

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Exatas

Programa de Pós-Graduação em Física

Augusto Vieira D'Assunção Freitas

**CONSTRUÇÃO DE UM OFTALMOSCÓPIO DE
VARREDURA A LASER ACOPLADO A TÉCNICAS
DE ESPALHAMENTO RAMAN ESTIMULADO**

Belo Horizonte
2025

Augusto Vieira D'Assunção Freitas

CONSTRUÇÃO DE UM OFTALMOSCÓPIO DE VARREDURA A LASER ACOPLADO A TÉCNICAS DE ESPALHAMENTO RAMAN ESTIMULADO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada e Interdisciplinar do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Leandro Malard Moreira

Belo Horizonte

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

F866c Freitas, Augusto Vieira D'Assunção.

Construção de um oftalmoscópio de varredura a laser acoplado a técnicas de espalhamento Raman estimulado / Augusto Vieira D'Assunção Freitas. – 2025.
81 f. : il.

Orientador: Leandro Malard Moreira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Departamento de Física.

Bibliografia: f. 74-79.

1. Efeito de Raman. 2. Oftalmologia – Equipamentos e acessórios. 3. Óptica não-linear. 4. Doença de Alzheimer. I. Título. II. Moreira, Leandro Malard. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Física.

CDU – 535 (043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

FOLHA DE APROVAÇÃO

A presente dissertação, intitulada "**Construção de um Oftalmoscópio de Varredura a Laser acoplado a Técnicas de Espalhamento Raman Estimulado**" de autoria de **AUGUSTO VIEIRA D'ASSUNÇÃO FREITAS** submetida à Comissão Examinadora, abaixo-assinada, foi aprovada para obtenção do grau de **MESTRE EM FÍSICA, Física Aplicada e Interdisciplinar**, em quatro de setembro de 2025.

Belo Horizonte, 04 de setembro de 2025.

Prof. Leandro Malard Moreira
Orientador do estudante
Departamento de Física/UFMG

Profa. Ana Maria de Paula
Departamento de Física/UFMG

Prof. Ubirajara Agero Batista
Departamento de Física/UFMG



Documento assinado eletronicamente por **Ubirajara Agero Batista, Servidor(a)**, em 05/09/2025, às 14:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Maria de Paula, Professora do Magistério Superior**, em 05/09/2025, às 16:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leandro Malard Moreira, Professor do Magistério Superior**, em 18/09/2025, às 09:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4522818** e o código CRC **3563AFD6**.

*Em dedicação aos meus pais,
Eliane Pinto Vieira e
Robert Einstein D'Assunção Freitas.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Robert e Eliane, que sempre se esforçaram para que eu pudesse atingir meus sonhos, além de me motivarem a segui-los. Por sempre exigirem meu melhor mas nunca faltando carinho, atenção ou risadas, muito obrigado.

Ao meu "tio Tungstênio", Dr. Rafael Pinto Vieira, que desde criança me inspira a seguir o caminho da ciência com seu entusiasmo, sempre me aconselhando nos momentos de dúvida e dificuldades e providenciando risadas ao longo do caminho.

À minha namorada, Maria Luiza, pelo amor e carinho que todos os dias me inspiram a ser alguém melhor e que espero sempre retribuir em igual ou maior medida. Você transforma cada momento ao seu lado no melhor da minha vida, impulsiona meu crescimento e me motiva a me esforçar para construir uma vida bela e plena.

Ao meu irmão, Ian Melo, que a cada dia que passa me traz mais orgulho. Que você seja esforçado o suficiente para que possa trilhar qualquer caminho da vida que queira com sucesso e felicidade.

À minha família, tão grande, feliz e unida como a qual fui presenteado. Aos meus avós, cuja disciplina, amor e esforço ao longo das décadas construiu alicerces tão firmes para as gerações vindouras, e cujos cuidados me moldaram no homem que sou hoje, compreendendo a importância do trabalho duro mas também de fazê-lo com humor e um sorriso no rosto. A todos meus tios, tias e parentes, próximos ou longínquos, de sangue ou não, com especial gratidão a Heloísa, Alexandre, Flávia, Fernando, Cristina, Márcia, Juarez, Maria Inês, Gilvam, Francisco Jr., Renata, Rafael, Juliana, Maria do Carmo, César, Leo e Gi que, por toda a companhia, risadas, felicidade e aprendizados ao longo dos anos, considero como pais e mães. Aos meus queridos primos, por serem os primeiros a quem chamei de amigos.

Ao meu orientador, Dr. Leandro Malard, pela mentoria, paciência e humor que fizeram deste mestrado um processo tão leve. Seus altos níveis de profissionalismo, conhecimento e paixão pela Física são louváveis e inspiradores, mas o caráter de sua pessoa é o que o torna tão admirável. Início o ciclo do Doutorado com a confiança que seu entusiasmo e apoio constantes nos permitirá continuar desenvolvendo um projeto de alto nível e relevância científica.

Aos professores do LabNS, Dr. Ado Jório, Dr. Carlos Monken e Dr. Luiz Gustavo Cançado, por manterem um clima tão positivo e inspirador no laboratório. Seus *inputs* se mostraram valiosos ao longo do desenvolvimento deste projeto e, juntos ao Dr. Malard, são figuras que nos inspiram diariamente a buscar novas alturas como Físicos.

Aos meus amigos de laboratório e FabNS, tão admiráveis e cujo companheirismo torna cada dia tão proveitoso: André, Bianca, Borsoi, Cacá, Cata, Danilo, Deybson, Diego, Douglas, Emerson, Fred, Gabi, Hudson, Jane, João Luiz, Joás, Lucas, Maíra, Malice, Márcia, Matheus, Miki, Rafael Nadas, Rafael Rojas, Raul, Taiguara, Thiago, Vitor Augusto, Vítor Monken e Willyam. Tenho certeza que o trabalho de cada um de vocês terá impactos incríveis neste mundo.

Ao Chico, que surgiu tão repentinamente na minha vida, mas que imediatamente a tornou tão mais feliz.

Aos meus amigos da UFSCar e do CNPEM, por todo o companheirismo ao longo dos anos. Onde quer que a vida os tenha levado, espero que encontrem sucesso e felicidade.

Aos corpos docentes e administrativos da UFSCar e da UFMG, em especial aos Professores Tribuzi, Santarelli, Ana de Paula, Mário e Vivaldo pelos ensinamentos.

Às agências de fomento FINEP e FAPEMIG, por financiarem a infraestrutura utilizada para a execução do experimento, e ao CNPq, por financiar minha bolsa.

RESUMO

O trabalho apresentado descreve o processo de fabricação de um protótipo de um Oftalmoscópio de Varredura a Laser (OVL) com o objetivo de diagnóstico não-invasivo de retinopatias por meio da integração com técnicas avançadas de espalhamento Raman Estimulado, em especial o diagnóstico da Doença de Alzheimer por meio da caracterização *in vivo* do peptídeo Beta-Amiloide. Inicialmente, apresentamos uma revisão teórica concisa sobre o Espalhamento Raman, partindo de sua forma espontânea e evoluindo até sua forma estimulada, e os fundamentos da óptica linear e não linear envolvidos em seus funcionamentos. Em seguida, são descritos os processos de montagem do OVL, incluindo os componentes ópticos e eletrônicos utilizados e *software* adaptado, com destaque para a integração com sistemas de varredura, detecção confocal e controle via LabVIEW. Resultados obtidos com fluorescência em amostras biológicas e um olho mecânico demonstram o funcionamento do sistema e sua aplicabilidade no imageamento de estruturas celulares. Por fim, são discutidos os próximos passos para correção de aberrações ópticas, otimização do funcionamento do sistema e implementação plena do imageamento Raman estimulado em ambiente clínico como uma evolução natural do projeto. Este trabalho representa um passo relevante na instrumentação óptica voltada ao diagnóstico precoce de retinopatias, com potencial de expansão para outras aplicações biomédicas baseadas em caracterização via espectroscopia vibracional.

Palavras-chave: Raman; Oftalmoscópio; Espalhamento Raman Anti-Stokes Coerente; Espalhamento Raman Estimulado; Fenômenos Ópticos Não-Lineares; Óptica não linear; Doença de Alzheimer;

ABSTRACT

The present work describes the development of a prototype Laser Scanning Ophthalmoscope (LSO) aimed at the non-invasive diagnosis of retinopathies through the integration of advanced Stimulated Raman Scattering (SRS) techniques, with particular focus on the diagnosis of Alzheimer's Disease via in vivo characterization of the beta-amyloid peptide. Initially, we present a concise theoretical overview of Raman Scattering, beginning with its spontaneous form and progressing to the stimulated regime, along with the fundamentals of linear and nonlinear optics involved in their mechanisms. Next, we describe the construction process of the LSO, including the optical and electronic components used and the adapted software, with emphasis on the integration with scanning systems, confocal detection, and LabVIEW-based control. Results obtained from fluorescence imaging of biological samples and a mechanical eye demonstrate the system's functionality and its applicability in imaging cellular structures. Finally, we discuss the next steps for correcting optical aberrations, optimizing system performance, and fully implementing SRS imaging in a clinical setting as a natural evolution of the project. This work represents a relevant step in optical instrumentation for the early diagnosis of retinopathies, with potential for expansion to other biomedical applications based on vibrational spectroscopy.

Keywords: Raman; Ophthalmoscope; Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS); Stimulated Raman Scattering (SRS); Nonlinear Optical Phenomena; Nonlinear Optics; Alzheimer's Disease.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Dipolo Molecular	14
Figura 2 – Oscilador de Lorentz Molecular	15
Figura 3 – Vibrações Moleculares	16
Figura 4 – Diversas vibrações moleculares possíveis do anel de Benzeno.	17
Figura 5 – Diagrama Espalhamento Raman	18
Figura 6 – Diagramas de Energia de Espalhamentos Lineares	19
Figura 7 – Espectro Raman do Poliestireno	21
Figura 8 – Modos ativos e inativos no Raman do Dióxido de Carbono.	23
Figura 9 – Moléculas Centrossimétricas e Não-Centrossimétricas	27
Figura 10 – Diagramas de Energia de Processos Não-Lineares de Segunda Ordem .	31
Figura 11 – Diagramas de Processos FWM e seus Diagramas de Energia.	33
Figura 12 – Diagramas de Energia de Processos Degenerados e Não-Degenerados FWM.	34
Figura 13 – Diagrama de Fenômenos CRS	38
Figura 14 – Diagramas de Energia para CARS e CSRS.	39
Figura 15 – Diagrama de Frequência CARS e CSRS.	39
Figura 16 – Diagramas de Energia de SRG e SRL.	40
Figura 17 – Microscopia Confocal.	44
Figura 18 – Imagens CARS de Axônios de Camundongo.	45
Figura 19 – Imagens CARS de Tecido Biológico.	45
Figura 20 – Espectro Raman da Placa Beta-Amiloide.	47
Figura 21 – Imageamento Multimodal da Beta-Amiloide.	47
Figura 22 – Diagrama OVL.	52
Figura 23 – Formação de Imagem por Pixels.	53
Figura 24 – Foto e Diagrama do OVL.	53
Figura 25 – Beamsplitter	54
Figura 26 – Espelhos.	55
Figura 27 – Espelhos de Varredura GVS002.	55
Figura 28 – Lentes de Escaneamento.	57
Figura 29 – Fotos do Olho Mecânico.	58
Figura 30 – Lâmina Fluorescente.	58
Figura 31 – Diagrama Sistema Confocal.	59
Figura 32 – Diagrama do Hardware do Sistema.	60
Figura 33 – Controles de Parâmetro do Software.	63
Figura 34 – Imagens Fluorescência Camundongo.	65

