

**Microscopia de Desfocalização e seus limites de
validade: um estudo experimental**

Ulisses Moreira Silveira Andrade

Microscopia de Desfocalização e seus limites de validade: um estudo experimental

Ulisses Moreira Silveira Andrade

Orientador: Prof. Ubirajara Agero Batista

Co-orientador: Prof. Oscar Nassif de Mesquita

Tese apresentada à Universidade Federal De Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências - Física**.

Março de 2010

Sumário

Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Abstract	v
1 Introdução	1
2 Microscopia de Desfocalização	3
2.1 Espectro Angular do Campo Elétrico da Luz	4
2.1.1 A Equação de Helmholtz	4
2.1.2 Propagação Livre do Espectro Angular	5
2.1.3 Propagação do Espectro Angular através de uma Lente Delgada	9
2.1.4 Propagação do Espectro Angular através do Microscópio Desfocalizado	14
2.2 Campo Elétrico para Microscópio Desfocalizado	19
2.2.1 Propagação do Espectro Angular através de um Objeto de Fase	22
2.2.2 Contraste de um Objeto de Fase Desfocalizado	26
2.2.3 Contraste e as Funções de Bessel	28
3 Materiais e Metodologia	31
3.1 Montagem Experimental	31
3.2 Amostras	33
3.3 Experimento	33
3.4 Calibração da Câmera	35

4	Resultados e Discussões	37
4.1	Caracterização das Redes de Difração	37
4.2	Comprimento de Desfocalização	41
4.3	Amplitude do contraste	48
5	Conclusões e Perspectivas	57
	Referências Bibliográficas	62

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais pelos ensinamentos, apoio e carinho. Às minhas irmãs, pelo carinho e amizade. À minha namorada, Vanessa, pelo companheirismo, carinho e acima de tudo pela paciência, Te adoro muito!!! Aos amigos pelos momentos de descontração, conversas e apoio. Aos amigos de graduação que estão presentes aqui na UFMG. Aos meus colegas de curso, por compartilhar horas de estudos. Aos meus amigos de laboratório pela convivência e ensinamentos. Agradeço ao meu orientador, Bira, e co-orientador, Oscar, pelos ensinamentos, discussões, pela oportunidade, confiança no meu trabalho e pela liberdade que me foi concedida dentro do laboratório. À professora Lucila Cescato pela fabricação das amostras utilizadas no experimentos. À Camilla pela disposição, empenho na calibração do AFM, sem essas medidas esse trabalho não seria possível. Aos professores, gostaria de agradecer pelo aprendizado nas disciplinas. Agradeço ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pela bolsa concedida e às outras agências de financiamento: FAPEMIG, Instituto Nacional de Fluidos Complexos e Instituto Milênio de Óptica Não-Linear, Fotônica e Biofotônica.

Resumo

Objetos de fase tornam-se visíveis quando desfocalizados num microscópio óptico operando em campo claro. Esse fenômeno tem grande aplicação no estudo de células e outras amostras biológicas, que se comportam como objetos de fase em um microscópio. A técnica de Microscopia de Desfocalização é conveniente para estes estudos e foi desenvolvida no Laboratório de Física de Sistemas Biológicos da UFMG. A desfocalização do objeto introduz uma diferença de fase entre a luz difratada e a não difratada que, ao se interferirem no plano imagem, produzem um contraste não nulo. Neste trabalho, aprofundamos o estudo da Microscopia de Desfocalização para grandes desfocalizações e verificamos o limite de validade da aproximação paraxial, considerada no desenvolvimento do modelo teórico. Utilizamos funções de Bessel para escrever o contraste para um objeto de fase desfocalizado. Os objetos de fase utilizados são redes de difração que possuem perfil senoidal, com período e amplitudes conhecidos. Como previsto pela teoria, para um objeto com vetor de onda conhecido, sua imagem oscila com frequência bem definida quando mudamos a posição do foco. Esse efeito é observado para desfocalizações da ordem de até $300\mu m$. Experimentalmente também determinamos a amplitude das redes de difração e obtemos bons resultados quando comparados com as medidas de Microscopia de Força Atômica das mesmas.

Abstract

Phase objects can be made visible by slight defocus in a bright-field light microscope. This property is very useful to quantify cells and other biological samples that behave as phase objects in a microscope. The Defocusing Microscopy is useful to study this systems and was developed in the Physics of Biological Systems Laboratory at UFMG. The defocus creates a phase difference between the diffracted and non-diffracted light that interfere generating a contrast in the image plane. In this work we show the validity of Defocusing Microscopy for larger defocus distances, and verify the limits defined by the paraxial approximation used in the theoretical model. We use Bessel functions to write the contrast of a defocus phase objects. Diffraction gratings with sinusoid profile and well defined, period and height, was used as phase objects. We show, as predicted by the model, for a grating with well defined wavenumber, its exact image reappears periodically, when we change the focus position. This effect was noted for defocus distances in order of $300\mu m$. Experimentally we find diffraction granting's amplitude and these results are very similar with results of Atomic Force Microscopy.

Capítulo 1

Introdução

Nos últimos anos o laboratório de Física Biológica do Departamento de Física da Universidade Federal de Minas Gerais vem desenvolvendo e aprimorando diversas técnicas para o estudo de amostras biológicas. A de maior destaque, utiliza a desfocalização do microscópio óptico em campo claro para obter informações sobre as amostras utilizadas, portanto a chamamos de Microscopia de Desfocalização [1–6].

A microscopia de desfocalização é aplicada em objetos de fase, que não causam perda na intensidade da luz incidente, eles apenas introduzem uma mudança na fase na luz transmitida. Objetos de fase não são visíveis quando se encontram no plano focal da objetiva, por isso um microscópio convencional possui usualmente sistemas para gerar contraste nestas amostras, os mais comuns são contraste de fase [7,8] e DIC(Differential Interference Contrast) [7,8]. Além destas técnicas mostramos que os objetos de fase tornam-se visíveis quando estão desfocalizados [5,6].

Materiais biológicos se comportam como objetos de fase ao serem observados num microscópio óptico, assim, utilizamos nossa técnica para obter dados quantitativos [5,6,9] de diversos tipos de células, como os macrófagos, que são células do sistema imunológico e células sanguíneas, dentre outras.

No desenvolvimento da Microscopia de Desfocalização utilizou-se a técnica de Óptica de Fourier [10,11], que possibilita verificar a mudança no espectro angular da luz ao atravessar cada elemento óptico existente no sistema, e algumas aproximações padrões, como a aproximação paraxial [12,13]. Além disso limitou-se o sistema a pequenas desfocalizações. Este trabalho tem como objetivo aprofundar o estudo da técnica para grandes desfocalizações, da ordem de até $300\mu m$, e verificar se as

aproximações consideradas no desenvolvimento da teoria são válidas. Para tanto utilizaremos como objetos de fase ideais redes de difração.

As redes foram fabricadas, utilizando a técnica de litografia interferométrica [14,15], no Laboratório de Óptica Difrativa localizado no Instituto de Física da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Para caracterizá-las, utilizamos medidas de Microscopia de Força Atômica (AFM), realizadas no Laboratório de Nanoscopia da UFMG.

A técnica prevê que o contraste da imagem de um objeto de fase desfocalizado é uma função periódica na desfocalização com frequência bem definida. Com os nossos experimentos verificamos essa frequência, e os resultados concordam muito bem com a previsão teórica. Também determinamos a amplitude das redes de difração e comparamos com os resultados obtidos com as medidas de AFM, obtendo também uma ótima concordância.

Em resumo, no capítulo 2, discutimos o desenvolvimento teórico da técnica Microscopia de Desfocalização, mostrando todos os passos necessários para se chegar a uma expressão para o contraste de um objeto de fase desfocalizado. Mostraremos um resultado já conhecido em trabalhos anteriores e apresentaremos uma nova maneira de escrever o contraste utilizando as funções de Bessel.

No capítulo 3, apresentamos o sistema óptico, a calibração utilizada na análise dos dados e as amostras utilizadas nos experimentos.

No capítulo 4, discutimos como são realizadas as análises dos dados coletados e apresentamos os resultados obtidos com as medidas de AFM e também os obtidos através da técnica Microscopia de Desfocalização.

Finalmente no capítulo 5, apresentamos as conclusões e perspectivas para futuros trabalhos.

Capítulo 2

Microscopia de Desfocalização

Neste capítulo iremos desenvolver o modelo teórico relacionado à Microscopia de Desfocalização. Primeiramente vamos deduzir a equação de Helmholtz [16] a partir das equações de Maxwell [17] livres de fontes e depois iremos calcular a expressão para o campo elétrico da luz. Utilizando as ferramentas matemáticas desenvolvidas em Óptica de Fourier vamos encontrar a expressão para o espectro angular do campo elétrico da luz. Veremos como é a propagação desse espectro através de um meio livre, através de uma lente delgada e também ao passar por um objeto de fase.

2.1 Espectro Angular do Campo Elétrico da Luz

2.1.1 A Equação de Helmholtz

As equações de Maxwell num meio homogêneo, linear e isotrópico livre de fontes são:

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{E} = 0, \quad (2.1a)$$

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{B} = 0, \quad (2.1b)$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t}, \quad (2.1c)$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{H} = \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} \quad (2.1d)$$

onde \vec{E} e \vec{B} são o campo elétrico e magnético respectivamente e \vec{D} é o vetor deslocamento elétrico que está relacionado com o campo elétrico através de $\vec{D} = \epsilon \vec{E}$, sendo ϵ a permissividade elétrica do meio, e $\vec{B} = \mu \vec{H}$, onde \vec{H} é o campo magnético num meio de permeabilidade magnética μ .

Aplicando o operador $\vec{\nabla}$ em ambos os lados da equação 2.1c e utilizando a identidade vetorial $\vec{A} \times (\vec{B} \times \vec{C}) = \vec{B}(\vec{A} \cdot \vec{C}) - (\vec{A} \cdot \vec{B})\vec{C}$ temos:

$$\vec{\nabla}(\vec{\nabla} \cdot \vec{E}) - \nabla^2 \vec{E} = -\epsilon\mu \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2}, \quad (2.2)$$

utilizando a equação 2.1a encontramos a equação de onda para o campo elétrico:

$$\nabla^2 \vec{E} = \epsilon\mu \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2}. \quad (2.3)$$

Vamos supor um campo elétrico monocromático $\vec{E}(\vec{r}, t)$ de frequência, ω , e dependência harmônica temporal, $e^{i\omega t}$, que se propaga na direção do vetor de onda \vec{k} ,

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = \vec{E}(\vec{r}) e^{i\omega t}. \quad (2.4)$$

Substituindo a equação 2.4 na equação 2.3 temos:

$$\nabla^2 \vec{E}(\vec{r}) + \omega^2 \epsilon \mu \vec{E}(\vec{r}) = 0. \quad (2.5)$$

Utilizando a relação:

$$k = \frac{\omega}{v} = \omega \sqrt{\epsilon \mu}. \quad (2.6)$$

a equação 2.5 fica da seguinte forma:

$$\nabla^2 \vec{E}(\vec{r}) + k^2 \vec{E}(\vec{r}) = 0. \quad (2.7)$$

Vemos que a parte espacial do campo elétrico satisfaz a equação 2.7, que é conhecida como equação de Helmholtz.

2.1.2 Propagação Livre do Espectro Angular

Trataremos aqui de campos elétricos escalares, com uma única polarização fixa, que se propagam na direção z . A transformada de Fourier bidimensional do campo elétrico num plano constante xy , perpendicular à direção de propagação é [11,18]:

$$A(k_x, k_y, z) = \int \int_{-\infty}^{+\infty} E(x, y, z) e^{-i(k_x \hat{i} + k_y \hat{j}) \cdot (x \hat{i} + y \hat{j})} dx dy, \quad (2.8)$$

onde $A(k_x, k_y, z)$ representa o espectro angular do campo elétrico.

Para simplificar a notação vamos definir um sistema de coordenadas como mostrado na figura 2.1.

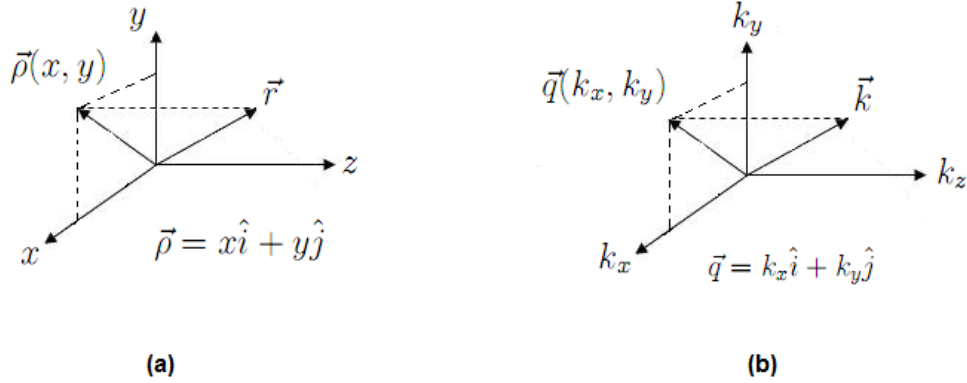


Figura 2.1: Coordenadas do sistema de referência: (a) no espaço real e (b) no espaço dos vetores de ondas

Assim podemos escrever:

$$\begin{aligned}\vec{q} &= k_x \hat{i} + k_y \hat{j}, \\ \vec{\rho} &= x \hat{i} + y \hat{j},\end{aligned}\tag{2.9}$$

onde \vec{q} é a projeção transversal de \vec{k} e $\vec{\rho}$ é projeção na plano xy de \vec{r} . Uma observação importante: a letra i na exponencial refere-se ao número imaginário, \hat{i} e \hat{j} são os unitários na direção x e y respectivamente.

O campo elétrico pode ser escrito como:

$$E(\vec{\rho}, z) = \frac{1}{(2\pi)^2} \int \int_{-\infty}^{+\infty} A(\vec{q}, z) e^{i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} d\vec{q}.\tag{2.10}$$

Substituindo a equação do campo elétrico 2.10 na equação de Helmholtz 2.7 temos:

$$\int \nabla^2 \left[A(\vec{q}, z) e^{i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} \right] d\vec{q} + \int k^2 A(\vec{q}, z) e^{i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} d\vec{q} = 0. \quad (2.11)$$

O operador ∇^2 pode ser escrito como:

$$\begin{aligned} \nabla^2 &= \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} \\ \nabla^2 &= \nabla_\rho^2 + \frac{\partial^2}{\partial z^2}. \end{aligned} \quad (2.12)$$

Então, a equação 2.11 torna-se:

$$\begin{aligned} \int \left\{ \nabla_\rho^2 \left[A(\vec{q}, z) e^{i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} \right] + \frac{\partial^2}{\partial z^2} \left[A(\vec{q}, z) e^{i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} \right] + k^2 \left[A(\vec{q}, z) e^{i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} \right] \right\} d\vec{q} &= 0 \\ \int \left\{ \left[-q^2 + \frac{\partial^2}{\partial z^2} + k^2 \right] A(\vec{q}, z) \right\} e^{i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} d\vec{q} &= 0. \end{aligned} \quad (2.13)$$

Para que esta equação seja válida, o integrando deverá ser nulo:

$$\left[-q^2 + \frac{\partial^2}{\partial z^2} + k^2 \right] A(\vec{q}, z) = 0, \quad (2.14)$$

mas

$$\vec{k} = k_x \hat{i} + k_y \hat{j} + k_z \hat{k} \iff k_z^2 = k^2 - q^2, \quad (2.15)$$

então a equação 2.14 torna-se:

$$\frac{\partial^2 A(\vec{q}, z)}{\partial z^2} + k_z^2 A(\vec{q}, z) = 0, \quad (2.16)$$

que tem como solução:

$$\begin{aligned} A(\vec{q}, z) &= A(\vec{q}, 0) e^{\pm i k_z z} \\ &= A(\vec{q}, 0) e^{\pm i k z \sqrt{1 - \frac{q^2}{k^2}}}. \end{aligned} \quad (2.17)$$

Vemos que a propagação do espectro ao longo do eixo z é descrita pelo fator de fase $e^{\pm i k_z z}$. Iremos considerar neste trabalho apenas o sinal positivo que indica que o campo se propaga no sentido crescente do eixo z . A raiz quadrada $\sqrt{1 - \frac{q^2}{k^2}}$ assume valores imaginários quando $q > k$, nesta condição as ondas propagantes decaem exponencialmente com z e são conhecidas como ondas evanescentes, campos evanescentes são observados utilizando-se a microscopia de campo próximo. Por outro lado, quando $q < k$ temos ondas que se propagam ao longo do eixo z , e são elas que efetivamente se propagam em um microscópio óptico convencional.

