нелинеарног ласерског микроскопа се компјутерски контролишу и ова огледала омогућавају померање ласерског снопа по узорку, у складу са задатом трајекторијом. Пре доласка на узорак, ласерски снап је проширен а затим фокусиран на узорак микроскопским објективом. Софтвер ласерског микроскопа је модификован тако да омогућава исцртавање произвољних облика коришћењем векторских слика. Таласна дужина и снага ласерске радијације, поларизација, време трајања импулса и брзина сканирања љуспице ласерским снопом су вариране да би се одредиле оптималне вредности ових параметара за сечење, бушење или фото-избељивање љуспица.

По потреби, ласерски се могу обрађивати и предња и задња страна љуспице, што значајно повећава криптографске могућности и информациони капацитет љуспице. Појединачне љуспице су узете са крила лептира и пребачене на микроскопско покровно стакло. Друго покровно стако је стављено преко љуспице (на горњу страну љуспице). Овако фиксиране љуспице се могу лакше манипулисати, што омогућава олакшану ласерску обраду обе стране љуспице. Приликом трансфера љуспица са крила лептира на покровно стакло долазило је до деформације љуспице. Ова деформација може бити природна или изазвана пребацивањем и позиционирањем љуспице. Проблем је решен кондензовањем водене паре у простору између супстрата и љуспице при чему долази до исправљања љуспице услед површинског напона. После испаравања воде, љуспица остаје поравната и причвршћена за супстрат.



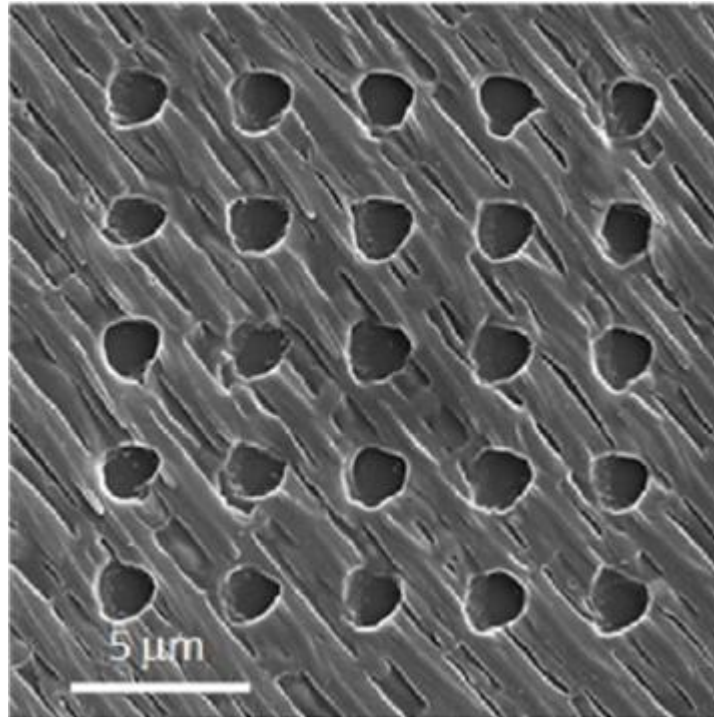
Слика 4.12. Фотографија љуспице *Issoria lathonia* лептира, на трансмисионом оптичком микроскопу. Љуспица је модификована - исечена фемтосекундним ласером. На љуспицу је утиснут „QR“ код.



Слика 4.13. Прагови оштећења ласерског сечења за 4 врсте лептира које су анализирани у овом истраживању.

Љуспице су првобитно осликане детекцијом флуоресценције која настаје услед двофотонске побуде хитина. Инструмент је затим пребачен у мод за векторско исцртавање. Повећана је снага фемтосекундног ласера тако да је могуће сећи љуспице (слика 4.12). Да би се утврдио праг оштећења (праг за сечење) исцртавани су једноставни облици при различитим вредностима снаге ласера. Откривено је да прагови оштећења зависе од таласне дужине ласерске радијације, микроскопског објектива, и од врсте лептира (коришћени су *Issoria lathonia*, *Argynnis adippe*, *Argynnis paphia*, *Argynnis aglaja*), слика 4.13. Најнижи прагови оштећења су добијени на 730 nm, са 40X, 1.3NA микроскопским објективом. Сечење је могуће само у фемтосекундном режиму. У континуалном режиму ласера сечење није могуће ни на највећим снагама. Ово показује да су мултифотонски процеси одговорни за ласерско сечење.

Минимални пречник ласерски изазваног оштећења у овом истраживању је био 1.7 μm . Најнижи прагови оштећења су 4,5 mW, када је коришћен 40X, 1.3NA микроскопски објектив и 8 mW када је коришћен 20X, 0.8NA микроскопски објектив, за $\lambda = 730 \text{ nm}$. У пракси је рађено на снагама изнад прага оштећења да би се обезбедила поуздана и поновљива ласерска обрада. Због тога је минимална ширина ласерског оштећења на узорку већа од латералне резолуције фемтосекундног система. У складу са овим чињеницама и узимајућу у обзир просечне димензије љуспице ($\approx 50 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m} = 5000 \mu\text{m}^2$), процењен информациони капацитет љуспице је око 3000 битава, третирајући место оштећено ласером као бинарно 1, а неоштећено као бинарно 0. На слици 4.14 приказана је типична матрица отвора направљених ласером, која показује начин на који су анализирани информациони капацитет љуспице и оптималне вредности параметара ласерског снопа за максимизацију тог капацитета.

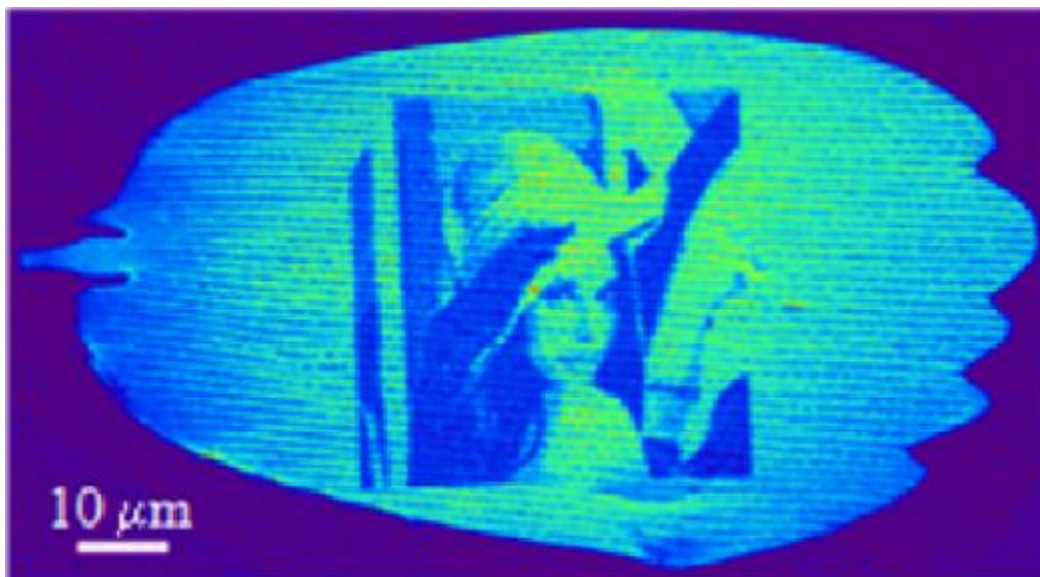


Слика 4.14. Матрица избушених отвора на љуспици *Issoria lathonia* лептира, електронски микрограф. Рупице су избушене титанијум-сафир ласером у фемтосекундном режиму, у оквиру нелинеарног ласерског микроскопа, са циљем одређивања минималног пречника ласерског оштећења на љуспици и, са тим у вези, одређивања информационог капацитета љуспице.

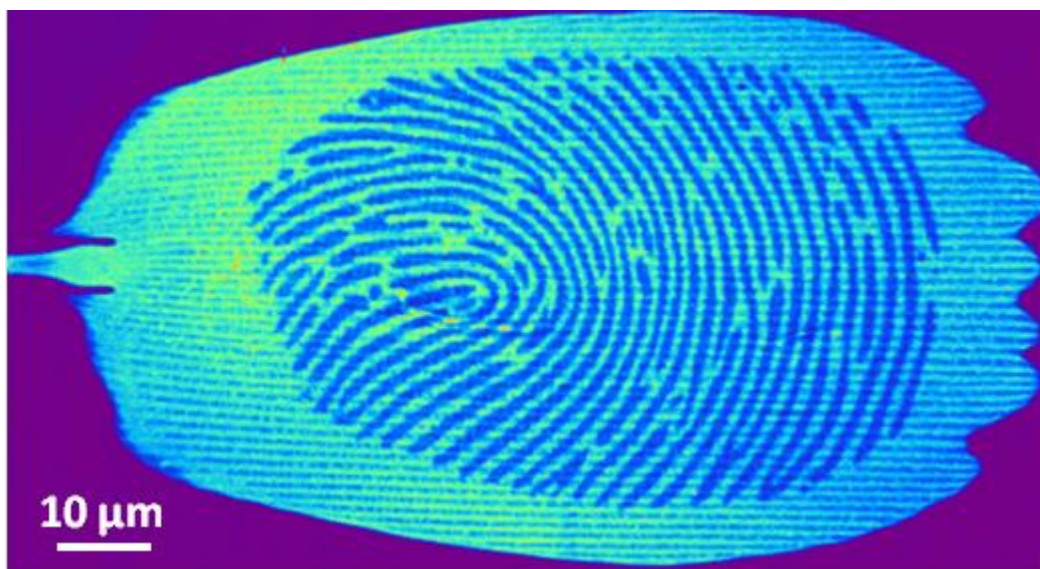
Сваки бит информације уписан на љуспицу лептира ласерским бушењем смањује број области на љуспици са статистички независним спектралним садржајем. На пример, ако се претпостави да је једна половина горње површине љуспице ласерски обрађена (што смањује нетакнуту површину љуспице са $50 \times 100 = 5000 \mu\text{m}^2$ на приближно $35 \times 70 = 2450 \mu\text{m}^2$; љуспица нема правилан геометријски облик па се зато употребљиве површине морају процењивати), онда остаје око 46 области љуспице са независним спектралним садржајем. Стога, процена броја различитих љуспица по сваком РГБ каналу, у овом случају, је 10^{46} , при чему је свака љуспица заштићена са 1500 битова додатне информације.

Информациони капацитет љуспице није ни приближно потпуно искоришћен процесом бушења или сечења љуспице. Дво-фотонска апсорпција хитина (који је доминантан градивни састојак љуспица), описана у другом поглављу ове дисертације, може се искористити да се на љуспицу запише додатна, прикривена информација у форми сиве слике. Ово се може постићи ултра брзим ласером у склопу нелинеарног ласерског микроскопа. Таласна дужина ласера је изабрана тако да фото-избељивање настаје као последица једно-фотонског процеса апсорпције (када се користи континуална ласерска радијација) или дво-фотонског процеса (када се користи фемто-секундна ласерска радијација). Таласна дужина, снага ласерске радијације и брзина скенирања љуспице ласерским снопом одређују степен фото-избељивања. Таквим приступом на

љуспицу је утиснута фотографија, селективним ласерским избељивањем одређених региона љуспице, слика 4.15. Информација се може регистровати УВ радијацијом ниског интензитета, као прикривени ниво заштите. У оптичкој рефлексији, информација се не може регистровати. Алтернативно, информација се може уписати УВ радијацијом ниског интензитета коришћењем УВ пројекционог система који се састоји од УВ лампе и одговарајућег објектива. Маска, која садржи транспарентне и нетранспарентне делове, који чине слику – информацију, поставља се у систем тако да се жељена слика пројектује директно на љуспицу. Фото-избељивање се контролише интензитетом УВ радијације и временом озрачивања узорка.



(a)



(б)

Слика 4.15. Фото-избељивање; а) селективно избељена љуспица са мотивом Лене, б) селективно избељена љуспица са мотивом отиска прста. Сlike су добијене на нелинеарном

ласерском микроскопу, на основу двофотонски побуђене флуоресценције хитина. Сlike Лене и отиска прста се не могу регистровати у оптичкој рефлексији.

Описана заштита докумената је ограничена на машинско читавање. Ово може бити проширено на форензички ниво, читавањем слике са електронског микроскопа при чему насумична карактеристика могу, нпр, да буду растојања између суседних трансферзалних гребенова на горњој површини љуспице. Ако је потребна визуелна контрола, може се уместо једне, употребити велики број љуспица, које прекривају велику површину на супстрату, видљиву голим оком. На овај скуп љуспица, могу се ласерски угравирати различити облици – нпр. отисак прста власника или ирис ока власника документа, при чему одређени број љуспица због ласерске обраде стиче промењене оптичке особине. Једна од ласерски немодификованих љуспица се онда може изабрати за машинско и форензичко испитивање [206].

4.6. Разматрање оптичко-заштитне функције крилних љуспица инсеката

Када се говори о заштити документа, поставља се важно питање: колико је тешко фалсификовати љуспицу лептира? То љуспице подразумева: имитирање саме структуре љуспице, која би онда у интеракцији са упадном светлошћу давала идентичан оптички одзив, или имитирање оптичког одзива љуспице неком другом, једноставнијом структуром. Први приступ се базира на обрнутом инжењерингу и на производњи идентичне структуре – љуспице, док се други приступ базира на имитирању оптичког ефекта.

Обрнути инжењеринг је процес који се састоји из две целине: прва подразумева анализу 3Д структуре целе љуспице, и анализу особина материјала од кога се љуспица састоји (индекс преламања и апсорпција). Други део обухвата синтезу копије љуспице која треба да има оптичке особине идентичне оригиналу, дакле постојање литографске технике којом би се копијала структура и особине материјала. Чак и уз употребу најбољих технологија данашњице (микротомографија, електронска или рентгенска холографија) овај приступ је немогућ због резолуције данашњих 3Д аналитичких и литографских техника (реда величине 10 nm), времена потребног за овако нешто и цене [228].

Имитирање оптичког одзива, с друге стране, захтева пажљиву анализу рефлексије у целом оптичком делу спектра и пуном просторном углу, уз поседовање метода да се веродостојно репродукује оптички таласни фронт. Овде се појављује фундаментално питање: да ли различите структуре могу да генеришу идентичне таласне фронтове? Овим питањем се бави теорија расејања, и постоји мноштво радова који се баве директним и инверзним проблемима ове врсте. Не постоји општи одговор на ово питање, јер он зависи од природе расејавача (транспарентан или нетранспарентан расејавач), граничних услова (проводник, диелектрик, појачавајућа средина), таласне дужине и просторног угла пробне радијације [229]. Постоје мање или више егзотичне ситуације у којима јединственост није загарантована, као што су појачавачка средина и оптички плаштови [230, 288]. Али, када се ради о предмету овог истраживања, одговор је – не постоје два различита расејавача који производе исто расејано оптичко поље (блиско и далеко)

[231].

Љуспице лептира су најбоље заштићене њиховом јединственошћу из које произилази неопходност фалсификовања сваког документа испочетка. Нано-структура сваке љуспице су јединствена (о овоме је било речи у деловима 4.2 и 4.3 ове дисертације) и у интеракцији са светлошћу производи низ оптичких ефеката: општи облик рефлексионог сектра, иридесценција, апсорпција, поларизација, флуоресценција, Моире, дефекти, дифракција у блиском и далеком пољу, локални спектар итд. Додатно, љуспице појединих врста лептира имају различите оптичке особине на горњој и доњој површини што се може искористити за читавање оптичког одзива са обе стране љуспице у савршеном поравнању („see-through register“ – једна од техника која се примењује у области заштите, нпр. новчаница). Симултана употреба свих или неких од поменутих ефеката значајно повећава могућности употребе љуспица лептира као заштитног варијабилног оптичког елемента.

Важно питање је да ли љуспице лептира могу да буду копиране неком холографском методом. До сада су површински и запремински холограми копирани контактним [232], неконтактним [233], и сканирајућим методама [234]. Међутим, ове методе нису погодне за копирање слојевите нано-структуре љуспица лептира због синусоидне природе холографски генерисаних дифракционих решетака. Такође, дифракционе решетке са периодом мањим од таласне дужине светлости не могу да буду копиране због еванесцентних таласа који настају приликом дифракције. Ове сићушне структуре које се налазе на спољашњој површини сваке љуспице су суштински важне за оптички одзив целе љуспице, зато што узрокују униформно расејавање радијације из „плавог“ дела спектра, у целом просторном углу, као што је показано у оптичком моделу љуспице.

Нису све врсте *Lepidoptera* подједнако погодне за примену у заштити докумената. Као што је показано, овакве структуре морају да имају сложену нано-структуру, са великом варијабилношћу и морају бити веома тешке за анализу и за обрнути инжењеринг. У овом истраживању су анализирани поједине врсте које припадају породици *Nymphalidae* (то је породица која припада реду *Lepidoptera*; овај ред инсеката обухвата лептире и мољце). То је најбројнија породица лептирова, која броји више од 6000 врста. Многе врсте из ове породице лептира имају иридесцентне љуспице на крилима.

Материјал од кога су изграђене љуспице је хитин. У питању је изузетно дуготрајан материјал. У природњачким музејима се могу видети примерци иридесцентних лептирова старих по неколико векова. Старост примерка лептира *I. Lathonia* коришћеног у овом истраживању је око 30 година и сребрна боја на његовим крилима се ни мало не разликује у односу на живе примерке. Фосили инсеката задржавају своју иридесценцију после петрификације и њихова иридесценција се не мења ни после неколико милиона година [256]. Ово се дакле може поредити са недавно описаном 5Д меморијом [257], за коју се тврди да има неограничено време живота.

Љуспице лептира могу незнатно да промене своје димензије услед промене температуре [258], влажности и присуства различитих гасова [259]. Услед овога долази до промене у њиховом оптичком одзиву, али ова промена је сувише мала да би утицала на примену љуспица лептира у заштити докумената, при нормалним атмосферским условима. Систематске промене у дугим временским интервалима нису очекиване услед хидрофобности, нерастворљивости и биолошке инертности хитина – доминантног састојка љуспица [260]. Важећи период већине докумената је краћи од 10 година, што је период у коме се очекује да се љуспице не мењају. Узимајући у обзир физичку и хемијску стабилност хитина и чињеницу да оптички одзив

неколико година старих узорака показује изузетну сличност са оптичким одзивом свежих узорака, за очекивати је да су оптички одзиви љуспица веома стабилни и да могу имати дугорочне криптографске примене.

Осим љуспица лептира *Issoria lathonia*, у оквиру проучавања оптичких особина природних фотонских структура, експериментално и теоријски је анализиран хитински оптички систем који се налази на дорзалној страни крила мољца *Diachrysia chrysitis* [97]. Показано је да овај оптички систем представља природан фино-подешен оптички филтер који се састоји од два слоја љуспица (покровне и базне) и крилне мембране. Његов рефлексциони спектар показује велику сличност са рефлексним спектром злата. Љуспице поседују површинску нано-дифракциону решетку која „плави“ део упадне светлости интензивно расејева у унутрашњост крилне мембране. Тамо се време боравка ових фотона продужава ефектом локалног таласовода и тиме се значајно повећава апсорпција на овим таласним дужинама. На овај начин, „плави“ део упадне светлости бива ефикасно елиминисан из рефлексije што у комбинацији са интерференцијом преостале упадне радијације инсекту омогућава златну боју његових крила.

5. Радијативне термалне особине хитинских наноструктура биолошког порекла

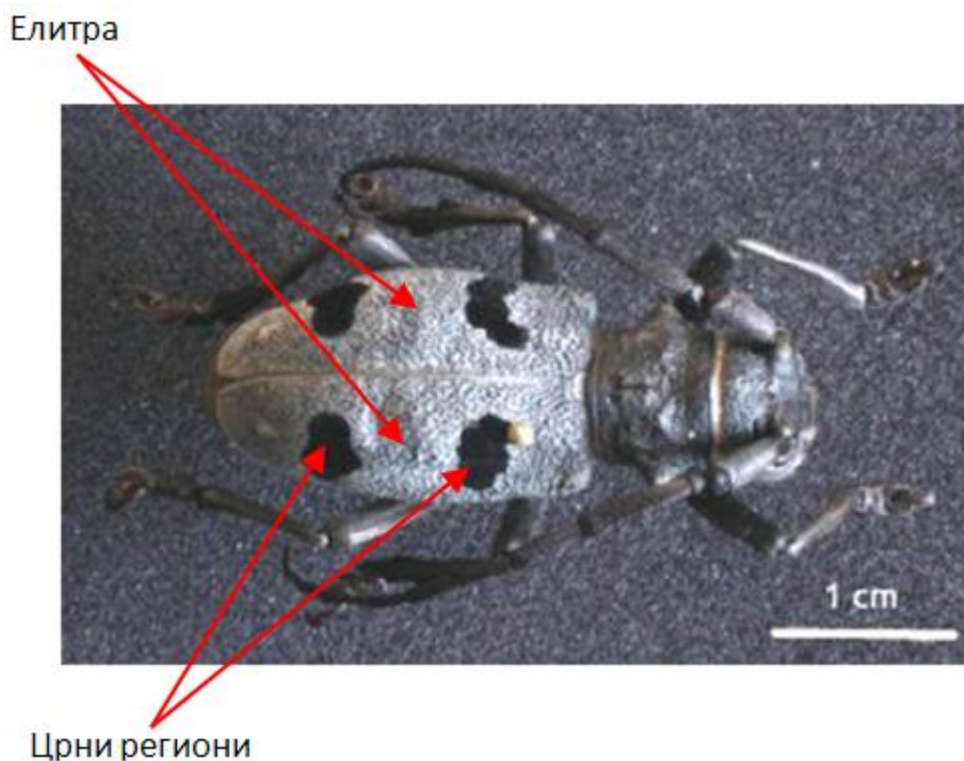
Природне хитинске микроструктуре могу, поред своје оптичке функције, имати и специфичне термалне особине. Њихова микро и наноструктура може узроковати симултану апсорпцију (или рефлексију) радијације из појединих делова оптичког спектра и ефикасну радијативну размену топлоте са околином. Код многих оваквих структура постоји адекватан баланс између апсорбоване радијативне енергије у оптичком делу спектра и ослобођене енергије у инфра-црвеном (ИЦ) спектралном опсегу [261-264, 290], којим инсект ефикасно дисипира топлотну енергију. Сложене фотонске структуре су код многих живих организама присутне и као део система за детекцију ИЦ радијације.

Интеракција природних хитинских микроструктура са ИЦ радијацијом је веома мало истраживана. Досадашња истраживања су углавном имала за циљ развијање квалитетног детектора ИЦ радијације и заснивала су се на промени микро и нано-структуре хитинске љуспице изазване променом температуре услед озрачивања ИЦ радијацијом. Хитинске микроструктуре се допирају различитим материјалима да би се повећала осетљивост, спектрална селективност и брзина одзива детектора. Већина данашњих приступа се заснива на употреби спектрално селективних ИЦ филтера или ИЦ апсорбера, што могу да буду, на пример, периодичне плазмонске [265-267] или периодичне фотонске структуре [268]. Додатна предност у односу на остале технике је што не постоји потреба за хлађењем инфра-црвеног детектора. У последње време су предложени различити дизајни и оперциони принципи за тзв. „нехлађену“ детекцију ИЦ радијације, као што су термалне биморфне структуре [269], микро-фотонски резонатори [270], термо-плазмонски уређаји [271] итд.

Хитинске љуспице лептира имају веома малу термалну масу што их чини одличним материјалом за примену у високо-осетљивој детекцији инфра-црвене радијације. Потенцијална резолуција је на нанометарском нивоу, због нанометарских димензија карактеристичних елемената хитинске структуре. На пример, микро и нано-структурисане хитинске љуспице лептира су допиране једнослојним карбонским нано-цевима [258]. Детекција ИЦ радијације се заснива на хомогеној термалној експанзији хитинске љуспице услед озрачивања, што доводи до повећања карактеристичних растојања унутар ове структуре (растојање између лонгитудиналних и трансферзалних гребенова, растојање између нано-гребенова на површинској нано-дифракционој решетки, растојање између горње и доње ламеле љуспице). Ова промена узрокује промену у оптичком одзиву структуре и ово се користи за детекцију инфра-црвене радијације. У другом истраживању, љуспице лептира су модификоване нано-структурама од злата [272]. Овај приступ се заснива на разлици у коефицијентима термалне експанзије за хитин и злато, услед чега долази до делимичне промене облика хитинске структуре приликом озрачивања ИЦ радијацијом. Ова промена се уочава у оптичком одзиву структуре.