Figura 35 – Padrão Raster.	66
Figura 36 – Ondas de Controle dos Espelhos de Varredura.	67
Figura 37 – Comparativo de Imagens Raster e Zigue-Zague.	67
Figura 38 – Imagens OVL vs. Microscópio Laboratorial.	68
Figura 39 – Diagramas Miopia vs. Hipermetropia.	68
Figura 40 – Comparativo Imagens de Alinhamento para Correção de Aberrações. . .	69
Figura 41 – Painel Frontal do Programa.	70
Figura 42 – Montagem Mesa Óptica	70
Figura 43 – Amostra de Açúcar.	71
Figura 44 – Imagens do Açúcar.	71

SUMÁRIO

1	DISCUSSÃO TEÓRICA	13
1.1	Óptica Linear	13
1.1.1	Equações de Onda	14
1.1.2	Espalhamento Raman Espontâneo	17
1.2	Usos do Espalhamento Raman	21
1.3	Óptica Não Linear	23
1.3.1	Centrossimetria	26
1.3.2	Não Linearidade de 3ª Ordem	27
1.3.3	Wave Mixing	30
1.3.3.1	Three-Wave Mixing	30
1.3.3.2	Four Wave Mixing	32
1.3.3.2.1	Degenerate Four Wave Mixing	34
1.3.4	Espalhamento Raman Não-Linear	35
1.3.5	Coherent Raman Scattering	35
1.3.6	Coherent Stokes Raman Scattering e Coherent Anti-Stokes Raman Scattering	38
1.3.7	Stimulated Raman Scattering (SRS)	40
1.4	Espalhamento Raman aplicado à Biomedicina	42
1.4.1	Imageamento e Microscopia com Espectroscopia Raman	42
1.4.2	A Doença de Alzheimer e Métodos Diagnósticos Potenciais com o uso de Óptica Não Linear	45
1.4.3	Parâmetros de Segurança	48
2	APARATO EXPERIMENTAL	51
2.1	O Oftalmoscópio de Varredura a Laser	51
2.2	O Protótipo Desenvolvido	53
2.2.1	Fonte Laser 562nm	54
2.2.2	Beamsplitter	54
2.2.3	Sistema de Espelhos	54
2.2.4	Espelhos de Varredura	55
2.2.5	Sistema Óptico de Escaneamento a Laser	56
2.2.6	Olho Mecânico e Amostra	57
2.2.7	Sistema Confocal	59
2.2.8	Filtros e Fotomultiplicadora	59
2.3	Hardware e Software	60
2.3.1	Placa DAQ PCI-6251 + Bloco Conector BNC 2120	60

2.3.2	Software LabVIEW	61
2.3.2.1	Init.vi	61
2.3.3	Scan.vi	62
2.3.3.1	RasterScan.vi	63
2.3.3.2	Close.vi	63
3	RESULTADOS	65
3.1	Imagens Iniciais	65
3.2	Melhoria das Imagens	66
3.3	Ajuste para Correção de Deformações Refrativas no Olho Mecânico	68
3.3.1	Ajustes no programa	69
3.3.2	Acoplamento da Espectroscopia Raman ao Sistema e Obtenção de Imagens com a Técnica	70
4	CONCLUSÃO	73
	REFERÊNCIAS	74
	APÊNDICES	80

1 Discussão Teórica

Desde seu refinamento e desenvolvimento de técnicas mais avançadas, fenômenos ópticos vêm sendo empregados em diversas áreas tanto fora quanto dentro da Física. Dentre eles, a Espectroscopia Raman (ER) se destaca por fornecer uma opção poderosa de caracterização sem a necessidade de uso de corantes ou outras técnicas invasivas. Estas qualidades lhe renderam amplo uso no campo da biomedicina, onde possui ainda grande potencial na caracterização *in vivo*, e por isso é importante que entendamos a fundo a teoria por trás dela.

1.1 Óptica Linear

Fenômenos ópticos lineares recebem este nome devido ao fato que a resposta de um material a um campo óptico aplicado depende linearmente da intensidade de tal campo.

De maneira geral, a componente elétrica de uma onda eletromagnética pode ser descrita pela equação [1]

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}, t) = E_0 \cos(\omega_0 t - \mathbf{k} \cdot \mathbf{r} + \phi) \hat{\mathbf{e}} \quad (1.1)$$

Onde t é o tempo (em segundos), ω é a frequência angular, $\mathbf{k}$ é o vetor de onda, cujo módulo k (o número de onda) é medido em radianos/metro e cuja direção $\hat{\mathbf{k}}$ representa a direção de propagação da onda, ϕ é a fase da onda, E_0 é a amplitude do campo elétrico e $\hat{\mathbf{e}}$ é a direção de oscilação do da componente do campo elétrico $\mathbf{E}$, tal que $\hat{\mathbf{e}} \cdot \hat{\mathbf{k}} = 0$

Ao incidir sobre matéria, a presença da onda elétrica provoca uma resposta na forma da reorganização das cargas positivas e negativas do material alvo (Fig 1). A separação destas carga faz surgir novos diferenciais de potenciais que, devido à lei da atração de cargas opostas, cria o chamado **dipolo induzido** $\tilde{P}$, que pode ser descrito pela equação [2]:

$$\tilde{P}(t) = \epsilon_0 [\chi^{(1)} \tilde{E}(t) + \chi^{(2)} \tilde{E}^2(t) + \chi^{(3)} \tilde{E}^3(t) + \dots] \equiv \tilde{P}_{(1)}(t) + \tilde{P}_{(2)}(t) + \tilde{P}_{(3)}(t) + \dots \quad (1.2)$$

Aqui, ϵ_0 é a permissividade elétrica do vácuo, que mede a capacidade do meio de permitir a existência e propagação de campos elétricos, e $\chi^{(n)}$ representa a susceptibilidade óptica de n -ésima ordem, ou a tendência de um meio em se polarizar sob a incidência de um campo elétrico, sendo que $n=1$ mede a resposta linear e $n>1$, as respostas não lineares. O termo

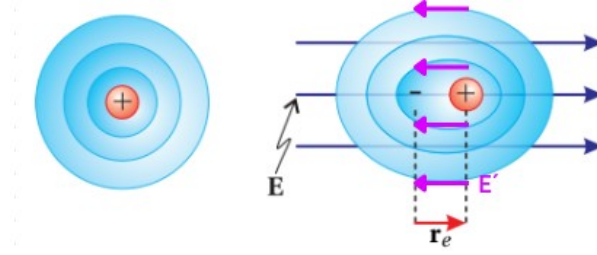


Figura 1 – Um átomo não perturbado (à esquerda) é formado por um núcleo positivo cercado de uma nuvem eletrônica negativa. Quando exposto a um campo eletromagnético $\vec{E}$, a nuvem eletrônica é reorganizada de modo a gerar uma diferença de potencial e consequentemente um dipolo. Assim, surge um campo $\vec{E}'$ induzido que age no sentido oposto ao incidente. Adaptado de [1]

$$\tilde{P}(t) = \epsilon_0 \chi^{(1)} \tilde{E}(t) \quad (1.3)$$

representa a porção linear dos fenômenos ópticos, pois aqui a polarização induzida é proporcional à intensidade do campo elétrico $\tilde{E}$ e $\chi^{(1)}$ é devidamente renomeado como susceptibilidade linear do material.

1.1.1 Equações de Onda

Em adição aos dipolos atômicos, que se referem a pares elétron-núcleo, outros tipos de dipolo existem e podem fazer uso da analogia de um Oscilador Harmônico de Lorentz [2, 3].

Para ligações moleculares, por exemplo, vamos considerar o caso mais simples de uma molécula diatômica. Dipolos atômicos assumem que o elétron (ou nuvem eletrônica) oscilava ao redor de um núcleo positivo estacionário. Para moléculas diatômicas, no entanto, assumimos que ambos os átomos se movimentam ao redor de um ponto de equilíbrio, com as ligações interatômicas agindo como a força restauradora. Desta forma, o movimento dos núcleos originará movimento das nuvens eletrônicas e induzirá dipolos. [1, 2]

Assumindo a analogia clássica de uma mola para representar a ligação entre dois átomos em uma molécula diatômica (figura 2), a ligação possui um único modo vibracional caracterizado por uma frequência natural ω_ν . Quando um campo elétrico incidente de frequência ω_p (*pump*) interage com essa ligação, ele pode ser descrito como $E(t) = E_0 \cos(\omega_p t)$. A interação entre o campo e a molécula induz a formação de um dipolo oscilante $p(t)$, cuja dinâmica é governada pela equação de movimento da posição nuclear $x(t)$ indicada pela equação 1.4, que ocorre como resposta vibracional da molécula a tal incidência [5, 6].

$$x(t) = x_\nu \cos(\omega_\nu t) \quad (1.4)$$

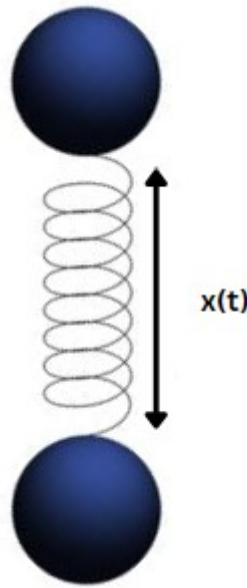


Figura 2 – Modelo de ligação molecular. A oscilação do sistema pode ser aproximada de um Oscilador Harmônico de Lorentz, dando origem aos fenômenos ópticos lineares. [4]

O momento de dipolo de **uma** ligação pode ser escrito da forma

$$p(t) = \epsilon_0 \alpha(t) E(t) = \epsilon_0 \alpha(t) E_0(t) \cos(\omega t) \quad (1.5)$$

levando em conta que o sistema está longe da ressonância e sendo α a polarizabilidade molecular expandida em uma Série de Taylor ao redor de seu valor inicial α_0 [5, 6]

$$\alpha(t) = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial x} \right)_0 x(t) + \dots \quad (1.6)$$

e $\alpha^{(0)}$ a polarizabilidade molecular na ausência de movimento nuclear.

Até agora, consideramos casos de dipolos atômicos ou moleculares de baixa complexidade. Na prática, no entanto, é muito raro que nossos experimentos ou práticas se limitem a tais. Moléculas orgânicas, por exemplo, tendem a ser consideravelmente maiores e, portanto, a apresentarem um maior número de ligações. É crucial, portanto, que entendamos como surgem os dipolos moleculares nestes casos.