Podemos facilitar os cálculos utilizando a aproximação de Fresnel [12,13] (paraxial), $q \ll k$, ou seja, a região de observação limita-se às proximidades do eixo z . Dessa forma podemos escrever

$$k_z = \sqrt{k^2 - q^2} \simeq k - \frac{q^2}{2k}. \quad (2.18)$$

Assim, a equação 2.17 torna-se:

$$A(\vec{q}, z) = A(\vec{q}, 0) e^{i k z} e^{-i \frac{q^2}{2k} z}. \quad (2.19)$$

Concluimos que para calcular a propagação do espectro ao longo do eixo z basta conhecermos o espectro angular inicial.

2.1.3 Propagação do Espectro Angular através de uma Lente Delgada

O objetivo desta seção é calcular o espectro angular ao atravessar uma lente delgada. Seguiremos o mesmo tratamento utilizado por Goodman [10]. Ao passar por uma lente, o campo elétrico sofre uma mudança na sua fase, e pode ser escrito como:

$$E_\ell(\vec{\rho}) = t_\ell(\vec{\rho})E_0(\vec{\rho}), \quad (2.20)$$

onde $\vec{E}_0(\vec{\rho})$ é o campo elétrico incidente e $t_\ell(\vec{\rho})$ é a transmissividade da lente, dada por:

$$t_\ell(\vec{\rho}) = e^{i\phi(\vec{\rho})}, \quad (2.21)$$

onde $\phi(\vec{\rho})$ é a fase introduzida pela lente. Para calcular a diferença de fase vamos nos basear na figura 2.2.

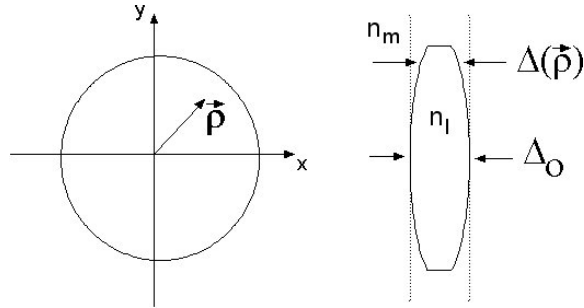


Figura 2.2: Representação das coordenadas e espessura da lente delgada

A espessura máxima da lente é denotada por Δ_0 , $\Delta(\vec{\rho})$ é a espessura em função da posição, n_m e n_ℓ são os índices de refração do meio e da lente respectivamente. A fase pode ser escrita como:

$$\phi(\vec{\rho}) = k_0 n_\ell \Delta(\vec{\rho}) + k_0 n_m (\Delta_0 - \Delta(\vec{\rho})) = k_0 n_m \Delta_0 + k_0 (n_\ell - n_m) \Delta(\vec{\rho}), \quad (2.22)$$

onde k_0 é o vetor de onda da luz no vácuo.

A idéia é calcular o caminho percorrido pela onda em função das coordenadas da lente, é conveniente separar a lente em três regiões como mostrado na figura 2.3. O raio de curvatura é definido como positivo para superfícies convexas e negativo para superfícies côncavas. A figura 2.3-(d) mostra as distâncias utilizadas para o cálculo.

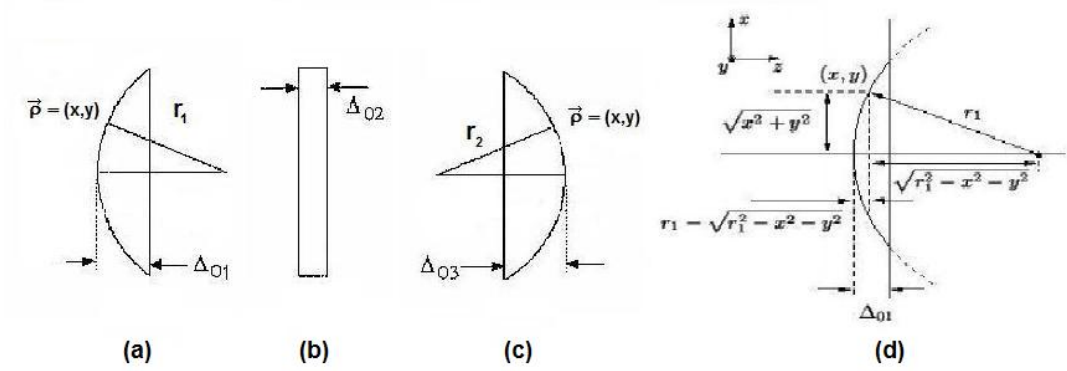


Figura 2.3: Representação das três regiões da lente: (a) parte convexa, (b) região central e (c) parte côncava; (d) distâncias utilizadas para o cálculo da fase.

O caminho percorrido na parte parte convexa da lente é:

$$\Delta_1(\vec{\rho}) = \Delta_{01} - \left(r_1 - \sqrt{r_1^2 - \rho^2} \right) = \Delta_{01} - r_1 \left(1 - \sqrt{1 - \frac{\rho^2}{r_1^2}} \right). \quad (2.23)$$

A parte central da lente é plana, logo o caminho será:

$$\Delta_2(\vec{\rho}) = \Delta_{02}. \quad (2.24)$$

A parte côncava contribui com uma distância:

$$\Delta_3(\vec{\rho}) = \Delta_{03} - \left(-r_2 + \sqrt{r_2^2 - \rho^2} \right) = \Delta_{03} + r_2 \left(1 - \sqrt{1 - \frac{\rho^2}{r_2^2}} \right). \quad (2.25)$$

A distância total percorrida na lente é igual à soma dos caminhos de cada região:

$$\begin{aligned}\Delta(\vec{\rho}) &= \Delta_1(\vec{\rho}) + \Delta_2(\vec{\rho}) + \Delta_3(\vec{\rho}) \\ &= \Delta_0 - r_1 \left(1 - \sqrt{1 - \frac{\rho^2}{r_1^2}}\right) + r_2 \left(1 - \sqrt{1 - \frac{\rho^2}{r_2^2}}\right).\end{aligned}\quad (2.26)$$

Estamos considerando lentes delgadas então vale a aproximação $\sqrt{1 - \frac{\rho^2}{R^2}} \cong 1 - \frac{\rho^2}{2R^2}$, então a equação 2.26 torna-se:

$$\Delta(\vec{\rho}) = \Delta_0 - \frac{\rho^2}{2} \left(\frac{1}{r_1} - \frac{1}{r_2}\right).\quad (2.27)$$

Substituindo a equação 2.27 em 2.22 temos:

$$\phi(\vec{\rho}) = k_0 n_\ell \Delta_0 - k_0 (n_\ell - n_m) \frac{\rho^2}{2} \left(\frac{1}{r_1} - \frac{1}{r_2}\right).\quad (2.28)$$

Levando a expressão da fase na equação da transmissividade temos:

$$t_\ell(\vec{\rho}) = e^{ik_0 n_1 \Delta_0} e^{-ik_0 (n_1 - n_m) \frac{\rho^2}{2} \left(\frac{1}{r_1} - \frac{1}{r_2}\right)}.\quad (2.29)$$

Utilizando a equação dos fabricantes de lentes,

$$\frac{1}{f} = \frac{n_1 - n_m}{n_m} \left(\frac{1}{r_1} - \frac{1}{r_2}\right),\quad (2.30)$$

a equação 2.29 pode ser escrita como:

$$t_\ell(\vec{\rho}) = e^{-i \frac{k}{2f} \rho^2},\quad (2.31)$$

onde f é a distância focal da lente e k é o módulo do vetor de onda da luz no meio. O termo de fase constante foi omitido pois ele independe da posição no plano xy .

O campo elétrico ao passar por uma lente será:

$$E_\ell(\vec{\rho}) = e^{-i\frac{k}{2f}\rho^2} E_0(\vec{\rho}). \quad (2.32)$$

Vamos agora calcular o espectro angular a partir da equação 2.32, utilizando a equação 2.8. O espectro angular será:

$$A_\ell(\vec{q}, z) = \int E_0(\vec{\rho}, z) e^{-i\frac{k}{2f}\rho^2} e^{-i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} d\vec{\rho}. \quad (2.33)$$

Notamos que a equação acima é a transformada de Fourier do produto de duas funções $\vec{E}_0(\vec{\rho}, z)$ e $e^{-i\frac{k}{2f}\rho^2}$. Aplicando o teorema da convolução [18,19] para a transformada de Fourier temos:

$$A_\ell(\vec{q}, z) = \left(\frac{1}{2\pi}\right)^2 A(\vec{q}, z) \otimes T_\ell(\vec{q}) = \left(\frac{1}{2\pi}\right)^2 \int A_0(\vec{q}', z) T_\ell(\vec{q} - \vec{q}') d\vec{q}' \quad (2.34)$$

onde $T_\ell(\vec{q})$ é a transformada de Fourier bidimensional de $t_\ell(\vec{\rho})$ e $A_0(\vec{q}, z)$ é a transformada de Fourier de $\vec{E}_0(\vec{\rho}, z)$.

Vamos calcular $T_\ell(\vec{q})$:

$$\begin{aligned} T_\ell(\vec{q}) &= \int e^{-i\left(\frac{k}{2f}\rho^2 + i\vec{q}\cdot\vec{\rho}\right)} d\vec{\rho} \\ &= \int e^{-i\left(\frac{k}{2f}\rho^2 + \vec{q}\cdot\vec{\rho} + \frac{f}{2k}q^2\right) - i\left(-\frac{f}{2k}q^2\right)} d\vec{\rho} \\ &= \int e^{-i\left|\sqrt{\frac{k}{2f}}\vec{\rho} + \sqrt{\frac{f}{2k}}\vec{q}\right|^2 - i\left(-\frac{f}{2k}q^2\right)} d\vec{\rho} \\ &= e^{i\left(\frac{f}{2k}q^2\right)} \int e^{-i\left|\sqrt{\frac{k}{2f}}\vec{\rho} + \sqrt{\frac{f}{2k}}\vec{q}\right|^2} d\vec{\rho}. \end{aligned} \quad (2.35)$$

Definindo,

$$\vec{u} = \sqrt{\frac{k}{2f}}\vec{\rho} + \sqrt{\frac{f}{2k}}\vec{q} \Rightarrow d\vec{u} = \sqrt{\frac{k}{2f}} d\vec{\rho} \quad (2.36)$$

e substituindo o resultado da integral

$$\int e^{-ax^2} dx = \sqrt{\frac{\pi}{a}}, \quad (2.37)$$

a equação 2.35 torna-se:

$$\begin{aligned} T_\ell(\vec{q}) &= e^{i(\frac{f}{2k}q^2)} \int e^{-iu^2} \sqrt{\frac{2f}{k}} d\vec{u} \\ &= \sqrt{\frac{2f}{k}} e^{i\frac{f}{2k}q^2} \int e^{-iu^2} d\vec{u} \\ &= \sqrt{\frac{2\pi f}{ik}} e^{i\frac{f}{2k}q^2}. \end{aligned} \quad (2.38)$$

O espectro angular da equação 2.33 pode ser escrito como:

$$\begin{aligned} A_\ell(\vec{q}, z) &= \frac{1}{(2\pi)^2} \int A_0(\vec{q}', z) T_\ell(\vec{q} - \vec{q}') d\vec{q}' \\ &= \frac{1}{(2\pi)^2} \sqrt{\frac{2\pi f}{ik}} \int A_0(\vec{q}', z) e^{i\frac{f}{2k}(\vec{q}-\vec{q}')^2} d\vec{q}'. \end{aligned} \quad (2.39)$$

A equação acima representa o espectro angular da luz ao passar por uma lente delgada.

2.1.4 Propagação do Espectro Angular através do Microscópio Desfocalizado

Nesta seção iremos calcular a propagação do espectro angular através de cada elemento óptico do nosso microscópio. No microscópio com óptica corrigida no infinito, o objeto é colocado no foco da objetiva, assim a imagem é formada no infinito, por isso é necessário introduzir uma lente para que a imagem seja conjugada na ocular, ela é conhecida como lente de tubo. A figura 2.4 representa um esboço do sistema óptico utilizado no laboratório.

O nosso trabalho consiste em encontrar uma expressão para o contraste de uma imagem desfocalizada. Vamos deslocar o objeto de uma distância Δf em relação à lente L_1 e calcular a propagação do espectro através do caminho óptico. A figura 2.5 representa o esquema do objeto de fase desfocalizado.

O espectro considerado inicialmente será $A_0(\vec{q}, 0)$ e será calculado nas seções seguintes.

A primeira etapa consiste em calcular a propagação do espectro angular através de uma distância $f_1 - \Delta f$, isto é, a distância correspondente entre objeto e a lente L_1 . Como nossa objetiva é de imersão à óleo, a propagação se dá num meio com índice de refração n . Nesse cálculo utilizaremos a equação 2.19, que corresponde à propagação do espectro angular no espaço livre:

$$A_1(\vec{q}, f_1 - \Delta f) = A_0(\vec{q}, 0) e^{ik(f_1 - \Delta f)} e^{-i\frac{q^2}{2k}(f_1 - \Delta f)}, \quad (2.40)$$

que será considerado como o espectro angular inicial para a próxima etapa.