У овом делу дисертације, истражен је утицај микро и наноструктуре на термалне особине биолошких система. Ово је посебно проучено на примеру елитре *Morimus asper funereus* (Mulsant, 1863) (Insecta: Coleoptera: Cerambycidae) инсекта (слика 5.1), чија је спољашња површина (она површина која је окренута ка спољашњој средини) прекривена хитинским микро-сочивима испод којих се налазе објекти који обликом и структуром подсећају на црна

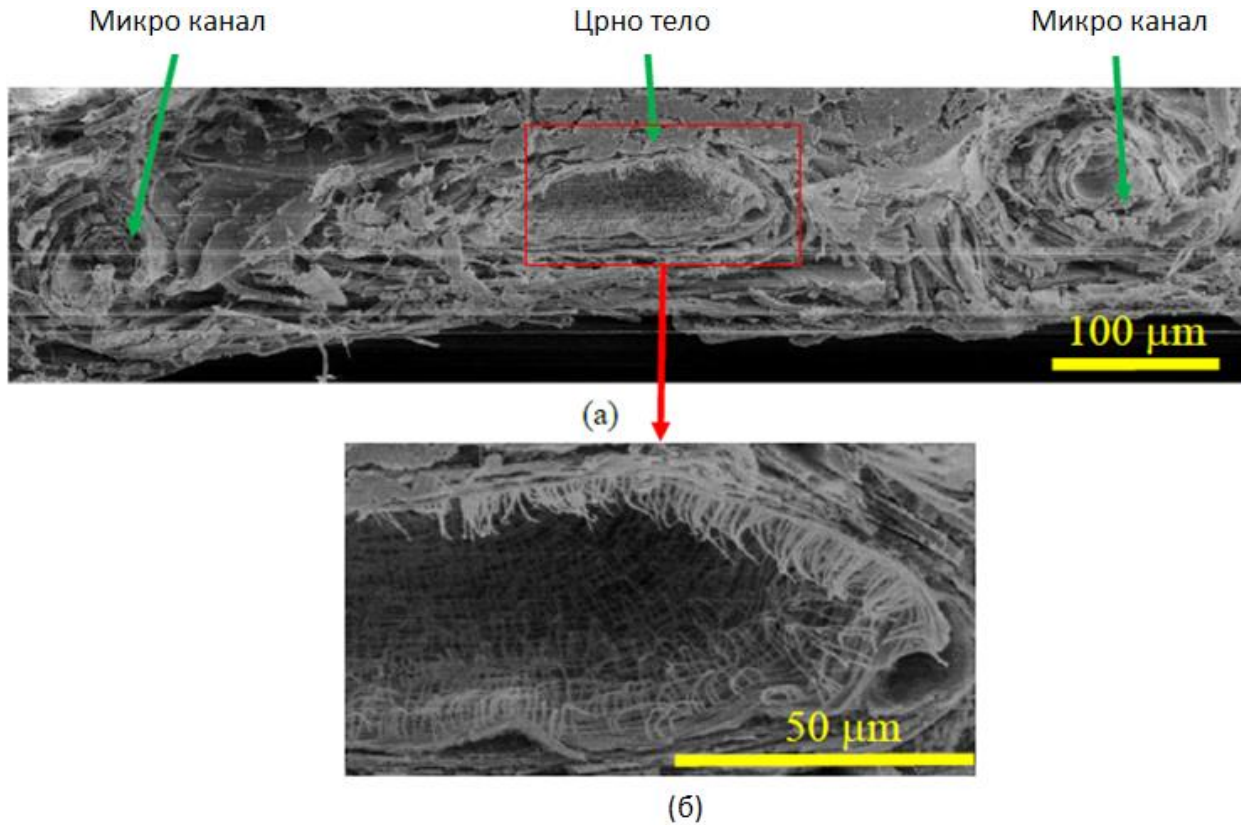
тела. Елитра је модификован предњи пар крила појединих редова инсеката (највећим делом тврдокрилаца), који представља својеврстан заштитни оклоп [273, 274]. Елитра испод себе скрива задњи пар крила, која инсектима служе за летење, али код овог инсекта су закржљала и немају никакву функцију. На њеној унутрашњој површини (она која је окренута ка телу инсекта) налази се ансамбл хипер-униформно распоређених микронских израслина конусног облика. Он можда има функцију стохастичке фотонске структуре која је оптимизована за ИЦ део спектра, са потпуном фотонском забрањеном зоном. Поменуте морфолошке карактеристике синергијски повећавају ефикасност апсорпције и емисије ИЦ радијације. Оптичком и електронском микроскопијом су истражене морфолошке карактеристике спољашњег и унутрашњег дела елитре, а термалном камером радијативне особине у термалном ИЦ делу спектра (7.5 – 13 μm). Затим су креирани 3Д модел и теоријски термални модел структуре.



Слика 5.1. *Morimus asper funereus*, на сивој елитри уочавају се четири црна региона.

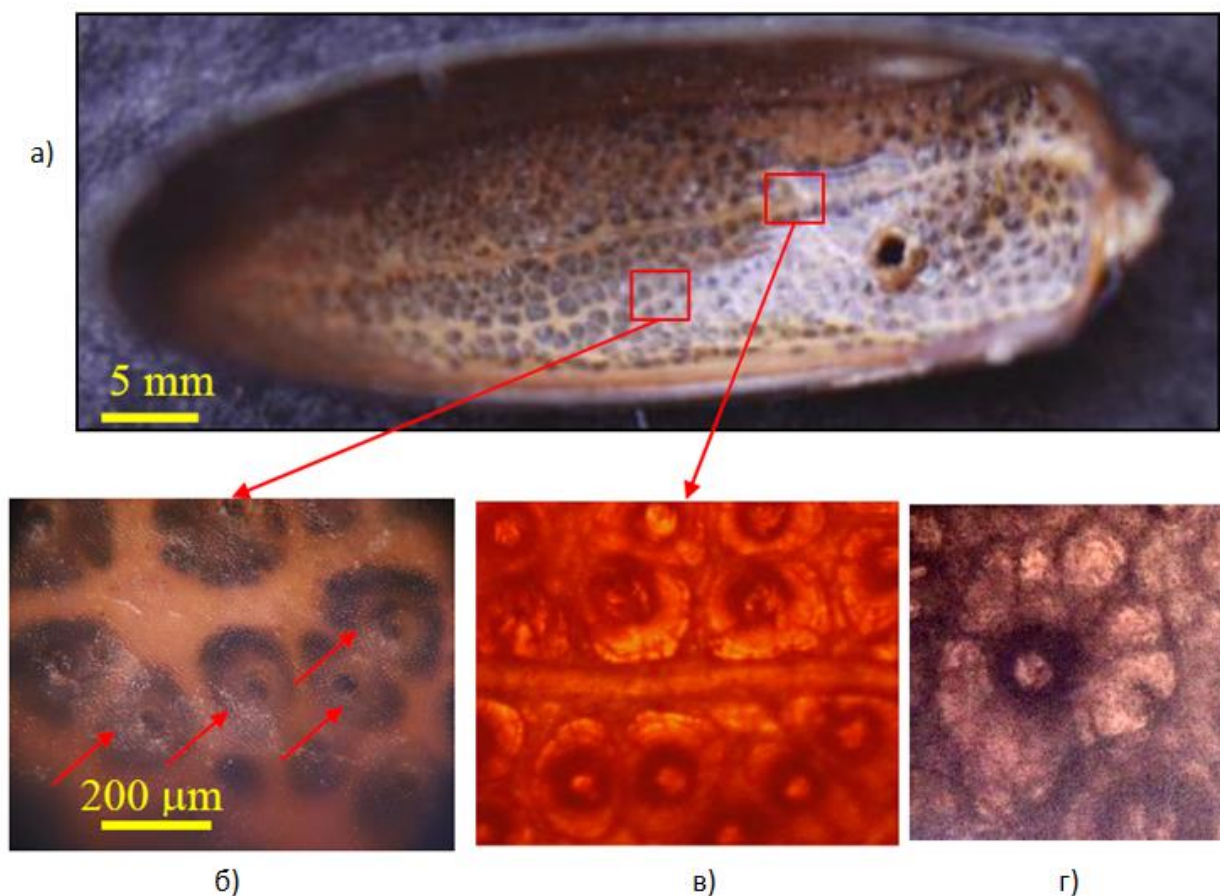
У првом делу истраживања је показано да инсект поседује хијерархијску структуру почев од макроскопског, па до микронског и нанометарског нивоа. Компјутеризована микротомографија показује да елитра има облик елипсоида, чија дебљина варира у опсегу 200-350 μm . На слици 5.2 приказан је електронски микрограф попречног пресека дела елитре. Уочава се да је елитра слојевито структурисана, и слојеви хитина обухватају микро-канале кроз које протиче хемолимфа (телесна течност која циркулише кроз тело бескичмењака). На слици се уочавају два микро-канала а између њих се налази објекат елипсоидног облика са кружном апертуром у центру. Објекат изгледа као стандардан модел црног тела [275]. У елитри се, као што ће се видети на наредним фотографијама, налази мноштво оваквих објеката.

Унутрашња површина (површина окренута ка телу инсекта) елитре је храпава (слика 5.3а), са овалним црним зонама (величине 0.2 – 0.4 mm, слика 5.3б), окруженим светло-жутим зидовима. У оптичкој трансмисији уочава се да су зидови заправо комплексна мрежа повезаних канала кроз које протиче хемолимфа, слика 5.3в. Објекти који својим обликом и структуром подсећају на црна тела су тамно црвени (слика 5.3в). Црвена боја потиче од меланина, који има велику апсорптивност у „плавом“ и „зеленом“ делу спектра и значајну трансмитивност у „црвеном“ делу оптичког спектра.

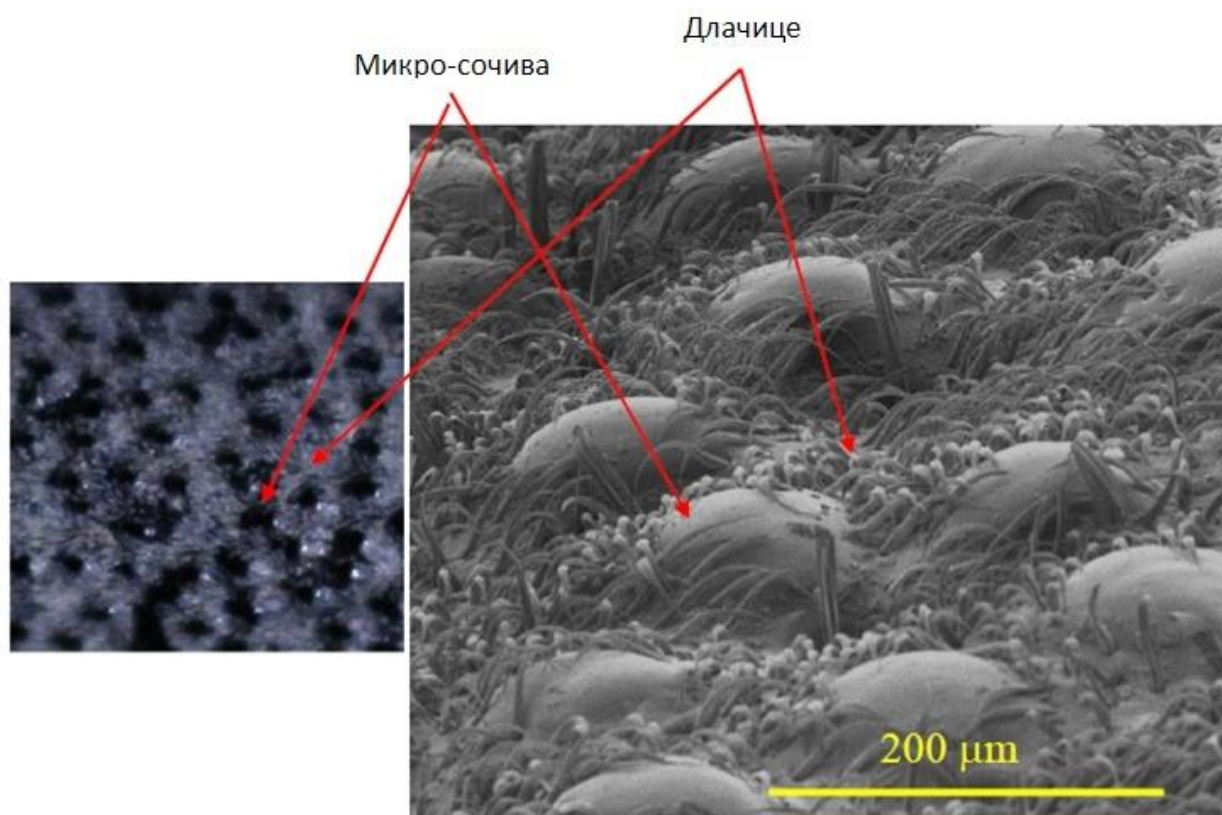


Слика 5.2. СЕМ снимци: а) попречни пресек елитре *M. asper funereus* инсекта, уочава се објекат који изгледа као црно тело, са микро каналима; б) увећана фотографија црног тела открива микро-сензиле (длачице микронских димензија) на унутрашњој површини црног тела.

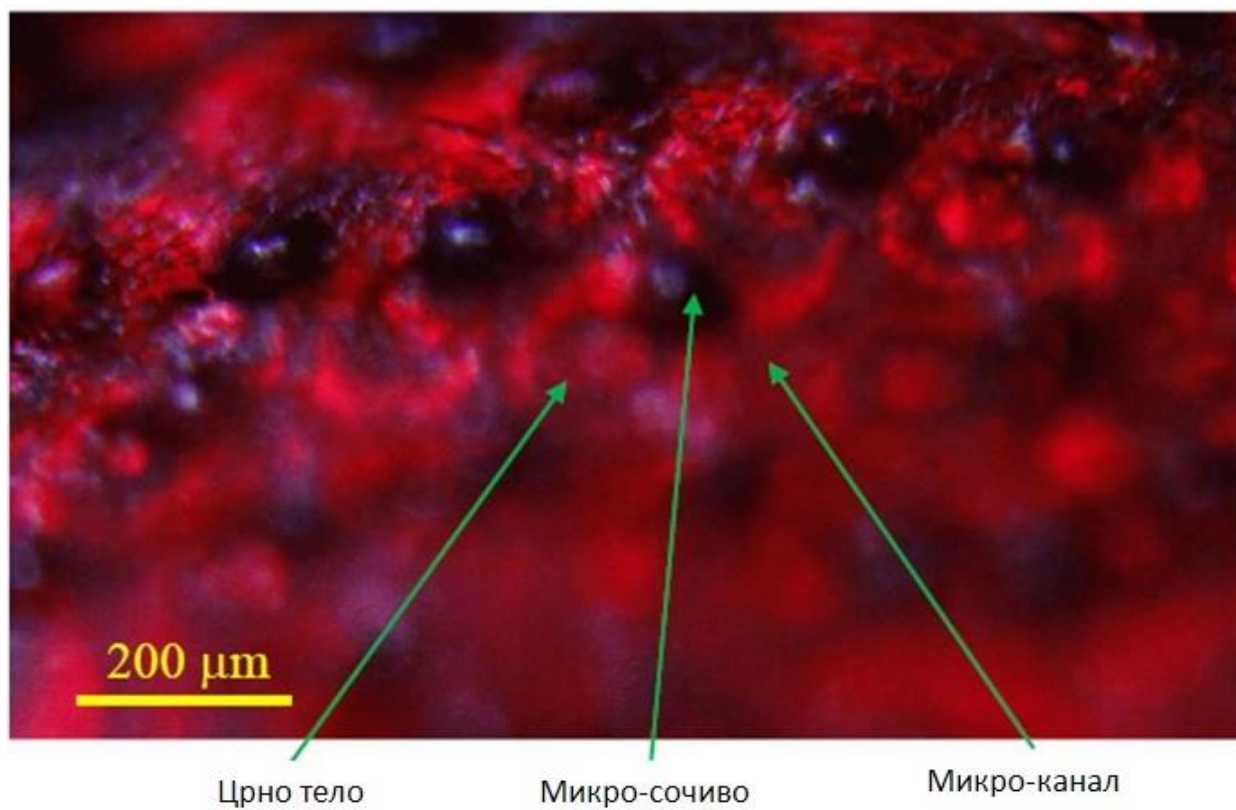
Спољашња површина (површина окренута ка спољашњој средини; на ову површину долази електро-магнетна радијација из спољашње средине) структуре поседује низ црних избочина, које имају облик микросочива, и окружене су длачицама (слика 5.4). Микросочива и црна тела имају прецизну међусобну оријентацију (слика 5.5), што се уочава симултаним детектовањем оптичке трансмисије и рефлексије структуре. Црно тело се налази у центру сваке овалне зоне, а микросочиво обухвата њену ивицу, и директно је фокусирано на канал испуњен хемолимфом.



Слика 5.3. а) оптичка фотографија унутрашње површине елитре *M. asper funereus* инсекта, у природном стању; б) увећани региони са фотографије а), уочавају се структуре сличне црном телу (сферног облика, са црном апертуром у центру, означене црвеним стрелицама); в) фотографија у оптичкој трансмисији открива систем канала који се гранају из централног канала и окружују црна тела; г) елитра избељена у водоник-пероксиду открива мрежу канала мањих димензија који повезују црно тело са централним каналом.



Слика 5.4. Спољашња површина елитре *M. asper funereus* инсекта, са микро-сочивима и длачицама. Оптичка фотографија је на левој страни а електронски микрограф на десној.

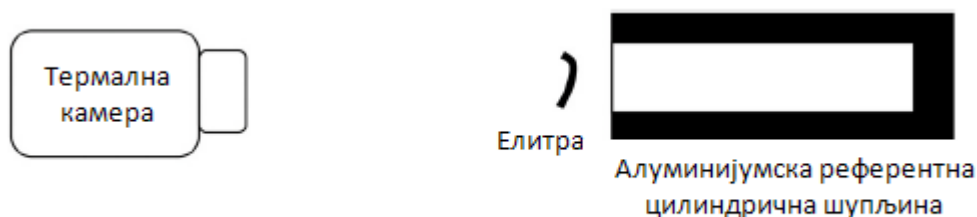


Слика 5.5. Фотографија елитре *M. asper funereus* инсекта на оптичком микроскопу, снимљена симултано у рефлексији и трансмисији. Микро-сочива су тамни региони, а испод њих се уочавају црна тела и канали.

5.1. Радијативне особине наноструктуре инсекта *Morimus asper funereus*

Радијативне особине структуре су истражене термографијом. Елитра инсекта је постављена испред референтне шупљине (са апсорптивношћу $> 99\%$) [293] и осликана термалном камером која има детекциони опсег $7.5 - 13 \mu m$ (опис камере је дат у Материјалима и Методама), слика 5.6. Због малих димензија инсекта, камера је позиционирана што је могуће ближе (на растојању $10-20 \text{ cm}$), а повремено је коришћено и додатно сочиво за додатно увећање. У оваквим условима постаје изражен „*Narcissus*“ ефекат (радијација коју емитује сама камера) [328, 329]. Због тога је анализирана биофотонска структура постављена изван термалног снопа који излази из објектива камере. Остатак камере је био прекривен алуминијумском фолијом.

Као референца за мерење термалне емисивности коришћена је алуминијумска шупљина на коју је нанесен апсорбујући материјал. Апсорптивност шупљине је теоријски израчуната и добијена је вредност од 0.996 [292].

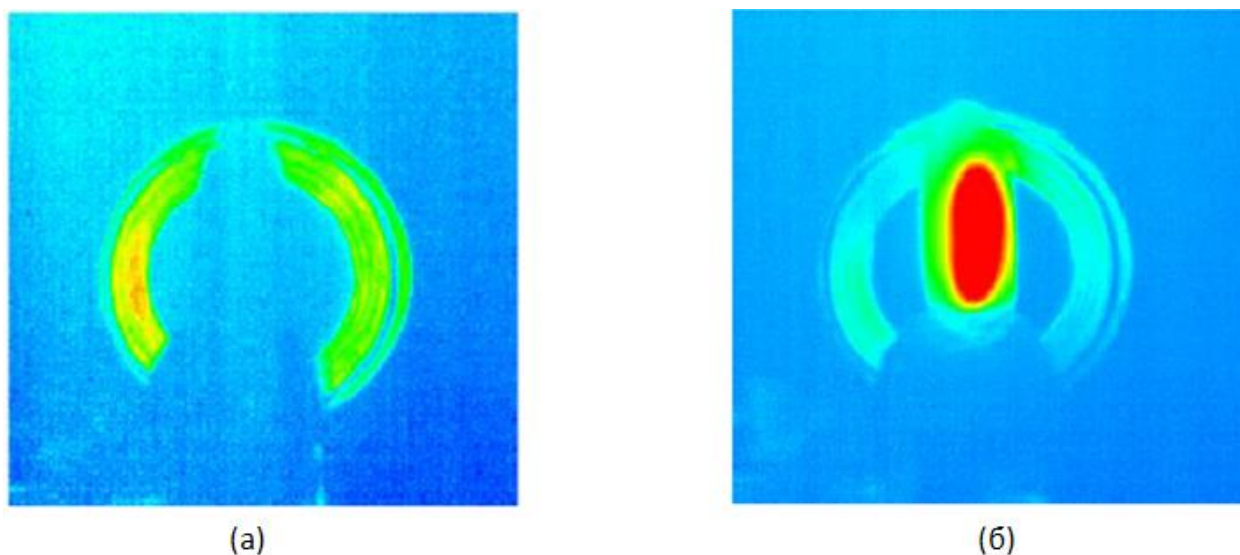


Слика 5.6. Шема експерименталне поставке за истраживање радијативних термалних особина елитре *Morimus asper funereus* инсекта

У стању термалне равнотеже, на собној температури, структура је неуочљива и постаје видљива само када се загрева ласерском радијацијом (слика 5.7). Ово важи за целу површину унутрашње и спољашње стране структуре. Дакле, може се закључити да је велика дирекциона емисивност ($> 99\%$) константна на целој површини структуре, у једнакој мери и за црне и за сиве делове, и да структура има карактеристике Ламбертовог извора. Овакав извор емитује радијацију у складу са косинусним законом [275-278]:

$$I(\theta) = I_0 \cos \theta \quad (5.1)$$

где је I_0 интензитет радијације коју емитује Ламбертов извор у правцу нормале на извор, а I је интензитет који извор емитује у правцу који са нормалом на извор формира угао θ . Дакле, интензитет емитоване радијације је максималан у правцу нормале на Ламбертов извор, а затим, у осталим правцима, опада по косинусном закону.



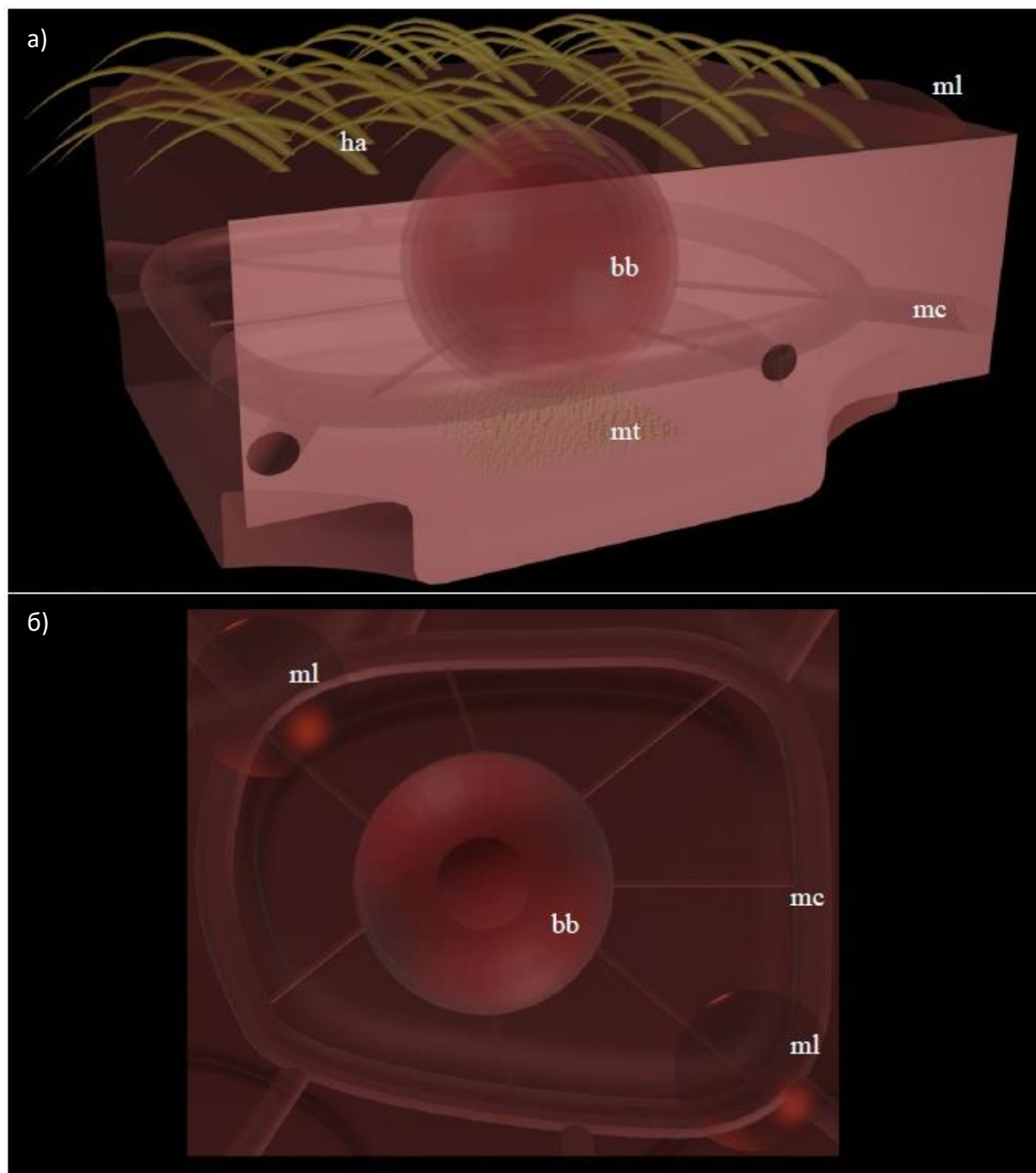
Слика 5.7. ИЦ фотографије елитре *M. asper funereus* инсекта, постављене испред црног тела. а) на собној температури, у стању термалне равнотеже, елитра је неуочљива; б) загрејана ласерском радијацијом, елитра постаје видљива.

5.2. Термални модел наноструктуре инсекта *Morimus asper funereus*

У складу са описаном анатомијом структуре биолошког црног тела *M. Funereus*-а, формиран је модел. Елементарна јединица модела је овална зона, која се састоји од слојевитог црног тела са зидовима са микроканалима, слика 5.8. Она се налази се између два слоја, један (спољашњи слој – окренут ка спољашњој средини) је прекривен микросочивима а други (унутрашњи слој – окренут ка телу инсекта) микротрихијама. Модел је приказан коришћењем слободног, графичког 3Д софтвера (Blender, free under GPL). На слици 5.8 су приказана два погледа на елементарне ћелије (5.8.(а) бочно са спољашње стране, 5.8.(б) ортогонално са унутрашње стране), тако да су јасно видљиве просторне релације између микросочива, зидова са микроканалима и црног тела. „Ray tracing“ метод (објашњен у Материјалима и Методама) је употребљен као прва апроксимација пропагације електро-магнетне радијације, да би се стекао интуитивни увид у начин на који се електро-магнетна радијација простире кроз ову структуру. Овај метод је показао да микросочива фокусирају ИЦ радијацију директно на микроканал испуњен хемолимфом, слика 5.9. Ово важи за велики опсег упадних углова (-20^0 до $+20^0$) надлазеће ИЦ радијације, која се ефикасно апсорбује хитином (коэффициент апсорпције хитина је 1000 cm^{-1} у опсегу $8\text{--}14\text{ }\mu\text{m}$ и 580 cm^{-1} у опсегу $3\text{--}5\text{ }\mu\text{m}$) и водом и конвертује у топлоту.