No espaço tridimensional, um sistema (molécula) com N partículas (átomos) possui $3N$ graus de liberdade. Para contar todos os possíveis modos normais de vibração de uma molécula com N átomos, três desses graus de liberdade são eliminados devido às translações moleculares ao longo das três dimensões x , y e z . Em moléculas não lineares, outros três graus de liberdade são eliminados, pois a molécula pode girar em torno de três eixos (em moléculas lineares, apenas dois graus de liberdade são eliminados, uma vez que

a rotação em torno do próprio eixo molecular não é observável) [7]. Assim, o número de modos normais possíveis em uma molécula é dado por

Tipo de Molécula	Fórmula de Modos Normais	Número de Modos em uma Molécula Triatômica Exem- plar
Linear	$3N-5$	4
Não-Linear	$3N-6$	3

Com base nessa explicação, apenas um modo normal é possível para uma molécula diatômica - a oscilação ao longo do eixo da ligação. Cada modo normal de vibração em uma molécula poliatômica pode ser excitado de forma independente, envolver a vibração simultânea de vários átomos da molécula e é independente dos demais modos normais [8]. Os diversos tipos de movimento são mostrados na figura 3:

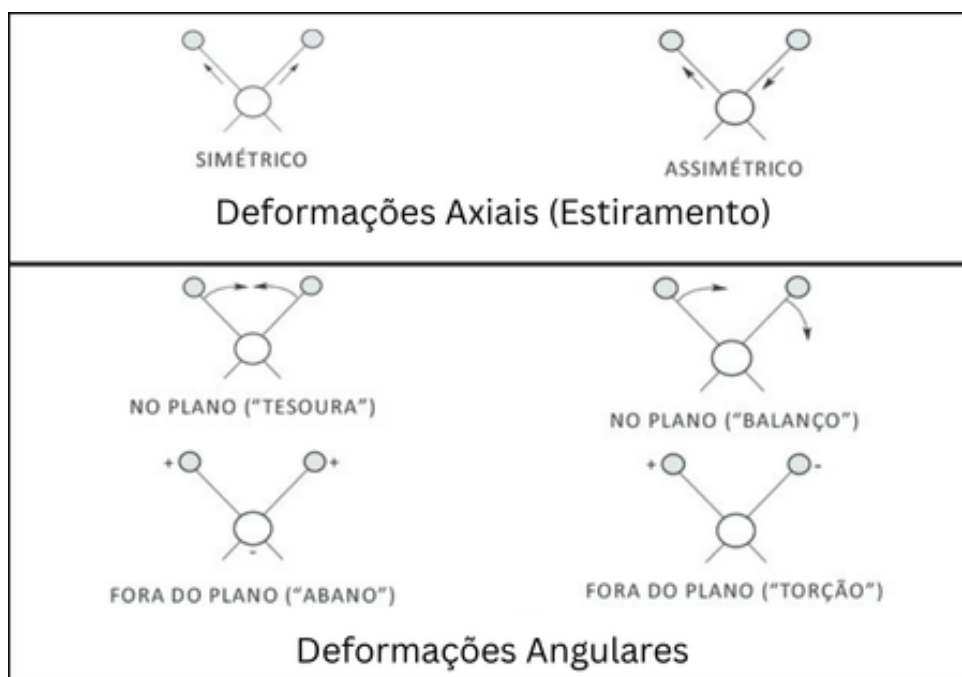


Figura 3 – Diferentes tipos de vibrações moleculares. Adaptado de [8].

Ao tratarmos de moléculas extensas, a grande quantidade de ligações torna suas análises individuais ineficazes. Uma prática mais elegante é o foco em bandas associadas a grupos funcionais específicos, que fornecem informações diretas sobre a composição atômica da molécula. Por exemplo, para um grupo carbonila ($C=O$), a ligação dupla teria uma constante elástica $k_{carbonila}$ diferente da $k_{hidroxila}$ de uma do grupo hidroxila ($O-H$), além de envolverem átomos de massas distintas. Isto, em conjunto com a equação de frequência de um oscilador clássico

$$\omega = \sqrt{\frac{k}{m}} \quad (1.7)$$

explica as diferenças de valores entre diferentes modos de vibração.

Anéis aromáticos representam um caso curioso. Sua estrutura composta por seis átomos de carbono ligados por ligações simples e duplas faz com que diversos modos vibracionais possam surgir (Figura 4), envolvendo diversos átomos ao mesmo tempo, cada um com sua frequência natural distinta [9].

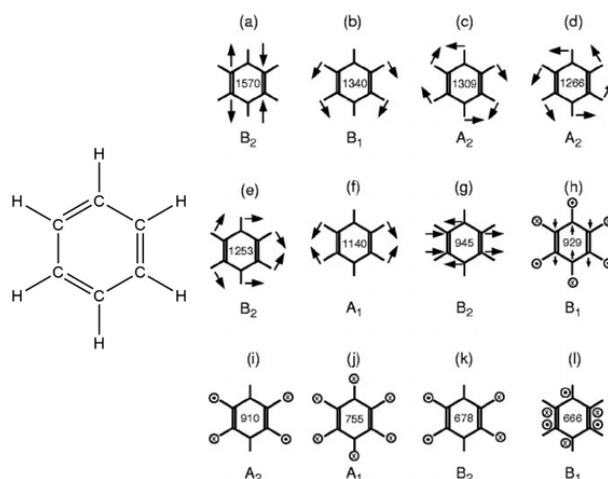


Figura 4 – (*Esq.*) Estrutura de um anel aromático (Benzeno). (*Dir.*) Algumas das combinações possíveis de oscilação do Benzeno. Cada combinação possui sua própria frequência natural, indicada pelo número no centro de cada figura. Adaptado de [9]

1.1.2 Espalhamento Raman Espontâneo

Observado inicialmente por C. V. Raman em 1928, o Efeito Raman (ER) refere-se, de forma geral, ao fenômeno de espalhamento inelástico de luz por modos vibracionais ou rotacionais de uma molécula. Quando este fenômeno ocorre de forma natural, sem estímulo adicional além da radiação incidente, denomina-se Espalhamento Raman Espontâneo (EREsp). Durante este processo, a grande maioria dos fótons incidentes sofre espalhamento elástico, denominado Espalhamento Rayleigh, sendo reemitidos no mesmo comprimento de onda da fonte. Uma pequena porção, no entanto, sofre espalhamento inelástico, sendo emitidas em comprimentos de onda maiores (anti-Stokes) ou menores (Stokes) do que o incidente (Figura 5) [3, 5, 10].

Um aspecto importante do fenômeno é que a mudança do valor da frequência do fóton emitido é igual ao módulo de vibração das ligações moleculares da matéria na qual o fóton original incide. Esta propriedade torna a ER uma poderosa técnica de caracterização,

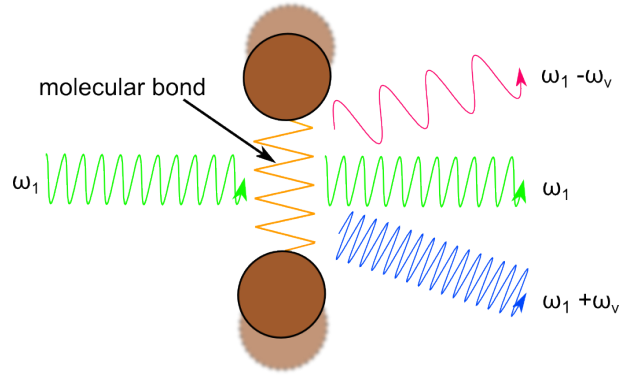


Figura 5 – O espalhamento de um fóton incidente sobre uma ligação molecular pode ocorrer de maneira elástica ou inelástica, esta última sendo responsável pelo surgimento dos fenômenos de Espalhamento Raman. Adaptado de [10]

visto que apresenta boa eficácia sem danificar a amostra e nem necessita de corantes externos como algumas técnicas de fluorescência ou citometria [11].

O espalhamento Rayleigh consiste na excitação de um elétron a partir de seu estado fundamental para um estado virtual de maior energia, promovida pela interação com um fóton incidente. Em seguida, o elétron retorna ao seu estado original, emitindo um fóton com a mesma energia, frequência e fase do fóton incidente. Trata-se, portanto, de um processo elástico, no qual não há transferência líquida de energia entre a radiação e a molécula, e a energia total permanece conservada durante o processo [10].

Em contrapartida ao espalhamento Rayleigh, o espalhamento Raman é um processo inelástico, no qual ocorre transferência de energia entre o fóton incidente e os modos vibracionais da molécula. Nessa interação, o sistema pode retornar a um estado vibracional diferente daquele de origem, e a diferença de energia é emitida na forma de um fóton de frequência distinta da do incidente. Esse desvio energético caracteriza os chamados deslocamentos Raman [10].

No espalhamento Stokes, o modo vibracional da molécula é excitado a partir de seu estado fundamental. Como resultado, o fóton espalhado apresenta energia menor do que a do fóton incidente. Do ponto de vista quântico, esse processo envolve a criação de um fônon, assegurando a conservação de energia no sistema. A equação que descreve esse processo é:

$$\hbar\omega_s = \hbar\omega_i - \hbar\omega_v \quad (1.8)$$

em que ω_s é a frequência do fóton espalhado (Stokes), $\hbar$ a constante Reduzida de Planck, ω_i é a frequência do fóton incidente e ω_v representa a frequência do modo vibracional (fônon criado).

Já no espalhamento anti-Stokes, a interação ocorre com moléculas que já se encon-

tram em estados vibracionais excitados [10]. Nessa situação, parte da energia vibracional da molécula é transferida para o campo eletromagnético, resultando em um fóton espalhado com energia maior que a do fóton incidente, o que corresponde à aniquilação de um fônon. A equação correspondente é:

$$\hbar\omega_{as} = \hbar\omega_i + \hbar\omega_v \quad (1.9)$$

Em temperatura ambiente, a população de moléculas nos estados vibracionais excitados é consideravelmente menor que a no estado fundamental. Por isto, a intensidade do espalhamento anti-Stokes tende a ser menor do que a de Stokes (Figura 6).