Vamos agora calcular o espectro que atravessa a lente L_1 . Aplicaremos a equação 2.39, válida para o espectro angular que atravessa uma lente delgada:

$$A_2(\vec{q}, f_1 - \Delta f) = \frac{1}{(2\pi)^2} \sqrt{\frac{2\pi f_1}{ik}} \int A_1(\vec{q}', f_1 - \Delta f) e^{i\frac{f_1}{2k}(\vec{q} - \vec{q}')^2} d\vec{q}' \quad (2.41)$$

Substituindo a equação 2.40 na equação 2.41, temos:

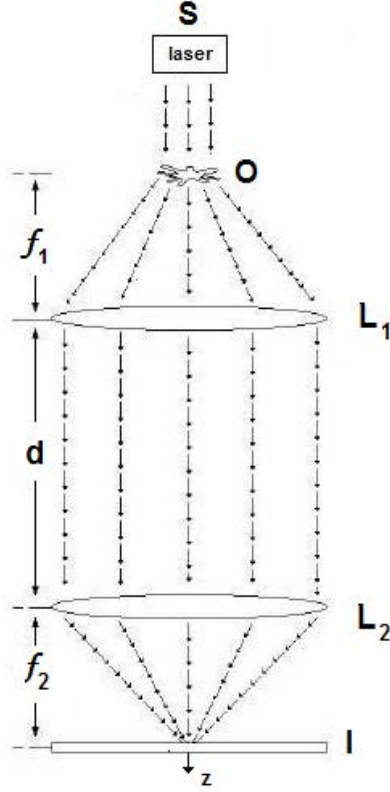


Figura 2.4: Esquema óptico do microscópio com óptica corrigida no infinito: S é a fonte de luz, um laser He-Ne, L_1 é a lente objetiva com distância focal f_1 , L_2 é a lente de tubo com distância focal f_2 , O é objeto que está no foco de L_1 , d é a distância entre as lentes, I é o plano imagem que está no plano focal de L_2 .

$$\begin{aligned}
A_2(\vec{q}, f_1 - \Delta f) &= \frac{1}{(2\pi)^2} \sqrt{\frac{2\pi f_1}{ik}} \int A_0(\vec{q}', 0) e^{ik(f_1 - \Delta f)} e^{-i\frac{q'^2}{2k}(f_1 - \Delta f)} e^{i\frac{f_1}{2k}(q^2 - 2\vec{q}\cdot\vec{q}' + q'^2)} d\vec{q}' \\
&= \frac{1}{(2\pi)^2} \sqrt{\frac{2\pi f_1}{ik}} e^{ik(f_1 - \Delta f)} e^{i\frac{f_1}{2k}q^2} \int A_0(\vec{q}', 0) e^{-i\frac{q'^2}{2k}(f_1 - \Delta f)} e^{i\frac{f_1}{2k}q'^2} e^{-i\frac{f_1}{k}(\vec{q}\cdot\vec{q}')} d\vec{q}' \\
&= \frac{1}{(2\pi)^2} \sqrt{\frac{2\pi f_1}{ik}} e^{ik(f_1 - \Delta f)} e^{i\frac{f_1}{2k}q^2} \int A_0(\vec{q}', 0) e^{i\frac{q'^2}{2k}(\Delta f)} e^{-i\frac{f_1}{k}(\vec{q}\cdot\vec{q}')} d\vec{q}'.
\end{aligned} \tag{2.42}$$

A equação acima representa o espectro angular que atravessa a lente L_1 .

Calcularemos agora a propagação deste espectro, através do ar, por uma distância d , utilizando a equação 2.19:

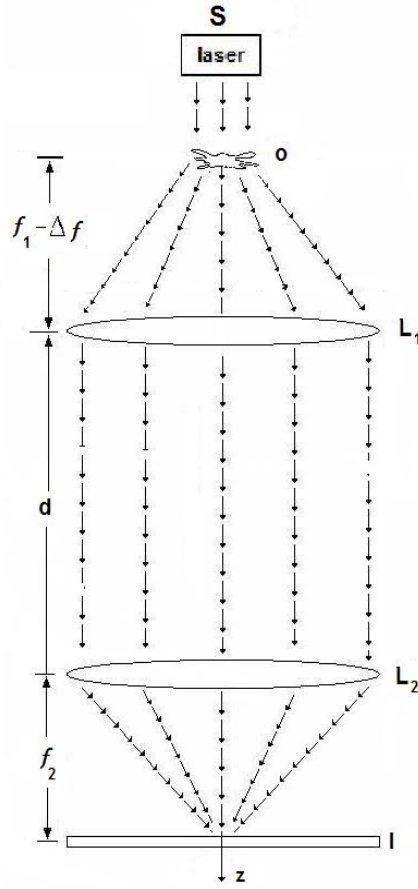


Figura 2.5: Esquema do microscópio desfocalizado: objeto está desfocalizado de uma pequena distância Δf ; as lentes estão separadas por uma distância d e a imagem é formada desfocalizada no plano I.

$$A_3(\vec{q}, d) = A_2(\vec{q}, f_1 - \Delta f) e^{ik_0 d} e^{-i\frac{q^2}{2k_0} d}. \quad (2.43)$$

Substituindo a expressão de $A_2(\vec{q}, f_1 - \Delta f)$ na equação 2.43 temos:

$$\begin{aligned} A_3(\vec{q}, d) &= \frac{1}{(2\pi)^2} \sqrt{\frac{2\pi f_1}{ik}} e^{ik(f_1 - \Delta f)} e^{i\frac{f_1}{2k} q^2} e^{ik_0 d} e^{-i\frac{q^2}{2k_0} d} \int A_0(\vec{q}', 0) e^{i\frac{q'^2}{2k}(\Delta f)} e^{-i\frac{f_1}{k}(\vec{q} \cdot \vec{q}')} d\vec{q}' \\ &= \frac{1}{(2\pi)^2} \sqrt{\frac{2\pi f_1}{ik}} e^{i[k(f_1 - \Delta f) + k_0 d]} e^{i\frac{q^2}{2} [\frac{f_1}{k} - \frac{d}{k_0}]} \int A_0(\vec{q}', 0) e^{i\frac{q'^2}{2k}(\Delta f)} e^{-i\frac{f_1}{k}(\vec{q} \cdot \vec{q}')} d\vec{q}'. \end{aligned} \quad (2.44)$$

Para simplificar a notação vamos definir a variável $D(\vec{q})$ como segue:

$$D(\vec{q}) = \int A_0(\vec{q}', 0) e^{i\frac{q'^2}{2k}(\Delta f)} e^{-i\frac{f_1}{k}(\vec{q}\cdot\vec{q}')} d\vec{q}' \quad (2.45)$$

Então a equação 2.44 torna-se:

$$A_3(\vec{q}, d) = \frac{1}{(2\pi)^2} \sqrt{\frac{2\pi f_1}{ik}} e^{i[k(f_1-\Delta f)+k_0d]} e^{i\frac{q^2}{2}[\frac{f_1}{k}-\frac{d}{k_0}]} D(\vec{q}) \quad (2.46)$$

O espectro angular que atravessa a lente L_2 será:

$$A_4(\vec{q}, d) = \frac{1}{(2\pi)^2} \sqrt{\frac{2\pi f_2}{ik_0}} \int A_3(\vec{q}', d) e^{i\frac{f_2}{2k}(\vec{q}-\vec{q}')^2} d\vec{q}' \quad (2.47)$$

Substituindo a expressão de $A_3(\vec{q}, d)$ temos:

$$\begin{aligned} A_4(\vec{q}, d) &= \frac{1}{i} \frac{1}{(2\pi)^3} \sqrt{\frac{f_1 f_2}{k k_0}} e^{i[k(f_1-\Delta f)+k_0d]} \int e^{i\frac{q'^2}{2}[\frac{f_1}{k}-\frac{d}{k_0}]} D(\vec{q}') e^{i\frac{f_2}{2k_0}(\vec{q}-\vec{q}')^2} d\vec{q}' \\ &= \frac{1}{i} \frac{1}{(2\pi)^3} \sqrt{\frac{f_1 f_2}{k k_0}} e^{i[k(f_1-\Delta f)+k_0d]} e^{i\frac{f_2}{2k_0}q^2} \int e^{i\frac{q'^2}{2}[\frac{f_1}{k}-\frac{d}{k_0}+\frac{f_2}{k_0}]} D(\vec{q}') e^{-i\frac{f_2}{k_0}(\vec{q}\cdot\vec{q}')} d\vec{q}'. \end{aligned} \quad (2.48)$$

Esta é a expressão do espectro angular ao passar pela lente L_2 . Resta agora calcular a propagação deste espectro até o anteparo que está a uma distância f_2 . O meio que se dá essa propagação é o ar. Utilizando a equação 2.19 encontramos:

$$A_5(\vec{q}, f_2) = A_4(\vec{q}, d) e^{ik_0 f_2} e^{-i\frac{q^2}{2k_0} f_2} \quad (2.49)$$

Substituindo a expressão de $A_4(\vec{q}, d)$ obtemos:

$$A_5(\vec{q}, f_2) = \frac{1}{i} \frac{1}{(2\pi)^3} \sqrt{\frac{f_1 f_2}{k k_0}} e^{i[k(f_1-\Delta f)+k_0d+k_0 f_2]} \int e^{i\frac{q'^2}{2}[\frac{f_1}{k}-\frac{d}{k_0}+\frac{f_2}{k_0}]} D(\vec{q}') e^{-i\frac{f_2}{k_0}(\vec{q}\cdot\vec{q}')} d\vec{q}'. \quad (2.50)$$

A equação 2.50 representa o espectro angular através do microscópio desfocalizado. Para facilitar os cálculos restantes é conveniente realizar uma mudança de variável:

$$\begin{aligned}\vec{q}'' &= \frac{f_2}{k_0} \vec{q}', \\ dq' &= \frac{k_0}{f_2} dq'', \\ q'^2 &= \frac{k_0^2}{f_2^2} q''^2\end{aligned}\tag{2.51}$$

Dessa forma, a equação 2.50 pode ser escrita como:

$$A_5(\vec{q}, f_2) = \frac{1}{i} \frac{1}{(2\pi)^3} \sqrt{\frac{f_1 k_0}{f_2 k}} e^{i[k(f_1 - \Delta f) + k_0 d + k_0 f_2]} \int e^{i \frac{k_0^2}{2f_2^2} \left[\frac{f_1}{k} - \frac{d}{k_0} + \frac{f_2}{k_0} \right] q''^2} D\left(\frac{k_0}{f_2} \vec{q}''\right) e^{-i(\vec{q}'' \cdot \vec{q})} dq''.\tag{2.52}$$

Definindo algumas grandezas:

$$\alpha = \frac{k_0^2}{2f_2^2} \left(\frac{f_1}{k} - \frac{d}{k_0} + \frac{f_2}{k_0} \right)\tag{2.53}$$

e

$$\beta = k(f_1 - \Delta f) + k_0 d + k_0 f_2.\tag{2.54}$$

Assim, temos:

$$A_5(\vec{q}, f_2) = \frac{1}{i} \frac{1}{(2\pi)^3} \sqrt{\frac{f_1 k_0}{f_2 k}} e^{i\beta} \int e^{i\alpha q''^2} D\left(\frac{k_0}{f_2} \vec{q}''\right) e^{-i(\vec{q}'' \cdot \vec{q})} dq''.\tag{2.55}$$

A equação 2.55 representa o espectro angular para o microscópio desfocalizado.

2.2 Campo Elétrico para Microscópio Desfocalizado

Nesta seção iremos calcular o campo elétrico utilizando a equação 2.10, a partir da expressão do espectro angular para o microscópio desfocalizado, $A_5(\vec{q}, f_2)$. Assim, temos:

$$E(\vec{\rho}, f_2) = \frac{1}{(2\pi)^2} \int A_5(\vec{q}, f_2) e^{i(\vec{q}\cdot\vec{\rho})} d\vec{q}. \quad (2.56)$$

Substituindo a expressão de $A_5(\vec{q}, f_2)$:

$$E(\vec{\rho}, f_2) = \frac{1}{i} \frac{1}{(2\pi)^5} \sqrt{\frac{k_0 f_1}{k f_2}} e^{1\beta} \int \int e^{i\alpha q'^2} D\left(\frac{k_0}{f_2} \vec{q}'\right) e^{-i\vec{q}\cdot\vec{q}'} e^{i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} d\vec{q} d\vec{q}'. \quad (2.57)$$

Podemos reescrever a equação 2.57 como:

$$E(\vec{\rho}, f_2) = \frac{1}{i} \frac{1}{(2\pi)^3} \sqrt{\frac{k_0 f_1}{k f_2}} e^{1\beta} \int \left[\frac{1}{(2\pi)^2} \int e^{i\vec{q}\cdot(\vec{\rho}-\vec{q}')} d\vec{q} \right] e^{i\alpha q'^2} D\left(\frac{k_0}{f_2} \vec{q}'\right) d\vec{q}'. \quad (2.58)$$

Utilizando a definição da função delta, equação 2.80, temos:

$$E(\vec{\rho}, f_2) = \frac{1}{i} \frac{1}{(2\pi)^3} \sqrt{\frac{k_0 f_1}{k f_2}} e^{1\beta} \int e^{i\alpha q'^2} D\left(\frac{k_0}{f_2} \vec{q}'\right) \delta(\vec{\rho} - \vec{q}') d\vec{q}' \quad (2.59)$$

que tem como resultado:

$$E(\vec{\rho}, f_2) = \frac{1}{i} \frac{1}{(2\pi)^3} \sqrt{\frac{k_0 f_1}{k f_2}} e^{1\beta} e^{i\alpha \rho^2} D\left(\frac{k_0}{f_2} \vec{\rho}\right) \quad (2.60)$$

Substituindo a expressão de $D\left(\frac{k_0}{f_2}\vec{\rho}\right)$ encontramos:

$$E(\vec{\rho}, f_2) = \frac{1}{i} \frac{1}{(2\pi)^3} \sqrt{\frac{k_0 f_1}{k f_2}} e^{1\beta} e^{i\alpha\rho^2} \int A_0(\vec{q}', 0) e^{i\frac{q'^2}{2k}\Delta f} e^{-i\frac{f_1 k_0}{f_2 k}(\vec{\rho}\cdot\vec{q}')} d\vec{q}' \quad (2.61)$$

Novamente fazendo uma troca de variável:

$$\vec{\rho} \rightarrow -\frac{k_0 f_1}{k f_2} \vec{\rho}, \quad (2.62)$$

e

$$\vec{q}' = \vec{q}, \quad (2.63)$$

onde $\vec{\rho}$ e \vec{q} são as coordenadas no plano imagem e no plano objeto respectivamente. O termo $\frac{k_0 f_1}{k f_2}$ corresponde ao fator de magnificação do microscópio e o sinal negativo significa que a imagem é invertida. Assim a equação 2.61 torna-se:

$$E(\vec{\rho}, f_2) = \frac{1}{i} \frac{1}{(2\pi)^3} \sqrt{\frac{k_0 f_1}{k f_2}} e^{1\beta} e^{i\alpha\frac{f_2^2 k^2}{f_1^2 k_0^2} \rho^2} \int A_0(\vec{q}, 0) e^{i\frac{q^2}{2k}\Delta f} e^{i(\vec{\rho}\cdot\vec{q})} d\vec{q} \quad (2.64)$$

Agrupando as fases fora da integral em $\beta(\rho')$ e a constante $G = \frac{1}{i2\pi} \sqrt{\frac{k_0 f_1}{k f_2}}$ podemos reescrever o campo elétrico como:

$$E(\vec{\rho}, f_2) = G \frac{e^{i\beta(\vec{\rho}')}}{(2\pi)^2} \int A_0(\vec{q}, 0) e^{i\frac{\Delta f}{2k} q^2} e^{i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} d\vec{q}, \quad (2.65)$$

que corresponde ao campo elétrico para o microscópio desfocalizado. O termo f_2 em $E(\vec{\rho}, f_2)$ significa que estamos sobre o plano imagem, vamos omitir esse termo daqui em diante.

Se não temos desfocalização a equação 2.65 torna-se:

$$E(\vec{\rho}) = G \frac{e^{i\beta(\vec{\rho}')}}{(2\pi)^2} \int A_0(\vec{q}, 0) e^{i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} d\vec{q}. \quad (2.66)$$

Utilizando a equação 2.10, o campo elétrico da equação 2.66 pode ser reescrito como:

$$E(\vec{\rho}) = E_0 e^{i\beta(\vec{\rho})}. \quad (2.67)$$

A intensidade do campo elétrico é dada por:

$$I(\vec{\rho}) = |E(\vec{\rho})|^2 \quad (2.68)$$

substituindo o campo elétrico da equação 2.67 na equação 2.68 encontramos:

$$I(\vec{\rho}) = |E(\vec{\rho})|^2 = |E_0(\vec{\rho})|^2 = I_0(\vec{\rho}). \quad (2.69)$$

O contraste correspondente é dado por:

$$C(\vec{\rho}) = \frac{I(\vec{\rho}) - I_0(\vec{\rho})}{I_0(\vec{\rho})} = 0. \quad (2.70)$$

A equação 2.70 nos fornece um resultado importante. Objetos de fase não são visíveis quando estão no plano focal da lente objetiva.

Vimos que a desfocalização introduz uma diferença de fase entre a luz difratada e a não-difratada, permitindo que ocorra interferência. Desta forma, o objeto de fase torna-se visível.