Затим је методом коначних елемената урађено детаљно моделовање пропагације ИЦ радијације кроз структуру. У далеком атмосферском ИЦ прозору ($8\text{--}14\text{ }\mu\text{m}$) радијација је, због великог коэффициента апсорпције хитина, ефикасно апсорбована у површинским слојевима структуре, слика 5.11. Ситуација је сложенија у блиском атмосферском ИЦ прозору ($3\text{--}5\text{ }\mu\text{m}$), где је апсорпција за ред величине мања [278]. Радијација из тог опсега се микросочивима фокусира на микроканале (који окружују црно тело), док је део термалне радијације који не пада на микросочива ефикасно рефлектован вишеслојним хитинским омотачем црног тела, слика

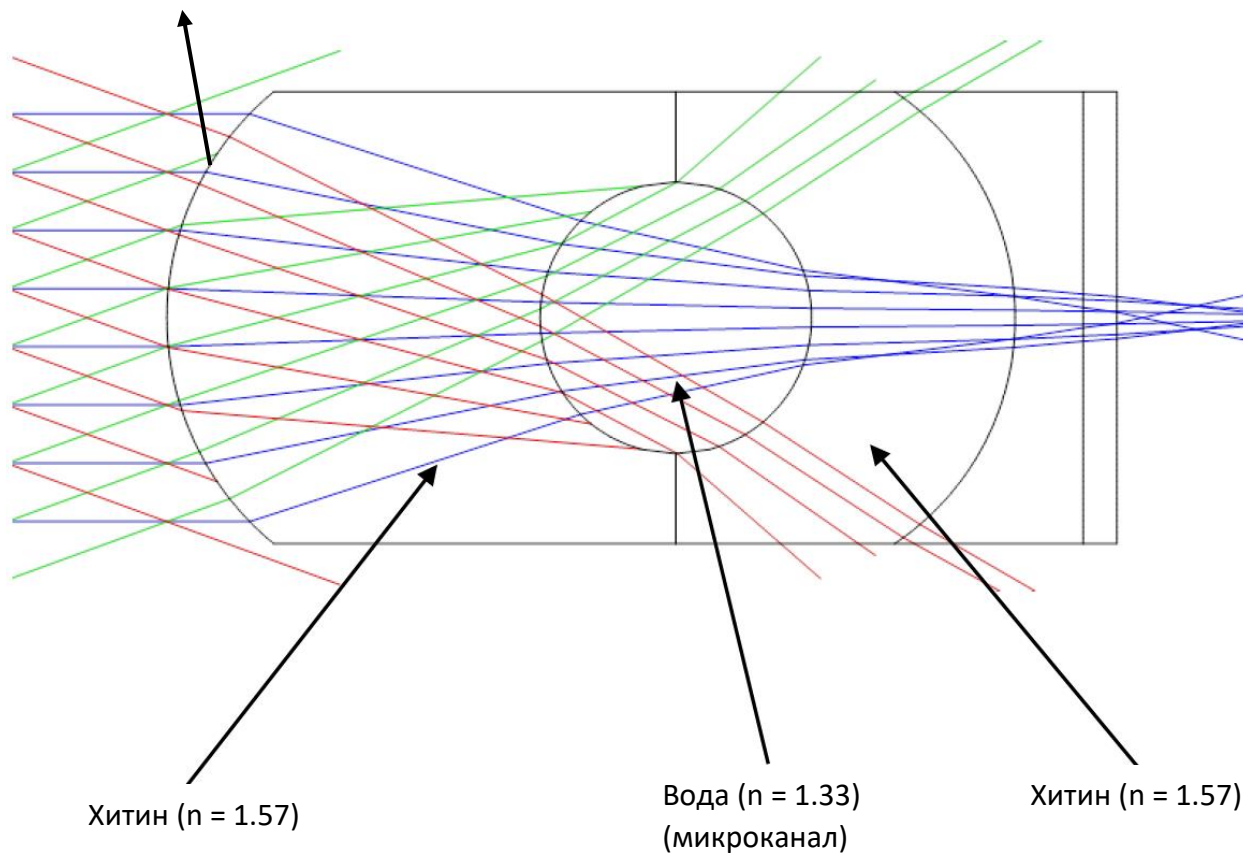
5.11. Микроканалы се брзо загреју надлазећом радијацијом и постоји конвективни трансфер термалне енергије у централну шупљину црног тела мрежом микроканала, налик на оне који су уочљиви на слици 5.3г. Сићушне длачице у унутрашњости ове шупљине (слика 5.2б) су вероватно сензиле (рецепори који детектују промену температуре), које сигнализирају инсекту да потражи хладније окружење, што је бихевиорална карактеристика инсекта.



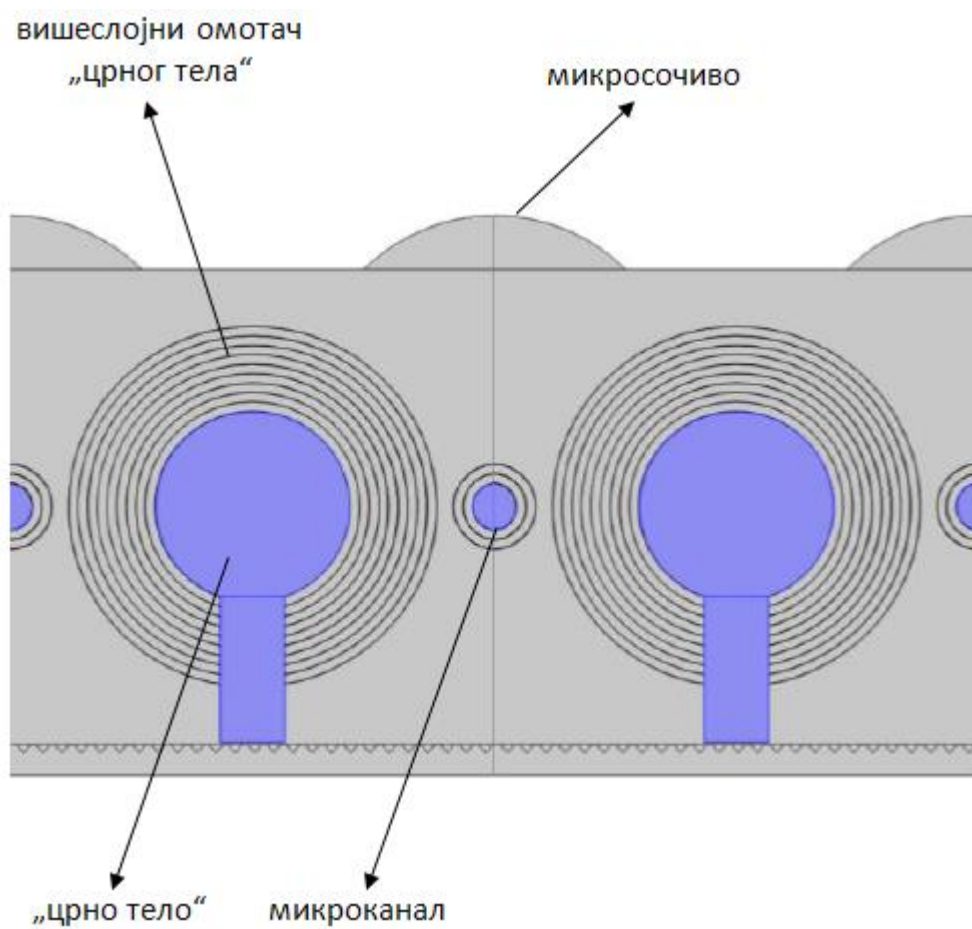
Слика 5.8. Полу-транспарентан 3Д модел елитре *M. asper funereus* инсекта у коме су приказане унутрашње структуре (mt – микротрихија, mc – микроканал, ml – микросочиво, bb – црно тело, ha - длачице); а) профил елитре на коме се уочава типичан положај микро-сочива на

њеној спољашњој површини; б) вертикална перспектива, у којој је приказан просторни распоред микросочива и микроканала. Микроканал у потпуности окружује црно тело и мањим каналима је повезан са њим.

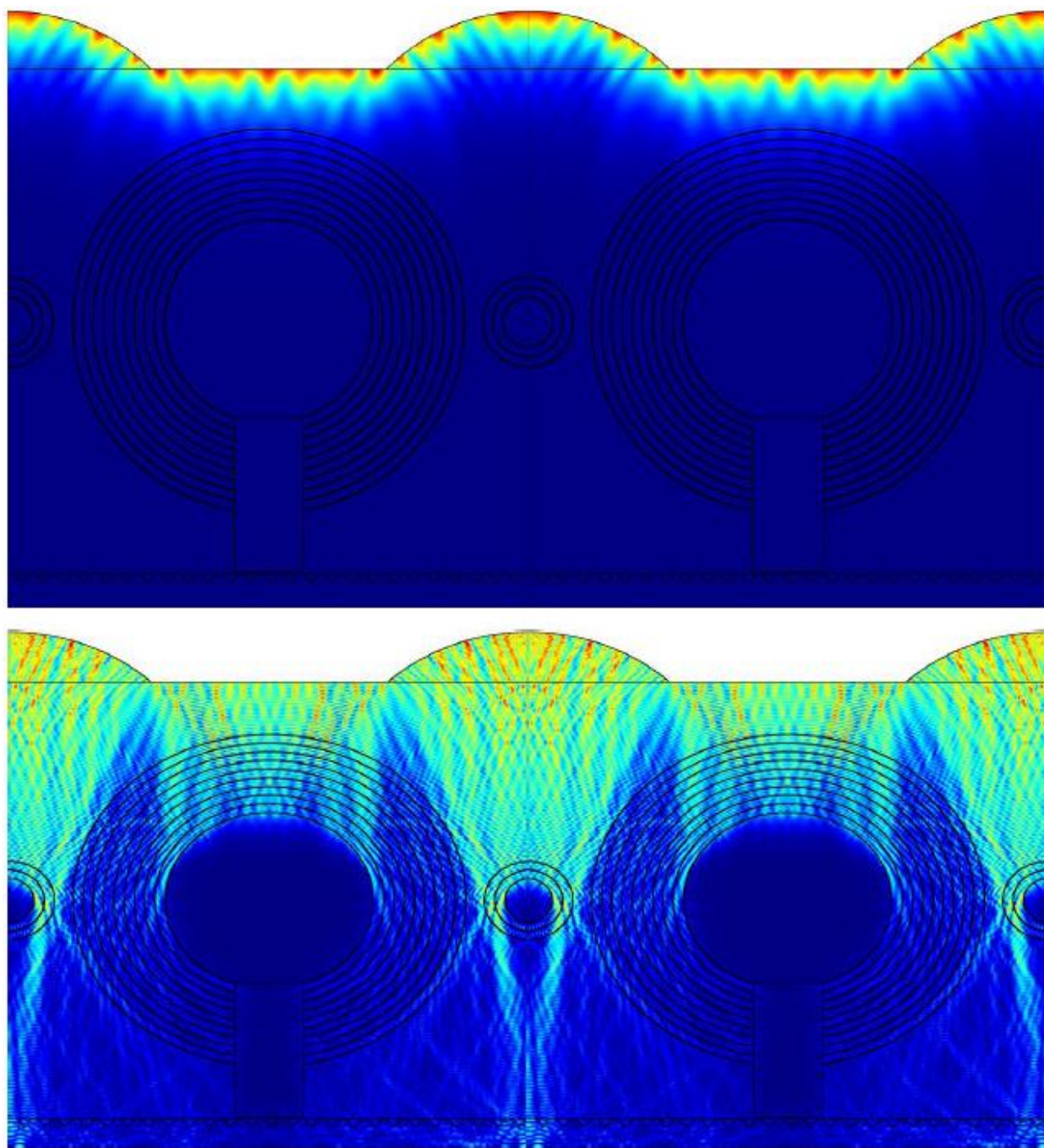
Спољашња површина микросочива



Слика 5.9. Ray tracing метод демонстрира правце простирања радијације у интервалу $3 - 5 \mu\text{m}$ кроз микросочиво и микроканал. Плави зраци долазе под правим углом, а црвени и зелени зраци долазе на елитру под угловима $+20^\circ$ и -20° .



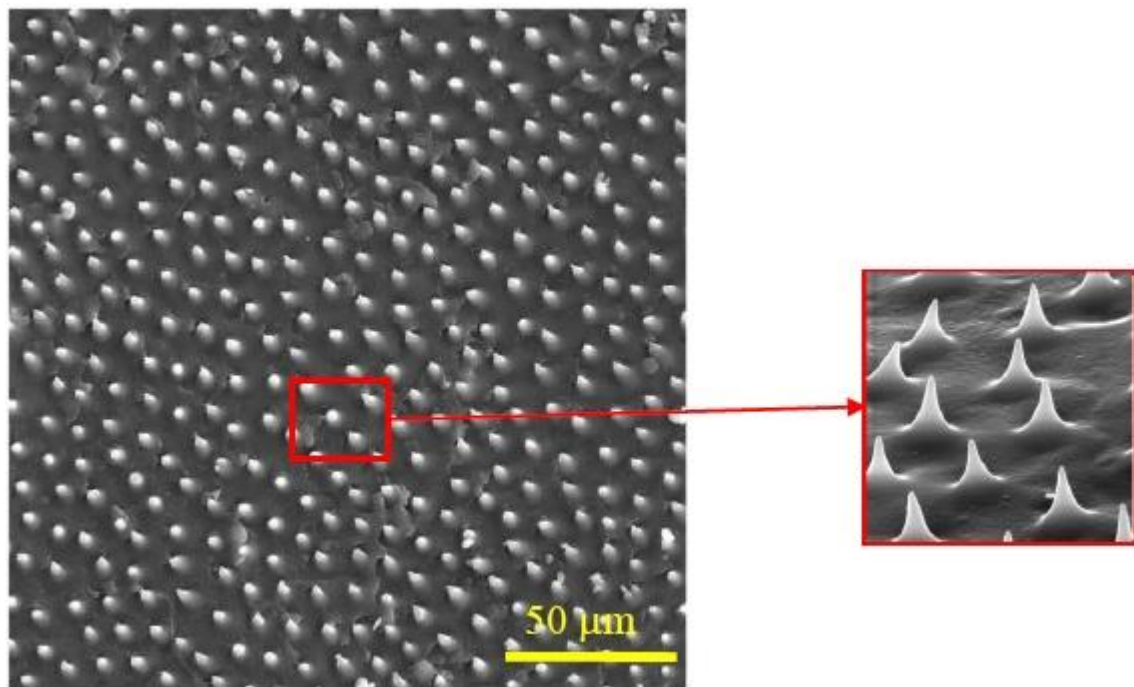
Слика 5.10. Модел елитре *M. asper funereus* инсекта, који је употребљен за анализу пропагације ИЦ радијације методом коначних елемената (у сивој боји је приказан хитин а у љубичастој боји је приказана хемолимфа).



Слика 5.11. Пропагација термалне ИЦ радијације унутар елитре *M. asper funereus* инсекта, израчуната методом коначних елемената. Анализирана су два спектрална опсега који одговарају далеком и блиском термалном атмосферском прозору: $\lambda = 8-14 \mu\text{m}$ (приказан је резултат за $\lambda = 10 \mu\text{m}$, горња слика), и за $\lambda = 3-5 \mu\text{m}$ (приказан је резултат за $\lambda = 4 \mu\text{m}$, доња слика).

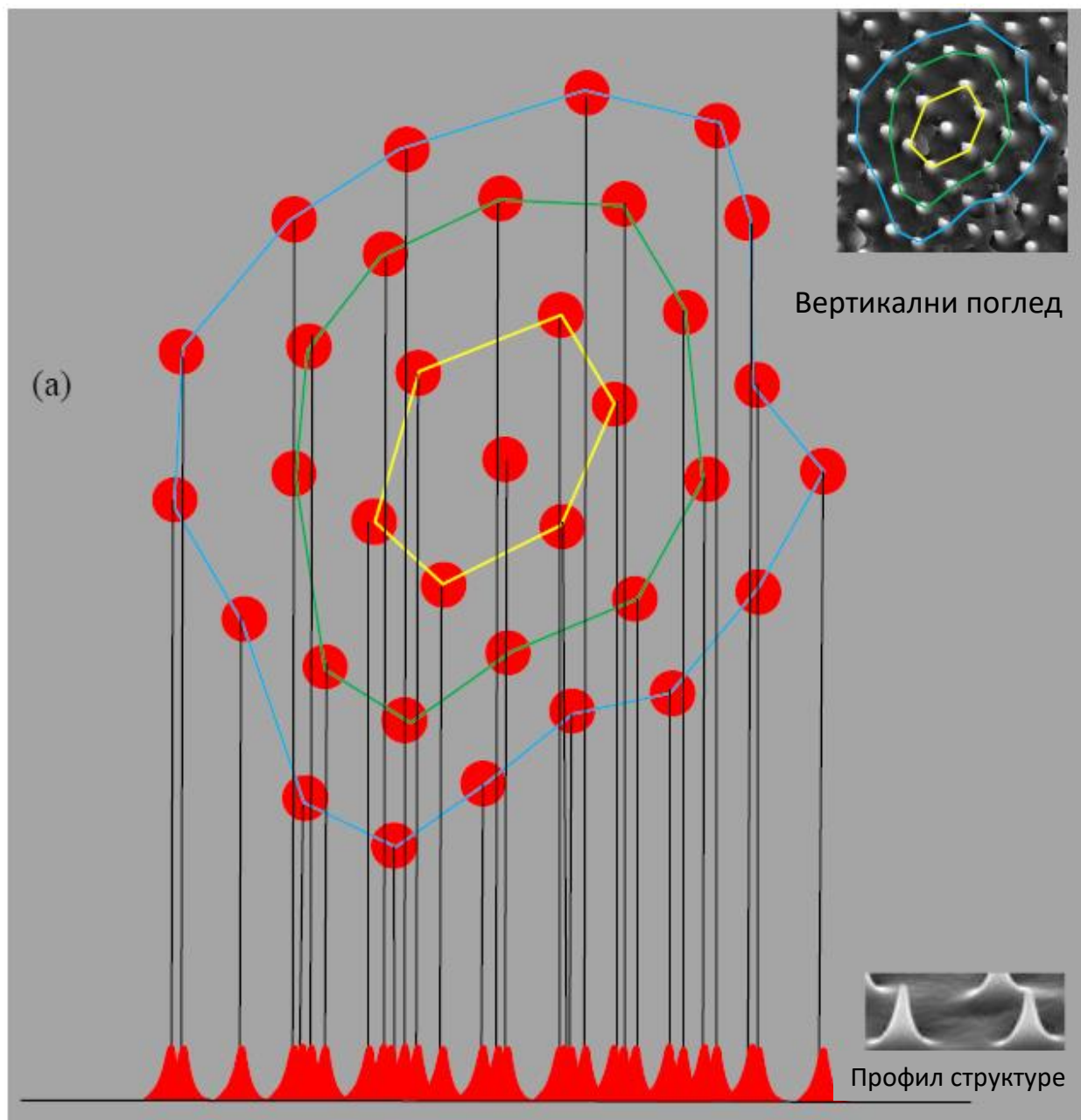
5.3. Хипер-униформност хитинских микроструктура

Још једна занимљива карактеристика је постојање површинских структура на унутрашњем делу елитре. Најбоље се уочавају на електронском микрографу унутрашње површине (која је окренута ка телу инсекта) елитре, а то су израслине конусног облика (тзв. микротрихије), висине $\sim 4 \mu\text{m}$ и полупречника основе $\sim 4.5 \mu\text{m}$, слика 5.12. Њихов распоред је уређен али не и потпуно регуларан (просечно међусобно растојање је $10 \mu\text{m}$). Код многих врста инсеката, оне причвршћују задња крила за елитру. Међутим, код *M. asper funereus* инсекта ово није случај, јер он има веома закржљала крила.



Слика 5.12. Електронски микрограф унутрашње површине елитре *M. asper funereus* инсекта и ансамбл микронских израслина, тзв. микротрихија. На левој слици је приказан изглед ансамбла из правца нормале на површину елитре, а на десном микрографу је приказана бочна перспектива, на којој се уочава да израслине имају облик конуса.

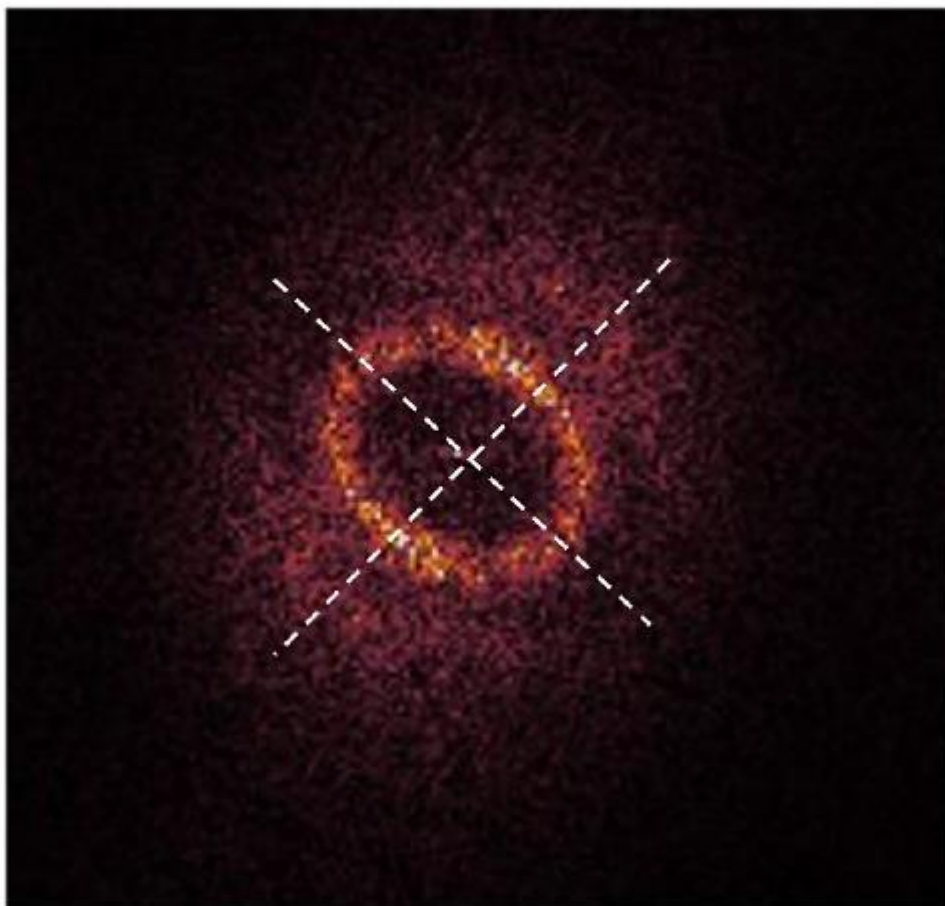
Ансамбл микротрихија је моделован као скуп конусних израслина на равној површини. Пречник основе свих конуса је $4.4 \mu\text{m}$, а висина је $3.8 \mu\text{m}$. Посматрано у правцу нормале на површину, распоред конуса је приказан на слици 5.13. На истој слици је приказан и бочни поглед на структуру где се види „преклапање“ конуса. Из тог разлога, радијација која долази под малим углом, блиско површини на којој се налазе конуси, има велику вероватноћу да наиђе на неки од конуса и буде апсорбована. Ово су елементарна разматрања на основу геометријске оптике. У наставку моделовања је примењен таласно-оптички приступ.



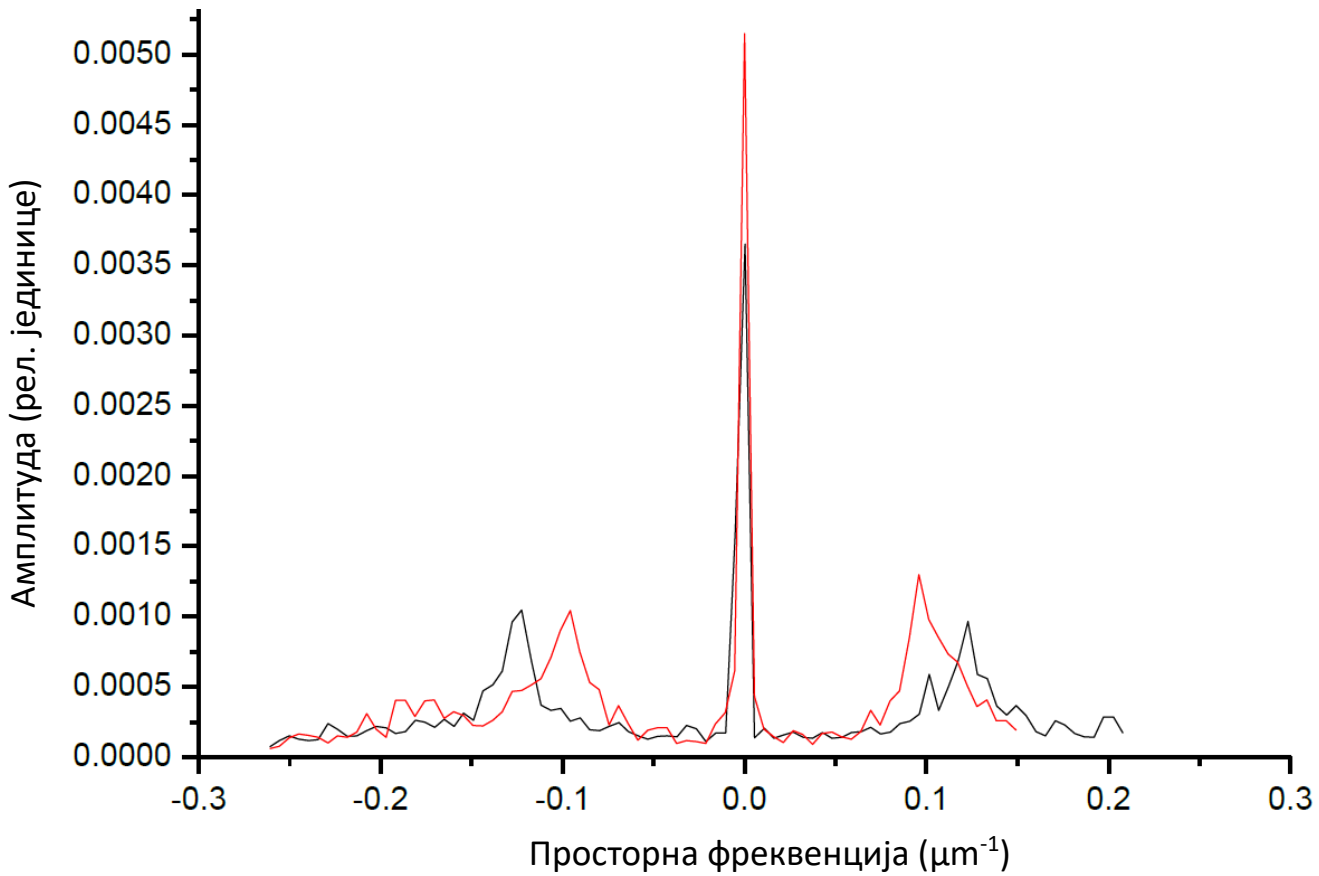
Слика 5.13. Расподела конусних микроструктура у вертикалној перспективи, креирана по узору на електронски микрограф са слике 5.12. У горњем десном углу приказан је део електронског микрографа на основу кога је урађена скица расподеле. На дну слике је приказана профилна перспектива.