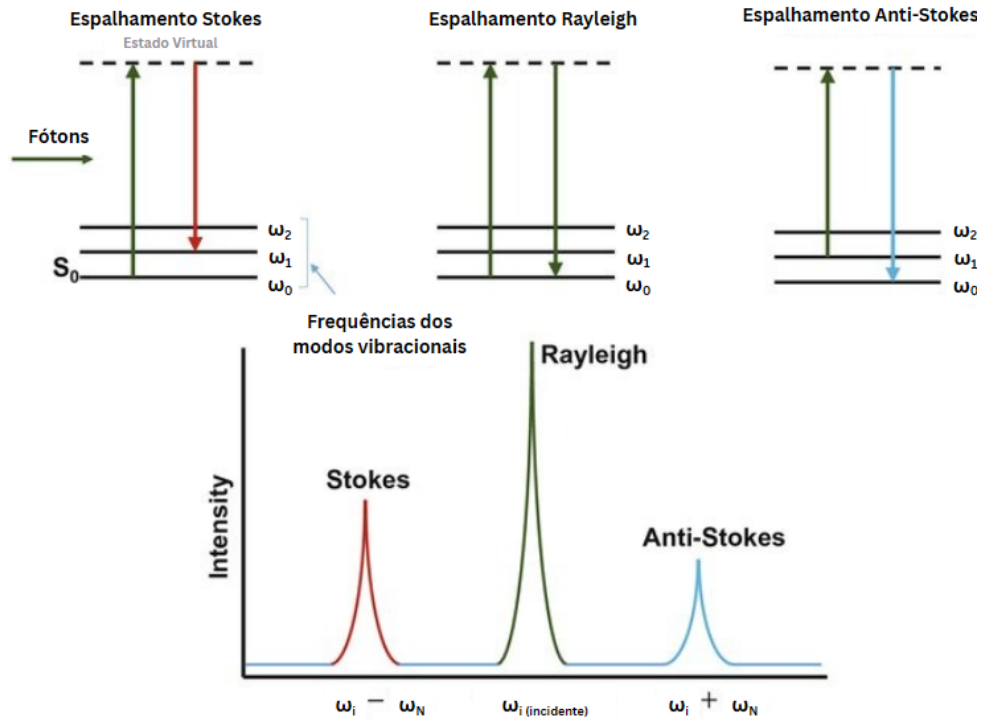


Figura 6 – Representação esquemática dos principais tipos de espalhamento óptico: Stokes (Esq.), Rayleigh (centro) e Anti-Stokes (Dir.). Os novos comprimentos de onda são emitidos com diferença $\pm\omega_N$, a frequência natural de oscilação do modo normal de vibração. Adaptado de [12]

O tensor de susceptibilidade elétrica $\chi^{(1)}$ da equação 1.2 está diretamente associado ao modos normais de vibração do material alvo. Cada um destes modos de vibração possui energia específica, e assim, ao medir-se a diferença de energia entre o fóton incidente e espalhado, é possível utilizar o ER como uma poderosa ferramenta de caracterização. Considerando um modo normal de vibração presente no material, a sua influência na susceptibilidade elétrica pode ser escrita na forma de de Série Expandida de Taylor [13]:

$$\chi_{i,j} = (\chi_{i,j})_0 + \sum \left(\frac{\partial \chi_{i,j}}{\partial Q_l} \right)_0 Q_l + \dots \quad (1.10)$$

onde i, j são coordenadas cartesianas do tensor $\chi^{(1)}$ e Q_l é um deslocamento em uma coordenada normal a um modo de vibração relativa à posição de equilíbrio dos centros atômicos. Este formato é adotado devido à dependência da resposta óptica do sistema da direção de propagação dos campos incidentes dentro do meio: é possível que campos interagindo em direções opostas resultem em efeitos ópticos emitidos em outras direções, por exemplo. No entanto, por questões de simplicidade, vamos ignorar este fator e considerar que todos os efeitos daqui em diante ocorrem unidimensionalmente e na mesma direção, substituindo a nomenclatura de susceptibilidade elétrica de i -ésima ordem $\chi_{i,j}^{(i)}$ por $\chi^{(i)}$ e Q_l por x [13].

$$\chi = \chi_0 + \sum \left(\frac{\partial \chi}{\partial x} \right)_0 x + \dots \quad (1.11)$$

$$x = x_0 \cos(\omega_\nu t) \quad (1.12)$$

Para o caso de uma única molécula, substitui-se a suscetibilidade óptica χ , que descreve a resposta macroscópica do material, pela polarizabilidade molecular α , que caracteriza a tendência de uma molécula individual em se polarizar. Como a suscetibilidade macroscópica resulta da soma das contribuições individuais das polarizações das moléculas, o desenvolvimento apresentado até aqui pode ser aplicado de forma análoga aos contextos micro e macroscópico.

Substituindo na equação 1.3 e considerando o formato de equação de onda $E = E_0 \cos(\omega t)$, obtemos uma nova forma da equação das componentes lineares de polarização de uma única molécula:

$$\begin{aligned} P_L &= (\alpha)_0 E_0 \cos(\omega_0 t) + \\ &+ \sum_k \left(\frac{\partial \alpha}{\partial x} \right)_0 x E_0 \cos(\omega_\nu t) \cos(\omega_0 t) \\ &= (\alpha)_0 E_0 \cos(\omega_0 t) \\ &+ \sum_k \left(\frac{\partial \alpha}{\partial x} \right)_0 \frac{x_0 E_0}{2} [\cos((\omega_0 - \omega_\nu)t) + \cos((\omega_0 + \omega_\nu)t)] \end{aligned} \quad (1.13)$$

onde E_0 é a amplitude do vetor campo elétrico [13].

A equação, após estas simplificações, possui duas partes:

$$P_L^{(R)} = (\alpha)_0 E_0 \cos(\omega_0 t) \quad (1.14)$$

que possui a frequência ω_0 e portanto se refere ao espalhamento Rayleigh, e

$$P_L^{(S/AS)} = \left(\frac{\partial \alpha}{\partial x} \right)_0 \frac{x_0 E_0}{2} [\cos((\omega_0 - \omega_k)t) + \cos((\omega_0 + \omega_k)t)] \quad (1.15)$$

que possui duas frequências: $\omega_0 + \omega_\nu$, que se refere ao Espalhamento Anti-Stokes, e $\omega_0 - \omega_\nu$, que se refere ao Espalhamento Stokes. O termo $\left(\frac{\partial \alpha}{\partial x}\right)$, no limite do campo de baixa intensidade, age ao modificar o índice refrativo do meio por vibrações, gerando as mudanças de $\pm \omega_\nu$ na equação 1.13 [13].

1.2 Usos do Espalhamento Raman

Como vimos na seção 1.1, grupos funcionais possuem modos naturais de vibração específicos. Estes modos próprios tornam o Espalhamento Raman um fenômeno poderoso na caracterização de materiais por meio da Espectroscopia Raman.

A Espectroscopia Raman consiste em iluminar uma amostra com um laser de frequência conhecida e analisar o sinal emitido com o auxílio de um espectrôscópio. O espectro resultante consistirá de picos na frequência incidente (referente ao espalhamento Rayleigh) e com defasagens iguais aos modos de vibração dos grupos funcionais presentes na amostra [3].

Tomando, por exemplo, o Espectro Raman do polímero termoplástico poliestireno (Figura 7):

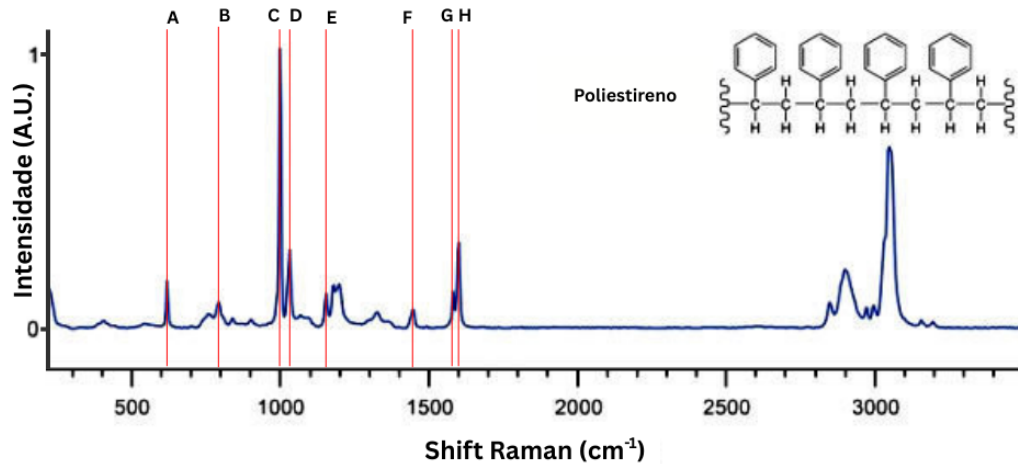


Figura 7 – Espectro Raman do Poliestireno. Os grupos funcionais referentes a cada um dos picos são detalhados na tabela 1. Adaptado de [14].

Observa-se diversos picos referentes a vibrações de grupos funcionais na Tabela 1:

Pico	Bandas de Vibração (cm^{-1})	Tipo de Vibração
A	621	Deformação Angular Fora do Plano Anel Aromático
B	795	Deformação Angular Fora do Plano C-H
C	1001	Respiração Anelar do Benzeno
D	1031	Deformação Dentro do Plano C-H
E	1155	Estiramento C-C
F	1450	Deformação Angular Tesoura CH ₂
G	1583	Estiramento C=C
H	1602	Estiramento Esqueletal do Anel Aromático

Tabela 1 – Tipos de vibração de grupos funcionais presente no poliestireno, referentes ao espectro da figura 7

Na espectroscopia, a unidade da diferença entre o comprimento de onda incidente e emitido é dado em centímetros recíprocos, cm^{-1} . Historicamente, esta convenção se dava pela maior facilidade de contar as franjas do padrão de interferência em interferômetros antigos. Atualmente, este hábito é mantido pelo formato mais compacto dos valores em relação à frequência, que seriam mais difíceis de encaixar nos intervalos do eixo x, mas principalmente por proporcionar uma relação linear entre a energia vibracional transferida entre a luz incidente e a molécula excitada,

$$E = h\nu = hc\tilde{\nu} \quad (1.16)$$

sendo $\tilde{\nu} = 1/\lambda$ o "número de onda".

Um aspecto importante é que nem todos os modos de vibração são detectáveis na Espectroscopia Raman. Como visto na equação 1.15, não será possível obter sinais de Espalhamento Raman para casos em que a polarizabilidade da molécula não varie durante a oscilação ($(\frac{\partial\alpha}{\partial Q})_0 = 0$) [15]. Qualitativamente falando, a incidência de um campo elétrico sobre uma ligação deve gerar uma vibração que altera como a nuvem eletrônica se comporta.

Um exemplo intuitivo simples para a visualização desta regra de seleção é a molécula de CO_2 (Figura 8). A vibração simétrica de estiramento altera a densidade eletrônica total de forma simétrica, aumentando ou diminuindo a polarizabilidade à medida em que a oscilação se aproxima de seus pontos máximos e mínimos, sendo assim um modo vibracional ativo no Raman. Já a vibração assimétrica, onde os átomos oscilam em sentidos opostos, gera diferenças no momento de dipolo, não na polarizabilidade, e por isto são visíveis não na espectroscopia Raman, mas sim na Espectroscopia Infravermelho, um outro método de caracterização cuja aprofundação não será tratada neste trabalho [7, 15, 16].