2.2.1 Propagação do Espectro Angular através de um Objeto de Fase

Objetos de fase são aqueles que mudam a fase da luz incidente sem que ocorra perda de intensidade. Nesta seção analisaremos qual a mudança no espectro angular da luz ao atravessar um objeto de fase. Primeiro iremos calcular o campo elétrico que atravessa um objeto de fase e depois calcularemos o espectro angular correspondente.

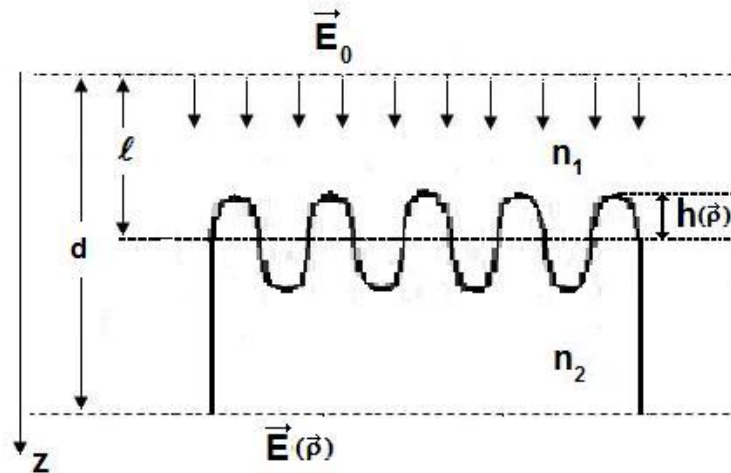


Figura 2.6: Esboço de um objeto de fase. \vec{E}_0 é o campo elétrico incidente; $h(\vec{\rho})$ é a amplitude do objeto; n_1 e n_2 são os índices de refração do meio por onde o campo elétrico se propaga; $\vec{\rho}$ é o vetor posição no plano (x, y) perpendicular à direção z de propagação do campo elétrico

A variação da fase do campo elétrico no espaço livre, com índice de refração n_1 , propagando por uma distância d é dada por:

$$\varphi_0 = n_1 k_0 d. \quad (2.71)$$

Supondo que agora tenhamos um objeto de fase, a variação de fase será:

$$\varphi_1(\vec{\rho}) = n_1 k_0 (l + h(\vec{\rho})) + n_2 k_0 [d - (l + h(\vec{\rho}))], \quad (2.72)$$

assim, a diferença de fase vale:

$$\begin{aligned} \Delta\varphi(\vec{\rho}) &= \varphi_1(\vec{\rho}) - \varphi_0 \\ &= (n_1 - n_2)k_0(l - d) + (n_1 - n_2)k_0h(\vec{\rho}) \\ &= -\Delta n k_0(l - d) - \Delta n k_0 h(\vec{\rho}) \\ &= \text{constante} + \varphi(\vec{\rho}), \end{aligned} \quad (2.73)$$

onde $\Delta n = n_2 - n_1$.

O campo elétrico ao passar pelo objeto de fase é dado por:

$$E(\vec{\rho}) = E_0 e^{i\Delta\varphi(\vec{\rho})}. \quad (2.74)$$

Substituindo a equação 2.73 na equação 2.74 e retirando a fase constante, que não interfere nos cálculos, temos:

$$E(\vec{\rho}) = E_0 e^{i\varphi(\vec{\rho})} = E_0 e^{-i\Delta n k_0 h(\vec{\rho})}. \quad (2.75)$$

onde E_0 é o campo elétrico incidente. A equação 2.75 é uma aproximação local para o campo elétrico difratado, e deixa de ser válida para componentes de Fourier de $h(\vec{\rho})$ com números de onda comparáveis com o números de onda da luz incidente no meio.

Supondo que a variação na fase seja muito pequena, $\varphi(\vec{\rho}) \ll 1$, o campo elétrico da equação 2.75 pode ser expandido até primeira ordem como segue

$$E(\vec{\rho}) \simeq E_0[1 - i\varphi(\vec{\rho})] = E_0[1 + i\Delta nk_0 h(\vec{\rho})]. \quad (2.76)$$

Podemos decompor o perfil do objeto de fase em uma série de Fourier, como segue:

$$h(\vec{\rho}) = \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') \text{sen}(\vec{q}' \cdot \vec{\rho}), \quad (2.77)$$

onde $h(\vec{q}')$ representa a amplitude do modo \vec{q}' da ondulação da interface.

Substituindo a equação 2.77 na equação 2.76 temos:

$$E(\vec{\rho}) = E_0 \left[1 + i\Delta nk_0 \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') \text{sen}(\vec{q}' \cdot \vec{\rho}) \right]. \quad (2.78)$$

A equação 2.78 corresponde ao campo elétrico ao atravessar um objeto de fase. O espectro angular correspondente será:

$$\begin{aligned} A_0(\vec{q}) &= \int E(\vec{\rho}) e^{-i\vec{q} \cdot \vec{\rho}} d\vec{\rho} \\ &= \int E_0 \left[1 + i\Delta nk_0 \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') \text{sen}(\vec{q}' \cdot \vec{\rho}) \right] e^{-i\vec{q} \cdot \vec{\rho}} d\vec{\rho} \\ &= \int E_0 \left[1 + i\Delta nk_0 \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') \left(\frac{e^{i\vec{q}' \cdot \vec{\rho}} - e^{-i\vec{q}' \cdot \vec{\rho}}}{2i} \right) \right] e^{-i\vec{q} \cdot \vec{\rho}} d\vec{\rho} \\ &= E_0 \left[\int e^{-i\vec{q} \cdot \vec{\rho}} d\vec{\rho} + \frac{\Delta nk_0}{2} \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') \int \left(e^{i(\vec{q}' - \vec{q}) \cdot \vec{\rho}} - e^{-i(\vec{q}' + \vec{q}) \cdot \vec{\rho}} \right) d\vec{\rho} \right]. \end{aligned} \quad (2.79)$$

A função $\delta(\vec{\rho})$ é definida por:

$$\delta(\vec{\rho}) = \frac{1}{(2\pi)^2} \int e^{i(\vec{q}\vec{\rho})} d\vec{q}. \quad (2.80)$$

Utilizando a equação acima, a equação 2.79 torna-se:

$$A_0(\vec{q}) = (2\pi)^2 E_0 \left[\delta(\vec{q}) - \frac{\Delta n k_0}{2} \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') \delta(\vec{q} + \vec{q}') + \frac{\Delta n k_0}{2} \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') \delta(\vec{q} - \vec{q}') \right]. \quad (2.81)$$

Esta equação representa o espectro angular ao passar por um objeto de fase.

2.2.2 Contraste de um Objeto de Fase Desfocalizado

Iremos agora calcular o campo elétrico da equação 2.65 substituindo a expressão de $A_0(\vec{q}, 0)$, obtida em 2.81:

$$\begin{aligned}
E(\vec{\rho}) &= G \frac{e^{i\beta(\vec{\rho})}}{(2\pi)^2} \int A_0(\vec{q}, 0) e^{i\frac{\Delta f}{2k} q^2} e^{i(\vec{\rho} \cdot \vec{q})} d\vec{q} \\
&= Ge^{i\beta(\vec{\rho})} E_0 \left\{ \int \left[\delta(\vec{q}) - \frac{\Delta nk_0}{2} \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') \left(\delta(\vec{q} + \vec{q}') - \delta(\vec{q} - \vec{q}') \right) \right] e^{i\frac{\Delta f}{2k} q^2} e^{i\vec{q} \cdot \vec{\rho}} \right\} d\vec{q} \\
&= Ge^{i\beta(\vec{\rho})} E_0 \left\{ 1 + \frac{\Delta nk_0}{2} \left[\sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') e^{i\frac{\Delta f}{2k} q'^2} e^{i\vec{q}' \cdot \vec{\rho}} - \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') e^{i\frac{\Delta f}{2k} q'^2} e^{-i\vec{q}' \cdot \vec{\rho}} \right] \right\} \\
&= Ge^{i\beta(\vec{\rho})} E_0 \left\{ 1 + \frac{\Delta nk_0}{2} \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') \left[e^{i\vec{q}' \cdot \vec{\rho}} - e^{-i\vec{q}' \cdot \vec{\rho}} \right] e^{i\frac{\Delta f}{2k} q'^2} \right\} \\
&= Ge^{i\beta(\vec{\rho})} E_0 \left\{ 1 + i\Delta nk_0 \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') \text{sen}(\vec{q}' \cdot \vec{\rho}) e^{i\frac{\Delta f}{2k} q'^2} \right\}. \tag{2.82}
\end{aligned}$$

Utilizando a equação 2.68, a intensidade será:

$$\begin{aligned}
I(\vec{\rho}) &= |G|^2 |E_0|^2 \left\{ 1 + i\Delta nk_0 \sum_{\vec{q}} h(\vec{q}) \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) e^{i\frac{\Delta f}{2k} q^2} \right\} \\
&\times \left\{ 1 - i\Delta nk_0 \sum_{\vec{q}} h(\vec{q}) \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) e^{-i\frac{\Delta f}{2k} q^2} \right\} \\
&= |G|^2 |E_0|^2 \left\{ 1 - i\Delta nk_0 \sum_{\vec{q}} h(\vec{q}) \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) e^{-i\frac{\Delta f}{2k} q^2} \right. \\
&\quad \left. + i\Delta nk_0 \sum_{\vec{q}} h(\vec{q}) \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) e^{i\frac{\Delta f}{2k} q^2} + (\Delta nk_0)^2 \sum_{\vec{q}} h^2(\vec{q}) \text{sen}^2(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \right\} \\
&= |G|^2 |E_0|^2 \left\{ 1 + i\Delta nk_0 \sum_{\vec{q}} \left[h(\vec{q}) \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \left(e^{i\frac{\Delta f}{2k} q^2} - e^{-i\frac{\Delta f}{2k} q^2} \right) \right] \right\} \\
&= |G|^2 |E_0|^2 \left\{ 1 - 2\Delta nk_0 \sum_{\vec{q}} \left[h(\vec{q}) \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \text{sen} \left(\frac{\Delta f}{2k} q^2 \right) \right] \right\}. \tag{2.83}
\end{aligned}$$

Definindo $I_0 = |G|^2|E_0|^2$, a equação acima pode ser reescrita como:

$$I(\vec{\rho}) = I_0 \left\{ 1 - 2\Delta nk_0 \sum_{\vec{q}} \left[h(\vec{q}) \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \text{sen}\left(\frac{\Delta f}{2k} q^2\right) \right] \right\} \quad (2.84)$$

O contraste [6] será dados por:

$$C(\vec{\rho}) = -2\Delta nk_0 \sum_{\vec{q}} \left[h(\vec{q}) \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \text{sen}\left(\frac{\Delta f}{2k} q^2\right) \right]. \quad (2.85)$$

Concluimos que o contraste é uma função oscilatória com frequência $\frac{q^2}{2k}$. Este resultado será discutido nos próximos capítulos.

2.2.3 Contraste e as Funções de Bessel

Anteriormente consideramos que a fase introduzida por um objeto de fase era muito pequena, $\varphi(\vec{\rho}) \ll 1$. Nesta seção iremos expandir a fase utilizando as Funções de Bessel, isto é útil pois não precisamos fazer nenhuma aproximação em relação à sua magnitude.

O campo elétrico foi escrito como:

$$E(\vec{\rho}) = E_0 e^{i\varphi(\vec{\rho})} = E_0 e^{-i\Delta nk_0 h(\vec{\rho})}. \quad (2.86)$$

Como nossos objetos de fase são redes de difração senoidais tais que, $h(\vec{\rho}) = h \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho})$, então:

$$E(\vec{\rho}) = E_0 e^{-i\Delta nk_0 h \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho})}. \quad (2.87)$$

Utilizando a expansão em funções de Bessel [18,19] temos:

$$\begin{aligned} e^{i\Delta nk_0 h \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho})} &= \sum_{m=-\infty}^{\infty} J_m(\Delta nk_0 h) e^{im\vec{q} \cdot \vec{\rho}} \\ &\simeq J_0(\Delta nk_0 h) + J_{-1}(\Delta nk_0 h) e^{-i\vec{q} \cdot \vec{\rho}} + J_1(\Delta nk_0 h) e^{i\vec{q} \cdot \vec{\rho}} + J_{-2}(\Delta nk_0 h) e^{-2i\vec{q} \cdot \vec{\rho}} + \\ &+ J_2(\Delta nk_0 h) e^{2i\vec{q} \cdot \vec{\rho}}. \end{aligned} \quad (2.88)$$

Assim, podemos reescrever o campo elétrico da equação 2.87 como:

$$E(\vec{\rho}) = E_0 \sum_{m=-\infty}^{\infty} J_m(\Delta nk_0 h) e^{im\vec{q} \cdot \vec{\rho}}, \quad (2.89)$$

onde J_m são as funções de Bessel.

O espectro angular correspondente pode ser calculado utilizando a equação 2.8, como segue:

$$\begin{aligned}
A_0(q.0) &= \int E_0 \sum_{-\infty}^{\infty} J_m(\Delta nk_0 h) e^{im\vec{q}' \cdot \vec{\rho}} e^{-i\vec{q} \cdot \vec{\rho}} d\vec{\rho} \\
&= \int E_0 \sum_{-\infty}^{\infty} J_m(\Delta nk_0 h) e^{i(m\vec{q}' - \vec{q}) \cdot \vec{\rho}} d\vec{\rho}, \tag{2.90}
\end{aligned}$$

utilizando a definição da função delta temos:

$$A_0(q.0) = (2\pi)^2 E_0 \sum_{-\infty}^{\infty} J_m(\Delta nk_0 h) \delta(-\vec{q} + m\vec{q}'). \tag{2.91}$$

A equação 2.91 corresponde ao espectro angular do campo elétrico ao passar por um objeto de fase. Para o cálculo do campo elétrico para um microscópio desfocalizado, utilizaremos a equação 2.65 e vamos considerar a equação 2.91 como espectro inicial. O campo elétrico será dado por:

$$\begin{aligned}
E(\vec{\rho}) &= G e^{i\beta(\vec{\rho}')} \int E_0 \sum_{-\infty}^{\infty} J_m(\Delta nk_0 h) \delta(-\vec{q} + m\vec{q}') e^{i\frac{\Delta f}{2k_0} q^2} e^{i\vec{q} \cdot \vec{\rho}} d\vec{q} \\
&= G e^{i\beta(\vec{\rho}')} E_0 \sum_{-\infty}^{\infty} J_m(\Delta nk_0 h) e^{i\frac{\Delta f}{2k} (mq)^2} e^{im\vec{q}' \cdot \vec{\rho}}. \tag{2.92}
\end{aligned}$$

Utilizando as propriedades $J_{mpar}(x) = J_{-mpar}(x)$ e $J_{mimpar}(x) = -J_{-mimpar}(x)$ e expandindo a equação acima até segunda ordem encontramos:

$$\begin{aligned}
E(\vec{\rho}) &= G e^{i\beta(\vec{\rho}')} E_0 \left[J_0(\Delta nk_0 h) + 2iJ_1(\Delta nk_0 h) e^{i\frac{\Delta f}{2k} q^2} \text{sen}(\vec{q}' \cdot \vec{\rho}) + \right. \\
&\quad \left. + 2J_2(\Delta nk_0 h) e^{4i\frac{\Delta f}{2k} q^2} \text{cos}(2\vec{q}' \cdot \vec{\rho}) \right]. \tag{2.93}
\end{aligned}$$

A intensidade correspondente será:

$$\begin{aligned}
I(\vec{\rho}) &= |G|^2 |E_0|^2 \left[J_0^2(\Delta nk_0 h) + 4J_1^2(\Delta nk_0 h) \text{sen}^2(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) + 4J_2^2(\Delta nk_0 h) \text{cos}^2(2\vec{q} \cdot \vec{\rho}) + \right. \\
&- 4J_0(\Delta nk_0 h) J_1(\Delta nk_0 h) \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \text{sen}\left(\frac{\Delta f}{2k} q^2\right) + \\
&+ 4J_0(\Delta nk_0 h) J_2(\Delta nk_0 h) \text{cos}(2\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \text{cos}\left(\frac{4\Delta f}{2k} q^2\right) + \\
&\left. + 8J_1(\Delta nk_0 h) J_2(\Delta nk_0 h) \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \text{cos}(2\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \text{sen}\left(\frac{3\Delta f}{2k} q^2\right) \right].
\end{aligned} \tag{2.94}$$

Utilizando identidades trigonométricas e definindo $I_0 = |G|^2 |E_0|^2 \left[J_0^2(\Delta nk_0 h) + 2J_1^2(\Delta nk_0 h) + 2J_2^2(\Delta nk_0 h) \right]$, podemos escrever o contraste como:

$$\begin{aligned}
C(\vec{\rho}) &= \frac{1}{J_0^2(\Delta nk_0 h) + 2J_1^2(\Delta nk_0 h) + 2J_2^2(\Delta nk_0 h)} \left[-4J_0(\Delta nk_0 h) J_1(\Delta nk_0 h) \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \times \right. \\
&\times \text{sen}\left(\frac{\Delta f}{2k} q^2\right) + 4J_0(\Delta nk_0 h) J_2(\Delta nk_0 h) \text{cos}(2\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \text{cos}\left(\frac{4\Delta f}{2k} q^2\right) + \\
&+ 8J_1(\Delta nk_0 h) J_2(\Delta nk_0 h) \text{cos}(2\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \text{sen}\left(\frac{3\Delta f}{2k} q^2\right) - 2J_1^2(\Delta nk_0 h) \text{cos}(2\vec{q} \cdot \vec{\rho}) + \\
&\left. + 2J_2^2(\Delta nk_0 h) \text{cos}(4\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \right].
\end{aligned} \tag{2.95}$$

Esta equação corresponde ao contraste de uma imagem desfocalizada expresso em funções de Bessel. Uma análise mais detalhada desta equação será feita nos próximos capítulos.