Детаљним увидом у просторни распоред конуса уочава се да он није регуларан а ни потпуно насумичан. Фуријеов трансформ ансамбла конуса има облик прстена, слика 5.14. Његова просторна фреквенција је $0.1 / \mu\text{m}$, што одговара просечном растојању од $10 \mu\text{m}$ између конуса, слика 5.15. На просторним фреквенцијама блиским централном Фуријеовом максимуму, амплитуда трансформа је веома мала. Ово је карактеристика хипер-униформне расподеле тачака, за коју је показано да се понаша као структура са потпуном фотонском забрањеном

зоном [280]. Блага елиптичност Фуријеовог трансформа је могућа последица елипсоидног облика површине на којој се налазе конуси.



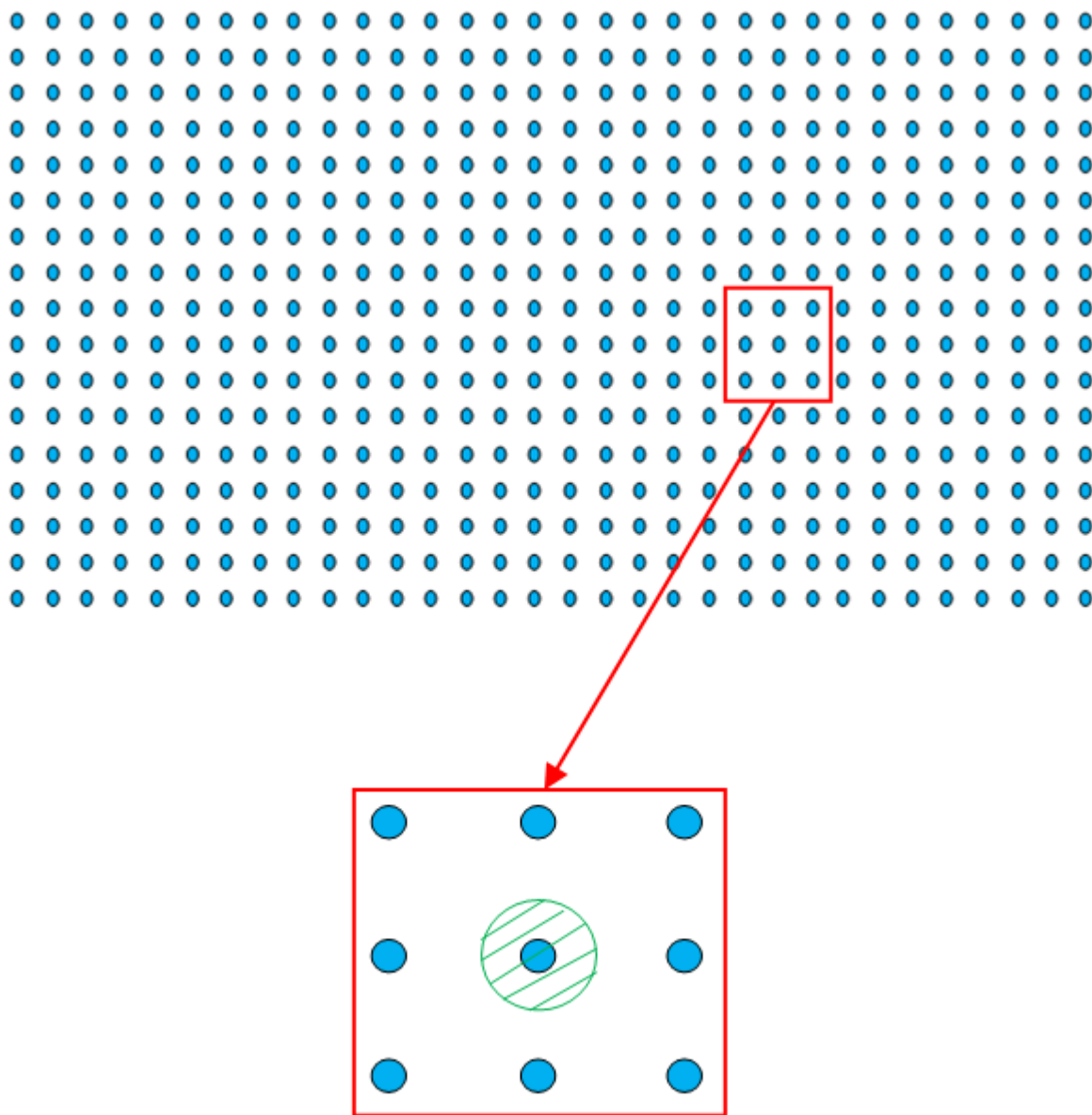
Слика 5.14. Фуријеов трансформ слике 5.12 на којој је приказана расподела конусних микроелемената. Трансформ има облик прстена са благом елиптичношћу.



Слика 5.15. Сканирање Фуријеовог трансформа са слике 5.14 у два ортогонална правца (приказана испрекиданим линијама на слици 5.14) открива максимум на просторној фреквенцији од $\sim 0.1/\mu\text{m}$ који одговара просечном растојању од $10 \mu\text{m}$ између конусних микроелемената.

Хипер-униформни систем честица има мале флукуације густине на великим растојањима [281]. Концепт хипер-униформности је креиран због класификације ансамбла тачака у складу са њиховим локалним густинама флукуација [279]. Ансамбл тачака је хипер-униформан ако се варијанса броја тачака $\sigma^2(R) \equiv \langle N_R^2 \rangle - \langle N_R \rangle^2$ у сферној области полупречника R повећава спорије него запремина узорка полупречника R , за велике вредности R (што значи да се варијанса броја честица повећава спорије од R^d , где је d број димензија простора). Хипер - униформна расподела конусних микро-објеката анализирана у овом истраживању је дводимензионална. Хиперуниформност је карактеристика свих кристала и квазикристала, као и посебне подкласе неуређених структура.

Хипер-униформни 2Д систем се понаша као стохастички фотонски кристал са потпуном фотонском забрањеном зоном – материјал код кога постоји одступање од савршено уређене структуре али су одступања веома мала па се материјал понаша као фотонски кристал (на пример, у случају 2Д кристала ово значи да чворови кристала не формирају савршену 2Д решетку већ за сваки чвор постоји мала област одступања у његовој позицији, и у оквиру те области он може да има било коју позицију, слика 5.16) [282-285]. Ово се може закључити на основу облика Фуријеовог трансформа (слика 5.14).

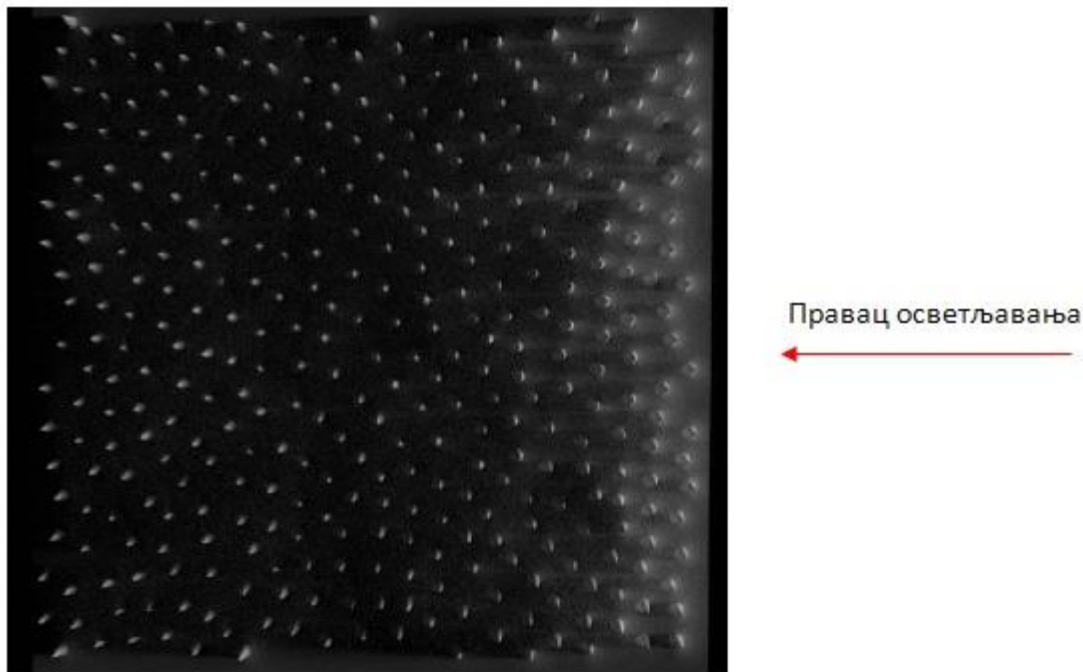


Слика 5.16. Шематски приказ распореда чворова идеалног 2Д кристала. Уколико се идеалан распоред наруши на адекватан начин, добија се хипер-униформни 2Д кристал. На доњем исечку је зеленим кругом приказана област одступања позиције централног чвора – његов центар може да буде у било којој тачки овог круга. Када се исти принцип примени на позиције свих чворова, уколико је област одступања позиције довољно мала, добија се хипер-униформни 2Д кристал.

Примењено на случај *M. Funereus*-а, за мале упадне углове радијације, када је правац простирања електро-магнетне радијације скоро паралелан равни конусних микроелемената, систем се понаша као Брегов рефлектор, блокирајући пропацију радијације на таласним дужинама:

$$\lambda = 2d/N \quad (5.2)$$

где је d период дифракционе решетки, тј. растојање између суседних конусних микроелемената, а N је цео број, уколико светлост пада на решетку под углом од 90° . За $d = 10 \text{ }\mu\text{m}$ и $N = 2$, Брегова таласна дужина ове структуре је $10 \text{ }\mu\text{m}$, и налази се у далеком атмосферском прозору ($\lambda = 8\text{-}14 \text{ }\mu\text{m}$). Додатно, за $N = 4$, Брегова таласна дужина одговара другом атмосферском прозору, у опсегу ($\lambda = 3\text{-}5 \text{ }\mu\text{m}$).



Слика 5.17. Вертикални поглед на ансамбл конусних микроструктура. На слици је приказан и правац осветљавања, радијација се креће под малим углом у односу на хоризонталну раван у којој се налазе основе конусних микроструктура. Уочава се да конусне микроструктуре спречавају пропацију ИЦ радијације.

5.4. Завршна разматрања термалних особина анализираних хитинских микроструктура

На елитри *M. asper funereus* инсекта су уочене и друге оптички занимљиве структуре које нису детаљно проучаване у оквиру ове дисертације, али би могле да утичу на радијативне особине.

Ширина свих хитинских ламела у елитри *M. asper funereus* инсекта је 4-5 μm са одговарајућом Бреговом таласном дужином 8-10 μm . Сваки слој садржи адекватно оријентисана микровлакна, која у систем уносе двојно преламање, и њихова оријентација је различита у различитим слојевима. Граничне површине између свих слојева су храпаве и расејавају радијацију, па слојеви потенцијално имају функцију планарних таласовода који додатно апсорбују радијацију. Ансамбл конуса може да буде трансмисиона решетка за радијацију која пада под угловима блиским нормали на површину а дифракциони редови могу бити уведени у хитинске ламеле – планарне таласоводе.

У додатним мерењима, једна страна елитре је загревана ласерским снопом и, у стању термалне равнотеже, друга страна има температуру која је нижа чак за око 20⁰. Тешко је разграничити допринос радијативног ослобађања топлоте у односу на остале термалне процесе (конвекција и кондукција). Међутим, ова хитинска структура би могла да буде одличан модел за дизајн термално-изолационих материјала

Већ дуго времена научници покушавају да креирају високо-апсорптивне структуре и направљени су многи микро и нано структурисани материјали [286], али само емисивност низа вертикално распоређених наноцеви („VANTA black“) је блиска емисивности црног тела [287]. Упоредо са текућим истраживањима силицијумских фотонских структура за уређаје који раде у блиском ИЦ спектралном региону, у овом истраживању је показано да природне, мање комплексне, хитинске структуре могу да постигну сличне резултате захваљујући ансамблу конусних површинских микро-елемената. Адекватна хипер-униформна структура се ефикасно такмичи са високо-напредним материјалима са нано-цевима. За разлику од вештачког VANTA материјала, који је фрагилан и чији је производни процес компликован, природно решење је флексибилно и једноставно.

Дакле, у овом делу дисертације је показано да комбинација хитинских микросочива, „црних тела“ и хипер-униформно распоређених конусних микроструктура омогућава одличну контролу термалне радијације. Потенцијалне примене су бројне и могу се чак и приширити са блиско инфра-црвене на терахерцну технологију.

Истраживање оптичких и термалних особина хитинских структура биолошког порекла обухватило је и анализу микро и нано – структурисаног спољашњег омотача тврдокрилца *Rosalia alpina* (Coleoptera: Cerambycidae) [289]. Показано је да овај хитински систем функционише као ефикасан пригушивач (*optical beam dump*) упадне радијације из оптичког дела спектра, апсорбујући скоро сву упадну радијацију. У ИЦ региону, хитинска микроструктура омогућава ефикасно ослобађање вишка термалне енергије радијативним путем.

6. Закључак

У оквиру ове докторске дисертације експериментално су истражене поједине нелинеарне оптичке особине хемијски пречишћеног хитина применом двофотонски побуђене флуоресценције и генерисањем другог хармоника. Измерен је интензитет дво-фотонски побуђене флуоресценције хитина у функцији таласне дужине (у опсегу 830 – 930 nm) и средње снаге побудног фемто-секундног ласерског зрачења (у опсегу 3,4 – 13,6 mW. Мале вредности снаге су изабране да би се минимизирало фото-оштећење узорка. Резултати показују да интензитет дво-фотонски побуђене флуоресценције хитина опада са порастом таласне дужине побудне ласерске радијације у поменутом опсегу и да дво-фотонски побуђена флуоресценција има максималан интензитет када је побудна таласна дужина око 830 nm. Измерено је време флуоресценције хитина и добијена вредност од 5,2 ns. Такође је измерен и флуоресцентни спектар хитина за једно-фотонску побуду и он показује максимум на 440 nm и спектралну ширину од ~ 120 nm. Истражени су и ефекти фото-избељивања који настају услед продуженог озрачивања хитина ласерским зрачењем. Доказано је постојање другог хармоника за хемијски чист хитин.

Ови резултати су употребљени за анализу оптичких и флуоресцентних особина појединих хитинских микро и наноструктура биолошког порекла, и за истраживање контролисане модификације ових особина ласерском радијацијом. Одређени су оптимални параметри ласерске радијације и нелинеарног ласерског микроскопа (таласна дужина побудне ласерске радијације, репетиција, снага ласерског зрачења, поларизација, временско трајање фемто-секундних побудних ласерских импулса, време задржавања ласерског снопа на узорку...) за осликавање хитинских нано-структура коришћењем дво-фотонски побуђене флуоресценције хитина, и за контролисану модификацију (сечење и фото-избељивање ласерским зрачењем) ових нано-структура и њихових оптичких особина. Сlike су добијене при снагама ласерске радијације мањим од 1 mW у опсегу 720-850 nm где хитин показује интензивну дво-фотонски побуђену флуоресценцију и са максималном попречном и основном резолуцијом од 0.7 μm и 2.1 μm , респективно. Најнижи прагови оштећења су 4,5 mW, када је коришћен 40 X 1.3 НА микроскопски објектив и 8 mW када је коришћен 20 X 0.8 НА микроскопски објектив, на побудној таласној дужини ласерског зрачења $\lambda = 730 \text{ nm}$. Није неочекивано то што су најнижи прагови оштећења на овој таласној дужини ако се имају у виду резултати из првог дела ове дисертације где је показано да је у доступном опсегу побудне ласерске радијације (700 - 1000 nm) дво-фотонски побуђена флуоресценција хитина има највећи интензитет за краће таласне дужине из овог дела спектра (слика 2.1). Минимални пречник ласерски изазваног оштећења у овом истраживању је био 1.7 μm . Фото-избељивање хитинске нано-структуре је остварено при минималним доступним снагама побуде (1-2 mW) у опсегу 720-850 nm где хитин показује интензивну дво-фотонски побуђену флуоресценцију.

Формиран је теоријски модел љуспице који објашњава њене оптичке особине, првенствено иридесценцију. У наставку истраживања, ови резултати су искоришћени за истраживање могућности употребе хитинских љуспица као заштитног варијабилног оптичког елемента. За потребе овог дела истраживања испитане су и друге важне особине као што су варијабилност и јединственост наноструктуре љуспица и њиховог оптичког одзива. Поред тога, због технолошке примене, показано је да се неопходна информација о аутентичности може записати директно на љуспицу, фемтосекундним ласером, у форми физичке модификације

љуспице. С тим у вези, узимајући у обзир просечне димензије љуспице ($\approx 50 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m} = 5000 \mu\text{m}^2$) процењен је информациони капацитет љуспице на ≈ 3000 битова, третирајући место оштећено ласером као бинарно 1, а неоштећено као бинарно 0.

Истражене су и термалне радијативне особине природне хитинске микроструктуре. Показано је да ова хитинска микроструктура омогућава одличну контролу термалне радијације.

У будућности би се наставило са теоријским и експерименталним истраживањем механизма интеракције између упадне радијације и природних хитинских наноструктура. Могућности њихове контролисане модификације ће бити проширене са директног ласерског исписивања на холографску и електронску литографију. Од вештачких материјала ће се првити копије природних хитинских наноструктура. Испитиваће се утицај модификације ових структура на њихове опто-механичке особине, и могућност коришћења ових елемената као оптичких меморија, и термалних детектора. Развијаће се софтвер који је потребан да би се истраживања спровела на нелинеарном ласерском микроскопу. Истраживаће се и друге могућности за примену софистицираних оптичких структура.

Литература

- [1] Chai Yeh, “Applied Photonics”, Elsevier, (2012).
- [2] Richard S. Quimby, “Photonics and Lasers: An Introduction”, John Wiley & Sons, (2006).
- [3] Goda, K., “Biophotonics and beyond”, *APL Photonics*, 4(5), 050401 (2019).
- [4] SPIE, “Gabriel Popescu plenary talk: Bridging Molecular and Cellular Biology with Optics”, *SPIE Newsroom*, (2015).
- [5] Newton, I. (1730), “Opticks”, 4th Ed., reprinted by Dover Publications, (1952).
- [6] Lord Rayleigh, “On the remarkable phenomenon of crystalline reflexion described by Prof. Stokes.”, *Phil. Mag.*, 26, 256–265, (1888).
- [7] A.A. Michelson (1911) LXI. “On metallic colouring in birds and insects”, *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 21:124, 554-567.
- [8] Lord Rayleigh, “On the optical character of some brilliant animal colours”, *Phil. Mag.*, 37, 98–111, (1918).
- [9] Lord Rayleigh O.M. F.R.S. (1919) VII. “On the optical character of some brilliant animal colours”, *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 37:217, 98-111.
- [10] Onslow, H. “The Iridescent Colours of Insects”, *Nature* 106, 215–218, (1920).
- [11] Lord Rayleigh, “Studies of iridescent colour, and the structure producing it. IV—Iridescent beetles”, *Proc. Roy. Soc.*, A103, 233–239, (1923).
- [12] Mayer, A. G., “On the colour and colour-patterns of moths and butterflies”, *Bull. Mus. Comp. Zool.*, 30, 169–254, (1897).
- [13] Michelson, A. A., “On metallic colouring in birds and insects”, *Phil. Mag.*, 21, 554–566, (1911).
- [14] Onslow, H., “On a periodic structure in many insect scales and the cause of their iridescent colours”, *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, B211, 1–74, (1921).
- [15] Merritt, E., “A spectrophotometric study of certain cases of structural color”, *Rev. Sci. Instrum.*, 11, 93–98, (1925).
- [16] S. Kinoshita, S. Yoshioka, Y. Fujii and N. Okamoto, “Photophysics of Structural Color in the Morpho Butterflies”, *Forma*, 17, 103–121, (2002).
- [17] Wilts, B. D., Saranathan, V., “A Literal Elytral Rainbow: Tunable Structural Colors Using Single Diamond Biophotonic Crystals in *Pachyrrhynchus congestus* Weevils”, *Small*, 1802328, (2018).
- [18] Shan, D., Gerhard, E., Zhang, C., Tierney, J. W., Xie, D., Liu, Z., & Yang, J., “Polymeric biomaterials for biophotonic applications”, *Bioactive Materials*, 3(4), 434–445, (2018).

- [19] M.J. Baker, C.S. Hughes, Hollywood K a., “Biophotonics: Vibrational Spectroscopic Diagnostics”, Morgan & Claypool Publishers, (2016).
- [20] S.T. Yang, L. Cao, P.G. Luo, et al., “Carbon dots for optical imaging in vivo”, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (32), 11308–11309, (2009).
- [21] A.S. Stender, K. Marchuk, C. Liu, et al., “Single cell optical imaging and spectroscopy”, *Chem. Rev.* 113 (4), 2469–2527, (2013).
- [22] H. Zhu, S.O. Isikman, O. Mudanyali, et al., “Optical imaging techniques for point-of-care diagnostics”, *Lab a Chip*, 13 (1), 51–67, (2013).
- [23] Kolle M, Lee S., “Progress and opportunities in soft photonics and biologically inspired optics”, *Adv. Mater.* 30, 1702669, (2018).
- [24] Hecht, E., “Optics”, 2nd edn., Reading, MA: Addison-Wesley, (1974).
- [25] Plattner Luca, “Optical properties of the scales of *Morpho rhetenor* butterflies: theoretical and experimental investigation of the back-scattering of light in the visible spectrum”, *J. R. Soc. Interface*, 1: 49-59, (2004).
- [26] Peter Vukusic, J. Roy Sambles, “Shedding light on butterfly wings,” *Proc. SPIE 4438, Physics, Theory, and Applications of Periodic Structures in Optics*, (26 December 2001).
- [27] Srinivasarao, Mohan, “Nano-optics in the biological world: beetles, butterflies, birds, and moths”, *Chemical reviews*, 99(7), 1935-1962, (1999).
- [28] Han, Z., Mu, Z., Li, B., Niu, S., Zhang, J., Ren, L., “A High-Transmission, Multiple Antireflective Surface Inspired from Bilayer 3D Ultrafine Hierarchical Structures in Butterfly Wing Scales”, *Small* 12(6), 713–720, (2015).
- [29] J. P. Vigneron, M. Rassart, Z. Vértesy, K. Kertész, M. Sarrazin, L. P. Biró, D. Ertz, and V. Lousse, “Optical structure and function of the white filamentary hair covering the edelweiss bracts”, *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.*, 71(1), 011906, (2005).
- [30] Hahn, David W., “Light scattering theory”, University of Florida, (2009).
- [31] Auber, L., “Formation of ‘Polyhedral’ Cell Cavities in Cloudy Media of Bird Feathers”, *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh. Section B. Biology*, 74, 27-41, (1974).
- [32] Huxley John, “The coloration of *Papilio zalmoxis* and *P. antimachus*, and the discovery of Tyndall blue in butterflies”, *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 193, 441–453, (1976).
- [33] Pradip Kumar Dutta, Joydeep Dutta, V.S.Tripathi, “Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications”, *Journal of Scientific & Industrial Research*, 63, 20-31, (2004).
- [34] Ernestine Alabaraoye, Mathew Achilonu, Robert Hester, “Biopolimer (Chitin) from Various Marine Seashell Wastes: Isolation and Characterization”, *Journal of Polimers and Environment*, 26(6), 2207-2218, (2017).

- [35] Zhang, F., Shen, Q., Shi, X., Li, S., Wang, W., Luo, Z., ... Shang, W., "Infrared Detection Based on Localized Modification of Morpho Butterfly Wings", *Advanced Materials*, 27(6), 1077–1082, (2014).
- [36] Li, Q., Zeng, Q., Shi, L., Zhang, X., & Zhang, K.-Q., "Bio-inspired sensors based on photonic structures of Morpho butterfly wings: a review", *Journal of Materials Chemistry C*, 4(9), 1752–1763, (2016).
- [37] Zhou, L., He, J., Li, W., He, P., Ye, Q., Fu, B., ... Shang, W., "Butterfly wing hears the sound: acoustic detection using biophotonic nanostructure", *Nano Letters*, (2019).
- [38] Wang, X.-S., Li, Y., & Shi, Y.-F., "Effects of sandwich microstructures on mechanical behaviors of dragonfly wing vein", *Composites Science and Technology*, 68(1), 186–192, (2008).
- [39] Slavica Grdanovska, "Characterization of radiation damage to a novel photonic crystal sensor", PhD Thesis, (2015).
- [40] Dutta P.K., Ravikumar M.N.V., Dutta J., "Chitin and chitosan for versatile applications", *JMS Polym Rev*, C42, 307, (2002).
- [41] Kast C.E., Frick W., Losert U., Schnurch A.B., "Thioglycolic acid conjugate: A new scaffold material for tissue engineering?", *Int.J.Pharmaceutics*, 256, 283, (2003).
- [42] Majeti N.V., Ravi Kumar, "A review of chitin and chitosan applications", *Reactive & Functional Polymers*, 46, 1-27, (2000).
- [43] H. Ghiradella, D. Aneshansley, T. Eisner, R. E. Silberglied and H. E. Hinton, "Ultraviolet Reflection of a Male Butterfly: Interference Color Caused by Thin-Layer Elaboration of Wing Scales", *Science*, 178, 1214–1217, (1972).
- [44] A. R. Parker, "The diversity and implications of animal structural colours", *J. Exp. Biol.*, 201, 2343–2347, (1998).
- [45] T. Hariyama, M. Hironaka, H. Horiguchi, D.G. Stavenga, in: S. Kinoshita, S. Yoshioka (Eds.), "Structural Colors in Biological Systems: Principles and Applications", *Osaka University Press*, Osaka, Japan, pp. 153–176, (2005).
- [46] J.P.Vigneron, M.Rassart, C.Vandenbem, V.Lousse, O.Deparis, L.P.Biro', D. Dedouaire, A. Cornet, P. Defrance, "Spectral filtering of visible light by the cuticle of metall woodboring beetles and microfabrication of a matching bioinspired material", *Phys. Rev. E*, 73, 041905, (2006).
- [47] J. Noyes, P. Vukusic, and I. Hooper, "Experimental method for reliably establishing the refractive index of buprestid beetle exocuticle", *Opt. Express*, 15, 4351-4358, (2007).
- [48] S. Yoshioka, S. Kinoshita, "Direct determination of the refractice index of natural multilayer systems", *Phys. Rev. E*, 83, 051917, (2011).
- [49] M. Nixon, A. Orr, and P. Vukusic, "Subtle design changes control the difference in colour reflection from the dorsal and ventral wing-membrane surfaces of the damselfly *Matronoides cyaneipennis*", *Opt. Express*, 21, 1479-1488, (2013).