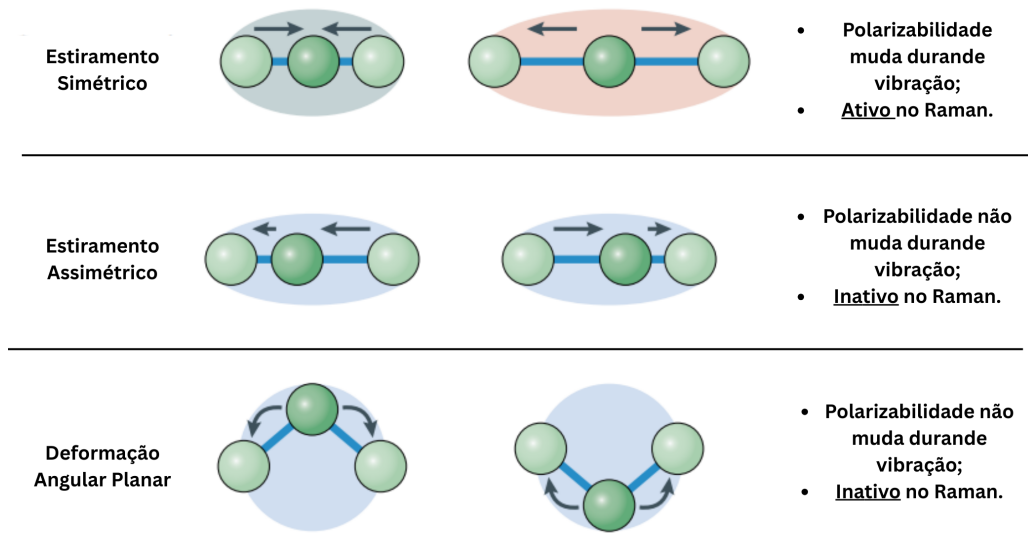


Figura 8 – Critérios de atividade Raman baseados na vibração molecular. Apenas vibrações que induzem variação na polarizabilidade molecular são ativas no Raman. Adaptado de [16]

1.3 Óptica Não Linear

No modelo de Oscilador Harmônico de Lorentz, adotado até aqui, assume-se que a intensidade do campo elétrico incidente é suficientemente baixa para que o deslocamento dos átomos em relação à posição de equilíbrio seja pequeno. Nessas condições, a dinâmica é bem descrita por

$$m\ddot{x} + 2m\gamma\dot{x} + m\omega_0^2x = -qE(t) \quad (1.17)$$

onde $q = e$ é a carga dos elétrons e γ é um fator de amortecimento, modelando perdas dos elétrons oscilantes. O deslocamento nuclear e subsequentemente dos elétrons associados a cada átomo é o responsável pela polarização dos sistemas. Vamos agora passar para o caso em que o campo óptico aplicado seja uma combinação de dois campos singulares:

$$\tilde{E}(t) = E_1e^{-i\omega_1t} + E_2e^{-i\omega_2t} + c.c. \quad (1.18)$$

À medida que a intensidade do campo elétrico aumenta, o deslocamento do dipolo se afasta mais intensamente do ponto de equilíbrio. Nessa situação, o potencial restaurador da ligação já não é mais puramente harmônico — o sistema passa a responder de forma não-linear, sendo melhor descrito por um oscilador anarmônico clássico. Esse comportamento é modelado pela inclusão de termos de ordem superior na equação de movimento, caracterizando um oscilador anarmônico clássico [2]:

$$\ddot{x} + \gamma\dot{x} + \omega_0^2 x(t) + c_2 x^2(t) + c_3 x^3(t) + \dots = -qE(t)/m \quad (1.19)$$

sendo c_n um parâmetro que quantifica a não-linearidade de n -ésima ordem. Para que uma solução seja possível, é necessário que estes parâmetros sejam restritos a valores pequenos, tornando os termos não-lineares mais fracos do que os lineares. Propõe-se assim uma expansão do termo deslocamento na forma [2]:

$$x(t) = \lambda x^{(1)} + \lambda^2 x^{(2)} + \lambda^3 x^{(3)} + \dots \quad (1.20)$$

onde $x^{(m)}$ e $\lambda^{(m)}$ representam a ordem e força da perturbação, respectivamente. Para que esta seja uma solução viável, os termos proporcionais a λ , λ^2 , λ^3 etc. devem satisfazer as equações:

$$\ddot{x}^{(1)} + 2\gamma\dot{x}^{(1)} + \omega_0^2 x^{(1)} = -\frac{q}{m} \tilde{E}(t), \quad (1.21)$$

$$\ddot{x}^{(2)} + 2\gamma\dot{x}^{(2)} + \omega_0^2 x^{(2)} + a [x^{(1)}]^2 = 0, \quad (1.22)$$

$$\ddot{x}^{(3)} + 2\gamma\dot{x}^{(3)} + \omega_0^2 x^{(3)} + 2ax^{(1)}x^{(2)} = 0. \quad (1.23)$$

A solução para o termo de menor ordem é dada por [2]

$$x^{(1)}(t) = x^{(1)}(\omega_1)e^{-i\omega_1 t} + x^{(1)}(\omega_2)e^{-i\omega_2 t} + c.c. \quad (1.24)$$

onde as amplitudes $x^{(1)}(\omega_j)$ são dadas por

$$x^{(1)}(\omega_j) = \frac{-q}{m} \frac{E_j}{D(\omega_j)} \quad (1.25)$$

sendo e e m a carga e massa do elétron, respectivamente, e $D(\omega_j)$ a função de denominador complexa:

$$D(\omega_j) = \omega_0^2 - \omega_j^2 - 2i\omega_j\gamma \quad (1.26)$$

A substituição de $x^{(1)}$ na equação 1.22 permite obter $x^{(2)}$, onde o termo quadrático gera novas frequências: $\pm 2\omega_1$, $\pm 2\omega_2$, $\pm(\omega_1 + \omega_2)$, $\pm(\omega_1 - \omega_2)$ e 0, que dão origem aos chamados fenômenos de mistura de frequência/de ondas (*wave mixing*), que serão abordados na seção 1.3.3. Para a frequência $2\omega_1$, por exemplo, temos:

$$\ddot{x}^{(2)} + 2\gamma\dot{x}^{(2)} + \omega_0^2 x^{(2)} = \frac{-a(qE_1/m)^2 e^{-2i\omega_1 t}}{D^2(\omega_1)} \quad (1.27)$$

com solução

$$x^{(2)}(2\omega_1) = \frac{-a(q/m^2)E_2^2}{D(2\omega_1)D^2(\omega_1)} \quad (1.28)$$

As amplitudes de respostas a outras frequências podem ser encontradas de maneiras análogas:

$$x^{(2)}(2\omega_2) = \frac{-a(q/m)^2 E_2^2}{D(2\omega_2)D^2(\omega_2)} \quad (1.29)$$

$$x^{(2)}(\omega_1 + \omega_2) = \frac{-2a(q/m)^2 E_1 E_2}{D(\omega_1 + \omega_2)D(\omega_1)D(\omega_2)} \quad (1.30)$$

$$x^{(2)}(\omega_1 - \omega_2) = \frac{-2a(q/m)^2 E_1 E_2^*}{D(\omega_1 - \omega_2)D(\omega_1)D(\omega_2)} \quad (1.31)$$

$$x^{(2)}(0) = \frac{-2a(q/m)^2 E_1 E_1^*}{D(0)D(\omega_1)D(-\omega_1)} + \frac{-2a(q/m)^2 E_2 E_2^*}{D(0)D(\omega_2)D(-\omega_2)} \quad (1.32)$$

Os resultados são então expressos em termos de susceptibilidades linear ($\chi^{(1)}$) e não-linear ($\chi^{(2)}$). Como visto na equação 1.2, a susceptibilidade pode ser definida pelas relações

$$P^{(n)}(\omega_j) = \epsilon_0 \chi^{(1)} E^n(\omega_j) \quad (1.33)$$

e ainda por

$$P^{(n)}(\omega_j) = -Nq x^{(n)}(\omega_j) \quad (1.34)$$

Onde N é o número de osciladores por unidade de volume. Comparando estas equações, a susceptibilidade linear pode ser representada como

$$\chi^{(1)}(\omega_j) = \frac{Nq^2/(\epsilon_0 m)}{D(\omega_j)} = \frac{Nq^2/(\epsilon_0 m)}{\omega_0^2 - \omega_j^2 - 2i\omega_j\gamma} \quad (1.35)$$

Para frequências próximas à ressonância, $D(\omega_j) \approx 2\omega_0(\omega_j - \omega_0 - i\gamma)$, e assim obtemos

$$\chi^{(1)}(\omega_j) = \frac{Nq^2}{2\epsilon_0 m \omega_0} \frac{(\omega_j - \omega_0) + i\gamma}{(\omega_j - \omega_0)^2 + \gamma^2} \quad (1.36)$$

As susceptibilidades não-lineares são calculadas de uma maneira similar. A amplitude da componente não-linear de polarização oscilando com frequência $2\omega_1$, por exemplo, dá origem a um fenômeno óptico de *wave mixing* conhecido como Geração de Segundo Harmônico (*Second Harmonic Generation*, SHG):

$$P^{(2)}(2\omega_1) = \epsilon_0 \chi^{(2)}(2\omega_1, \omega_1, \omega_1) E(\omega_1)^2 = -N q x^{(2)}(2\omega_1) \quad (1.37)$$

Aplicando-a na equação 1.28, conectamos a resposta microscópica do modelo do oscilador com a resposta macroscópica do meio, obtendo a forma final da susceptibilidade não linear de segunda ordem associada ao fenômeno de SHG

$$\chi^{(2)}(2\omega_1, \omega_1, \omega_1) = \frac{N (q^3/m^2) a}{\epsilon_0 D(2\omega_1) D^2(\omega_1)} \quad (1.38)$$

Aplicando a equação 1.35, podemos reescrever o resultado como um produto de susceptibilidades lineares:

$$\chi^{(2)}(2\omega_1, \omega_1, \omega_1) = \frac{\epsilon_0^2 m a}{N^2 q^3} \chi^{(1)}(2\omega_1) [\chi^{(1)}(\omega_1)]^2 \quad (1.39)$$

Este processo pode ser repetido para as polarizabilidades de cada uma das componentes, mas tal desenvolvimento não é relevante para o trabalho em questão (estes podem ser encontrados com mais detalhes em [2]): o que importa são as conclusões emergentes destas relações. Principalmente, estas expressões mostram que a resposta de segunda ordem é maximizada quando as frequências incidentes se aproximam da frequência de ressonância ω_0 , condição que intensifica a polarização induzida e, conseqüentemente, os fenômenos ópticos não lineares associados.

O detalhamento para o procedimento de determinação da susceptibilidade de segunda ordem pode ser replicada para $\chi^{(3)}$, partindo da busca de uma solução para a equação 1.23, como veremos na próxima sessão.

1.3.1 Centrossimetria

Antes de prosseguirmos, é fundamental que entendamos o conceito de centrossimetria molecular e seu impacto na geração ou não de fenômenos não-lineares. Em geral, estruturas moleculares podem ser separadas em duas categorias: aquelas com um centro de simetria (centrossimétricas) e aquelas sem (não-centrossimétricas). Moléculas centrossimétricas são aquelas em que o meio se mantém não afetado mediante uma operação de inversão espacial $((x, y, z) \rightarrow (-x, -y, -z))$ ao redor de um centro de simetria. Na prática, para cada átomo da molécula, existe um átomo idêntico espelhado e equidistante do centro de simetria [3].