Se considerarmos $\Delta nk_0 h \ll 1$, $J_0(\Delta nk_0 h) \simeq 1$ e $J_1(\Delta nk_0 h) \simeq \frac{\Delta nk_0 h}{2}$, e a equação 2.85 é recuperada.

Como em algumas das amostras utilizadas $\Delta nk_0 h \approx 1$, usaremos a equação 2.95 para a análise de nossos resultados.

Capítulo 3

Materiais e Metodologia

Neste capítulo apresentaremos a montagem experimental, as amostras utilizadas e descreveremos o procedimento para a calibração do sistema.

3.1 Montagem Experimental

O microscópio óptico invertido Nikon, *Eclipse TE300*, foi utilizado nos experimentos juntamente com uma objetiva de imersão à óleo, com ótica corrigida no infinito, modelo CFI Plan Apochromatic, com aumento de 100x e abertura numérica (NA) de 1.4. Associado ao microscópio temos um deslocador piezoelétrico, PI Digital Piezo Controller modelo E-710.3CD, que nos permite translações nos três eixos do plano xyz , com precisão de 5 nm. A figura 3.1 ilustra um esquema do sistema utilizado na realização das medidas.

A fonte de luz utilizada é um laser He-Ne (modelo SP-127, $\lambda = 632,8$ nm) ilustrada pela linha vermelha na figura 3.1. O laser é refletido por um espelho até a amostra. O feixe de luz deve possuir incidência normal à superfície da amostra para garantir que a região a ser analisada permaneça constante enquanto mudamos o foco durante o experimento.

Para a coleta de dados foi usado uma câmera CCD (UNIQ ViSION, modelo UP-1830CL) conectada a um computador. A câmera possui resolução de 12bits o que corresponde a 4095 níveis de cinza.

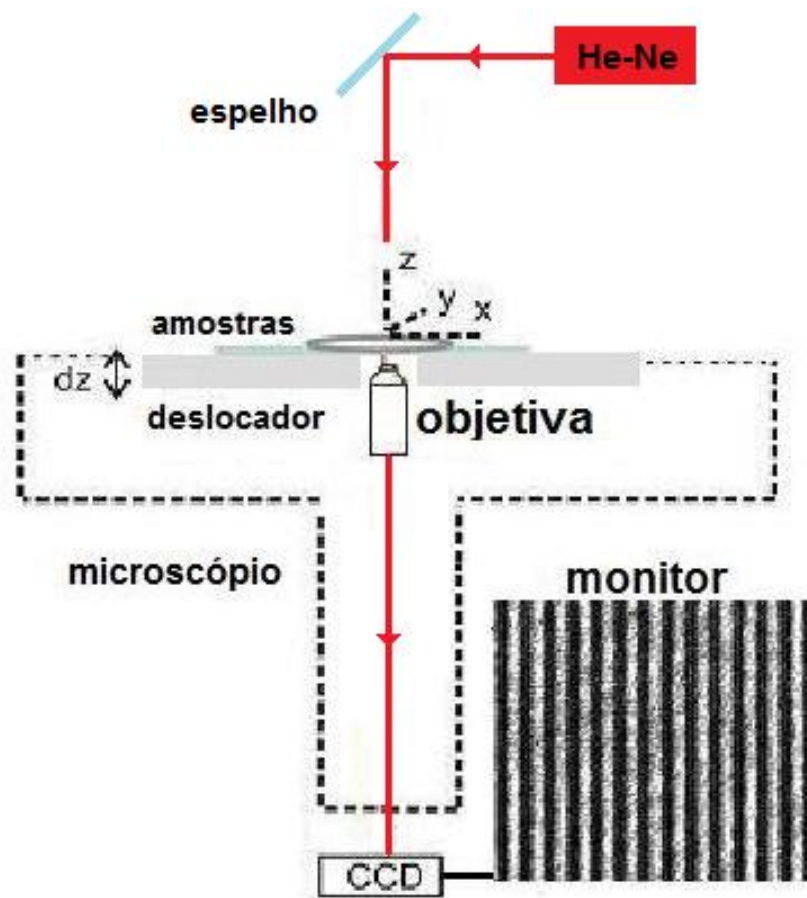


Figura 3.1: Esquema da montagem experimental utilizada nos experimentos.

3.2 Amostras

As amostras utilizadas são redes de difração com perfil senoidal, com amplitudes e período diversos. As redes foram fabricadas com a técnica de litografia interferométrica no Laboratório de Óptica Difractiva do Instituto de Física da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), coordenado pela Prof^a. Lucia Helena Cescato. Foi utilizado para a confecção das redes a fotorresina (SC 1827) que possui índice de refração $n = 1.62$ para comprimento de onda de luz incidente $\lambda = 6328\text{\AA}$.

Para a determinação do perfil de cada rede foram feitas medidas de microscopia de força atômica (AFM), no Laboratório de Nanoscopia sediado no Departamento de Física da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Foi utilizado um microscópio Solver-Pro da NT-MDT operando no modo contato. A sonda utilizada foi de nitreto de silício com raio de aproximadamente 15 nm.

3.3 Experimento

O primeiro passo consiste em posicionar a amostra sobre o deslocador piezoelétrico. É importante garantir que o plano da amostra não possua inclinação relativa com o porta amostra. Esse ajuste é feito observando a imagem no monitor e ao mesmo tempo deslocando a amostra sobre o objetiva. A figura 3.2 ilustra a imagem observada no monitor de uma rede de difração desfocalizada.

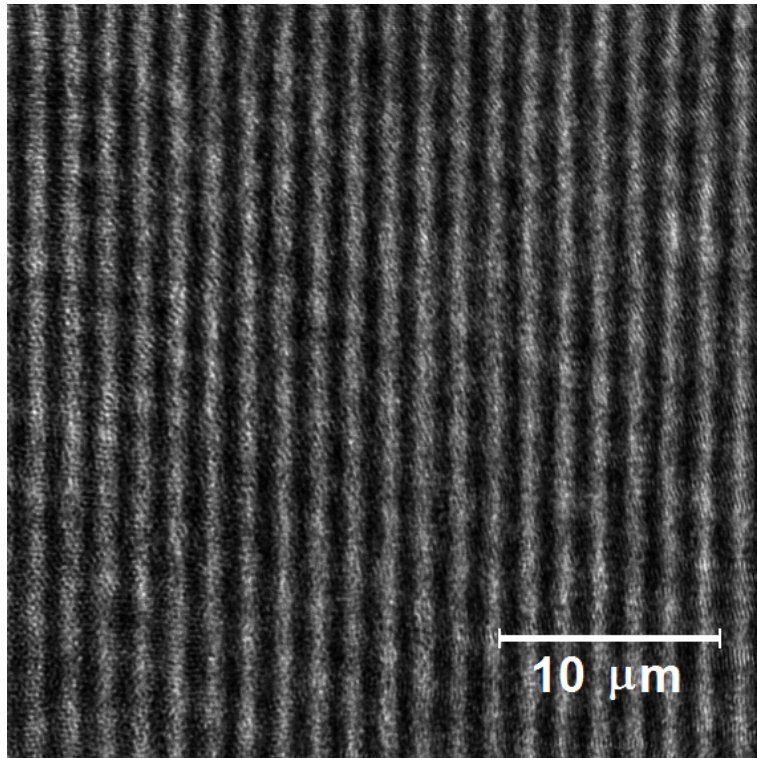


Figura 3.2: Imagem de uma rede de difração desfocalizada observada no monitor. Ela possui período, $\lambda_{rede} = (1.70 \pm 0.05)\mu m$ e amplitude $h_{AFM} = (57.1 \pm 0.7)nm$. A iluminação feita com um laser He-Ne ($\lambda_{laser} = 6328\text{\AA}$).

O próximo passo consiste em deslocar a amostra com uma velocidade constante, em relação à objetiva, e ao mesmo tempo capturar, utilizando a câmera CCD, as variações na imagem observada. Esse deslocamento se dá na direção perpendicular ao plano da amostra, neste caso direção z . A velocidade de deslocamento utilizada foi de $10 \mu\text{m}/\text{s}$ num intervalo de $300 \mu\text{m}$. A câmera utilizada consegue capturar $15 \text{quadros}/\text{s}$, então capturamos imagens a cada $0.67 \mu\text{m}$ de desfocalização. Para cada experimento foi gravado um filme contendo 450 quadros.

3.4 Calibração da Câmera

A câmera nos fornece informações em níveis de cinza, como estamos interessados na intensidade de luz fizemos uma calibração para encontrar a relação entre nível de cinza e intensidade de luz. Essa relação depende do ganho utilizado na câmera, para todos os experimentos utilizamos o mesmo valor de ganho.

Posicionamos uma lamínula de vidro sobre o porta amostra e para cada intensidade de luz gravamos um filme de 150quadros . Para determinação da intensidade de luz utilizamos um contador de fótons (EGG-Photo Counting Module, SPCM-200-PQ-F500). O nível de cinza é obtido através da média de todos os pixels da imagem média de todos os quadros. O tratamento das imagens capturadas é feito utilizando o software de domínio público ImageJ.

Observamos que os níveis de cinza (N) e a intensidade (I) obedecem a seguinte relação linear:

$$N = b + aI \Leftrightarrow I = \frac{N - b}{a}, \quad (3.1)$$

como visto na figura 3.3.

Utilizando a expressão da intensidade, o contraste será:

$$\begin{aligned} C &= \frac{I - I_0}{I_0} \\ &= \frac{N - N_0}{N_0} \left(\frac{N_0}{N_0 - b} \right) \end{aligned} \quad (3.2)$$

onde N_0 é o nível de cinza médio da imagem. O parâmetro "b", é obtido através do ajuste linear da relação entre N e I como vemos na figura abaixo:

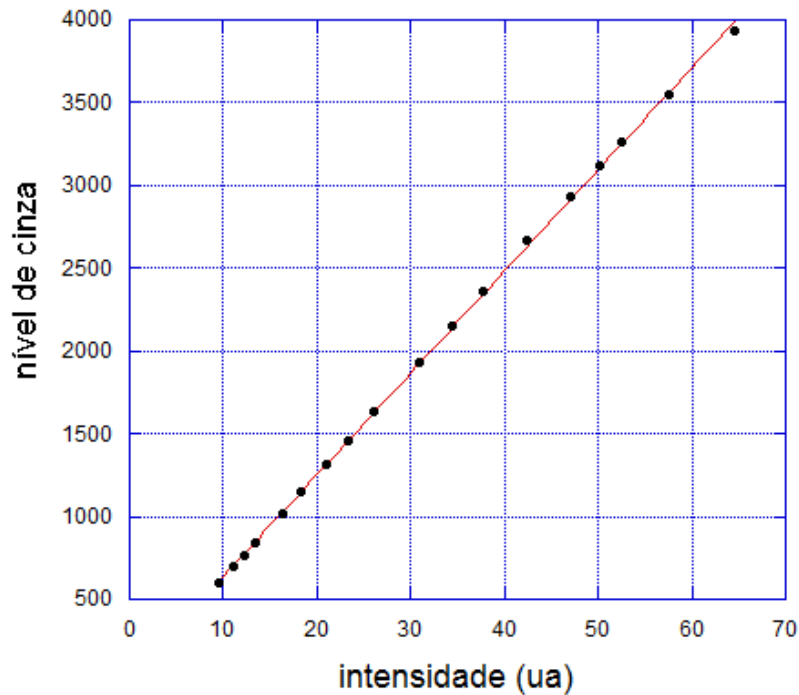


Figura 3.3: Calibração de Intensidades para o ganho 10.11 dB. A linha em vermelho representa o ajuste linear, $N = (23 \pm 10) + (61.5 \pm 0.3)I$.

Se utilizarmos um valor de 2000 para o nível de cinza médio, N_0 , vemos que o fator de correção do contraste, $\frac{N_0}{N_0 - b} \approx 1.01$, é muito próximo da unidade o que significa que o contraste da intensidade, $\frac{I - I_0}{I_0}$, é muito próximo do contraste dos níveis de cinza, $\frac{N - N_0}{N_0}$. Em nossos experimentos sempre determinamos o fator de correção para obter o valor correto do contraste.

Capítulo 4

Resultados e Discussões

Neste capítulo apresentaremos a caracterização das redes de difração através de medidas de AFM, explicaremos a metodologia utilizada na análise dos dados coletados e finalmente discutiremos os resultados obtidos com a microscopia de des-focalização.

4.1 Caracterização das Redes de Difração

As medidas de AFM foram realizadas para determinar o perfil das redes de difração. Utilizamos dois softwares para o tratamento das imagens, Nova e ImageJ. A figura 4.1 ilustra o perfil típico obtido para uma das amostras utilizando o software Nova.

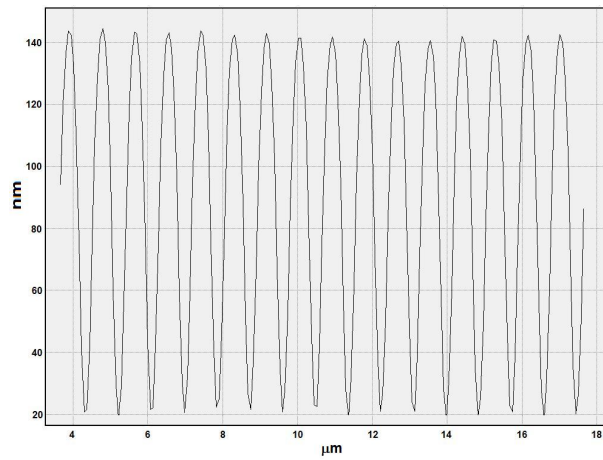


Figura 4.1: Perfil de uma rede de difração obtida da imagem de AFM. O período obtido foi $(0.78 \pm 0.05) \mu m$ e a amplitude de $(68 \pm 2) nm$.