- [50] A. E. Seago, P. Brady, J. P. Vigneron, and T. D. Schultz, “Gold bugs and beyond: a review of iridescence and structural colour mechanisms in beetles (Coleoptera)”, *J. R. Soc. Interface*, 6(Suppl 2), S165–S184, (2009).
- [51] Doekele G. Stavenga, Bodo D. Wilts, Hein L. Leertouwer, Takahiko Hariyama, “Polarized iridescence of the multilayered elytra of the Japanese jewel beetle, *Chrysochroa fulgidissima*”, *Phil. Trans. R. Soc. B*, 366, 709–723, (2011).
- [52] Deparis, O., Vandenbem, C., Rassart, M., Welch, V. L., Vigneron, J. P., “Color-selecting reflectors inspired from biological periodic multilayer structures”, *Opt. Express*, 14, 3547–3555, (2006).
- [53] Hariyama, T., Hironaka, M., Takaku, Y., Horiguchi, H., Stavenga, D. G., “The leaf beetle, the jewel beetle, and the damselfly; insects with a multilayered show case. In Structural color in biological systems—principles and applications (eds S. Kinoshita & S. Yoshioka)”, pp. 153–176. Osaka, Japan: *Osaka University Press*, (2005).
- [54] Kinoshita, S., Yoshioka, S., Miyazaki, J., “Physics of structural colors”, *Rep. Prog. Phys.*, 71, 076 401, (2008).
- [55] Vukusic P., Sambles J.R., Lawrence C.R., Wootton R.J., “Quantified interference and diffraction in single Morpho butterfly scales”, *Proc. R. Soc. Lond. B*, 266, (1999).
- [56] Serge Bethier, “Iridescences – The Physical Colors of Insects”, Springer, (2007).
- [57] Vukusic P., Wootton R.J. and Sambles J.R., “Remarkable iridescence in the hindwings of the damselfly *Neurobasis chinensis chinensis* (Linnaeus) (Zygoptera: Calopterygidae)”, *Proc. R. Soc. Lond. B*, 271, (2004).
- [58] A. Levy-Lior, E. Shimoni, O. Schwartz, E. Gavish-Regev, D. Oron, G. Oxford, S. Weiner, and L. Addadi, “Guanine-based Biogenic Photonic-Crystal Arrays in Fish and Spiders”, *Adv. Funct. Mater.*, 20, 320, (2010).
- [59] E. J. Denton, M. F. Land, “Mechanism of reflexion in silvery layers of fish and cephalopods“, 178, *Proc. R. Soc. Lond. B* (1971).
- [60] Jordan, T., Partridge, J. & Roberts, N., “Non-polarizing broadband multilayer reflectors in fish”, *Nature Photon*, 6, 759–763, (2012).
- [61] Hart, S. D. et al., “External reflection from omnidirectional dielectric mirror fibers”, *Science*, 296, 510–513, (2002).
- [62] Yang, S. H., Cooper, M. L., Bandaru, P. R., Mookherjea, S., “Giant birefringence in multi-slotted silicon nanophotonic waveguides”, *Opt. Express*, 16, 8306–8316, (2008).
- [63] Gessmann, T., Schubert, E. F., Graff, J. W., Streubel, K. & Karnutsch, C., “Omnidirectional reflective contacts for light-emitting diodes”, *IEEE Electron Dev. Lett.*, 24, 683–685, (2003).
- [64] Weber, M. F., “Giant birefringent optics in multilayer polymer mirrors”, *Science*, 287, 2451–2456, (2000).
- [65] Denton, E. J., Review Lecture: “On the organization of reflecting surfaces in some marine animals”, *Phil. Trans. R. Soc. B*, 258, 285–313, (1970).

- [66] Denton, E. J., Land, M. F., “Mechanism of reflexion in silvery layers of fish and cephalopods”, *Proc. R. Soc. B*, 178, 43–61, (1971).
- [67] McKenzie, D. R., Yin, Y., McFall, W. D., “Silvery fish skin as an example of a chaotic reflector”, *Proc. R. Soc. A*, 451, 579–584, (1995).
- [68] Zhang, D., Li, Z., Hu, W., Cheng, B., “Broadband optical reflector—an application of light localization in one dimension”, *Appl. Phys. Lett.*, 67, 2431–2432, (1995).
- [69] Tomasz M. Trzeciak, Peter Vukusic, “Photonic crystal fiber in the polychaete worm *Pherusa* sp.”, *Phys. Rev. E*, 80, 061908, (2009).
- [70] H. Kikuta, H. Toyota, W. Yu, “Optical elements with subwavelength structured surfaces”, *Optical Review*, 10, 2, 63–73, (2003).
- [71] Cao, Wei; Zhou, Xuhao; McCallum, Naneki C.; Hu, Ziying; Ni, Qing Zhe; Kapoor, Utkarsh; Heil, Christian M.; Cay, Kristine S.; Zand, Tara; Mantanona, Alex J.; Jayaraman, Arthi, “Unraveling the Structure and Function of Melanin through Synthesis”, *Journal of the American Chemical Society*, 143 (7): 2622–2637, (2021).
- [72] Meredith, P., Riesz, J., “Radiative Relaxation Quantum Yields for Synthetic Eumelanin”, *Photochemistry and Photobiology*, 79(2), 211–216, (2007).
- [73] Mason, C. W., “Structural colors in feathers I”, *J. Phys. Chem.*, 27, 201–251, (1923a).
- [74] Mason, C. W., “Structural colors in feathers II”, *J. Phys. Chem.*, 27, 401–447, (1923b).
- [75] Greenwalz, C. H., Brandt, W., Friel, D. D., “Iridescent colors of humming-bird feathers”, *J. Opt Soc. Am.*, 50, 1005–1013, (1960).
- [76] Jean Pol Vigneron, Jean-Francois Colomer, Marie Rassart, Abigail L. Ingram, and Virginie Lousse, “Structural origin of the colored reflections from the black-billed magpie feathers”, *Phys. Rev. E*, 73, 021914, (2006).
- [77] Auber, L., “The structure producing “non-iridescent” blue colour in bird feathers”, *Proc. Zool. Soc. London*, 129, 455–486, (1957).
- [78] Dyck, J., “Structure and spectral reflectance of green and blue feathers of the rose-faced lovebird (*Agapornis roseicollis*)”, *Biol. Skr.*, 18(2), 1–67, (1971).
- [79] Prum, R. O., Torres, R. H., Williamson, S., Dyck, J., “Coherent light scattering by blue feather barbs”, *Nature*, 396, 28–89, (1998).
- [80] Prum, R. O., Torres, R., Williamson, S., Dyck, J., “Two-dimensional Fourier analysis of the spongy medullary keratin of structurally coloured feather barbs”, *Proc. R. Soc. London*, 266, 13–22, (1999).
- [81] Parker, A., McPhedran, R., McKenzie, D. *et al.*, “Aphrodite's iridescence”, *Nature*, 409, 36–37, (2001).

- [82] Jian Zi, Xindi Yu, Yizhou Li, Xinhua Hu, Chun Xu, Xingjun Wang, Xiaohan Liu, Rongtang Fu, “Coloration strategies in peacock feathers”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100 (22), 12576-12578, (2003).
- [83] Yizhou Li, Zhihua Lu, Haiwei Yin, Xindi Yu, Xiaohan Liu, and Jian Zi, “Structural origin of the brown color of barbules in male peacock tail feathers”, *Phys. Rev. E*, 72, 010902 (R), (2005).
- [84] Tomasz M. Trzeciak, Peter Vukusic, “Photonic crystal fiber in the polychaete worm *Pherusa* sp.”, *Phys. Rev. E*, 80, 061908, (2009).
- [85] Christopher Pedler, “The fine structure of the tapetum cellulosum”, *Experimental Eye Research*, 2, 189-195, (1963).
- [86] Lord Rayleigh Sec. R.S. XXVI., “On the remarkable phenomenon of crystalline reflexion described by Prof. Stokes”, *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 26:160, 256-265, (1888).
- [87] Yablonovitch, Eli, “Inhibited Spontaneous Emission in Solid-State Physics and Electronics”, *Physical Review Letters*, 58(20): 2059–2062, (1987).
- [88] John, Sajeev, “Strong localization of photons in certain disordered dielectric superlattices”, *Physical Review Letters*, 58 (23): 2486–9, (1987).
- [89] P. Vukusic, J. R. Sambles, “Photonic structures in biology”, *Nature*, 424(6950), 852–855 (2003).
- [90] K. Kertész, Z. Bálint, Z. Vértésy, G. I. Márk, V. Lousse, J. P. Vigneron, M. Rassart, and L. P. Biró, “Gleaming and dull surface textures from photonic-crystal-type nanostructures in the butterfly *Cyanophrys remus*”, *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.*, 74(2), 021922, (2006).
- [91] L. Biró, K. Kertész, Z. Vértésy, G. Mark, Z. Bálint, V. Lousse, J. Vigneron, “Living photonic crystals: Butterfly scales — Nanostructure and optical properties”, *Mater. Sci. Eng. C*, 27, 941–946, (2007).
- [92] J. W. Galusha, L. R. Richey, J. S. Gardner, J. N. Cha, and M. H. Bartl, “Discovery of a diamond-based photonic crystal structure in beetle scales”, *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.*, 77(5), 050904, (2008).
- [93] J. D. Joannopoulos, S. G. Johnson, J. N. Winn, R. D. Meade, “Photonic Crystals: Molding the Flow of Light”, 2nd Ed., Princeton University Press, Princeton, NJ , (2008).
- [94] S. Kinoshita, “Structural Colors in the Realm of Nature”, World Scientific Publishing Company, Singapore, (2008).
- [95] Dejan Pantelić, Svetlana Savić-Šević, Dejan V. Stojanović, Srećko Ćurčić, Aleksandar J. Krmpot, Mihailo Rabasović, Danica Pavlović, Vladimir Lazović, Vojislav Milošević, “Scattering-enhanced absorption and interference produce a golden wing color of the burnished brass moth, *Diachrysis chrysis*”, *Phys. Rev. E*, 95, 032405, (2017).

- [96] Rayleigh Sec RSL. XXVI. On the remarkable phenomenon of crystalline reflection described by Prof. Stokes, *Phil Mag.*, 26(160): 256-265, (1988).
- [97] M. Maldovan, E. L. Thomas, “Diamond-structured photonic crystals”, *Nature Materials*, 3, 593-600, (2004).
- [98] B. D. Wilts, K. Michielsen, H. De Raedt, D. G. Stavenga, “Iridescence and spectral filtering of the gyroid-type photonic crystals in *Parides sesostris* wing scales”, *Interface Focus.*, 2, 681-687, (2011).
- [99] Guldin, S., Huttner, S., Kolle, M., Welland, M. E., Muller- Buschbaum, P., Friend, R. H., Steiner, U., Tetreault, N., “Dye-sensitized solar cell based on a three-dimensional photonic crystal”, *Nano Letters*, 10, 2303–2309, (2010).
- [100] Almeida, V., Barrios, C., Panepucci, R. et al., “All-optical control of light on a silicon chip”, *Nature*, 431, 1081- 1084, (2004).
- [101] G. A. Ozin, S. M. Yang, “The Race for the Photonic Chip: Colloidal Crystal Assembly in Silicon Wafers”, *Adv. Funct. Mater.*, 11 , 95-104, (2001).
- [102] A. Chutinan, S. John, O. Toader, “Diffractionless Flow of Light in All-Optical Microchips”, *Phys. Rev. Lett.*, 90, 123901, (2003).
- [103] F. Capolino, “Applications of Metamaterials”, CRC Press , Boca Raton, FL, (2009).
- [104] Jayawardana Kbskb, Gamalath Wkail, “Band Gaps of Diamond Structured Photonic Crystals”, *Open Acc J Photoen*, 2(1): 00018, (2018).
- [105] D. Levine, and P. Steinhardt, “Quasicrystals: A New Class of Ordered Structures”, *Phys. Rev. Lett.*, 53(26), 2477–2480, (1984).
- [106] Poladian, L., Wickham, S., Lee, K., Large, M. C., “Iridescence from photonic crystals and its suppression in butterfly scales”, *J. R. Soc. Interface*, 6(Suppl. 2), S233–S242, (2009).
- [107] Wilts, B. D., Michielsen, K., De Raedt, H., Stavenga, D. G., “Hemispherical Brillouin zone imaging of a diamond-type biological photonic crystal”, *Journal of The Royal Society Interface*, 9(72), 1609–1614, (2011).
- [108] Parker, A., Townley, H., “Biomimetics of photonic nanostructures”, *Nature Nanotech*, 2, 347–353, (2007).
- [109] Victoria Welch, Virginie Lousse, Olivier Deparis, Andrew Parker, and Jean Pol Vigneron, “Orange reflection from the three-dimensional photonic crystal in the scales of the weevil *Pachyrrhynchus congestus pavonius* (Curculionidae)”, *Phys. Rev. E*, 75, 041919, (2007).
- [110] Krisztián Kertész, Zsolt Bálint, Zofia Vértesy, Géza I. Márk, Virginie Lousse, Jean Pol Vigneron, Marie Rassart, and László P. Biró, “Gleaming and dull surface textures from photonic-crystal-type nanostructures in the butterfly *Cyanophrys remus*”, *Phys. Rev. E*, 74, 021922, (2006).

- [111] K. Michielsen, H. De Raedt, D.G. Stavenga, “Reflectivity of the gyroid biophotonic crystals in the ventral wing scales of the Green Hairstreak butterfly, *Callophrys ruby*”, *J. R. Soc. Interface*, 7, (2009).
- [112] Vinodkumar Saranathan, Chinedum O. Osuji, Simon G. J. Mochrie, Heeso Noh, Suresh Narayanan, Alec Sandy, Eric R. Dufresne, and Richard O. Prum, “Structure, function, and self-assembly of single network gyroid (I_{4132}) photonic crystals in butterfly wing scales”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107 (26), 11676-11681, (2010).
- [113] K. Michielsen, D.G. Stavenga, “Gyroid cuticular structures in butterfly wing scales: biological photonic crystals”, *J. R. Soc. Interface*, 5, (2007).
- [114] Jeremy W. Galusha, Lauren R. Richey, John S. Gardner, Jennifer N. Cha, Michael H. Bartl, “Discovery of a diamond-based photonic crystal structure in beetle scales”, *Phys. Rev. E*, 77, 050904(R), (2008).
- [115] Bodo D. Wilts and Vinodkumar Saranathan, “A Literal Elytral Rainbow: Tunable Structural Colors Using Single Diamond Biophotonic Crystals in *Pachyrrhynchus congestus* Weevils”, *Small*, 1802328, (2018).
- [116] Bodo D. Wilts, Kristel Michielsen, Jeroen Kuipers, Hans De Raedt and Doekle G. Stavenga, “*Brilliant camouflage*: photonic crystals in the diamond weevil, *Entimus imperialis*”, *Proc. R. Soc. B*, 279, (2012).
- [117] Jeremy W. Galusha, Matthew R. Jorgensen, and Michael H. Bartl, “Diamond-Structured Titania Photonic-Bandgap Crystals from Biological Templates”, *Adv. Mater.*, 22, 107–110, (2010).
- [118] Zhiwu Han, Shichao Niu, Chunhui Shang, Zhenning Liu and Luquan Ren, “Light trapping structures in wing scales of butterfly *Trogonoptera brookiana*”, *Nanoscale*, 4, 2879, (2012).
- [119] Schultz, T., Bernard, G., “Pointillistic mixing of interference colours in cryptic tiger beetles”, *Nature*, 337, 72–73, (1989).
- [120] Williamson, S. J., Cummins, H. Z., “Light and Color in Nature and Art”, Wiley, New York, (1983).
- [121] Welch, V., Lousse, V., Deparis, O., Parker, A. & Vigneron, J., “Orange reflection from a three-dimensional photonic crystal in the scales of the weevil *Pachyrrhynchus congestus pavonius* (Curculionidae)”, *Phys. Rev. E*, 75, 41919-1–41919-9, (2007).
- [122] Yang, S.-H., “Spintronics on chiral objects”, *Applied Physics Letters*, 116(12), 120502, (2020).
- [123] Finlayson, E. D., McDonald, L. T., Vukusic, P., “Optically ambidextrous circularly polarized reflection from the chiral cuticle of the scarab beetle *Chrysina resplendens*”, *Journal of The Royal Society Interface*, 14(131), 20170129, (2017).
- [124] Jewell, S. A., Vukusic, P., Roberts, N. W., “Circularly polarized colour reflection from helicoidal structures in the beetle *Plusiotis boucardi*”, *New Journal of Physics*, 9(4), 99–99, (2007).

- [125] De Silva, L., Hodgkinson, I., Murray, P., Wu, Q. H., Arnold, M., Leader, J., Mcnaughton, A., “Natural and Nanoengineered Chiral Reflectors: Structural Color of Manuka Beetles and Titania Coatings”, *Electromagnetics*, 25(5), 391–408, (2005).
- [126] Cécilia Boyon, Vanessa Soldan, and Michel Mitov, “Bioinspired, Cholesteric Liquid-Crystal Reflectors with Time-Controlled Coexisting Chiral and Achiral Structures”, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 13, 25, 30118–30126, (2021).
- [127] Lakshman De Silva, Ian Hodgkinson, Petra Murray, Qi Hong Wu, Matthew Arnold, John Leader, Andrew Mcnaughton, “Natural and Nanoengineered Chiral Reflectors: Structural Color of Manuka Beetles and Titania Coatings”, *Electromagnetics*, 25:5, 391-408, (2005).
- [128] Suet Ying Ching, Guixin Li, Hoi Lam Tam, David T. P. Goh, Joseph K. L. Goh, Kok Wai Cheah, “Chirality in Rhomborhina Gigantea beetle”, *Opt. Mater. Express*, 4, 2340-2345, (2014).
- [129] Hans Arwin, Roger Magnusson, Jan Landin, Kenneth Järrendahl, “Chirality-induced polarization effects in the cuticle of scarab beetles: 100 years after Michelson”, *Philosophical Magazine*, 92:12, 1583-1599, (2012).
- [130] G. E. Schröder-Turk, S. Wickham, H. Averdunk, F. Brink, J. D. Fitz Gerald, L. Poladian, M. C. J. Large, S. T. Hyde, “The chiral structure of porous chitin within the wing-scales of *Callophrys rubi*,” *J. Struct. Biol.*, 174, 290–295, (2011).
- [131] M. Saba, M. Thie, M. D. Turner, S. T. Hyde, M. Gu, K. Grosse-Brauckmann, D. N. Neshev, K. Mecke, G. E. Schröder-Turk, “Circular dichroism in biological photonic crystals and cubic chiral nets,” *Phys. Rev. Lett.*, 106, 103902, (2011).
- [132] S A Jewell, P Vukusic and N W Roberts, “Circularly polarized colour reflection from helicoidal structures in the beetle *Plusiotis boucardi*”, *New J. Phys.*, 9, 99, (2007).
- [133] Finlayson ED, McDonald LT, Vukusic P., “Optically ambidextrous circularly polarized reflection from the chiral cuticle of the scarab beetle *Chrysina resplendens*”, *J. R. Soc. Interface*, 14: 20170129, (2017).
- [134] Agez, G., Bayon, C., Mitov, M., “Multiwavelength micromirrors in the cuticle of scarab beetle *Chrysina gloriosa*”, *Acta Biomaterialia*, 48, 357–367, (2017).
- [135] Brink, D. J., van der Berg, N. G., Prinsloo, L. C., “The role of interface effects on the reflection of circularly polarised light from the thin-film structure of scarabus beetles”, *Surface and Interface Analysis*, 40(3-4), 769–771, (2008).
- [136] Mendoza-Galván, A., del Río, L.F., Järrendahl, K. *et al.*, “Graded pitch profile for the helicoidal broadband reflector and left-handed circularly polarizing cuticle of the scarab beetle *Chrysina chrysargyrea*”, *Sci Rep* 8, 6456, (2018).
- [137] Brink, D. J., van der Berg, N., Prinsloo, L., “Multi-color reflection from chiral thin-film stacks”, *Nanophotonic Materials VIII*, (2011).
- [138] Arwin, H., Magnusson, R., Järrendahl, K., Schoeche, S., “Effective structural chirality of beetle cuticle determined from transmission Mueller matrices using the Tellegen constitutive relations”, *Journal of Vacuum Science & Technology B*, 38(1), 014004, (2020).

- [139] Winter, B., Butz, B., Dieker, C., Schröder-Turk, G. E., Mecke, K., Spiecker, E., “Coexistence of both gyroid chiralities in individual butterfly wing scales of *Callophrys rubi*”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(42), 12911–12916, (2015).
- [140] Hernández-Jiménez, M., Azofeifa, D. E., Libby, E., Barboza-Aguilar, C., Solís, Á., Arce-Marenco, L., ... Vargas, W. E., “Qualitative correlation between structural chirality through the cuticle of *Chrysina aurigans* scarabs and left-handed circular polarization of the reflected light”, *Optical Materials Express*, 4(12), 2632, (2014).
- [141] Coyle S, Prakash G V, Baumberg J J, Abdalsalem M, Bartlett P N, “Spherical micromirrors from template self-assembly: Polarization rotation on the micron scale”, *Appl. Phys. Lett.*, 83, 767–9, (2003).
- [142] P. Vukusic, B. Hallam, J. Noyes, “Brilliant whiteness in ultrathin beetle scales”, *Science*, 315(5810), 348, (2007).
- [143] Burresi, M., Cortese, L., Pattelli, L., Kolle, M., Vukusic, P., Wiersma, D. S., Steiner, U., Vignolini, S., “Bright-White Beetle Scales Optimise Multiple Scattering of Light.”, *Scientific Reports*, 4(1), (2014).
- [144] Schanda, János D., “Colorimetry” In Casimer DeCusatis (ed.), *Handbook of Applied Photometry*, OSA/AIP. pp. 327–412 (1997).
- [145] Stephen Westland, “CIE Whiteness”, *Encyclopedia of Color Science and Technology*, 27851-8, 5-1, (2015).
- [146] Michal Vik et al., “WHITENESS FORMULA BASED ON CIECAM02 AND THEIR TEXTILE APPLICATION”, Proceedings of the 29th CIE SESSION, Washington D.C., USA, (2019).
- [147] XYZ-CIE Tristimulus Values, Hunter Lab, Applications Note, Vol. 8, No. 1 (2008).
- [148] Ernst Ganz, “Whiteness: photometric specification and colorimetric evaluation”, *Appl. Opt.*, 15, 2039-2058, (1976).
- [149] Yoshioka, S., Kinoshita, S., “Structural or pigmentary? Origin of the distinctive white stripe on the blue wing of a *Morpho* butterfly”, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1583), 129–134, (2006).
- [150] Pedro David Garcia, Riccardo Sapienza, Cefe Lopez, “Photonic Glasses: A Step Beyond White Paint”, *Advanced Materials*, 22(1), 12–19, (2010).
- [151] Kuo, H. P., Chuang, M. Y., Lin, C. C., “Design correlations for the optical performance of the particle-diffusing bottom diffusers in the LCD backlight unit”, *Powder Technology*, 192(1), 116–121, (2009).
- [152] Harrison AW, Walton MR, “Radiative cooling of TiO₂ white paint”, *Sol Energy*, 20: 185–188, (1978).
- [153] Stavenga, D. G., Stowe, S., Siebke, K., Zeil, J., Arikawa, K., “Butterfly wing colours: scale beads make white pierid wings brighter”, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*,

271(1548), 1577–1584, (2004).

[154] Yu, K., Fan, T., Lou, S., Zhang, D., “Biomimetic optical materials: Integration of nature’s design for manipulation of light”, *Progress in Materials Science*, 58(6), 825–873, (2013).

[155] Buresi, M., Cortese, L., Pattelli, L. *et al.*, “Bright-White Beetle Scales Optimise Multiple Scattering of Light”, *Sci Rep*, 4, 6075, (2015).

[156] Vukusic P., Sambles J.R., Lawrence C.R., “Structurally assisted blackness in butterfly scales”, *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 271, (2004).

[157] Y. A. Akimov, W. S. Koh, S. Y. Sian, S. Ren, “Nanoparticle-enhanced thin film solar cells: Metallic or dielectric nanoparticles?”, *Appl. Phys. Lett.*, 96, 073111, (2010).

[158] E.Yablonovitch, G.D.Cody, “Intensity enhancement in textured optical sheets for solar cells”, *IEEE Trans. Electron Devices*, 29, 300, (1982).

[159] Nijhout, H. F., “The development and evolution of butterfly wing patterns”, Washington, DC: Smithsonian Institute Press, (1991).

[160] Silberglied, R. E., “Visual communication and sexual selection among butterflies”, In *The biology of butterflies, Symposium of the Royal Society of London, no. 11* (ed. R. I. Vane-Wright & P. E. Ackery), pp. 207–223. London: Academic, (1984).

[161] Brown, R. J. C., Brewer, P. J., Milton, M. J. T., “The physical and chemical properties of electroless nickel-phosphorus alloys and low reflectance nickel-phosphorus black surfaces”, *J. Mater. Chem.*, 12, 2749–2754, (2002).

[162] Arnold, K. E., Owens, I. P., Marshall, N. J., “Fluorescent signaling in parrots”, *Science*, 295, 92, (2002).

[163] Evans, J., Cuthill, I., Bennett, A., “The effect of flicker from fluorescent lights on mate choice in captive birds”, *Anim. Behav.*, 72, 393-400, (2006).

[164] Kevin J. McGraw, Matthew B. Toomey, Paul M. Nolan, Nathan I. Morehouse, Melanie Massaro, Pierre Jouventin, “A description of unique fluorescent yellow pigments in penguin feathers”, *Pigment Cell Res.*, 20, 301–304, (2007).

[165] Schumaier, G., P. C. Harrison, J. McGinnis, “Effect of colored fluorescent light on growth, cannibalism, and subsequent egg production of single comb white leghorn pullets”, *Poult. Sci.*, 47:1599–1602, (1968).

[166] Kevin J. McGraw, Melanie Massaro, Trevor J. Rivers, Thomas Mattern, “Annual, sexual, size- and condition-related variation in the colour and fluorescent pigment content of yellow crest-feathers in Snares Penguins (*Eudyptes robustus*)”, *Emu - Austral Ornithology*, 109:2, 93-99, (2009).

[167] Pete Vukusic, Ian Hooper, “Directionally controlled Fluorescence Emission in Butterflies”, *Science*, 310, 5751, (2005).