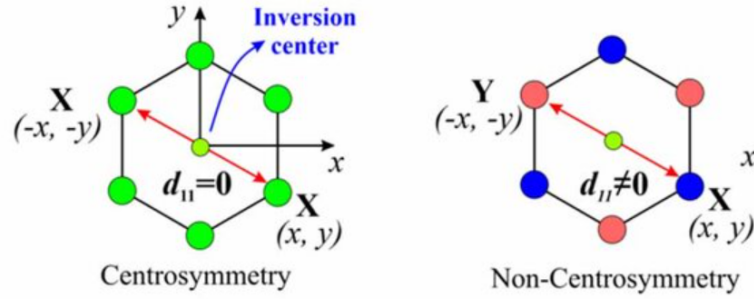


Figura 9 – Representações de centrosimetria em moléculas. (Esq.) Para a molécula centrosimétrica, a inversão dos átomos $\mathbf{X}$ em (x,y) e $(-x,-y)$ resulta em uma molécula idêntica à anterior. (Dir.) Já no caso da molécula não-centrossimétrica, os átomos presentes nestas mesmas coordenadas diferem um do outro ($\mathbf{X}$ e $\mathbf{Y}$), e portanto a operação de inversão espacial resulta em uma molécula diferente. [17].

Este aspecto interfere no comportamento não-linear do modo vibracional associado a esta molécula. Para visualizar, vamos supor uma molécula centrossimétrica. Mediante aplicação de um campo externo $\vec{E}$, as componentes de polarização de segunda ordem serão dadas por

$$P^{(2)}(\vec{E}) = \epsilon_0 \chi^{(2)} E^2 \quad (1.40)$$

Agora, imaginamos um campo invertido $(-\vec{E})$ incidindo sobre esta mesma molécula. Utilizando esta mesma equação, obtemos

$$P^{(2)}(-\vec{E}) = \epsilon_0 \chi^{(2)} (-E)(-E) \quad (1.41)$$

$$= \epsilon_0 \chi^{(2)} E^2 \quad (1.42)$$

$$= P^{(2)}(\vec{E}) \quad (1.43)$$

Para meios centrossimétricos (moléculas, cristais, etc), as propriedades físicas devem se manter intactas mediante operações de inversão, como ocorre na equação 1.43. Para que isto ocorra, a susceptibilidade de segunda ordem deve ser nula ($\chi^{(2)} = 0$) e, por consequência, efeitos ópticos associados à susceptibilidade de segunda ordem não ocorrem em materiais centrossimétricos [2,3].

1.3.2 Não Linearidade de 3ª Ordem

Agora definido um meio centrossimétrico, assumimos que a força restauradora de um movimento da posição do elétron x assume a forma

$$\tilde{F}_{rest} = -m\omega_0^2\tilde{x} + mb\tilde{x}^3 \quad (1.44)$$

sendo b um parâmetro de intensidade da não-linearidade. A resposta não linear de menor ordem resultante desta força é a contribuição de 3ª ordem para a polarização, descrita por uma susceptibilidade $\chi^{(3)}$ [2]. Trocando $\tilde{x}$ por $\tilde{\mathbf{r}}$ para representar o deslocamento do átomo da sua posição de equilíbrio, temos

$$\tilde{F}_{rest} = -m\omega_0^2\tilde{\mathbf{r}} + mb(\tilde{\mathbf{r}} \cdot \tilde{\mathbf{r}})\tilde{\mathbf{r}} \quad (1.45)$$

cuja equação de movimento se dá por

$$\ddot{\tilde{\mathbf{r}}} + 2\gamma\dot{\tilde{\mathbf{r}}} + \omega_0^2\tilde{\mathbf{r}} - b(\tilde{\mathbf{r}} \cdot \tilde{\mathbf{r}})\tilde{\mathbf{r}} = -q\tilde{\mathbf{E}}(t)/m \quad (1.46)$$

Em casos de susceptibilidades de terceira ordem, o caso mais geral ocorre para uma incidência de campo elétrico com três componentes:

$$\tilde{\mathbf{E}}(t) = \mathbf{E}_1 e^{-i\omega_1 t} + \mathbf{E}_2 e^{-i\omega_2 t} + \mathbf{E}_3 e^{-i\omega_3 t} + c.c. \quad (1.47)$$

Esta solução é análoga ao caso de susceptibilidade de segunda ordem de um meio não-centrossimétrico [2]. Substitui-se $\tilde{\mathbf{E}}$ por $\lambda\tilde{\mathbf{E}}$, onde λ indica a força da perturbação. Desta forma, buscamos uma solução do tipo

$$\tilde{\mathbf{r}}(t) = \lambda\tilde{\mathbf{r}}^{(1)}(t) + \lambda^2\tilde{\mathbf{r}}^{(2)}(t) + \lambda^3\tilde{\mathbf{r}}^{(3)}(t) + \dots \quad (1.48)$$

Inserindo esta solução na equação 1.46, encontramos a forma

$$\ddot{\tilde{\mathbf{r}}}^{(1)} + 2\gamma\dot{\tilde{\mathbf{r}}}^{(1)} + \omega_0^2\tilde{\mathbf{r}}^{(1)} = -\frac{q}{m}\tilde{\mathbf{E}}(t), \quad (1.49)$$

$$\ddot{\tilde{\mathbf{r}}}^{(2)} + 2\gamma\dot{\tilde{\mathbf{r}}}^{(2)} + \omega_0^2\tilde{\mathbf{r}}^{(2)} = 0, \quad (1.50)$$

$$\ddot{\tilde{\mathbf{r}}}^{(3)} + 2\gamma\dot{\tilde{\mathbf{r}}}^{(3)} + \omega_0^2\tilde{\mathbf{r}}^{(3)} - b(\tilde{\mathbf{r}}^{(1)} \cdot \tilde{\mathbf{r}}^{(1)})\tilde{\mathbf{r}}^{(1)} = 0 \quad (1.51)$$

A solução da equação 1.49 é [2]

$$\tilde{\mathbf{r}}^{(1)}(t) = \sum_n \mathbf{r}^{(1)}(\omega_n) e^{-i\omega_n t} \quad (1.52)$$

onde

$$\mathbf{r}^{(1)}(\omega_n) = \frac{-q\mathbf{E}(\omega_n)/m}{D(\omega_n)}, \quad (1.53)$$

$$D(\omega_n) = \omega_0^2 - \omega_n^2 - 2i\omega_n\gamma \quad (1.54)$$

Podemos descrever as componentes cartesianas da polarização pela relação

$$P_i^{(1)}(\omega_n) = \epsilon_0 \sum_j \chi_{ij}^{(1)}(\omega_n) E_j(\omega_n) \quad (1.55)$$

Onde a susceptibilidade linear obtém o formato

$$\chi_{ij}^{(1)}(\omega_n) = \chi^{(1)}(\omega_n) \delta_{ij} \quad (1.56)$$

e cujo valor é

$$\chi^{(1)}(\omega_n) = \frac{Nq^2/m}{\epsilon_0 D(\omega_n)} \quad (1.57)$$

De maneira análoga ao caso centrossimétrico, o valor da resposta de terceira ordem é obtida ao introduzirmos a expressão de $\tilde{\mathbf{r}}^{(1)}(t)$ na equação 1.51, que se torna

$$\ddot{\tilde{\mathbf{r}}}^{(3)} + 2\gamma\dot{\tilde{\mathbf{r}}}^{(1)} + \omega_0^2\tilde{\mathbf{r}}^{(3)} = - \sum_{mnp} \frac{bq^3[\mathbf{E}(\omega_m) \cdot \mathbf{E}(\omega_n)]\mathbf{E}(\omega_p)}{m^3 D(\omega_m)D(\omega_n)D(\omega_p)} \quad (1.58)$$

$$\times e^{-i(\omega_n+\omega_n+\omega_p)t} \quad (1.59)$$

e que tem uma solução geral da forma

$$\mathbf{r}^{(3)}(\omega_q) = - \sum_{(mnp)} \frac{bq^3[\mathbf{E}(\omega_m) \cdot \mathbf{E}(\omega_n)]\mathbf{E}(\omega_p)}{m^3 D(\omega_q)D(\omega_m)D(\omega_n)D(\omega_p)} \quad (1.60)$$

Finalmente, nós igualamos as definições das polarizações de terceira ordem

$$P^{(3)}(\omega_q) = -Nq\mathbf{r}^{(3)}(\omega_q) \quad (1.61)$$

$$= \epsilon_0 \sum_{jkl} \sum_{mnp} \chi_{ijkl}^{(3)}(\omega_q, \omega_m, \omega_n, \omega_p) E_j(\omega_m) E_k(\omega_n) E_l(\omega_p) \quad (1.62)$$

para obtermos a forma final da susceptibilidade de terceira ordem:

$$\chi_{ijkl}^{(3)}(\omega_q, \omega_m, \omega_n, \omega_p) = \frac{Nbq^4[\delta_{ij}\delta_{kl} + \delta_{ik}\delta_{jl} + \delta_{il}\delta_{jk}]}{3\epsilon_0 m^3 D(\omega_q)D(\omega_m)D(\omega_n)D(\omega_p)} \quad (1.63)$$

De maneira análoga ao caso de segunda ordem, percebemos que a susceptibilidade aumenta à medida em que os termos Lorentzianos $D(\omega)$ no denominador atingem seus menores valores. Para estes casos, podemos dizer que a resposta ressonante do sistema atinge seu máximo, e os fenômenos ópticos associados são observados com maior frequência e intensidade.

Até agora, analisamos os casos das frequências incidentes admitindo que as mesmas não apresentam nenhuma interação entre si. No entanto, este não é o caso, graças a um processo chamado *Wave Mixing*.

1.3.3 Wave Mixing

Wave Mixing se refere ao processo em que dois ou mais campos interagem entre si para a geração de campos em frequências diferentes daquelas incidentes. Na óptica linear, o princípio da superposição impede a ocorrência deste fenômeno e faz com que dois campos incidentes mediados por um meio linear produzam campos nas mesmas frequências. Para o caso de um meio não linear, no entanto, esta restrição não se aplica e as combinações são permitidas.

1.3.3.1 Three-Wave Mixing

Como vimos na seção 1.3, a incidência de um campo dicromático sobre um meio não linear de segunda ordem produz uma polarização do tipo [6]

$$P^{(2)} = P_0^{(2)} + P_{\omega_1+\omega_2}^{(2)} + P_{2\omega_1}^{(2)} + P_{2\omega_2}^{(2)} + \text{n.f.c.} \quad (1.64a)$$

$$= 2\epsilon_0\chi^{(2)} (E_1E_1^* + E_2E_2^*) \quad (1.64b)$$

$$+ 2\epsilon_0\chi^{(2)} (E_1E_2e^{-i(\omega_1+\omega_2)t} + \text{c.c.}) \quad (1.64c)$$

$$+ 2\epsilon_0\chi^{(2)} (E_1E_2^*e^{-i(\omega_1-\omega_2)t} + \text{c.c.}) \quad (1.64d)$$

$$+ \epsilon_0\chi^{(2)} (E_1^2e^{-2i\omega_1t} + \text{c.c.}) \quad (1.64e)$$

$$+ \epsilon_0\chi^{(2)} (E_2^2e^{-2i\omega_2t} + \text{c.c.}) \quad (1.64f)$$

Evidentemente, a interação entre as duas componentes e a meio não-linear levam ao surgimento de diversos fenômenos devido à polarização induzida. A este processo, onde duas frequências dão origem a uma terceira, chamamos *Three wave Mixing* (TWM), e os efeitos emergentes são os mesmos gerados pelas equações de movimento nuclear $x^{(2)}(t)$ descritos na seção 1.3.