Uma imagem 3D também pode ser obtida das imagens de AFM, como mostra a figura 4.2.

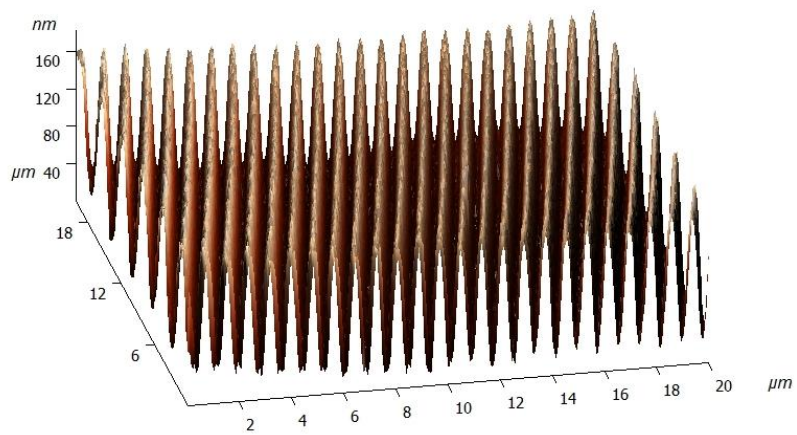


Figura 4.2: Imagem 3D da mesma amostra da imagem da figura 4.1.

Não apresentaremos todas as imagens das amostras pois elas apresentam o mesmo perfil, diferindo apenas no período e na amplitude.

Para o cálculo do período utilizamos o software Nova, nele existe uma ferramenta que nos fornece a distância entre dois pontos selecionados. Para cada amostra fizemos uma série de medidas e depois determinamos o valor médio do período.

A amplitude foi calculada utilizando o software ImageJ. De posse das imagens de AFM, aplicamos a transformada de Fourier à imagem e usando o software ImageJ, obtemos o espectro de potência com as frequências e suas respectivas amplitudes, como ilustra a figura 4.3:

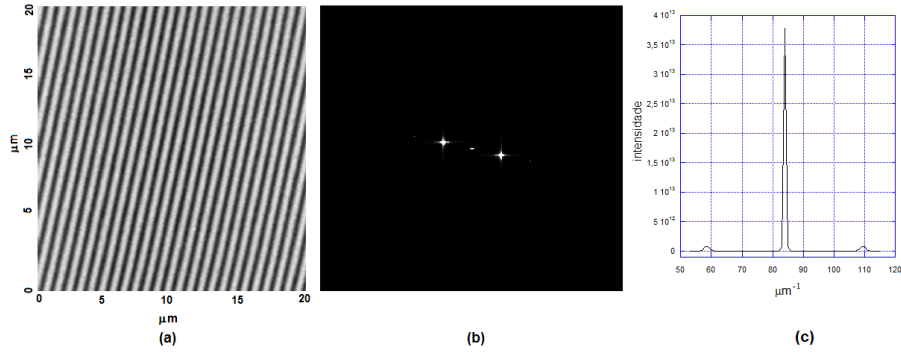


Figura 4.3: (a) Imagem de AFM de uma rede de difração, (b) espectro de potência da mesma imagem e (c) perfil do espectro de potência.

Através do espectro de potência podemos calcular a amplitude para cada frequência através da seguinte relação:

$$Amplitude = \frac{\sqrt{Intensidade}}{\acute{a}rea}. \quad (4.1)$$

Todas imagens possuem área de 256^2 pixel². A amplitude da 1ª ordem, A_1 é calculada somando a contribuição dos dois picos em torno do pico central mostrados na figura 4.3-c. A amplitude da rede de difração, h_{AFM} , será dada por:

$$h_{AFM} = A_1. \quad (4.2)$$

A tabela 4.1 mostra o resultado obtido para o período, λ_{rede} , e amplitude, h_{AFM} , para cada uma das amostras.

Amostra	λ_{rede} (μm)	h_{AFM} (nm)
1	0.61 ± 0.02	73.5 ± 0.5
2	0.76 ± 0.04	59.9 ± 0.3
3	0.78 ± 0.05	68 ± 2
4	1.01 ± 0.05	118 ± 4
5	1.31 ± 0.03	115 ± 3
6	1.33 ± 0.05	36.1 ± 0.2
7	1.67 ± 0.05	54.2 ± 0.8
8	1.70 ± 0.05	57.1 ± 0.7

Tabela 4.1: Tabela contendo os valores do período e amplitudes para as redes de difração.

No capítulo 2, encontramos expressões para o contraste de uma imagem de um objeto de fase desfocalizado. Observando as imagens de AFM, vemos que a periodicidade das redes se dá em apenas uma direção, como mostra a figura 4.4.

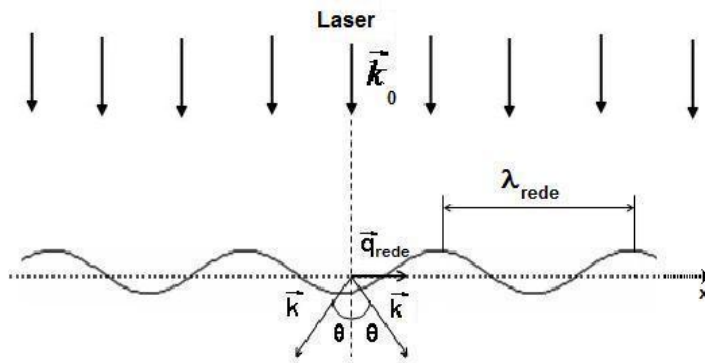


Figura 4.4: Esquema do perfil da uma rede de difração mostrando os vetores de onda difratados, \vec{k} , e da rede, \vec{q}_{rede} .

Assim podemos reescrever a equação 2.95 como:

$$\begin{aligned}
C(x) = & \frac{1}{J_0^2(\Delta nk_0 h) + 2J_1^2(\Delta nk_0 h) + 2J_2^2(\Delta nk_0 h)} \left[-4J_0(\Delta nk_0 h)J_1(\Delta nk_0 h)\text{sen}(q_{rede}x) \times \right. \\
& \times \text{sen}\left(\frac{\Delta f}{2k}q_{rede}^2\right) + 4J_0(\Delta nk_0 h)J_2(\Delta nk_0 h)\text{cos}(2q_{rede}x)\text{cos}\left(\frac{4\Delta f}{2k}q_{rede}^2\right) + \\
& + 8J_1(\Delta nk_0 h)J_2(\Delta nk_0 h)\text{cos}(2q_{rede}x)\text{sen}(q_{rede}x)\text{sen}\left(\frac{3\Delta f}{2k}q_{rede}^2\right) + \\
& \left. - 2J_1^2(\Delta nk_0 h)\text{cos}(2q_{rede}x) + 2J_2^2(\Delta nk_0 h)\text{cos}(4q_{rede}x) \right].
\end{aligned} \tag{4.3}$$

4.2 Comprimento de Desfocalização

Para determinarmos o comprimento de desfocalização vamos primeiro analisar os termos da equação 4.3. Utilizando a maior amplitude para termos os maiores valores para o argumento $\Delta nk_0 h$ e utilizando $\Delta n = 0.50$, podemos ver que os termos $4J_0(\Delta nk_0 h)J_2(\Delta nk_0 h) \simeq 0.155$ e $8J_1(\Delta nk_0 h)J_2(\Delta nk_0 h) \simeq 0.096$, que dependem de Δf , são pequenos se comparados à $4J_0(\Delta nk_0 h)J_1(\Delta nk_0 h) \simeq 1.034$, então a contribuição desses termos pode ser desprezada. A equação 4.3 torna-se:

$$C(x) = \frac{-4J_0(\Delta nk_0 h)J_1(\Delta nk_0 h)}{J_0^2(\Delta nk_0 h) + 2J_1^2(\Delta nk_0 h) + 2J_2^2(\Delta nk_0 h)} \text{sen}(q_{rede}x)\text{sen}\left(\frac{\Delta f}{2k}q_{rede}^2\right), \tag{4.4}$$

com frequência de oscilação, f_{desf} , dada por:

$$\begin{aligned}
f_{desf} &= \frac{q_{rede}^2}{2nk_0}, \\
\frac{2\pi}{\lambda_{desf}} &= \frac{q_{rede}^2}{2nk_0}, \\
\lambda_{desf} &= 2n \frac{\lambda_{rede}^2}{\lambda_{laser}},
\end{aligned} \tag{4.5}$$

onde n é o índice de refração do meio, λ_{laser} é o comprimento de onda do laser, λ_{rede} corresponde ao período da rede de difração e λ_{desf} corresponde ao comprimento de desfocalização.

Para determinar o comprimento de desfocalização de cada rede, traçamos um gráfico do contraste em função da desfocalização. Para a medida do contraste selecionamos uma região de contraste constante, com área 1024×1 (píxel)², da imagem e efetuamos uma média sobre de todos os píxels dessa região, como mostra a figura 4.5.

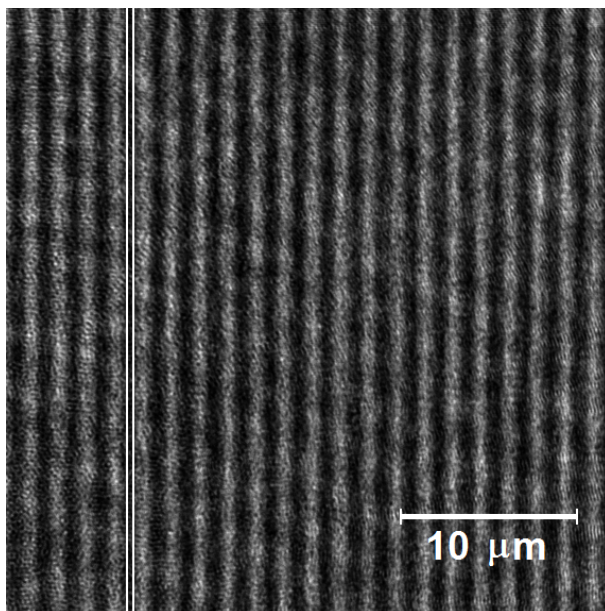


Figura 4.5: Imagem exemplificando a seleção utilizada para o cálculo do contraste em função da desfocalização.

Isto é feito para cada quadro e como resultado obtemos um valor de contraste em função da desfocalização. A figura 4.7 ilustra um dos resultados obtidos para o contraste:

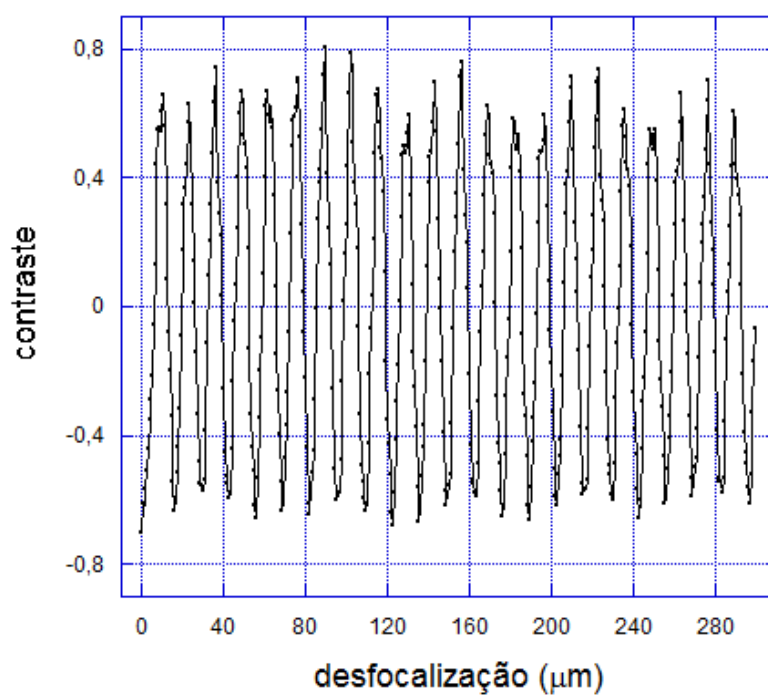


Figura 4.6: Gráfico do contraste em função da desfocalização obtido em um dos experimentos. O comprimento de desfocalização correspondente é $(13.33 \pm 0.01) \mu m$.

Para determinar o comprimento de desfocalização, λ_{desf} , aplicamos a transformada de Fourier ao gráfico do contraste e ajustamos uma gaussiana no resultado obtido. O ajuste nos fornece o resultado para λ_{desf} , como mostra o gráfico abaixo:

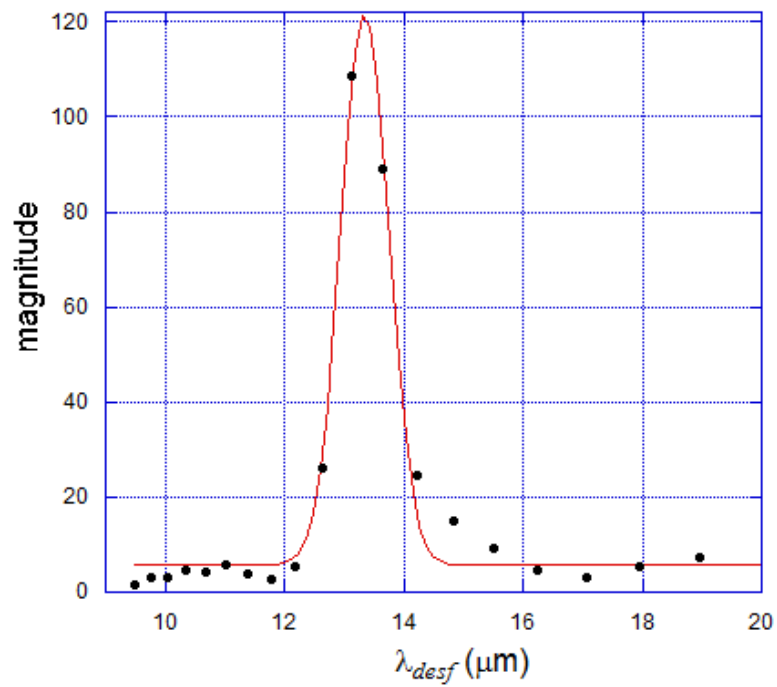


Figura 4.7: Transformada de Fourier do contraste do gráfico da figura . A curva vermelha representa o ajuste e os pontos referem-se ao resultado do experimento. O comprimento de desfocalização encontrado foi $\lambda_{desf} = (13.3 \pm 0.4)\mu\text{m}$.

Esse procedimento é aplicado a todos os experimentos. A tabela 4.2 mostra os resultados obtidos.

Amostra	$\lambda_{rede} (\mu m)$	$\lambda_{desf} \text{ experimental } (\mu m)$
1	0.61 ± 0.02	1.488 ± 0.004
2	0.76 ± 0.04	2.88 ± 0.02
3	0.78 ± 0.05	2.89 ± 0.02
4	1.01 ± 0.05	4.69 ± 0.04
5	1.31 ± 0.03	8.19 ± 0.07
6	1.33 ± 0.05	8.2 ± 0.1
7	1.67 ± 0.05	13.3 ± 0.4
8	1.70 ± 0.05	13.3 ± 0.4

Tabela 4.2: Valores do comprimento desfocalização obtido nos experimentos.

Nossos resultados mostram que o valor experimental obtido para os períodos de desfocalização se aproximam dos valores esperados utilizando $n = 1.5$, como mostra a figura 4.8.