- [168] Lim, L. M. L., Land, M. F., Li, D., “Sex-specific UV and fluorescence signals in jumping spiders”, *Science*, 315, 481, (2007).
- [169] Sean J. Mulligan, Brian A. MacVicar, “Two-Photon Fluorescence Microscopy: Basic Principles, Advantages and Risks”, *Modern Research and Educational Topics in Microscopy*, 881-889, (2007).
- [170] Peter TC So, “Two-photon Fluorescence Light Microscopy”, *Encyclopedia of Life Sciences*, (2001).
- [171] Peter T. C. So, Chen Y. Dong, Barry R. Masters, Keith M. Berland, “Two-Photon Excitation Fluorescence Microscopy”, *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2:1, 399-429, (2000).
- [172] P. Theer, M.T. Hasan, W. Denk, “Two-photon imaging to a depth of 1000 μm in living brains by use of a Ti:Al₂O₃ regenerative amplifier”, *Opt. Lett.*, 28, 1022–1024, (2003).
- [173] M. Oheim, E. Beaurepaire, E. Chaigneau, J. Mertz, S. Charpak, “Two-photon microscopy in brain tissue: parameters influencing the imaging depth”, *J. Neurosci. Methods*, 111, 29–37, (2001).
- [174] E. Beaurepaire, M. Oheim, J. Mertz, “Ultra-deep two-photon fluorescence excitation in turbid media”, *Opt. Commun.*, 188, 25–29, (2001).
- [175] E. Beaurepaire, J. Mertz, “Epifluorescence collection in two-photon microscopy”, *Appl. Opt.*, 41, 5376–5382, (2002).
- [176] A. Hopt, E. Neher, “Highly nonlinear photodamage in two-photon fluorescence microscopy”, *Biophys. J.*, 80, 2029–2036, (2001).
- [177] W. Denk, K. Svoboda, “Photon upmanship: why multiphoton imaging is more than a gimmick”, *Neuron*, 18, 351–357, (1997).
- [178] W. Denk, J. H. Strickler, W. W. Webb, “Two-photon laser scanning fluorescence microscopy,” *Science*, 248, 73–76, (1990).
- [179] C. Xu, W. Zipfel, J.B. Shear, R.M. Williams, W.W. Webb, “Multiphoton fluorescence excitation. New spectral windows for biological nonlinear microscopy”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93, 10763–10768, (1996).
- [180] R. Lansford, G. Bearman, S.E. Fraser, “Resolution of multiple green fluorescent protein color variants and dyes using two-photon microscopy and imaging spectroscopy”, *J. Biomed. Opt.*, 6, 311–318, (2001).
- [181] Masters BR, So PTC, Gratton E, “Multiphoton excitation fluorescence microscopy and spectroscopy of in vivo human skin”, *Biophysical Journal*, 72, 2405–2412, (1997).
- [182] Bewersdorf J, Rainer P, Hell SW, “Multifocal multiphoton microscopy”, *Optics Letters*, 23, 665–667, (1998).
- [183] Denk W, Delaney KR, Gelperin A et al., “Anatomical and functional imaging of neurons using 2-photon laser scanning microscopy”, *Journal of Neuroscience Methods*, 54, 151–162, (1994).

- [184] Mohler WA, Simske JS, Williams-Masson EM, Hardin JD, White JG, “Dynamics and ultrastructure of developmental cell fusions in the *Caenorhabditis elegans* hypodermis”, *Current Biology*, 8, 1087–1090, (1998).
- [185] Errington, R.J., Ameer-beg, S.M., Vojnovic, B., Patterson, L.H., Zloh, M., Smith, P.J., “Advanced microscopy solutions for monitoring the kinetics and dynamics of drug-DNA targeting in living cells”, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 57, 153–167, (2005).
- [186] Mouras, R., Rischitor, G., Downes, A., Salter, D., Elfick, A., “Non-linear optical microscopy for drug delivery monitoring and cancer tissue imaging”, *J. Raman Spectrosc.*, 41, 848-852, (2010).
- [187] Lin, S.J., Jee, S.H., Dong, C.Y., “Multiphoton microscopy: a new paradigm in dermatological imaging”, *Eur. J. Dermatol.*, 17, 361–366, (2007).
- [188] Tsung-Hua, T., Shiou-Hwa, J., Chen-Yuan, D., Sung-Jan, L., “Multiphoton microscopy in dermatological imaging”, *J. Dermatol. Sci.*, 56, 1–8, (2009).
- [189] Bagatolli, L.A., Sanchez, S.A., Hazlett, T., Gratton, E., “Giant vesicles, Laurdan, and two photon fluorescence microscopy: evidence of lipid lateral separation in bilayers”, *Methods Enzymol.*, 360, 481–500, (2003).
- [190] Krishnan, R. V., Saitoh, H., Terada, H., Centonze, V. E., Herman, B., “Development of a multiphoton fluorescence lifetime imaging microscopy system using a streak camera”, *Review of Scientific Instruments*, 74(5), 2714–2721, (2003).
- [191] J. B. Guild, C. Xu, and W. W. Webb, “Measurement of group delay dispersion of high numerical aperture objective lenses using two-photon excited fluorescence”, *Appl. Opt.*, 36, 397–401, (1997).
- [192] Cryan, J. R., “Molecular phylogeny of Cicadomorpha (Insecta: Hemiptera: Cicadoidea, Cercopoidea and Membracoidea): adding evidence to the controversy”, *Systematic Entomology*, 30(4), 563–574, (2004).
- [193] Siddique, R., Gomard, G., Hölscher, H., “The role of random nanostructures for the omnidirectional anti-reflection properties of the glasswing butterfly”, *Nat Commun*, 6, 6909, (2015).
- [194] Valerie R. Binetti, Jessica D. Schiffman, Oren D. Leaffer, Jonathan E. Spanier, Caroline L. Schauer, “The natural transparency and piezoelectric response of the Greta oto butterfly wing”, *Integrative Biology*, 1(4), 324–329, (2009).
- [195] Perez Goodwyn, P., Maezono, Y., Hosoda, N. et al., “Waterproof and translucent wings at the same time: problems and solutions in butterflies”, *Naturwissenschaften*, 96, 781–787, (2009).
- [196] Goodwyn, P. P., De Souza, E., Fujisaki, K., Gorb, S., “Moulding technique demonstrates the contribution of surface geometry to the super-hydrophobic properties of the surface of a water strider”, *Acta Biomaterialia*, 4(3), 766–770, (2008).
- [197] Bird, J. C. et al., “Reducing the contact time of a bouncing drop”, *Nature*, 503 (7476): 385-388, (2013).
- [198] Schmitz, H., Bleckmann, H., “The photomechanic infrared receptor for the detection of forest fires in the beetle *Melanophila acuminata* (Coleoptera: Buprestidae)”, *J Comp Physiol A*, 182, 647–657, (1998).

- [199] Evans, W. G., “Perception of Infrared Radiation from Forest Fires by *Melanophila Acuminata* de Geer (Buprestidae, Coleoptera)”, *Ecology*, 47(6), 1061–1065, (1966).
- [200] G. F. Robert, P. H. Adler, “Insect Biodiversity”, Science and Society, Chichester, UK: Willey-Blackwell, (2009).
- [201] Xiaofeng Zhou, Shalom W. Applebaum, Moshe Coll, “Overwintering and Spring Migration in the Bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Israel”, *Environmental Entomology*, 29, 6, 1289–1294, (2000).
- [202] Nijhout, H.F., “The developmental physiology of color patterns in Lepidoptera”, In Berridge, M.J., Treherne, J.E., Wigglesworth, V.V.B. (ed), *Advances in Insect Physiology*, Volume 18. Academic Press, Florida, 141–248, (1985).
- [203] Prum, R.O., Quinn, T., Torres, R.H., “Anatomically diverse butterfly scales all produce structural colours by coherent scattering”, *The Journal of Experimental Biology*, 209: 748–765, (2006).
- [204] Doucet Stephanie M, Meadows Melissa G, “Iridescence: a functional perspective”, *J. R. Soc. interface.*, 6: 115–S132, (2009).
- [205] Tan, Y., Gu, J., Xu, W., Chen, Z., Liu, D., Liu, Q., Zhang, “Reduction of CuO Butterfly Wing Scales Generates Cu SERS Substrates for DNA Base Detection”, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 5(20), 9878–9882, (2013).
- [206] Zhang, M., Meng, J., Wang, D., Tang, Q., Chen, T., Rong, S., ... Wu, Y., “Biomimetic synthesis of hierarchical 3D Ag butterfly wing scale arrays/graphene composites as ultrasensitive SERS substrates for efficient trace chemical detection”, *Journal of Materials Chemistry C*, 6(8), 1933–1943, (2018).
- [207] Tan, Y., Gu, J., Xu, L., Zang, X., Liu, D., Zhang, W., ... Zhang, D., “High-Density Hotspots Engineered by Naturally Piled-Up Subwavelength Structures in Three-Dimensional Copper Butterfly Wing Scales for Surface-Enhanced Raman Scattering Detection”, *Advanced Functional Materials*, 22(8), 1578–1585, (2012).
- [208] Zhang, W., Zhang, D., Fan, T., Gu, J., Ding, J., Wang, H., ... Ogawa, H., “Novel Photoanode Structure Templated from Butterfly Wing Scales”, *Chemistry of Materials*, 21(1), 33–40, (2009).
- [209] Fang, J., Song, G., Liu, Q., Zhang, W., Gu, J., Su, Y., ... Zhang, D., “Enhanced photocatalytic hydrogen production on three-dimensional gold butterfly wing scales/CdS nanoparticles”, *Applied Surface Science*, 427, 807–812, (2018).
- [210] Parker, A., Townley, H. “Biomimetics of photonic nanostructures”, *Nature Nanotech*, 2, 347–353, (2007)
- [211] Bhushan, B., “Biomimetics: lessons from nature-an overview”, *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 367(1893), 1445–1486, (2009).

- [212] Franziska Schenk, Doekele G. Stavenga, “The Lesser Purple Emperor butterfly, *Apatura ilia*: from mimesis to biomimetics”, *Faraday Discussions*, 223, 145-160, (2020).
- [213] P. Vukusic, R. Kelly, I. Hooper, “A biological sub-micron thickness optical broadband reflector characterized using both light and microwaves”, *J. Roy. Soc. Interface*, 6, S193 – S201, (2009).
- [214] “Malin Space Science Systems – Mars Science Laboratory (MSL), Mars Hand Lens Imager (MHLI)”, Instrument Description.
- [215] Johnson, Dave, “How to Do Everything: Digital Camera (5th ed.)”, McGraw-Hill Osborne Media, p. 336, (2008).
- [216] Sidney F. Ray, “Applied Photographic Optics (3rd ed.)”, Oxford: Focal Press, p. 231-232, (2002).
- [217] D. Domine, F.-J. Haug, C. Battaglia, C. Ballif, “Modeling of light scattering from micro- and nanotextured surfaces”, *J. Appl. Phys.*, 107, 044504, (2010).
- [218] Y. A. Akimov, W. S. Koh, S. Y. Sian, S. Ren, “Nanoparticle-enhanced thin film solar cells: Metallic or dielectric nanoparticles?”, *Appl. Phys. Lett.*, 96, 073111, (2010).
- [219] J. e. Schanda, “Colorimetry: Understanding the CIE System”, Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, (2007).
- [220] Smith, Thomas, Guild, John, “The C.I.E. colorimetric standards and their use”, *Transactions of the Optical Society*, 33 (3): 73–134, (1931–32).
- [221] I. G. Johnston et al., “Mitochondrial variability as a source of extrinsic cellular noise”, *PLoS Comput. Biol.*, 8, e1002416:1, (2012).
- [222] Kaern, M.; Elston, T.R.; Blake, W.J., Collins, J.J., “Stochasticity in gene expression: from theories to phenotypes”, *Nat. Rev. Genet.*, 6 (6): 451–464, (2005).
- [223] Lewin, Benjamin, “Genes”, 6th edition, Oxford University Press, (1997).
- [224] Maheshri N, O'Shea, “Living with noisy genes: how cells function reliably with inherent variability in gene expression”, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 36: 413–434, (2007).
- [225] Johnston, I.G., “The chaos within: exploring noise in cellular biology”, *Significance*, 19 (4): 17–21, (2012).
- [226] G . T . di Francia, “Degrees of freedom of an image”, *JOSA*, 59, 799 - 804, (1969).
- [227] A. Dinwiddie, R. Null, M. Pizzano, L. Chuong, A. Leigh Krup, H. Ee Tan, N. H. Patel, “Dynamics of F-actin prefigure the structure of butterfly wing scales”, *Dev. Biol.*, 392, 404 (2014).
- [228] K. Watanabe, T. Hoshino, K. Kanda, Y. Haruyama, T. Kaito, S. Matsui, “Optical measurement and fabrication from a *Morpho*-butterfly-scale quasistucture by focused ion beam chemical vapor deposition”, *J. Vac. Sci. Technol. B*, 23, 570, (2005).
- [229] D. Colton, R. Kress, “Inverse Acoustic and Electromagnetic Scattering Theory”, 2nd ed. New York, NY: Springer, (1998).

- [230] F. Monticone, A. Alu, “Do clocked objects really scatter less?”, *Phys. Rev. X*, 3(041005), 1, (2013).
- [231] G. Bao, P. Li, J. Lin, F. Triki, “Inverse scattering problems with multi-frequencies”, *Inverse Probl*, 31, 093001, (2015).
- [232] S. Toxqui-López, A. Olivares-Pérez, I. Fuentes-Tapia, A. Quintero-Romo, “Duplication of holograms by using fingernail polish”, *Opt. Mater.*, 29, 1604 (2007).
- [233] Benjamin D. Chrysler, Raymond K. Kostuk, “Volume hologram replication system for spectrum-splitting photovoltaic applications”, *Appl. Opt.*, 57, 8887-8893, (2018).
- [234] Makoto Okui, Koki Wakunami, Ryutaro Oi, Yasuyuki Ichihashi, Boaz Jessie Jackin, Kenji Yamamoto, “Copying of holograms by spot scanning approach”, *Appl. Opt.*, 57, 4117-4122, (2018).
- [235] E.P. Newman, “Franklin Making Money More Plentiful”, *Proceedings of the American Philosophical Society*, 115, 341, (1971).
- [236] Farley Grubb, “Benjamin Franklin and the birth of the paper money economy”, Essay based on Mar. 30, 2006 lecture , published by Federal Reserve Bank of Philadelphia.
- [237] R. L. Van Renesse, “Optical document security”, 3rd ed., Norwood, MA: Artech House, (2004).
- [238] W. Zhang, J. Gu, Q. Liu, H. Su, T. Fan, D. Zhang, “Butterfly effects: novel functional materials inspired from the wing scales”, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 16, 19767, (2014).
- [239] C. Boehm, M. Hofer , “ Physically unclonable functions in theory and practice ”, Springer, (2013).
- [240] R. Pappu, B. Recht, J. Taylor, N. Gershenfeld, “Physical one-way functions”, *Science*, 297, 2026–2030, (2002).
- [241] J. D. R. Buchanan et al, “Forgery: “Fingerprinting” documents and packaging”, *Nature*, 436 (7050): 475, (2005).
- [242] Hamm-Dubischar, C. Patent No. WO 2007031077 (A1), “Inorganic marking particles for characterizing products for proof of authenticity method for production and use thereof”, (2007).
- [243] Biermann, N., Rauhe, H., “Method for Producing Security Markings”, WO2004070667 A2, (2004).
- [244] Rauhe, H., “Verfahren zur Herstellung von information stragenden mikropartikulären Gemischen”, Patent DE10238506 A1, (2004).
- [245] J. Wood, “Invariant pattern recognition”, *Pattern Recognition.*, 29, 1, 1-17, (1996).
- [246] A. Grace, M. Spann, “A comparison between Fourier-Mellin descriptors and moment based features for invariant object recognition using neural networks”, *Pattern Recognition Lett.*, 12, 635-643, (1991).
- [247] Y. Li, “Reforming the theory of invariant moments for pattern recognition”, *Pattern Recognition*, 25, 723-730, (1992).

- [248] Y. Sheng, H. H. Arsenault, “Experiments on pattern recognition using invariant Fourier-Mellin descriptors”, *J. Optical Soc. America A (Optics and Image Sci.)*, 3, 771-776, (1986).
- [249] R. Wu, H. Stark, “Three dimensional object recognition from multiple views”, *J. Optical Soc. America A (Optics and Image Sci.)*, 3, 1543-1557, (1986).
- [250] T. M. Caelli, Zhi-Qiang Liu, “On the minimum number of templates required for shift, rotation and size invariant pattern recognition”, *Pattern Recognition*, 21, 205-216, (1988).
- [251] Wood, J., “Invariant pattern recognition: A review.”, *Pattern Recognition*, 29(1), 1–17, (1996).
- [252] J. L. de Bougrenet de la Tocnay, F. Ghorbei, “A rotation, scaling and translation invariant pattern classification system”, *Pattern Recognition Lett.*, 8, 55-58, (1988).
- [253] S. Kagcyu, N. Ohnishi, N. Sugie, “Augmented multilayer perceptron for rotation-and scale-invariant hand-written numeral recognition”, *Proceedings of 1991 IEEE International Joint Conference on Neural Networks*, 1, pp. 54-59. IEEE (1991).
- [254] Y. Sheng, J. Duvernoy, “Circular Fourier radial Mellin transform descriptors for pattern recognition”, *J. Optical Soc. America A (Optics and Image Sci.)*, 3, 885-888, (1986).
- [255] Y. Sheng, C. Lejeune, “Invariant pattern recognition using Fourier-Mellin transforms and neural networks”, *J. Optics*, 22, 223-228, (1991).
- [256] M. E. McNamara et al, “Fossilized Biophotonic Nanostructures Reveal the Original Colors of 47-Million-Year Old Moths”, *PLoS Biol.*, 9, e1001200:1, (2011).
- [257] J. Zhang, M. Gecevicius, M. Beresna, P. G. Kazansky, “Seemingly Unlimited Lifetime Data Storage in Nanostructured Glass”, *Phys. Rev. Lett.*, 112, 033901, (2014).
- [258] Pris, A., Utturkar, Y., Surman, C. et al., “Towards high-speed imaging of infrared photons with bio-inspired nanoarchitectures”, *Nature Photon* 6, 195–200, (2012).
- [259] Potyrailo, R., Ghiradella, H., Vertiatikh, A. et al., “*Morpho* butterfly wing scales demonstrate highly selective vapour response”, *Nature Photon*, 1, 123–128, (2007).
- [260] Hsuan-Ming Hu, Jolanta A. Watson, Bronwen W. Cribb, Gregory S. Watson, “Fouling of nanostructured insect cuticle: adhesion of natural and artificial contaminants”, *Biofouling*, 27:10, 1125-1137, (2011).
- [261] Shi, N.N., Tsai, C.C., Camino, F., Bernard, G.D., Yu, N., Wehner, R., “Keeping cool: Enhanced optical reflection and radiative heat dissipation in Saharan silver ants”, *Science*, 349(6245), 298-301, (2015).
- [262] Gillott, C., “Food Uptake and Utilization”, *Entomology*, 487–513, (2005).
- [263] Gullan, P. J., Cranston, P.S., “The insects: an outline of entomology”, John Wiley & Sons, (2004).
- [264] Capinera, J.L., “Encyclopedia of entomology”, Springer Science & Business Media, New York, (2008).

- [265] Hui, Y., Gomez-Diaz, J. S., Qian, Z., Alu, A., Rinaldi, M., “Plasmonic piezoelectric nanomechanical resonator for spectrally selective infrared sensing”, *Nature communications*, 7(1), 1-9, (2016).
- [266] Dao, T. D., Ishii, S., Yokoyama, T., Sawada, T., Sugavaneshwar, R. P., Chen, K., Wada, Y., Nabatame T., Nagao, T., “Hole array perfect absorbers for spectrally selective midwavelength infrared pyroelectric detectors”, *Acs Photonics*, 3(7), 1271-1278, (2016).
- [267] Ogawa, S., Okada, K., Fukushima, N., Kimata, M., “Wavelength selective uncooled infrared sensor by plasmonics”, *Applied Physics Letters*, 100(2), 021111, (2012).
- [268] Fleming, J. G., Lin, S. Y., El-Kady, I., Biswas, R., Ho, K. M., “All-metallic three-dimensional photonic crystals with a large infrared bandgap”, *Nature*, 417(6884), 52-55, (2002).
- [269] LeMieux, M. C., McConney, M. E., Lin, Y. H., Singamaneni, S., Jiang, H., Bunning, T. J., Tsukruk, V. V., “Polymeric nanolayers as actuators for ultrasensitive thermal bimorphs”, *Nano letters*, 6(4), 730-734, (2006).
- [270] Watts, M. R., Shaw, M. J., Nielson, G. N., “Microphotonic thermal imaging”, *Nature Photonics*, 1(11), 632-634, (2007).
- [271] Yi, F., Zhu, H., Reed, J. C., Cubukcu, E., “Plasmonically enhanced thermomechanical detection of infrared radiation”, *Nano letters*, 13(4), 1638-1643, (2013).
- [272] Zhang, F., Shen, Q., Shi, X., Li, S., Wang, W., Luo, Z., ... Shang, W., “Infrared detection based on localized modification of Morpho butterfly wings”, *Advanced materials*, 27(6), 1077-1082, (2015).
- [273] Michelle Gleeson, “Miniature Lives: Identifying Insects in Your Home and Garden”, CSIRO Publishing, page 313, (2016).
- [274] Augustus Radcliffe Grote, “Canadian Entomologist”, *Entomological Society of Canada*, 41, (1909).
- [275] Chandrasekhar, S., “Radiative Transfer”, Oxford University Press, (1950).
- [276] RCA Electro-Optics Handbook, page 18 .
- [277] Warren J. Smith, “Modern Optical Engineering”, *McGraw-Hill*, p. 228, 256, (2000).
- [278] Pedrotti & Pedrotti, “Introduction to Optics”, Prentice Hall, (1993).
- [279] Shi, N.N., “Biological and Bioinspired Photonic Materials for Passive Radiative Cooling and Waveguiding”, Doctoral dissertation, Columbia University, (2018).
- [280] Florescu, M., Torquato, S., Steinhardt, P.J., “Designer disordered materials with large, complete photonic band gaps”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(49), 20658-20663, (2009).
- [281] Torquato S, Stillinger FH, “Local density fluctuations, hyperuniformity, and order metrics”, *Phys. Rev. E*, 68:041113/1–25, (2003).
- [282] Takeda, S., Viktorovtich, P., Obara, M., “Anderson localization of light in two-dimensional random photonic crystals”, *1st International Symposium on Access Spaces (ISAS)*, (2011).

- [283] Bingi, J., Nair, R. V., Vijayan, C., “Time dependent Bloch mode transmittance in self-assembled random photonic crystal for photonic time delay switching”, *Optical Materials*, 64, 95–99, (2017).
- [284] Asatryan, A. A., Robinson, P. A., Botten, L. C., McPhedran, R. C., Nicorovici, N. A., Martijn de Sterke, C., “Effects of disorder on wave propagation in two-dimensional photonic crystals”, *Physical Review E*, 60(5), 6118–6127, (1999).
- [285] Chiasera Alessandro, Scotognella Francesco, Criante Luigino, Varas Stefano, Valle Giuseppe Della, Ramponi Roberta, Ferrari Murizio, “Disorder in Photonic Structures Induced by Random Layer Thickness”, *Science of Advanced Materials*, 7, 1207-1212(6), (2015).
- [286] Mizuno, K., Ishii, J., Kishida, H., Hayamizu, Y., Yasuda, S., Futaba, D.N., Yumura, M., Hata, K., “A black body absorber from vertically aligned single-walled carbon nanotubes”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(15), 6044-6047, (2009).
- [287] De Nicola, F., Hines, P., De Crescenzi, M., Motta, N., “Thin randomly aligned hierarchical carbon nanotube arrays as ultrablack metamaterials”, *Physical Review B*, 96(4), 045409, (2017).
- [288] Leonhardt, U., Tyc, T., “Broadband invisibility by non-Euclidean cloaking”, *Science*, 323(5910), 110-112, (2009).
- [289] Pavlović, D., Vasiljević, D., Salatić, B., Lazović, V., Dikić, G., Tomić, L., Ćurčić, S., Milovanović, P., Todorović, D., Pantelić, D. V., “Photonic structures improve radiative heat exchange of *Rosalia alpina* (Coleoptera: Cerambycidae)”, *Journal of Thermal Biology*, 76, 126–138, (2018).
- [290] Heinrich, B., “The hot-blooded insects: strategies and mechanisms of thermoregulation”, Springer Science & Business Media, New York, (2013).
- [291] Vollmer, M., Möllmann, K.P., “Infrared thermal imaging: fundamentals, research and applications”, John Wiley & Sons, (2010).
- [292] Prokhorov, A., “Effective emissivities of isothermal blackbody cavities calculated by the Monte Carlo method using the three-component bidirectional reflectance distribution function model”, *Applied Optics*, 51(13), 2322 – 2332, (2012).
- [293] Griffiths, P., de Hasseth, J. A., “Fourier Transform Infrared Spectrometry”, (2nd ed.), Wiley-Blackwell, (2007).
- [294] Manor, Joshua; Feldblum, Esther S., Arkin, Isaiah T., “Environment Polarity in Proteins Mapped Noninvasively by FTIR Spectroscopy”, *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 3 (7): 939–944, (2012).
- [295] Brielle, Esther S., Arkin, Isaiah T., “Site-Specific Hydrogen Exchange in a Membrane Environment Analyzed by Infrared Spectroscopy”, *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 9 (14): 4059–4065, (2018).
- [296] Rawat, P. S., Srivastava, R. C., Dixit, G., Asokan, K., “Structural, functional and magnetic ordering modifications in graphene oxide and graphite by 100 MeV gold ion irradiation”, *Vacuum*, 109700, (2020).
- [297] Deepty, M., Ch Srinivas, E. Ranjith Kumar, N. Krisha Mohan, C. L. Prajapat, TV Chandrasekhar Rao, Sher Singh Meena, Amit Kumar Verma, D. L. Sastry, “XRD, EDX, FTIR and ESR spectroscopic

studies of co-precipitated Mn-substituted Zn-ferrite nanoparticles”, *Ceramics International* ,45, 6, 8037-8044, (2019).

[298] Dole, M.N., Patel, P.A., Sawant, S.D., Shedpure, P.S., “Advance Applications of Fourier Transform Infrared Spectroscopy”, *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 7, 159–166, (2011).

[299] Haas, J., Mizaiko, B., “Advances in Mid-Infrared Spectroscopy for Chemical Analysis”, *Annu. Rev. Anal. Chem*, 9, 45–68, (2016).