Mais especificamente, os termos 1.64c e 1.64d se referem ao movimento nuclear das equações 1.30 e 1.31, representando os fenômenos de *Sum Frequency Generation* (SFG) e *Difference Frequency Generation* (DFG), respectivamente, representados na Figura 10 [2].

Já os termos 1.64e e 1.64f são referentes às equações de movimento 1.28 e 1.29, respectivamente. Ambas representam o fenômeno de *Second Harmonic Generation* (SHG).

Embora possuam expressões diferentes, o SHG pode ser visto como uma forma degenerada de SFG, já que a única diferença entre os fenômenos é a igualdade ou não das frequências dos fótons incidentes.

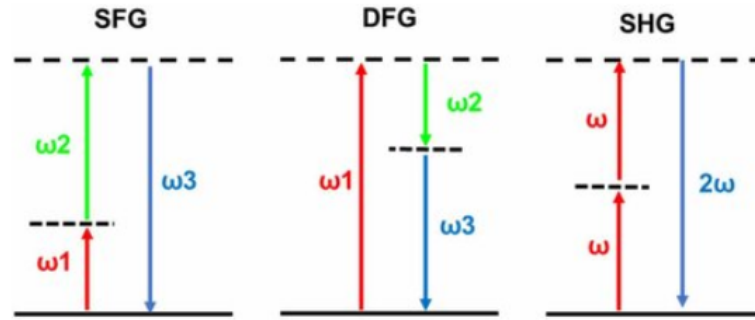


Figura 10 – Diagramas de Energia dos processos de SFG (Esq.), DFG (centro) e SHG (Dir.). Observe que a única diferença entre SFG e SHG é o fato de que as frequências das ondas incidentes são idênticas às do SHG. Adaptado de [18].

Nos diagramas, as linhas pontilhadas indicam níveis virtuais de energia, indicando que nenhum tipo de absorção ocorre. Como visto anteriormente, estas interações não podem ocorrer caso o meio de propagação seja centrossimétrico, tornando o SHG uma ferramenta útil para a caracterização das propriedades de simetria dos materiais. A possibilidade de uso de um único laser e a emissão do sinal longe da frequência de excitação também facilitam a implementação do método.

Matematicamente, a intensidade do SHG é dada por [19]

$$I(2\omega_1) \propto |\chi^{(2)}| I_0^2 L^2 \text{senc}^2\left(\frac{\Delta k L}{2}\right) \quad (1.65)$$

sendo I_0 a intensidade da fonte, L o comprimento do caminho óptico no meio e $\text{senc}(x) = \text{sen}(x)/x$. Aqui, a dependência quadrática da intensidade incidente faz com que o sinal resultante seja aprimorado para feixes estreitamente focalizados. Quando usado em conjunto com técnicas de imageamento, este fator garante ao SHG uma excelente resolução espacial.

1.3.3.2 Four Wave Mixing

Four Wave Mixing (FWM) é um processo análogo ao TWM explicado na seção anterior, mas com a geração de uma quarta frequência a partir da incidência de três componentes frequenciais sobre um meio não linear de terceira ordem [6].

O processo é mediado por uma polarização de terceira ordem

$$P^{(3)}(t) = \epsilon_0 \chi^{(3)} E^3(t) \quad (1.66)$$

com incidência tricromática

$$E(t) = E_1 e^{-i\omega_1 t} + E_2 e^{-i\omega_2 t} + E_3 e^{-i\omega_3 t} + c.c. \quad (1.67)$$

Podemos obter as componentes frequenciais inserindo $E(t)$ na equação 1.66 e elevando-a ao cubo, extraindo assim as componentes. Para efeito de exemplo, façamos a contribuição de uma das componentes:

$$E^3(t) = (E_1 e^{-i\omega_1 t} + E_2 e^{-i\omega_2 t} + E_3 e^{-i\omega_3 t} + \quad (1.68)$$

$$E_1^* e^{i\omega_1 t} + E_2^* e^{i\omega_2 t} + E_3^* e^{i\omega_3 t})^3 = \quad (1.69)$$

$$\underline{E_1 E_2^* E_3^* e^{-i(\omega_1 - \omega_2 - \omega_3)}} + \dots \quad (1.70)$$

O produto das componentes sublinhadas, portanto, origina o efeito de FWM de frequência $(\omega_1 - \omega_2 - \omega_3)$. Análises para outras componentes podem ser feitas de maneiras similares relativamente simples, mas seriam excessivamente longas e não cabem no escopo desta dissertação. Por enquanto, nos contentamos em dizer que a expressão total contém 44 componentes de frequência [2], mais especificamente:

$$\omega_1, \omega_2, \omega_3, 3\omega_1, 3\omega_2, 3\omega_3, (\omega_1 + \omega_2 + \omega_3),$$

$$(\omega_1 + \omega_2 - \omega_3), (\omega_1 - \omega_2 + \omega_3), (-\omega_1 + \omega_2 + \omega_3),$$

$$(2\omega_1 \pm \omega_2), (2\omega_1 \pm \omega_3), (2\omega_2 \pm \omega_1), (2\omega_2 \pm \omega_3), (2\omega_3 \pm \omega_1), (2\omega_3 \pm \omega_2)$$

e as negativas de cada uma. Alguns componentes aparecem diversas vezes devido a permutações das frequências [2]. Exemplos de processos podem ser representados pelos diagramas da Figura 11:

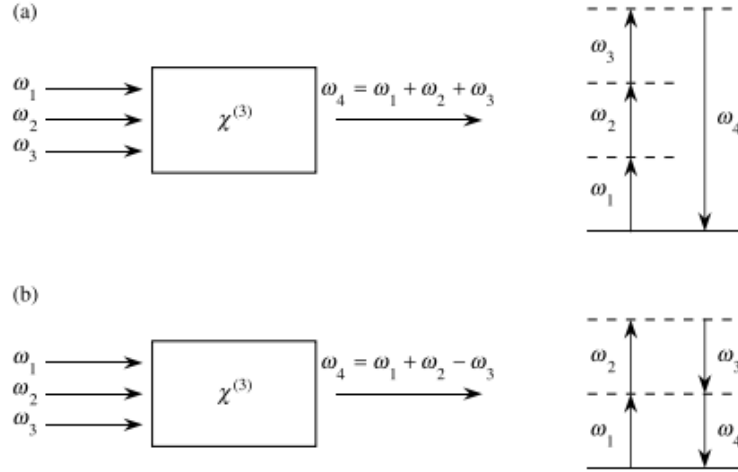


Figura 11 – Processos de FWM possíveis mediante incidência de campo tricromático sobre meio não linear de terceira ordem de frequências resultantes $\omega_4 = \omega_1 + \omega_2 + \omega_3$ (a) e $\omega_4 = \omega_1 + \omega_2 - \omega_3$ (b). [2].

Aplicando estes termos na equação 1.66, as formas de polarização de cada componentes podem ser obtidas:

$$P(\omega_1) = \epsilon_0 \chi^{(3)} (3E_1 E_1^{*2} + 6E_1^* E_2^2 + 6E_1 E_3 E_3^*), \quad (1.71)$$

$$P(\omega_2) = \epsilon_0 \chi^{(3)} (6E_1^* E_1 E_2 + 3E_2 E_2^{*2} + 6E_2 E_3 E_3^*), \quad (1.72)$$

$$P(\omega_3) = \epsilon_0 \chi^{(3)} (6E_1^* E_1 E_3 + 6E_2 E_2^* E_3 + 3E_3 E_3^{*2}), \quad (1.73)$$

$$P(3\omega_1) = \epsilon_0 \chi^{(3)} E_1^3, \quad P(3\omega_2) = \epsilon_0 \chi^{(3)} E_2^3, \quad P(3\omega_3) = \epsilon_0 \chi^{(3)} E_3^3, \quad (1.74)$$

$$P(\omega_1 + \omega_2 + \omega_3) = 6\epsilon_0 \chi^{(3)} E_1 E_2 E_3, \quad (1.75)$$

$$P(\omega_1 + \omega_2 - \omega_3) = 6\epsilon_0 \chi^{(3)} E_1 E_2 E_3^*, \quad (1.76)$$

$$P(\omega_1 + \omega_3 - \omega_2) = 6\epsilon_0 \chi^{(3)} E_1 E_2^* E_3, \quad (1.77)$$

$$P(\omega_2 + \omega_3 - \omega_1) = 6\epsilon_0 \chi^{(3)} E_1^* E_2 E_3, \quad (1.78)$$

$$P(2\omega_1 + \omega_2) = 3\epsilon_0 \chi^{(3)} E_1^2 E_2, \quad P(2\omega_1 + \omega_3) = 3\epsilon_0 \chi^{(3)} E_1^2 E_3, \quad (1.79)$$

$$P(2\omega_2 + \omega_1) = 3\epsilon_0 \chi^{(3)} E_2^2 E_1, \quad P(2\omega_2 + \omega_3) = 3\epsilon_0 \chi^{(3)} E_2^2 E_3, \quad (1.80)$$

$$P(2\omega_3 + \omega_1) = 3\epsilon_0 \chi^{(3)} E_3^2 E_1, \quad P(2\omega_3 + \omega_2) = 3\epsilon_0 \chi^{(3)} E_3^2 E_2, \quad (1.81)$$

$$P(2\omega_1 - \omega_2) = 3\epsilon_0 \chi^{(3)} E_1^2 E_2^*, \quad P(2\omega_1 - \omega_3) = 3\epsilon_0 \chi^{(3)} E_1^2 E_3^*, \quad (1.82)$$

$$P(2\omega_2 - \omega_1) = 3\epsilon_0 \chi^{(3)} E_2^2 E_1^*, \quad P(2\omega_2 - \omega_3) = 3\epsilon_0 \chi^{(3)} E_2^2 E_3^*, \quad (1.83)$$

$$P(2\omega_3 - \omega_1) = 3\epsilon_0 \chi^{(3)} E_3^2 E_1^*, \quad P(2\omega_3 - \omega_2) = 3\epsilon_0 \chi^{(3)} E_3^2 E_2^* \quad (1.84)$$

Nesta notação, é de praxe que complexos conjugados dos campos elétricos sejam associados a frequências negativas. Os números 1, 3 ou 6 que aparecem em cada notação servem para compensar as permutações existentes em cada combinação frequencial [2].

1.3.3.2.1 Degenerate Four Wave Mixing

Até agora, assumimos que as frequências incidentes são diferentes umas das outras. No entanto, esta não é uma condição para que o processo de FWM ocorra. Quando duas das três frequências incidentes são iguais, o processo passa a se chamar *Degenerate Four Wave Mixing* (DFWM).

Neste caso, o campo incidente pode ser descrito por

$$E(t) = E_p e^{-i\omega_p t} + E_s e^{-i\omega_s t} \quad (1.85)$$

sendo os subscritos "p" e "s" representativos das frequências "Pump" e "Stokes", respectivamente. Comparando-a com a equação do campo tricromático não-degenerado e realizando o mesmo procedimento para a obtenção dos termos frequenciais, é fácil perceber que o termo cúbico do campo degenerado terá menos termos.