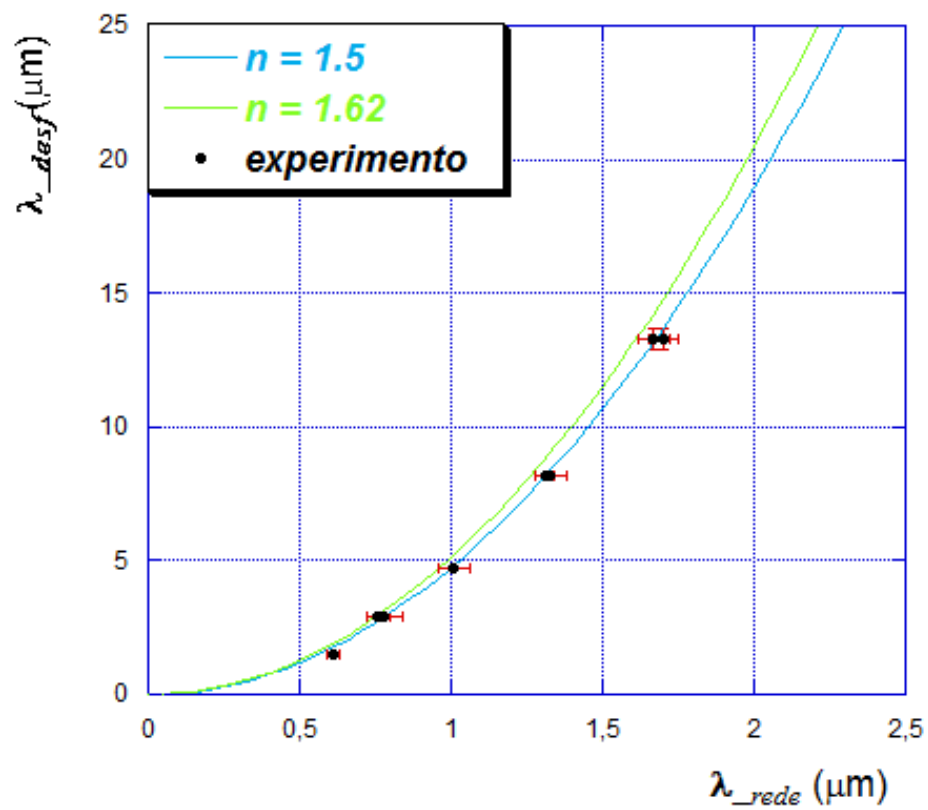


Figura 4.8: Gráfico do comprimento de desfocalização obtido experimentalmente e os valores esperados para os índices de refração 1.5 e 1.62. Vemos que os dados se ajustam bem melhor ao índice de refração do vidro.

A fotorresina, de índice de refração $n = 1.62$ é depositada sobre uma lamínula de vidro que possui índice de refração, $n=1.5$. O óleo utilizado acima do objetiva também apresenta o mesmo índice de refração da lamínula. O resultado sugere que o índice de refração a ser utilizado na equação 4.5 é o índice de refração do vidro, ou seja, o meio em que se dá a maior parte da propagação do vetor de onda difratado pelo objeto de fase.

4.3 Amplitude do contraste

Continuando a análise para obter informações quantitativas sobre os objetos de fase, precisamos verificar se a amplitude obtida com a teoria da Microscopia de Desfocalização está de acordo com nossos resultados de AFM. Concluímos da equação 2.95 que utilizando o valor máximo do contraste podemos calcular a amplitude do objeto.

Descreveremos agora o procedimento utilizado para o cálculo da amplitude do contraste para cada amostra utilizada. A figura 4.9 mostra o contraste ao longo de uma linha da imagem desfocalizada da figura 3.2.

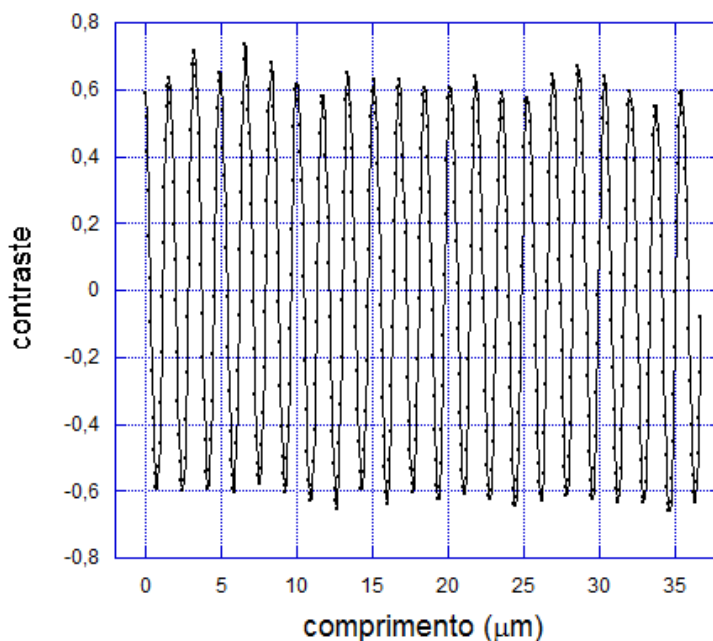


Figura 4.9: Contraste ao longo de uma linha da imagem desfocalizada da figura 3.2.

A amplitude máxima do contraste foi medida a partir das imagens desfocal-

izadas das redes de difração.

Com o software ImageJ calculamos a transformada de Fourier para alguns quadros do filme onde observamos que o contraste alcançava um valor máximo. A figura 4.10-a representa a imagem desfocalizada de uma rede de difração neste ponto de máximo de contraste. Ao calcularmos a transformada de Fourier desta imagem, obtemos as frequências com as respectivas intensidades, que podem ser vistas na figura 4.10-b e c, que representa o espectro de potência da imagem.

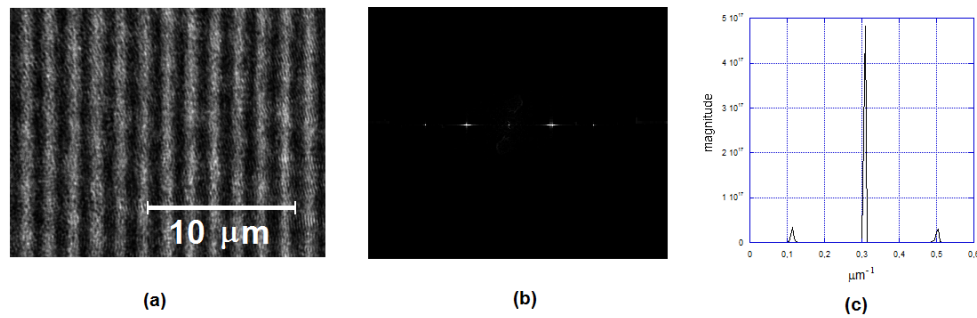


Figura 4.10: (a) Imagem de uma rede de difração desfocalizada obtida nos experimentos e seu espectro de potência (b) e (c) perfil do espectro de potência.

O ponto central corresponde à ordem zero, os laterais correspondem à primeira ordem e os dois subseqüentes estão relacionados com a segunda ordem.

A amplitude correspondente à cada frequência é calculada através da equação 4.1, a área das imagens é de 1024^2 píxel²

Neste trabalho consideraremos somente a primeira ordem para definir o contraste, pois as ordens superiores tem um efeito muito pequeno no contraste, como foi mostrado na seção anterior.

A amplitude da ordem zero, A_0 , está associada ao *contraste médio* da imagem. A amplitude do contraste, C_{max} , é calculada dividindo a amplitude da primeira ordem A_1 pelo *contraste médio*:

$$C_{max} = \frac{A_1}{A_0}. \quad (4.6)$$

Este cálculo é realizado para vários quadros e depois tomamos a média dos resultados obtidos.

Para que a análise seja consistente vamos calcular a Transformada de Fourier da equação 2.94:

$$\begin{aligned} \mathfrak{F}\{I(\vec{\rho})\} &= \int I(\vec{\rho}) e^{-i\vec{q}' \cdot \vec{\rho}} d\vec{\rho} \\ &= \left[J_0^2(\Delta nk_0 h) + 2J_1^2(\Delta nk_0 h) + 2J_2^2(\Delta nk_0 h) \right] \delta(0) + \\ &+ \left[-\frac{2J_0(\Delta nk_0 h)J_1(\Delta nk_0 h)}{i} \text{sen} \left(\frac{\Delta f}{2k} q_{rede}^2 \right) + \right. \\ &- \left. \frac{2J_0(\Delta nk_0 h)J_1(\Delta nk_0 h)}{i} \text{sen} \left(\frac{3\Delta f}{2k} q_{rede}^2 \right) \right] \times \\ &\times \delta(\vec{q} - \vec{q}') + \left[\frac{2J_0(\Delta nk_0 h)J_1(\Delta nk_0 h)}{i} \text{sen} \left(\frac{\Delta f}{2k} q_{rede}^2 \right) + \right. \\ &+ \left. \frac{2J_0(\Delta nk_0 h)J_1(\Delta nk_0 h)}{i} \text{sen} \left(\frac{3\Delta f}{2k} q_{rede}^2 \right) \right] \times \delta(\vec{q} + \vec{q}'). \end{aligned} \quad (4.7)$$

Os termos de ordens superiores em \vec{q}' foram omitidos na equação acima. Somando as contribuições da primeira ordem, o contraste será dado por:

$$C(\vec{\rho}) = \frac{4J_0(\Delta nk_0 h)J_1(\Delta nk_0 h)\text{sen}\left(\frac{\Delta f}{2k}q_{rede}^2\right) + 4J_1(\Delta nk_0 h)J_2(\Delta nk_0 h)\text{sen}\left(\frac{3\Delta f}{2k}q_{rede}^2\right)}{J_0^2(\Delta nk_0 h) + 2J_1^2(\Delta nk_0 h) + 2J_2^2(\Delta nk_0 h)}. \quad (4.8)$$

O contraste máximo, encontrado para $\frac{\Delta f}{2k}q_{rede}^2 = \pi/2$, é dado por:

$$C(\vec{\rho})_{max} = \frac{4J_0(\Delta nk_0 h)J_1(\Delta nk_0 h) - 4J_1(\Delta nk_0 h)J_2(\Delta nk_0 h)}{J_0^2(\Delta nk_0 h) + 2J_1^2(\Delta nk_0 h) + 2J_2^2(\Delta nk_0 h)}. \quad (4.9)$$

Traçamos o gráfico do contraste em função de h , mostrado na figura 4.11. O índice de refração da fotorresina tabelado é 1.62, então utilizamos $\Delta n = 0.62$. E $k_0 = \frac{2\pi}{\lambda_{laser}}$. Com os valores de contraste obtidos nos experimentos determinamos o valor da amplitude para cada amostra.

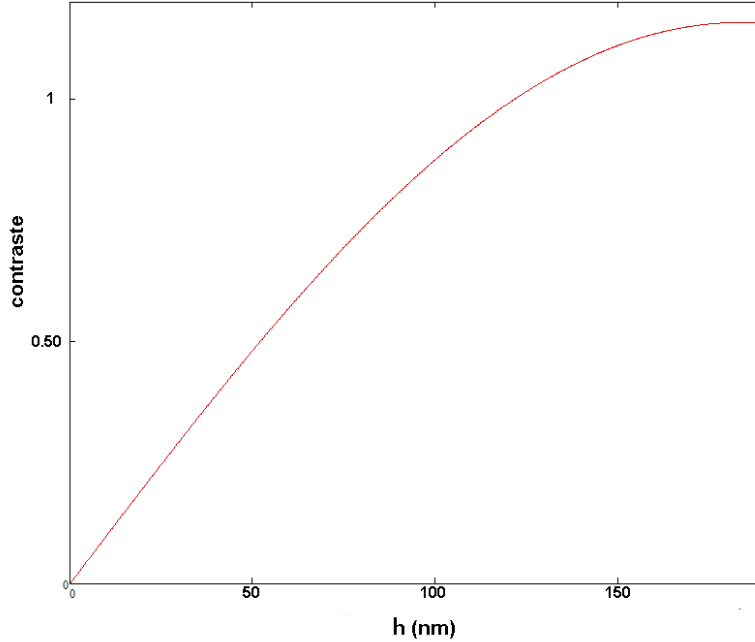


Figura 4.11: Gráfico do contraste em função de h .

Chamaremos a amplitude das redes obtida através da Microscopia de Desfocalização de h_{desf} . Para verificar a validade da técnica, comparamos os resultados obtidos com as medidas de AFM. A tabela abaixo mostra os valores obtidos:

$\lambda_{rede} (\mu m)$	$h_{AFM}(nm)$	$h_{desf} (nm)$	$\frac{h_{desf}}{h_{AFM}}$
0.61 ± 0.02	73.5 ± 0.5	32 ± 5	0.43 ± 0.07
0.76 ± 0.04	59.9 ± 0.3	51 ± 4	0.85 ± 0.07
0.78 ± 0.05	68 ± 2	52 ± 5	0.76 ± 0.09
1.01 ± 0.05	118 ± 4	91 ± 4	0.77 ± 0.06
1.31 ± 0.03	115 ± 3	100 ± 10	0.90 ± 0.10
1.33 ± 0.05	36.1 ± 0.2	32 ± 4	0.90 ± 0.10
1.67 ± 0.05	54.2 ± 0.8	45 ± 3	0.83 ± 0.07
1.70 ± 0.05	57.1 ± 0.7	54 ± 6	0.9 ± 0.1

Tabela 4.3: Tabela mostrando as amplitudes h_{AFM} , h_{desf} e a razão calculada entre elas, utilizando $\Delta n = 0.62$

A figura 4.12 ilustra os resultados obtidos para a razão das amplitudes em função do período da rede normalizado pelo comprimento de onda da laser:

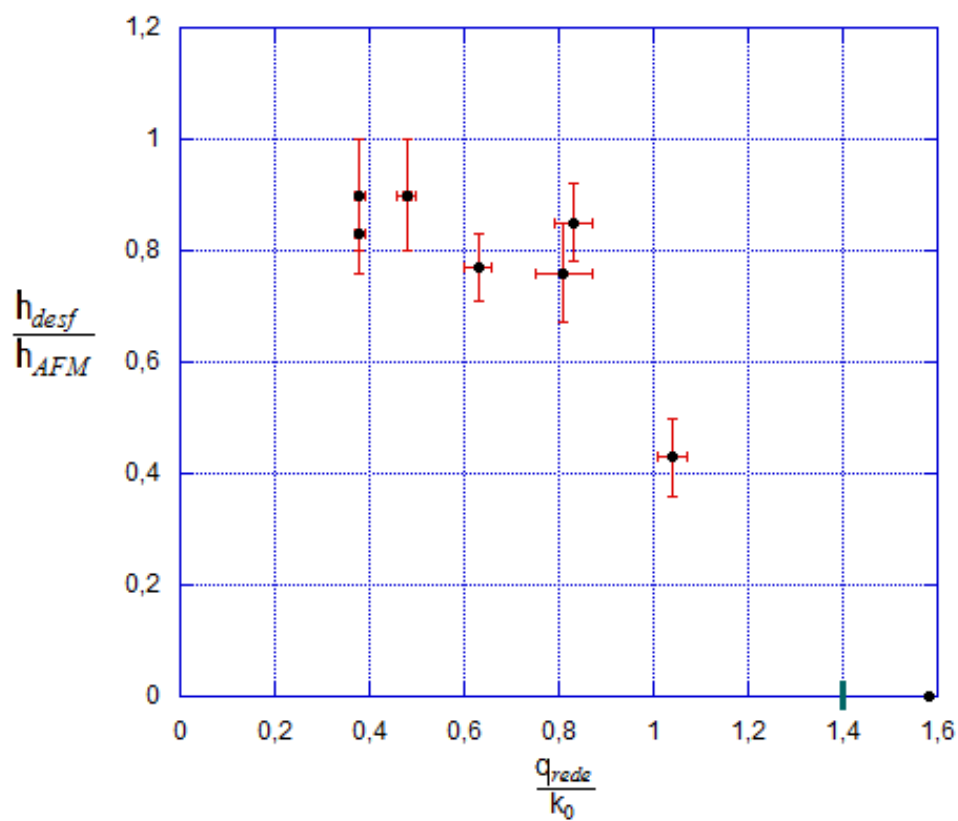


Figura 4.12: Gráfico da razão entre as amplitudes em função do vetor de onda da rede normalizado pelo vetor de onda do laser, utilizando $\Delta n = 0.62$. O ponto marcado em verde representa a abertura numérica da objetiva, não conseguimos coletar vetores de onda difratados, normalizado pelo vetor de onda da luz incidente, maiores que esse valor.