[300] Li, G., Jing, W., Wen, Z., “Identification of Unknown Mixtures of Materials from Biopharmaceutical Manufacturing Processes by Microscopic-FTIR and Library Searching”, *Am. Pharm. Rev.*, 14, 60, (2011).

[301] Stefanowics, Z., Stefanowics, J., Mulas, K., “Determination of Tropicamide And Its Major Impurity in Raw Material By the HPLC-DAD Analysis and Identification of This Impurity Using the Offline HPLC-FT-IR Coupling”, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 49, 214–220, (2009).

[302] Basiuk, V.A., “Quantum chemical calculations of infrared spectra for the identification of unknown compounds by GC/FTIR/MS in exobiological simulation experiments”, *Adv. Space Res.*, 27, 255–260, (2001).

[303] Kumar Pandey, A., Rapolu, R., Raju, Ch.K., Sasalamari, G., Kumar, G.S., Awasthi, A., Navalgund, S.G., Surendranath, K.V., “The novel acid degradation products of losartan: Isolation and characterization using Q-TOF, 2D-NMR and FTIR”, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 120, 65–71 ,(2016).

[304] Roychoudhury, P., Harvey, L.M., McNeil, B., “The potential of mid infrared spectroscopy (MIRS) for real time bioprocess monitoring”, *Anal. Chim. Acta.*, 571, 159–166, (2006).

[305] Scholz, T., Lopes, V.V., Calado, C.R.C., “High-throughput analysis of the plasmid bioproduction process in *Escherichia coli* by FTIR spectroscopy”, *Biotechnol. Bioeng.*, 109, 2279–2285, (2012).

[306] Villar, A., Gorritxategi, E., Aranzabe, E., Fernandez, S., Otaduy, D., Fernandez, L.A., “Low-cost visible–near infrared sensor for on-line monitoring of fat and fatty acids content during the manufacturing process of the milk”, *Food Chem.*, 135, 2756–2760, (2012).

[307] Bi, X., Yang, X., Bostrom, M.P.G., Pleshko Camacho, N., “Fourier transform infrared imaging spectroscopy investigations in the pathogenesis and repair of cartilage”, *Biochim. Biophys. Acta*, 1758, 934–941, (2006).

[308] Nabers, A., Ollesch, J., Schartner, J., Kotting, C., Genius, J., Haußmann, U., Klafki, H., Wiltfang, J., Gerwert, K., “An infrared sensor analysing label-free the secondary structure of the Abeta peptide in presence of complex fluids”, *J. Biophotonics*, 9, 224–234, (2016).

[309] Barrios, V.A.E., Mendez, J.R.R., Aguilar, N.V.P., Espinosa, G.A., Rodríguez, J.L.D., “FTIR—An Essential Characterization Technique for Polymeric Materials”, *Materials Science, Engineering and Technology*, Theophanides, T., Ed.; IntechOpen: London, UK, (2012).

[310] Al-Ali, A.A.S., Kassab-Bashi, T.Y., “Fourier Transform Infra Red (FTIR) Spectroscopy of New Copolymers of Acrylic Resin Denture Base Materials”, *IJERSTE*, 4, 172–180, (2015).

- [311] Sardon, H., Engler, A.C., Chan, J.M.W., Coady, D.J., O'Brien, J.M., Mecerreyes, D., Yang, Y.Y., Hedrick, J.L., "Homogeneous isocyanate- and catalyst-free synthesis of polyurethanes in aqueous media", *Green Chem.*, 15, 1121–1126, (2013).
- [312] Schartner, J., Hoeck, N., Guldenhaupt, J., Mavarani, L., Nabers, A., Gerwert, K., Kotting, C., "Chemical Functionalization of Germanium with Dextran Brushes for Immobilization of Proteins Revealed by Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Difference Spectroscopy", *Anal. Chem.*, 87, 7467–7475, (2015).
- [313] Navarra, G., Cannas, M., D'Amico, M., Giacomazza, D., Militello, V., Vaccaro, L., Leone, M., "Thermal oxidative process in extra-virgin olive oils studied by FTIR, rheology and time-resolved luminescence", *Food Chem.*, 126, 1226–1231, (2011).
- [314] Poiana, M.-A., Alexa, E., Melania-Florina Munteanu, M.-F., Gligor, R., Moigreadean, D., Mateescu, C., "Use of ATR-FTIR spectroscopy to detect the changes in extra virgin olive oil by adulteration with soybean oil and high temperature heat treatment", *Open Chem.*, 13, 689–698, (2015).
- [315] Malek, M.A., Nakazawa, T., Kang, H.-W., Tsuji, K., Ro, C.-U., "Multi-Modal Compositional Analysis of Layered Paint Chips of Automobiles by the Combined Application of ATR-FTIR Imaging, Raman Microspectrometry, and SEM/EDX", *Molecules*, 24, 1381–1397, (2019).
- [316] González-Gaitano, G., Isasi, J. R., "Analysis of the Rotational Structure of CO₂ by FTIR Spectroscopy", *The Chemical Educator*, 6(6), 362–364, (2001).
- [317] Woodbridge, E. L., Fletcher, T. R., Leone, S. R., "Photofragmentation of acetone at 193 nm: rotational- and vibrational-state distributions of the carbon monoxide fragment by time-resolved FTIR emission spectroscopy", *The Journal of Physical Chemistry*, 92(19), 5387–5393, (1988).
- [318] Ulenikov, O. N., Onopenko, G. A., Gromova, O. V., Bekhtereva, E. S., Horneman, V.-M., "Re-analysis of the (100), (001), and (020) rotational structure of SO₂ on the basis of high resolution FTIR spectra", *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 130, 220–232, (2013).
- [319] Daryl L. Logan., "A first course in the finite element method", Cengage Learning, (2011).
- [320] Born, M.; Wolf, E., "Principles of optics: electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light", Oxford, Pergamon Press, (1964).
- [321] Speakman J.R., Ward S., "Infrared Thermography: principles and applications", *Zoology* 101, 224 – 232, (1998).
- [322] Tait Elder, John Strong, "The infrared transmission of atmospheric windows", *Journal of the Franklin Institute* 255 (3), 189-208, (1953).
- [323] Ronald G. Driggers, "Encyclopedia of optical engineering", Volume 3. CRC Press. p. 2303, (2003).
- [324] Demchenko, Alexander P., "Photobleaching of organic fluorophores: quantitative characterization, mechanisms, protection", *Methods and Applications in Fluorescence* 8(2), 022001, (2020).
- [325] Ghauharali, R. I., Brakenhoff, G. J., "Fluorescence photobleaching-based image standardization for fluorescence microscopy", *Journal of Microscopy*, 198, 88-100, (2001).

- [326] Shawkey Matthew D, Morehouse Nathan I, Vukusic Peter, “A protean palette: colour materials and mixing in birds and butterflies”, *J. R. Soc. Interface*, 6, S221–S231, (2009).
- [327] Barzic, A.I., Albu, R.M., “Optical properties and biointerface interactions of chitin”, *Polym. Bull.*, 78, 6535–6548, (2021).
- [328] Liang, Zhang, “Narcissus effect in staring infrared optical system”, *Infrared and Laser Engineering* (2006): S2.
- [329] Anthony S. Lau, “The Narcissus Effect In Infrared Optical Scanning Systems”, *Proc. SPIE* 0107, Stray Light Problems in Optical Systems, (1977).
- [330] D. C. Culver, T. Pipan, “The Biology of Caves and Other Subterranean Habitats”, Oxford University Press, Oxford, (2009).
- [331] K. Christiansen, “Morphological adaptations”, in *Encyclopedia of Caves*, W. B. White and D. C. Culver, Eds., 2nd ed., pp. 517–528, Elsevier, Amsterdam, (2012).
- [332] A. I. Camacho, “The Natural History of Biospeleology”, *Monografias del Museo nacional de ciencias naturales, Consejo superior de investigaciones científicas*, Madrid, (1992).
- [333] P. J. Gullan, P. S. Cranston, “The Insects: An Outline of Entomology”, John Wiley & Sons, New York, (2009).
- [334] M. Moseley, “Observations on the cave-associated beetles (Coleoptera) of Nova Scotia, Canada”, *Int. J. Speleol.*, 38, 163–172, (2009).
- [335] Cody, D. D., *AAPM/RSNA Physics Tutorial for Residents: Topics in CT. RadioGraphics*, 22(5), 1255–1268 (2002).
- [336] B. Nie et al., “Multimodal microscopy with sub-30 fs Yb fiber laser oscillator”, *Biomed. Opt. Express*, 3, 1750–1756, (2012).
- [337] E. J. Gualda et al., “In vivo imaging of anatomical features of the nematode *Caenorhabditis elegans* using non-linear (TPEF-SHG-THG) microscopy”, *Proc. SPIE*, 6630, 663003, (2007).
- [338] R. Carriles et al., “Imaging techniques for harmonic and multiphoton absorption fluorescence microscopy,” *Rev. Sci. Instrum.*, 80, 081101, (2009).
- [339] C. K. Chou et al., “Polarization ellipticity compensation in polarization second-harmonic generation microscopy without specimen rotation”, *J. Biomed. Opt.*, 13, 014005, (2008).
- [340] J.-A. Conchello, J. W. Lichtman, “Optical sectioning microscopy”, *Nat. Methods*, 2, 920–931, (2005).

Прилог А

Нелинеарна ласерска микроскопија хитинских структура инсеката

Нелинеарне оптичке особине хитина, које су истражене у првом делу овог истраживања, искоришћене су и за демонстрацију примена нелинеарне ласерске микроскопије хитина у ентомологији.

Анализирани су делови тела два пећинска инсекта: *Plusiocampa christiani* (Condé & Bareth, 1996, који припада подкласи *Apterygota* - инсекти без крила) и *Pheggomisetes ninae* (S. Ćurčić, Schönmann, Brajković, B. Ćurčić & Tomić, 2004, који припада подкласи *Pterygota* - инсекти са крилима). Ови инсекти су изабрани зато што не садрже пигменте, па је њихов доминантан градивни састојак хитин. Ова особина, настала услед адаптације на подземни стил живота [330], чини их веома погодним за ово истраживање – приликом озрачивања узорака ласерском радијацијом очекује се двофотонски побуђена флуоресценција и други хармоник од хитина, а не од комбинације одзива хитина и пигмената присутних код других (копнених) инсекта. Детектована је само природна ауто-флуоресценција инсеката. Кутикула, спољашњи тврд омотач, им је веома танак, са хомогено распоређеним хитином [331] што омогућава осликавање дубинских структура инсеката и ласерску хирургију.

Plusiocampa christiani, слика 3.5а, је изабран због карактеристичне беле боје која је последица потпуног одсуства пигмента [332]. Изузев одређене количине протеина, кутикула овог инсекта је окарактерисана као високо-хитинизована структура [333]. Ово је потврђено упоређивањем дво-фотонски побуђеног флуоресцентног спектра кутикуле и хемијски прочишћеног хитина (слика 3.6). На слици 3.6 се уочава велики степен сличности између кривих у опсегу 830-860 nm. На већим таласним дужинама флуоресценција инсекта је већа, услед присуства флуоресцентних пигмената у кутикули (највероватније протеини) који интензивније флуоресцирају у поменутом спектралном опсегу.

Pheggomisetes ninae, слика 3.5б, је слабо пигментисан инсект и његова флуоресценција највећим делом потиче од хитина, уз слабо изражено присуство флуоресценције која потиче од других компонената кутикуле [334].



(a)



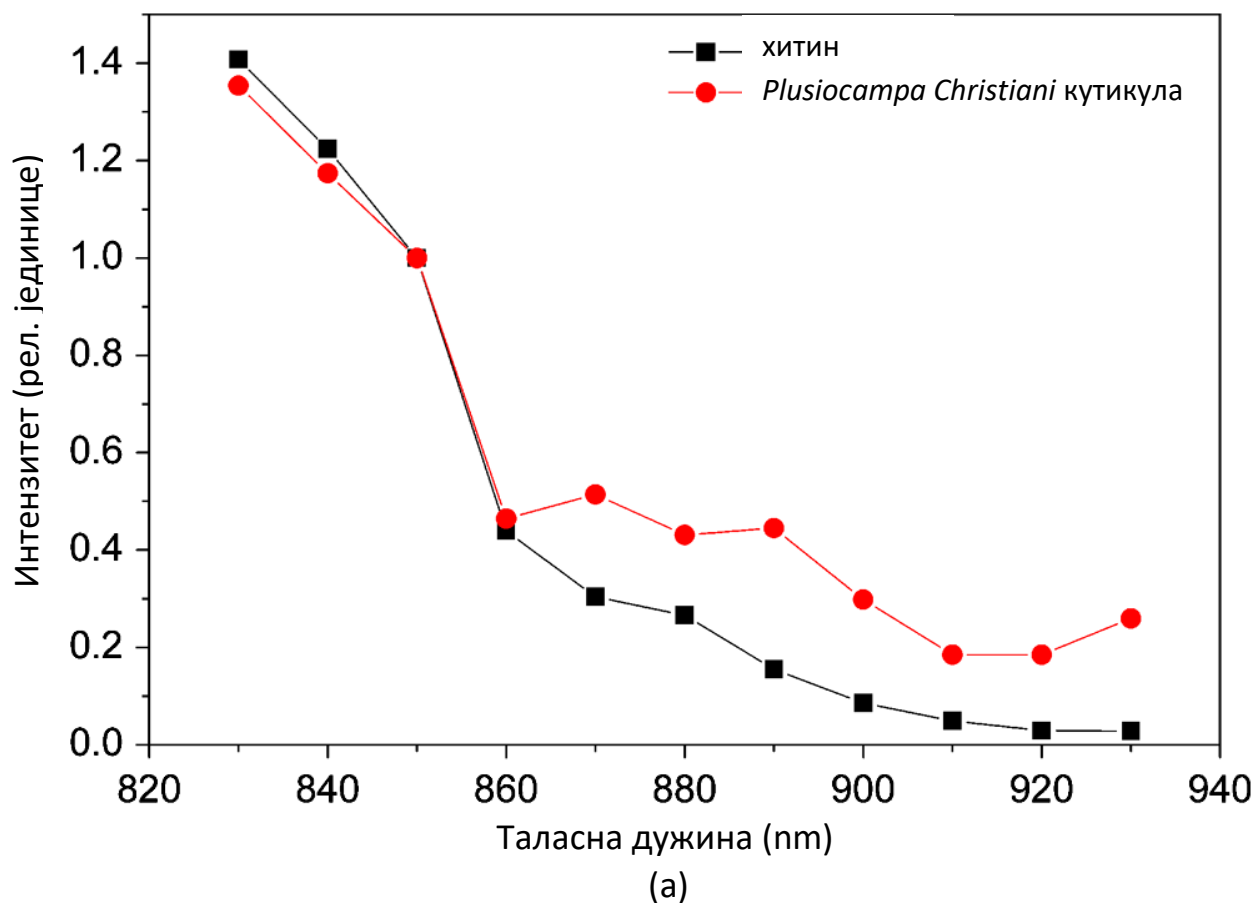
(b)

Слика 3.5. а) *Plusiocampa christiani* ; б) *Pheggomisetes ninae*. Фотографисао Драган Антић, Биолошки факултет у Београду.

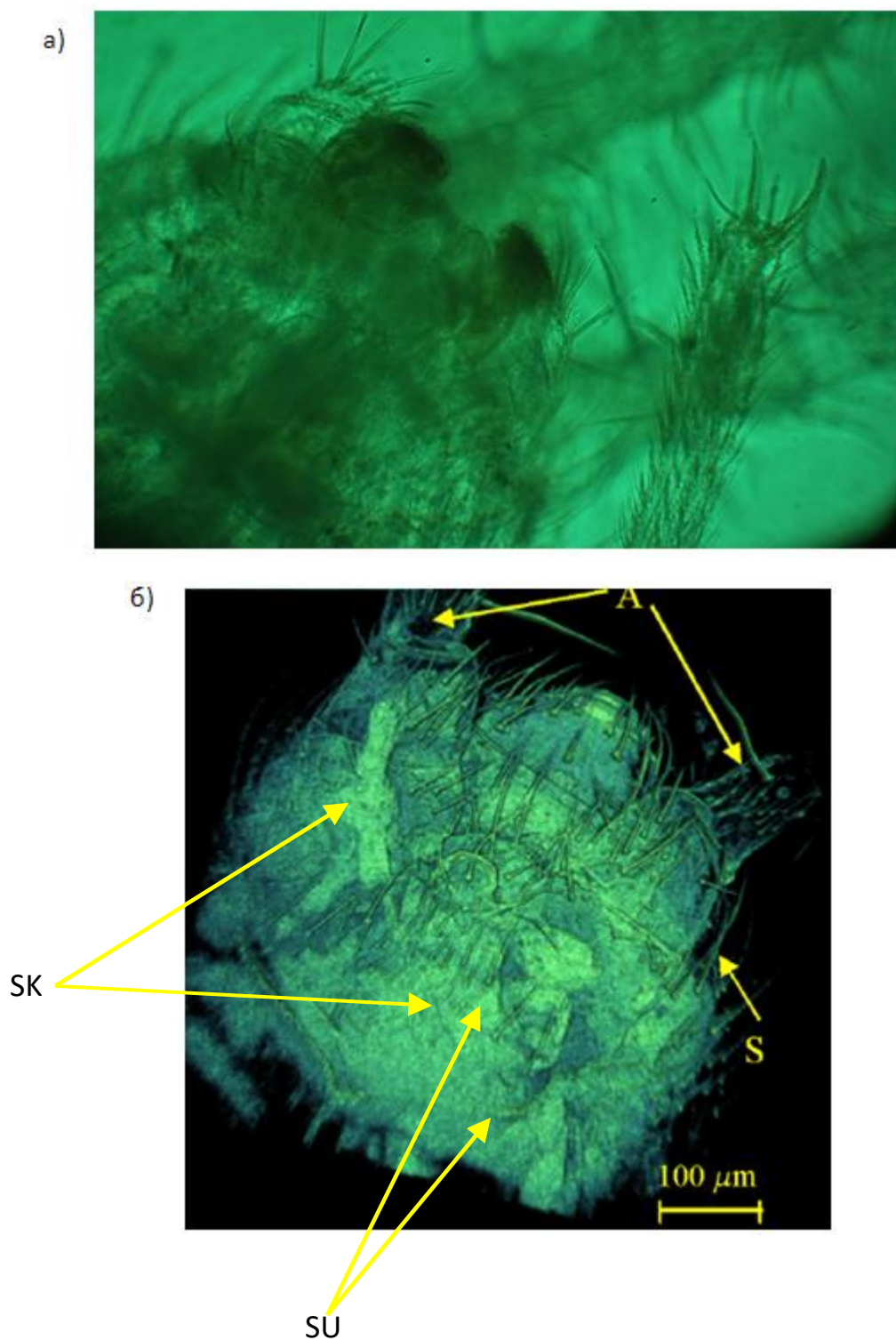
Значај флуоресцентне нелинеарне ласерске микроскопије у изучавању морфологије инсеката демонстриран је на сликама 3.7, 3.8, 3.9 и 3.10. На свим сликама се уочава знатно квалитетније и детаљније осликавање узорака коришћењем двофотонски побуђене флуоресценције хитина на нелинеарном ласерском микроскопу, у поређењу са оптичком микроскопијом. Све слике су добијене на релативно малим снагама ласерске радијације (10 – 12 mW). Интензитет сигнала је варирао у зависности од дела тела инсекта. Ширина видног поља (654 μm) омогућава да глава *Plusiocampa christiani* инсекта буде у целости осликана (слика 3.7б). Дубина продирања ласерске радијације ($\sim 200 \mu\text{m}$) омогућава осликавање делова усне регије, који су смештени вентрално. Латерална резолуција нелинеарног ласерског микроскопа (630 nm X 915 nm, за објектив 40X, 0.65 NA) је довољна да на слици буду јасно уочљиви поједини детаљи дорзалног дела главе: антене, склерити (скелетне плоче којима је обавијен сваки телесни регион инсеката), сuture (бразде које се налазе између склерита), као и сете (ситне длачице којима је прекривено тело инсекта, многе сете имају функцију сензора). Ово је демонстрирано и на примерима задњег дела абдомена инсекта *Plusiocampa christiani* (слика 3.9) и апикалног дела главе *Pheggomisetes ninae* инсекта, у вентралној перспективи, приказаног на слици 3.10, на којој су веома видљиви делови усне регије (делови доње вилице (лат. *mandibula*), чељусти (лат. *maxillae*), усна (лат. *labium*)), укључујући детаљну површинску структуру и сете.

Мушке гениталије инсекта *Pheggomisetes ninae* инсекта су приказане на слици 3.8. Карактеристике мушког копулаторног органа су веома значајне у одређивању врсте организма па је зато мушки копулаторни орган (лат. *aedeagus*) веома често приказан и осликан у таксономским студијама. На слици 3.11, из бочног кадра едеагуса *Pheggomisetes ninae* инсекта се виде фини детаљи површинског рељефа, комплексна структура налик на зубе је видљива, а препознатљиви су и унутрашња врећица и веома окоштани делови едеагуса (ово је приказано на лонгитудиналним и попречним пресецима приказаним на сликама 3.11 а-г). Сви делови мушког репродуктивног органа су веома видљиви (средњи режањ, обе параметре са сетама, базална булба, копулаторни део, и унутрашња врећица). За све 4 фотографије (бр. 3.7, 3.8, 3.9 и 3.10) коришћена је побудна таласна дужина од 930 nm. Ова таласна дужина је изабрана да би се избегла флуоресценција резидуалног ткива заосталог после дисекције инсекта. Хитин релативно

слабо апсорбује радијацију на 930 nm, што је омогућило продирање ласерског зрачења дубље у тело инсекта и осликавање делова тела који се налазе испод кутикуле. Дубина продирања побудне ласерске радијације је процењена на 200 μm . Све поменуте структуре су осликане са знатно више детаља у односу на светлосну или конфокалну микроскопију.



Слика 3.6. Спектар двофотонски побуђене флуоресценције хемијски чистог хитина и *Plusiocampa Christiani* кутикуле

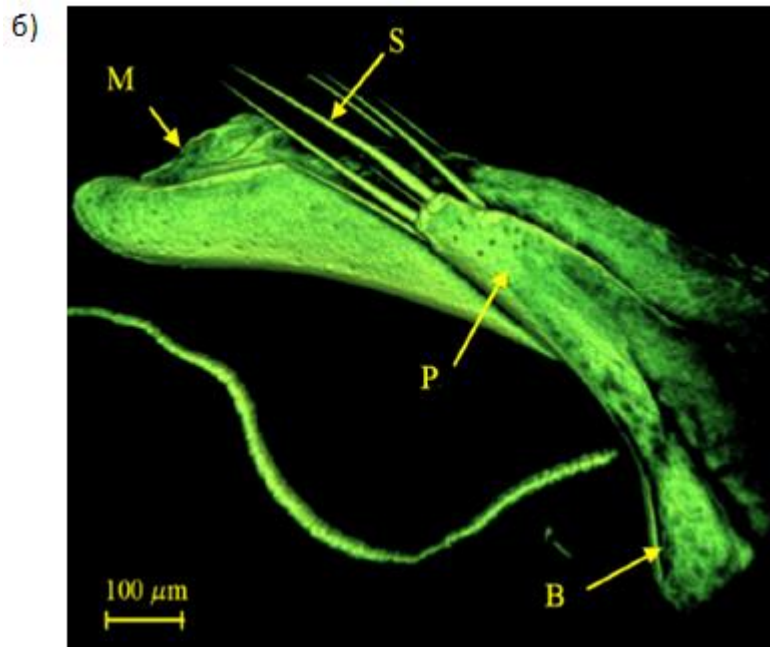


Слика 3.7. Нелинеарна ласерска микроскопија омогућава квалитетније осликавање хитинског узорка у поређењу са оптичком микроскопијом; а) фотографија са оптичког микроскопа, у светлом пољу, б) слика добијена двофотонски побуђеном флуоресценцијом хитина, на нелинеарном ласерском микроскопу. Слика је добијена коришћењем алгоритма пројекције максималног интензитета (опис алгоритма је дат у Материјалима и Методама) из скупа од 80 2Д фотографија, вертикално растојање између узаостопних 2Д слика је 2 μm. Ове 2Д слике су

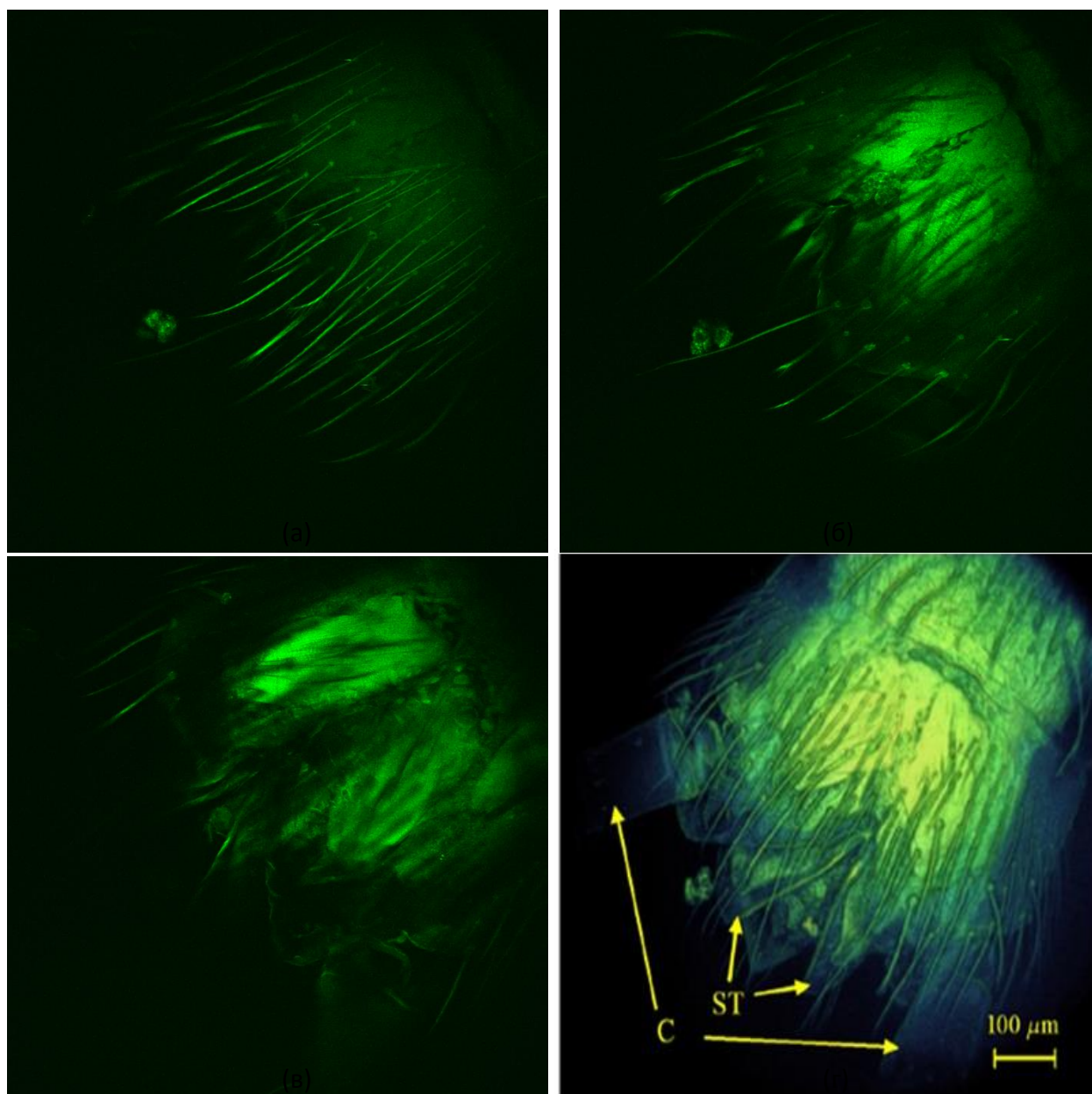
хоризонтални пресеци објекта и скуп ових слика се може приказати као транспарентан осликани објекат где се за разлику од реалног нетранспарентног објекта, може видети и његова унутрашња структура, што представља 3Д модел објекта. Ширина видног поља је 654 μm . Обе слике су направљене 40X / 0.65 микроскопским објективом. А – антене, SK – склерити, SU – сuture, S – сете. На сликама је приказана дорзална страна главе *Plusiocampa christiani* инсекта.

a)

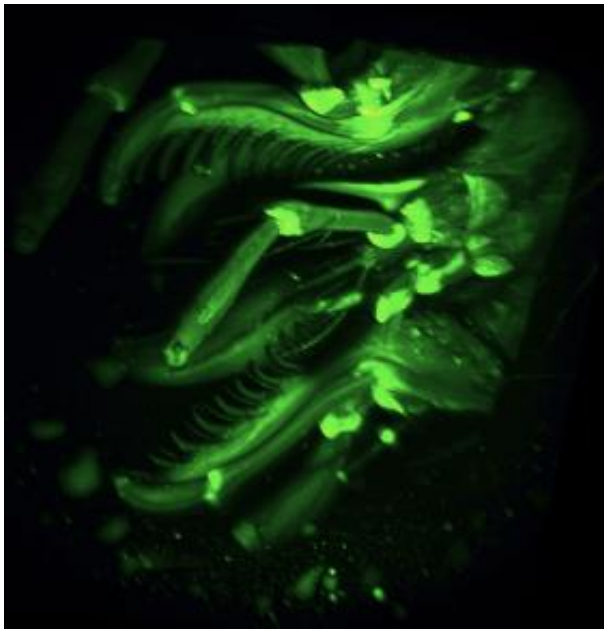




Слика 3.8. На овој слици су, као и на претходној (слика 3.7) представљене могућности нелинеарне ласерске микроскопије за квалитетније осликавање хитинског узорка. Нелинеарна микроскопија омогућава да се објект ослика са много више детаља у поређењу са стандардном оптичком микроскопијом; а) фотографија са оптичког микроскопа, б) слика добијена двофотонски побуђеном флуоресценцијом хитина, на нелинеарном ласерском микроскопу. Слика је формирана на основу 120 2Д-слика уз помоћ VolView 3.4 софтвера, (вертикално) растојање између узастопних 2Д слика је 2 μm. За обе слике је коришћен 40X / 0.65 микроскопски објектив. *Rhygomisetes pinus* инсект, мушке гениталије у бочној перспективи; М – средњи режањ, Р – парамере, S – сете, В – базална булба.



Слика 3.9. Употреба алгоритма пројекције максималног интензитета у побољшању квалитета слике. Слика г) добијена је применом поменутог алгоритма на 80 хоризонталних пресека (на сликама а), б) и в) су приказана 3 пресека), вертикално растојање између узастопних пресека је 2 μm . Слике су направљене 40X / 0.65 микроскопским објективом. На појединачним хоризонталним пресецима уочава се мање детаља у односу на коначну слику (г). Слике су добијене двофотонски побуђеном флуоресценцијом хитина, на нелинеарном ласерском микроскопу. На сликама је приказана дорзална страна задњег дела абдомена *Plusiocampa christiani* инсекта.



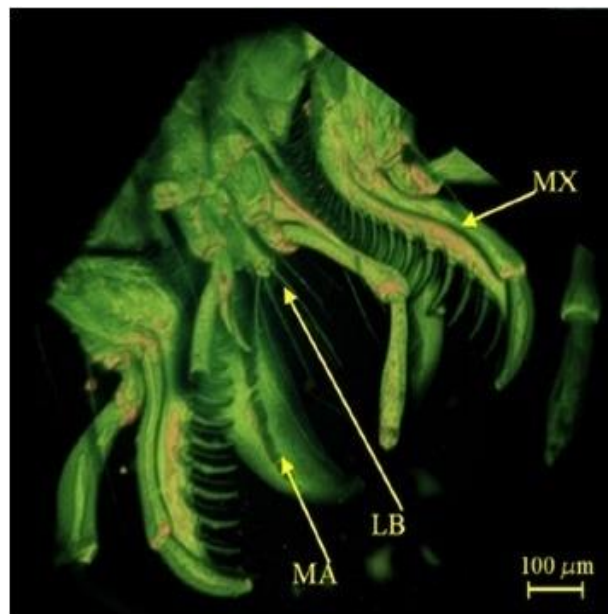
(a)



(б)



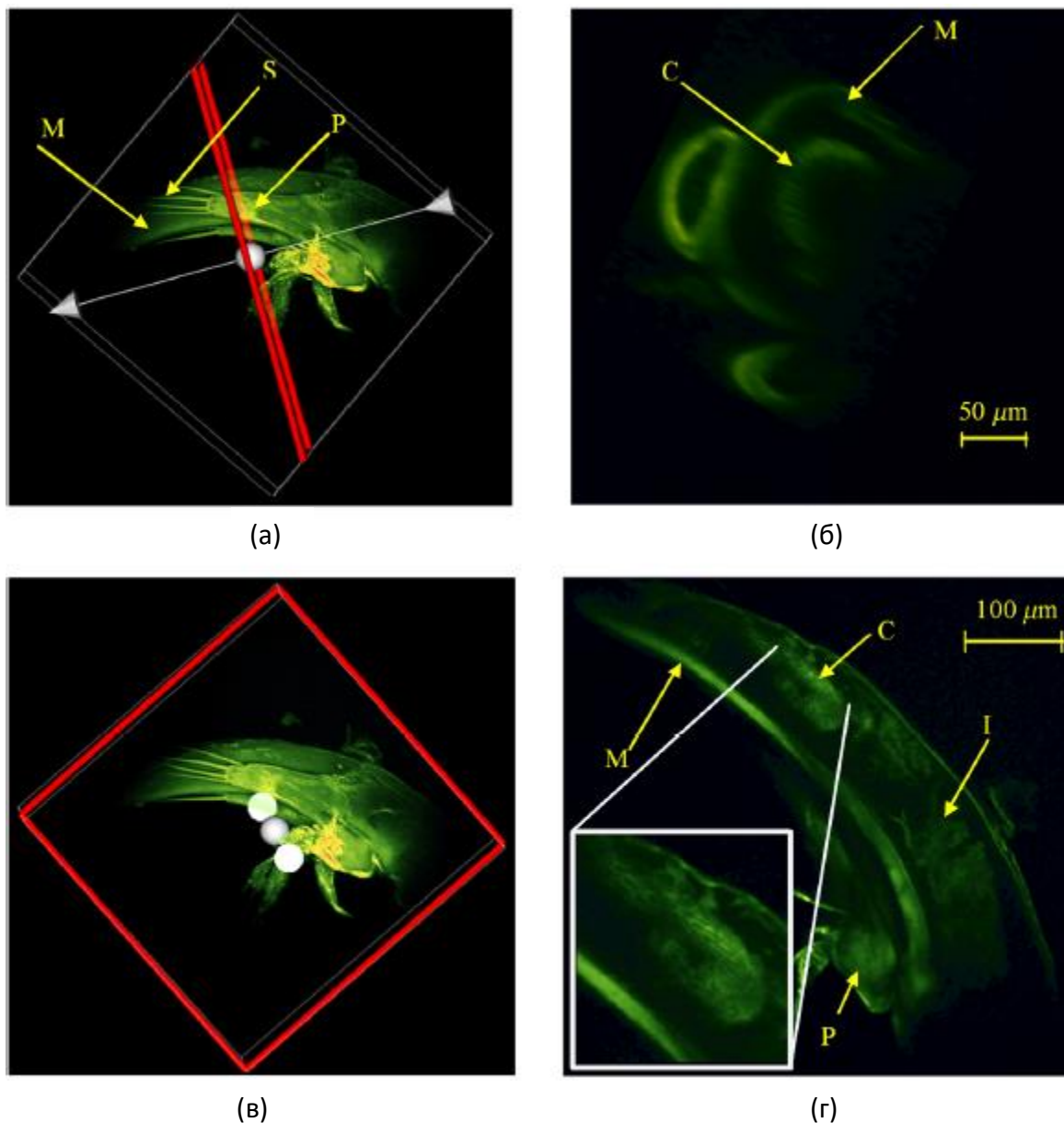
(в)



(г)

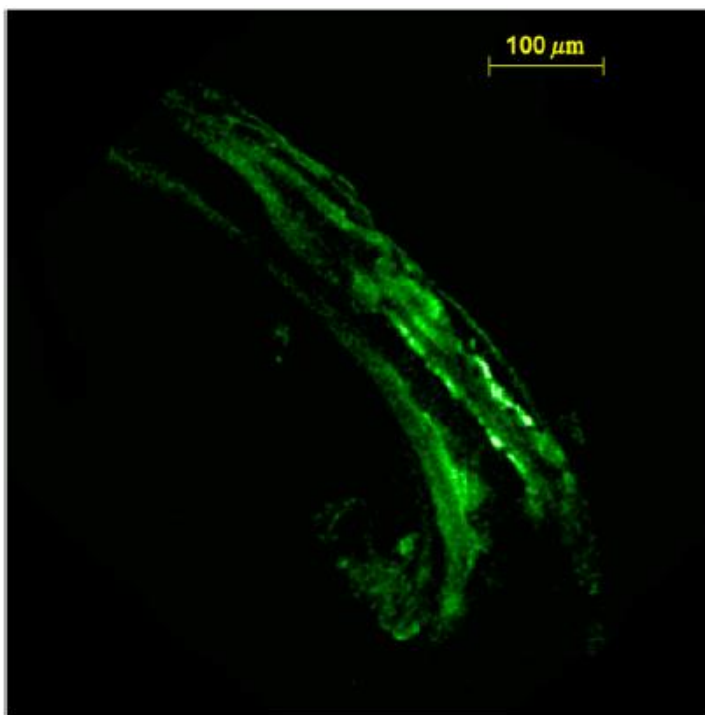
Слика 3.10. Приказ 3Д модела узорка, добијеног нелинеарном ласерском микроскопијом, под различитим угловима. Модел је формиран на основу 230 2Д-слика (добијених двофотонски побуђеном флуоресценцијом хитина) уз помоћ VolView 3.4 софтвера, (вертикално) растојање између узастопних 2Д слика је 2 μm . Коришћен је 25X / 0.5 микроскопски објектив. Приказан је 3Д модел *Rheggomisetes pinae* инсекта, део његове главе са деловима усне регије, у вентралној перспективи. На слици г) су обележени карактеристични делови: МА – мандибула (доња вилица, лат. *mandibula*), МХ – чељусты (лат. *maxillae*), LB – усна (лат. *labium*).

Одабиром адекватне побудне таласне дужине (840 – 930 nm или 1040 nm), могу се осликавати различити делови кутикуле, са различитим дубинама продирања ласерске радијације. На слици 3.12 је приказана унутрашња врећица репродуктивног органа *Pheggomisetes ninae* инсекта, осликана при побудној таласној дужини од 1040 nm и широкопојасној детекцији. Поређењем слика 3.11 г) и 3.12, уочавамо да су различите структуре осликане са различитим квалитетом на две различите побудне таласне дужине.



Слика 3.11. Могућност приказа 3Д модела узорка, добијеног нелинеарном ласерском микроскопијом, по различитим пресецима, на примеру пећинског инсекта *Pheggomisetes ninae*. Сlike су направљене 25X, NA 0.8, вода / глицерин имерзионим микроскопским објективом; а) мушке гениталије са приказаном равни попречног пресека (црвена линија), М – средњи режањ, Р – парамере, S – сете; б) одговарајући попречни пресек на коме се уочава средњи режањ М и копулаторни део С; в) мушке гениталије са означеном лонгитудиналном равни (црвени квадрат); г) одговарајући лонгитудинални пресек мушких гениталија, М- средњи режањ, Р –

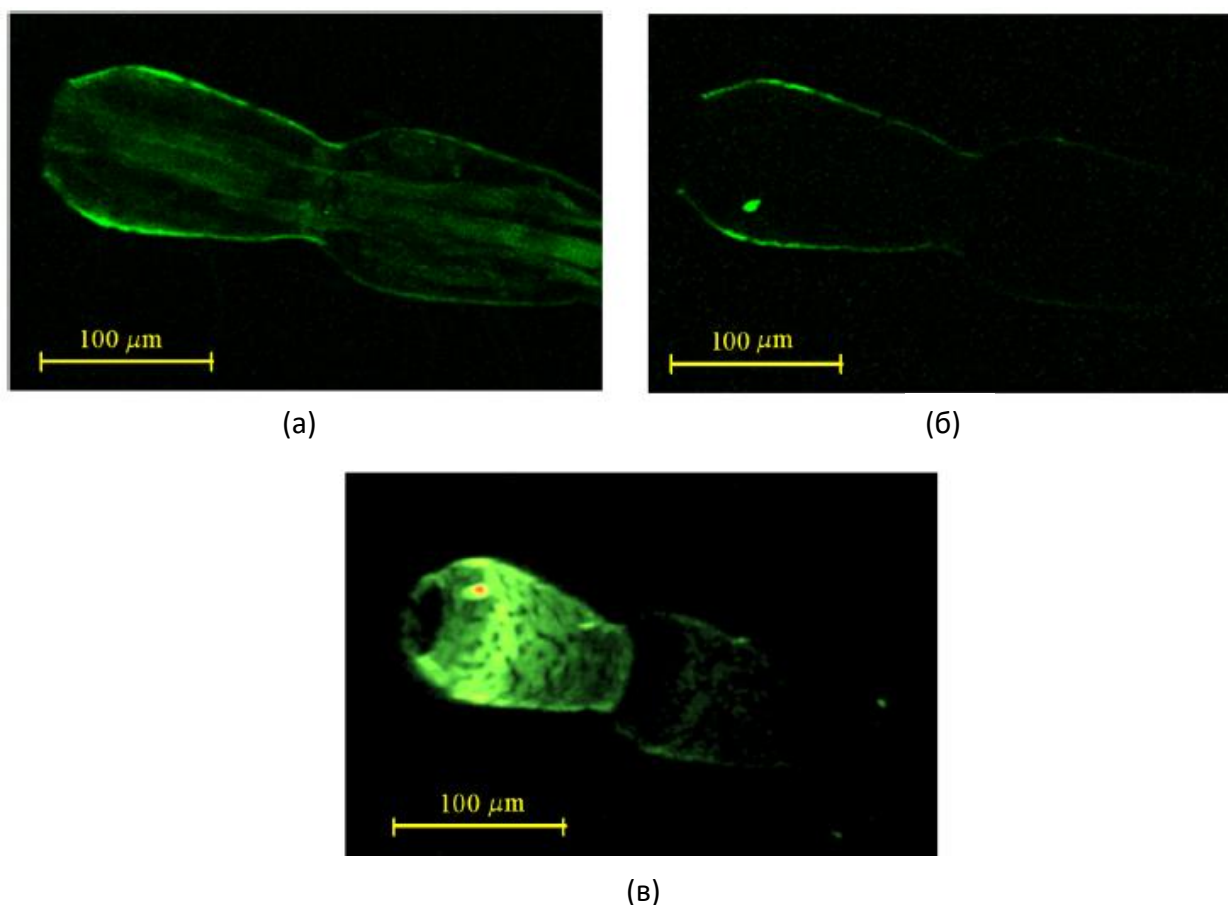
парамере, I – унутрашња врећица, C – копулаторни део. Уметак (бели квадрат): увећани копулаторни део са видљивом фином структуром, налик на површину зуба.



Слика 3.12. Промена таласне дужине омогућава да се виде различите структуре. Слика је добијена при побудној таласној дужини од 1040 nm и широко-појасној детекцији. У поређењу са сликом 3.11 г, која је снимљена на таласној дужини од 930 nm уочавају се различите структуре. На слици је приказана унутрашња врећица *Pheggomisetes ninae* едеагуса.

Постојање другог хармоника код природних хитинских структура као и његова употреба за осликавање су само успутно споменуте у референцама [336] и [337], без јаке експерименталне потврде. У овом истраживању, други хармоник је коришћен за осликавање хитина у кутикули инсекта. На пример, део антене инсекта *P. christiani* је осликан коришћењем другог хармоника и двофотонски побуђене флуоресценције (слика 3.13). Побудна таласна дужина је у оба случаја 840 nm. За детекцију двофотонски побуђене флуоресценције коришћен је широко-појасни филтер (400-700 nm, слика 3.13а), а за детекцију другог хармоника уско-појасни (420 nm, слика 3.13б) филтер. Са слике се може приметити да широко-појасна детекција омогућава осликавање финих детаља антене док уско-појасна детекција даје квалитетније осликавање ивица саме структуре. На основу слика добијених детекцијом другог хармоника формиран је 3Д модел антене инсекта (слика 3.13в). Сигнал другог хармоника је много слабији од флуоресценције на слици 3.13а, јер су и други хармоник и флуоресценција детектовани у рефлексији. Због тога није било потребе за коришћењем додатног филтера за елиминисање другог хармоника када је детектована флуоресценција.

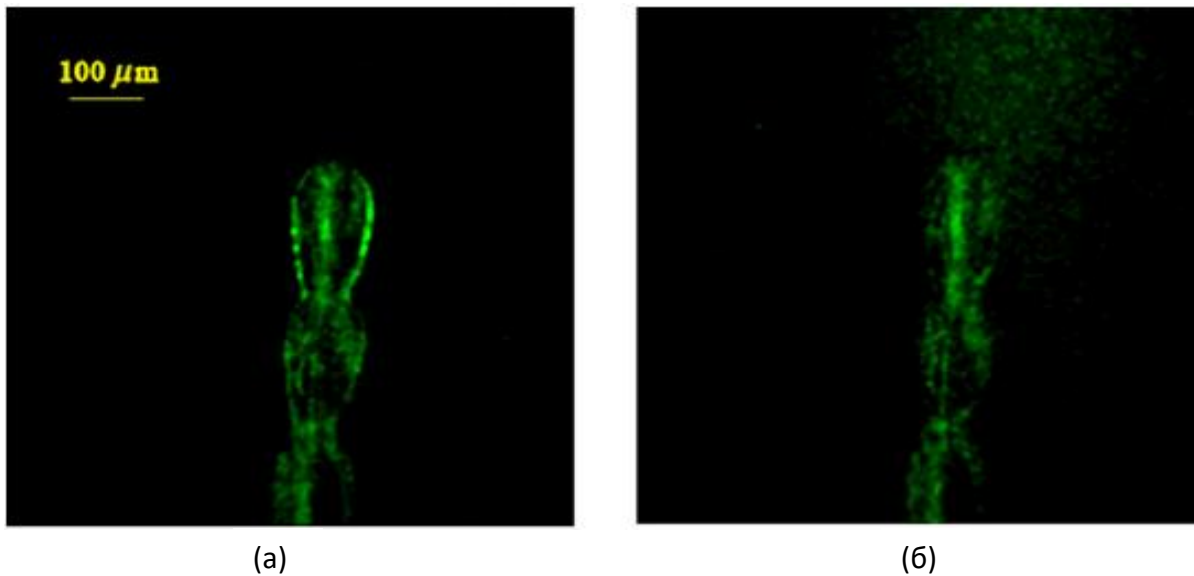
Због проучавања поларизационих ефеката, потврђено је да детекциони систем микроскопа није осетљив на поларизацију сигнала. Поларизациона елиптичност стечена у побудној грани микроскопа је занемарљива.



Слика 3.13. Разлике у осликовању хитинског узорка методама двофотонски побуђене флуоресценције и генерисања другог хармоника; а) побудна таласна дужина 840 nm и широко-појасна детекција у опсегу 400-700 nm; б) побудна таласна дужина 840 nm и уско-појасна детекција на 420 nm; в) запремиски приказ (“volume rendering”, објашњен у Материјалима и Методама) скупа слика добијених при побуди на 840 nm и детекцији на 420 nm. На сликама је приказан врх антене *Plusiocampa christiani* инсекта.

Познато је да зависност детектованог сигнала од поларизације побудне ласерске светлости може да указује на присуство другог хармоника у детектованом сигналу [339]. Међутим, у овом истраживању је откривено да су поларизациони ефекти уочљиви у оба случаја - када се као сигнал детектује други хармоник (840 nm побудна таласна дужина и детекција на 420 nm уско-појасним филтером) али и када је сигнал дво – фотонски побуђена флуоресценција (840 nm побудна таласна дужина и широко-појасна детекција у опсегу 400-700 nm). Због додатног истраживања овог феномена, у потпуности је елиминисан други хармоник коришћењем побуде на 850 nm и уско-појасне детекције на 450 ± 5 nm. Чак и тада, јасно је уочљива зависност флуоресценције узорка од поларизације побудног ласерског зрачења (слика 3.14 на којој се види део антене *P. christiani* инсекта усликан са две ортогонално поларизоване побуде). Уочено је да се интензитет сигнала као и однос сигнал-шум могу значајно изменити ротацијом равни поларизације побудне ласерске радијације. Ова појава није честа, нити је у потпуности објашњена. Молекули хитина нису симетрични и имају одређену оријентацију (ови молекули имају облик влакна и груписани су у снопове), што може бити узрок различитих

интензитета сигнала и односа сигнал-шум. У складу са референцама [338] и [340], ово може се искористити за разликовање карактеристика узорка или процеса.



Слика 3.14. Зависност двофотонски побуђене флуоресценције узорка од поларизације побудног ласерског зрачења; а) хоризонтална поларизација; б) вертикална поларизација побудне ласерске радијације. На сликама је приказан врх антене *Plusiocampa christiani* инсекта.

У овом истраживању, за осликавање хитинских структура био је довољан мали део доступне снаге побудног ласера. Ако се повећа снага ласерске радијације (изнад 20 – 30 mW на површини узорка) долази до ласерског оштећења (термални ефекти отпаравања, топљење, промена хемијске структуре - карбонизација) појединих делова кутикуле и откривања унутрашњих делова тела инсекта. Овај вид ласерске хирургије ткива треба радити веома пажљиво, у смислу постепеног повећања интензитета снаге ласерске радијације, да би се локализовало ласерски индуковано оштећење. Ово ће бити предмет будућих истраживања.

У току истраживања, уочено је неколико експерименталних проблема којима је потребно веома пажљиво приступити када се снимају хитинске структуре инсеката. Узорци треба да буду фиксирани за микроскопско постоље материјалом који не флуоресцира. Откривено је да је глицерин погоднији од Канада балзама, који показује висок ниво ауто - флуоресценције. Инсекти попут *P. christiani* су пре снимања потопљени у уље, да би се ткиво конзервирало. Није детектована значајна ауто-флуоресценција уља нити промена флуоресцентних особина узорка после третмана (потапања у уље).

У овом истраживању су коришћени само мртви инсекти, али може се без проблема радити и са живим узорцима. То је експериментално потврђено. Уколико се адекватно контролише снага побудне ласерске радијације откривено је да она није опасна, чак и за веома осетљива ткива као што су инсектове очи - посматране су и осликане *in vivo* оматидије (основне јединице композитног ока инсеката) неколико инсеката без штетних ефеката ласерског зрачења. Ово је такође предмет будућих истраживања.

Током експеримената, истраживане су и друге врсте инсеката: *Apatura ilia*(Denis & Schiffermüller, 1775), *A. iris*(Linnaeus, 1758), *Pieris rapae*(Linnaeus, 1758)... Потврђено је да сви испитивани инсекти флуоресцирају приликом озрачивања ласерском радијацијом. Интензитет

сигнала је варирао, у зависности од дела тела инсекта и од врсте инсекта. Резултати потврђују погодност и ефикасност нелинеарне ласерске микроскопије хитина за примене у ентомологији, узимајући у обзир дубину продирања ласерске радијације, контролисано фото-избељивање узорка и одсуство потребе за бојењем узорка флуоресцентним бојама (нпр. *calcofluor white*, родамин Б, родамин 6Г, флуоресцеин...).

Биографија

Владимир Лазовић је рођен 12.05.1986.-е године у Београду. После завршене средње школе, Девете београдске гимназије, уписује Физички факултет у Београду, 2005.-е године, смер Примењена физика и информатика. Дипломирао је 2012.-е године са просечном оценом 8,77. Исте године уписује докторске студије на Физичком факултету Универзитета у Београду, смер Квантна оптика и ласери, и постаје истраживач приправник у Центру за фотонику Института за физику у Београду, где ради и данас. Био је ангажован на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја под називом: „Генерисање и карактеризација нанофотонских функционалних структура у биомедицини и информатици“. 2015.-е године изабран је у звање истраживач сарадник. Бави се оптичком, електронском и нелинеарном микроскопијом. Истражује интеракцију светлости и материје, са акцентом на природне микронске и нанометарске фотонске структуре, и практичне примене ових структура. До сада је објавио 16 радова у међународним часописима (M21, M22 и M23), 1 патент признат на међународном нивоу, и две патентне пријаве.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Владимир Лазовић

Број индекса 8015 / 2019

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Оптичке и флуоресцентне особине хитина и хитинских микроструктура биолошког порекла

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 25. 4. 2022.

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Владимир Лазовић

Број индекса 8015 / 2019

Студијски програм Фотоника и ласери

Наслов рада Оптичке и флуоресцентне особине хитина и хитинских микроструктура биолошког порекла

Ментор Дејан Пантелић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 25. 4. 2022.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Оптичке и флуоресцентне особине хитина и хитинских микроструктура биолошког порекла

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 25. 4. 2022.

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада. Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прерада. Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство – делити под истим условима. Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.