Vemos que a razão entre as amplitudes se aproxima da unidade para vetores de onda da rede correspondente a aproximadamente 90% do vetor de onda do laser. Acima desse valor, o resultado da microscopia de desfocalização não acompanha o valor esperado encontrando pela medida de AFM, isto sugere que a aproximação paraxial já não é mais válida a partir desse valor. Uma estimativa para a validade da aproximação paraxial, a partir destes dados, seria um ângulo de aproximadamente 40° em torno do eixo de propagação da laser.

A abertura numérica da objetiva é de $N = 1.40$, o período da rede mínimo para que se observe um padrão de difração é:

$$\begin{aligned} \text{sen}(\theta_{max}) &= \frac{q_{rede}^{max}}{k} \\ \lambda_{rede}^{min} &= \frac{\lambda_{laser}}{\underbrace{n \text{sen}(\theta_{max})}_{NA}} \\ \lambda_{rede}^{min} &\approx 0.45 \mu m. \end{aligned} \tag{4.10}$$

O ponto cuja razão entre as amplitudes é nula reflete essa condição. O período da rede correspondente para esse ponto é $\lambda_{rede} = 0.40 \mu m$.

É possível que a diferença de índice de refração que deveria ser utilizada seja uma média entre o índice de refração da fotorresina (1.62) e do vidro (1.50), o que devemos verificar fazendo experimentos adicionais. Como exemplo, se utilizarmos o valor de $\Delta n = 0.50$, que corresponde à diferença de índice de refração entre o vidro e a água, observamos que os valores da razão entre as amplitudes ficam um pouco acima da unidade. Esses resultados podem ser vistos na tabela 4.3 e na figura 4.13:

$\lambda_{rede} (\mu m)$	$h_{AFM}(\text{nm})$	$h_{desf} (\text{nm})$	$\frac{h_{desf}}{h_{AFM}}$
0.61 ± 0.02	73.5 ± 0.5	40 ± 6	0.54 ± 0.09
0.76 ± 0.04	59.9 ± 0.3	64 ± 5	1.07 ± 0.09
0.78 ± 0.05	68 ± 2	66 ± 6	1.0 ± 0.1
1.01 ± 0.05	118 ± 4	112 ± 5	0.95 ± 0.07
1.31 ± 0.03	115 ± 3	130 ± 20	1.1 ± 0.2
1.33 ± 0.05	36.1 ± 0.2	40 ± 3	1.11 ± 0.09
1.67 ± 0.05	54.2 ± 0.8	56 ± 3	1.03 ± 0.07
1.70 ± 0.05	57.1 ± 0.7	67 ± 7	1.2 ± 0.1

Tabela 4.4: Tabela mostrando as amplitudes h_{AFM} , h_{desf} e a razão calculada entre elas, utilizando $\Delta n = 0.50$

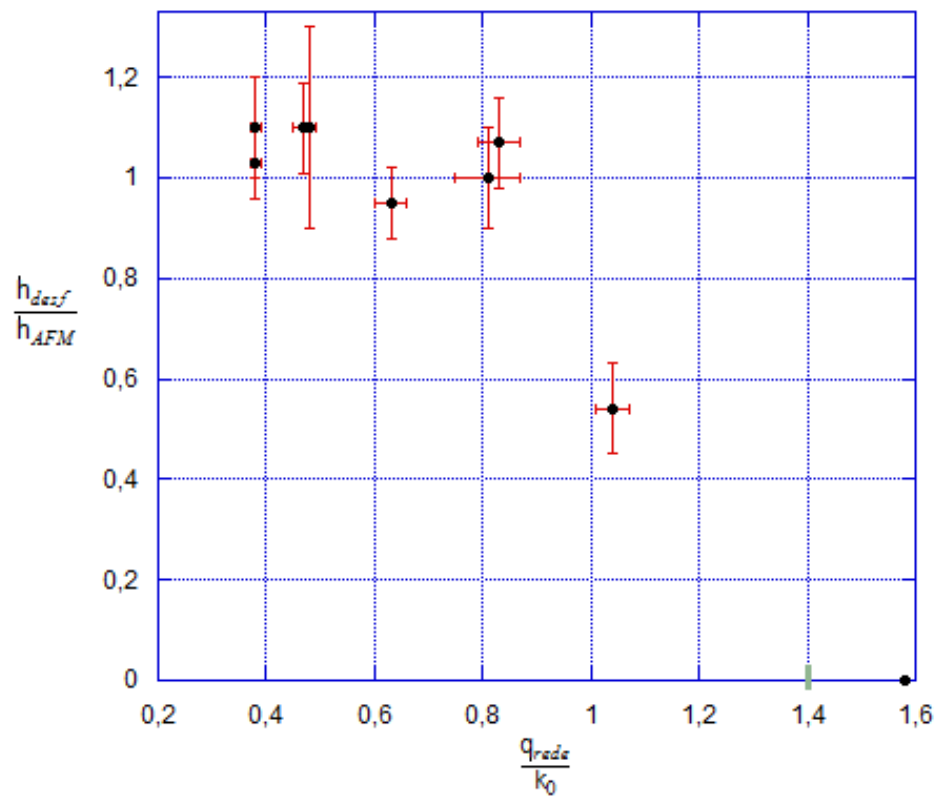


Figura 4.13: Gráfico da razão entre as amplitudes em função do vetor de onda da rede normalizado pelo vetor de onda do laser, utilizando $\Delta n = 0.50$. O ponto marcado em verde representa a abertura numérica da objetiva, não conseguimos coletar vetores de onda difratados, normalizado pelo vetor de onda da luz incidente, maiores que esse valor.

Capítulo 5

Conclusões e Perspectivas

Neste trabalho utilizamos como objetos de fase, redes de difração com período e amplitudes conhecidos, para aprimoramos o modelo óptico da Microscopia de Desfocalização e verificar seus limites de validade. Mostramos que ele é válido para grandes desfocalizações, da ordem de $300\mu m$, e que pode ser aplicado ao estudo de objetos com vetores de onda da ordem de até $9\mu m^{-1}$, se utilizarmos iluminação $\lambda_{laser} = 6328\text{\AA}$.

Aplicando a técnica à esses objetos concluímos que o contraste da imagem varia senoidalmente em função da desfocalização, Δf . As medidas do comprimento de desfocalização, λ_{desf} , concordam muito bem com a previsão teórica.

Conseguimos obter informações quantitativas sobre a amplitude de objetos de fase quando estão desfocalizados. Os resultados experimentais da microscopia de desfocalização para as amplitudes das redes se aproximam em até 90 % do valor encontrado através das medidas de AFM, quando usamos o índice de refração tabelado da fotorresina, e concorda excepcionalmente bem se usamos o índice de refração do vidro. Pretendemos usar meios com índices de refração diferentes para entender melhor o comportamento da amplitude obtida através da Microscopia de Desfocalização. Os resultados sugerem que o índice de refração a ser utilizado pode depender de uma combinação entre os índices da fotorresina e do vidro.

Ainda como perspectivas do nosso trabalho, pretendemos ampliar o estudo utilizando fontes de luz não monocromáticas, pois grande parte dos microscópios ópticos apresentam essa característica.

Lista de Figuras

2.1	Coordenadas do sistema de referência: (a) no espaço real e (b) no espaço dos vetores de ondas	6
2.2	Representação das coordenadas e espessura da lente delgada	9
2.3	Representação das três regiões da lente: (a) parte convexa, (b) região central e (c) parte côncava; (d) distâncias utilizadas para o cálculo da fase.	10
2.4	Esquema óptico do microscópio com óptica corrigida no infinito: S é a fonte de luz, um laser He-Ne, L_1 é a lente objetiva com distância focal f_1 , L_2 é a lente de tubo com distância focal f_2 , O é objeto que está no foco de L_1 , d é a distância entre as lentes, I é o plano imagem que está no plano focal de L_2	15
2.5	Esquema do microscópio desfocalizado: objeto está desfocalizado de uma pequena distância Δf ; as lentes estão separadas por uma distância d e a imagem é formada desfocalizada no plano I.	16
2.6	Esboço de um objeto de fase. \vec{E}_0 é o campo elétrico incidente; $h(\vec{\rho})$ é a amplitude do objeto; n_1 e n_2 são os índices de refração do meio por onde o campo elétrico se propaga; $\vec{\rho}$ é o vetor posição no plano (x, y) perpendicular à direção z de propagação do campo elétrico	22
3.1	Esquema da montagem experimental utilizada nos experimentos.	32
3.2	Imagem de uma rede de difração desfocalizada observada no monitor. Ela possui período, $\lambda_{rede} = (1.70 \pm 0.05)\mu m$ e amplitude $h_{AFM} = (57.1 \pm 0.7)nm$. A iluminação feita com um laser He-Ne ($\lambda_{laser} = 6328\text{Å}$).	34
3.3	Calibração de Intensidades para o ganho 10.11 dB. A linha em vermelho representa o ajuste linear, $N = (23 \pm 10) + (61.5 \pm 0.3)$	36

4.1	Perfil de uma rede de difração obtida da imagem de AFM. O período obtido foi $(0.78 \pm 0.05) \mu m$ e a amplitude de $(68 \pm 2) nm$	38
4.2	Imagem 3D da mesma amostra da imagem da figura 4.1.	38
4.3	(a) Imagem de AFM de uma rede de difração, (b) espectro de potência da mesma imagem e (c) perfil do espectro de potência.	39
4.4	Esquema do perfil da uma rede de difração mostrando os vetores de onda difratados, \vec{k} , e da rede, \vec{q}_{rede}	40
4.5	Imagem exemplificando a seleção utilizada para o cálculo do contraste em função da desfocalização.	42
4.6	Gráfico do contraste em função da desfocalização obtido em um dos experimentos. O comprimento de desfocalização correspondente é $(13.33 \pm 0.01) \mu m$	43
4.7	Transformada de Fourier do contraste do gráfico da figura . A curva vermelha representa o ajuste e os pontos referem-se ao resultado do experimento. O comprimento de desfocalização encontrado foi $\lambda_{desf} = (13.3 \pm 0.4) \mu m$	44
4.8	Gráfico do comprimento de desfocalização obtido experimentalmente e os valores esperados para os índices de refração 1.5 e 1.62. Vemos que os dados se ajustam bem melhor ao índice de refração do vidro.	46
4.9	Contraste ao longo de uma linha da imagem desfocalizada da figura 3.2.	48
4.10	(a) Imagem de uma rede de difração desfocalizada obtida nos experimentos e seu espectro de potência (b) e (c) perfil do espectro de potência.	49
4.11	Gráfico do contraste em função de h	51
4.12	Gráfico da razão entre as amplitudes em função do vetor de onda da rede normalizado pelo vetor de onda do laser, utilizando $\Delta n = 0.62$. O ponto marcado em verde representa a abertura numérica da objetiva, não conseguimos coletar vetores de onda difratados, normalizado pelo vetor de onda da luz incidente, maiores que esse valor.	53

4.13 Gráfico da razão entre as amplitudes em função do vetor de onda da rede normalizado pelo vetor de onda do laser, utilizando $\Delta n = 0.50$. O ponto marcado em verde representa a abertura numérica da objetiva, não conseguimos coletar vetores de onda difratados, normalizado pelo vetor de onda da luz incidente, maiores que esse valor. 56

Lista de Tabelas

4.1	Tabela contendo os valores do período e amplitudes para as redes de difração.	40
4.2	Valores do comprimento desfocalização obtido nos experimentos. . . .	45
4.3	Tabela mostrando as amplitudes h_{AFM} , h_{desf} e a razão calculada entre elas, utilizando $\Delta n = 0.62$	52
4.4	Tabela mostrando as amplitudes h_{AFM} , h_{desf} e a razão calculada entre elas, utilizando $\Delta n = 0.50$	55

Referências Bibliográficas

- [1] **Agero, U., Monken, C. H., Ropert, C., Gazzinelli, R. T., and Mesquita, O. N.**, “Cell Surface Fluctuations Studied with Defocusing Microscopy.” *Physical Review E* 67, 051904 (2003).
- [2] **Agero, U., Mesquita, L. G., Neves, B. R. A., Gazzinelli, R. T., and Mesquita, O. N.**, “Defocusing Microscopy.” *Microscopy Research and Technique* 65, 159–165 (2004).
- [3] **Neto, J. C., Agero, U., Oliveira, D. C. P., Gazzinelli, R. T., and Mesquita, O. N.**, “Real-time Measurements of Surface Dynamics on Macrophages and the Phagocytosis of *Leishmania* Parasites.” *Experimental Cell Research* 303, 207–217 (2005).
- [4] **Mesquita, L. G., Agero, U., and Mesquita, O. N.**, “Defocusing Microscopy: An approach for Red Blood Cell Optics.” *Applied Physics Letters* 88, 133901 (2006).
- [5] **Batista, U. A.**, Microscopia de Desfocalização Aplicada ao Estudo de Fagocitose por Macrófagos. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil (2003).
- [6] **Glionna, G.**, Tomografia de Hemácias. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil (2009).
- [7] **Born, M. and Wolf, E.**, Principles of Optics. Cambridge University Press, New York, 7th ed. (1999).
- [8] **Murphy, D. B.**, Fundamental of Light Microscopy and Electronic Imaging. John Wiley Sons, New York (2001).

- [9] **Neto, J. C., Agero, U., Oliveira, D. C. P., Gazinelli, R. T., and Mesquita, O. N.**, “Measuring Optical and Mechanical Properties of a Living Cell with Defocusing Microscopy.” *Biophysics Journal* 91, 1108–1115 (2006).
- [10] **Goodman, J. W.**, Introduction to Fourier Optics. McGraw-Hill Co., Inc., New York (2002).
- [11] **Monken, C. H.**, “Teoria da Difração através da Óptica de Fourier.” *Notas de aulas do curso de Óptica - UFMG* .
- [12] **Garcia-Sucerquia, J., Castañeda, R., and Medina, F. F.**, “Fresnel-Fraunhofer diffraction and spatial coherence.” *Optics Communications* 205, 239–245 (2002).
- [13] **Mezouari, S. and Harvey, R.**, “Validity of Fresnel and Fraunhofer approximations in scalar diffraction.” *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics* 5, S86–S91 (2003).
- [14] **Rivera, L. E. G.**, Fabricação e Caracterização de NanoPeneiras Poliméricas. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil (2009).
- [15] **de Menezes, J. W.**, Projeto de Camadas Fotônicas 2D e Fabricação utilizando Múltiplas Exposições Holográficas. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil (2006).
- [16] **Fowles, G. R.**, Introduction to Modern Optics. Holt, Rinehart And Winston, INC., 2nd ed. (1968).
- [17] **Jackson, J. D.**, Classical Electrodynamics. John Wiley.
- [18] **Arfken, G. B. and Weber, H. J.**, Mathematical Methods for Physicists. Academic Press, New York (2001).
- [19] **Boas, M. L.**, Mathematical Methods in the Physical Science. John Wiley, 3rd ed.