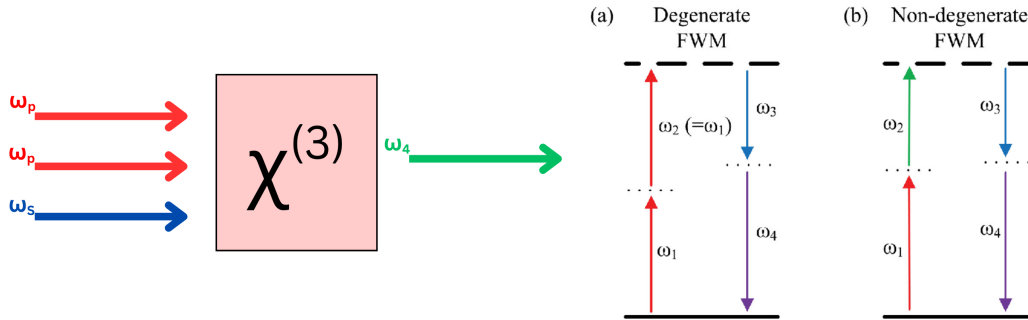


Figura 12 – Esq.: Incidindo sobre um meio linear de terceira ordem, três ondas se combinam de maneiras diferentes para produzir uma quarta ordem. Dir.: Diagramas de combinações possíveis de DFWM (a) e FWM (b). Adaptado de [20].

O processo da Figura 12 (a) representa um dos processos de DFWM possíveis, no qual dois fótons de frequência $\omega_P = \omega_1 = \omega_2$ levam o sistema a um nível virtual de maior energia, para depois decair devido à incidência do fóton de frequência ω_S . Para a manutenção da energia do sistema, um fóton de frequência $2\omega_P - \omega_S$ é emitido ao final do processo [2].

Similarmente ao processo de SHG, a intensidade do fenômeno de DFWM pode ser representado pela equação [19]:

$$I(\omega_{FWM}) \propto |\chi^{(3)}|^2 I_P^2 I_S L^2 \text{senc}^2\left(\frac{\Delta k L}{2}\right) \quad (1.86)$$

Sendo I_s e I_P as intensidades das ondas incidentes.

1.3.4 Espalhamento Raman Não-Linear

Já explicitamos que interações de ondas dicromáticas e tricromáticas mediadas por meios não lineares induzem a geração de novas componentes frequenciais a partir de fenômenos de *Wave Mixing*. Agora, iremos explorar a interação de campos dicromáticos com ligações moleculares que, por processos similares, produz efeitos não lineares de **Espalhamento Raman**. As aplicações e relevância destes fenômenos para nosso projeto serão explicados logo depois.

1.3.5 Coherent Raman Scattering

Novamente, consideramos um campo dicromático da forma

$$E(t) = E_p e^{-i\omega_t t} + E_s e^{-i\omega_s t} + c.c. \quad (1.87)$$

mas desta vez incidindo sobre uma ligação molecular de frequência ω_ν .

Esta interação, como vimos anteriormente, induz a criação de um dipolo elétrico

$$p(t) = \epsilon_0 \alpha(t) (E_p e^{-i\omega_t t} + E_s e^{-i\omega_s t} + c.c.) \quad (1.88)$$

Considerando que a força presente no dipolo pode ser representada por [21]

$$F(t) = -\frac{\partial W}{\partial x} = -\frac{\partial(-p(t)E(t))}{\partial x} \quad (1.89)$$

e inserindo o formato do campo elétrico dicromático, temos

$$F(t) = \epsilon_0 \left(\frac{\partial \alpha}{\partial x} \right)_0 (E_p E_s^* e^{-i(\omega_p - \omega_s)t} + c.c. + \dots) \quad (1.90)$$

As contribuições dos termos cruzados omitidas são aquelas que se distanciam muito da frequência natural ω_ν ($\omega_p, \omega_s, \omega_p + \omega_s$) e, por isto, não contribuem para a ressonância do sistema. De maneira prática, a falta de contribuição para o movimento vibracional do dipolo significa que estes termos podem não apenas ser omitidos, mas inteiramente ignorados. O termo $\omega_p - \omega_s$ é retido porque pode estar em ressonância com o modo vibracional do sistema ($\omega_p - \omega_s = \omega_\nu$) [5, 6]. Assim, a força é

$$F(t) = \epsilon_0 \left(\frac{\partial \alpha}{\partial x} \right)_0 (E_p E_s^* e^{-i(\omega_p - \omega_s)t} + c.c.) \quad (1.91)$$

Esta força é então introduzida em uma equação de oscilador harmônico amortecido da forma

$$\frac{d^2x(t)}{dt^2} + 2\gamma \frac{dx(t)}{dt} + \omega_\nu^2 x(t) = \frac{F(t)}{\mu} \quad (1.92)$$

sendo μ a massa reduzida do sistema. A solução desta equação se dá por [5, 6]

$$x(t) = x_\nu^{-i(\omega_p - \omega_s)} + c.c. \quad (1.93)$$

com

$$x_\nu = - \frac{(\epsilon_0/(\omega_p - \omega_s)\mu) \left(\frac{\partial \alpha}{\partial x} \right)_0 E_p E_s^*}{\omega_\nu - (\omega_p - \omega_s) + i\gamma} \quad (1.94)$$

Aqui, podemos enxergar as similaridades com as equações de posição nuclear desenvolvidas na seção 1.3, onde igualdades entre diferenças das componentes frequenciais e as frequências naturais levavam a uma condição de ressonância e maximização das oscilações vibracionais do sistema. Para o caso $\omega_p - \omega_s = \omega_\nu$, portanto, a amplitude de movimento atinge seu máximo, assim como a intensidade dos fenômenos não-lineares.

Até agora, as relações foram desenvolvidas para um único dipolo. Na prática, um meio será composto por N dipolos, gerando uma polarização P total

$$P(t) = Np(t) = N\epsilon_0\alpha(t)E(t) \quad (1.95)$$

Aplicando-se a expansão 1.6, obtém-se as formas finais da polarização total [6, 21]:

$$P(t) = N\epsilon_0 \left[\alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial x} \right)_0 x(t) \right] E(t) = P^{(L)}(t) + P^{(NL)}(t) \quad (1.96)$$

onde

$$P^{(L)}(t) = N\epsilon_0\alpha_0 (E_p e^{-i\omega_p t} + E_s e^{-i\omega_s t} + c.c.), \quad (1.97)$$

$$P^{(NL)}(t) = N\epsilon_0 \left(\frac{\partial \alpha}{\partial x} \right)_0 (x_\nu^{-i(\omega_p - \omega_s)t} + c.c.) \times (E_p e^{-i\omega_p t} + E_s e^{-i\omega_s t} + c.c.) \quad (1.98)$$

A expansão dos termos entre parênteses da componente não linear $P^{(NL)}(t)$ nos dá novos componentes frequenciais

$$P^{NL}(t) = P(2\omega_s - \omega_p) e^{-i(2\omega_s - \omega_p)t} + P(2\omega_p - \omega_s) e^{-i(2\omega_p - \omega_s)t} + P(\omega_s) e^{-i\omega_s t} + P(\omega_p) e^{-i\omega_p t} + n.f.c. \quad (1.99)$$

que dão origem a novos efeitos de DFWM devido à existência de modos ativos no Raman. Observe que o termo $P^L(t)$ é referente ao espalhamento Rayleigh do EREsp: anteriormente, o termo $\left(\frac{\partial \alpha}{\partial x}\right)_0$ interagiu apenas com campos fracos, gerando mudanças frequenciais de $\pm\omega_\nu$. A introdução de campos suficientemente fortes, por sua vez, promove o aparecimento da porção não-linear de fenômenos.

Estes fenômenos são classificados sob o termo geral *Coherent Raman Scattering* (CRS) e incluem a geração de novas frequências (*Coherent Stokes Raman Scattering* (CSRS) e *Coherent Anti-Stokes Raman Scattering* (CARS)) e a intensificação ou diminuição das intensidades das frequências incidentes originais (*Stimulated Raman Gain* (SRG) e *Stimulated Raman Loss* (SRL), respectivamente). Ambos SRG e SRL compõem a porção de processos denominada *Stimulated Raman Scattering* (SRS) [2].

O uso das palavras "*Stimulated*" (estimulada) e "*coherent*" (coerente) está ligado às propriedades intrínsecas do processo e portanto merecem um pouco mais de atenção.

Embora o termo "Stimulated Raman Scattering" se refira aos processos de SRL e SRG apresentados, todos os processos de CRS possuem natureza estimulada. A incidência dos feixes Pump e Stokes induzem excitação ao dipolo por meio de ressonância, modulando as frequências incidentes e estimulando a criação de bandas laterais $\pm\omega_\nu$. As relações específicas são:

- CSRS: $\omega_{CSRS} = \omega_s - \omega_\nu = \omega_s - (\omega_p - \omega_s) = 2\omega_s - \omega_p$
- CARS: $\omega_{CARS} = \omega_p + \omega_\nu = \omega_p + (\omega_p - \omega_s) = 2\omega_p - \omega_s$
- SRG: $\omega_{SRG} = \omega_p - \omega_\nu = \omega_p - (\omega_p - \omega_s) = \omega_s$
- SRL: $\omega_{SRL} = \omega_s + \omega_\nu = \omega_s + (\omega_p - \omega_s) = \omega_p$

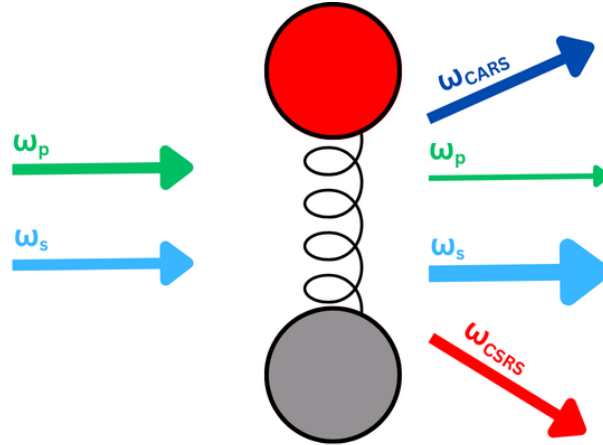


Figura 13 – Diagrama dos fenômenos CRS. Mediante incidência de campo dicromático sobre ligação molecular em condição de ressonância, pode ocorrer o surgimento de novas frequências (CARS e CSRS), aumento da intensidade do campo Stokes (SRG) ou diminuição da intensidade do campo Pump (SRG). Autoria própria.

Esta excitação por ressonância leva a um aumento da probabilidade de transições vibracionais, efetivamente aumentando a proporção de fótons que contribuem para o sinal Raman em relação ao caso espontâneo (cerca de 10% no CRS em relação aos $1/10^6$ fótons que sofrem EREsp) e a intensidade do fenômeno. Por esta razão, o Espalhamento Estimulado é preferido ao invés do Espontâneo para algumas aplicações, como veremos a seguir [21].

Já a natureza coerente dos fenômenos de CRS decorre do fato de que as oscilações moleculares são induzidas de forma ordenada pelos campos ópticos incidentes. Quando a diferença entre as frequências dos feixes pump e Stokes é igual à frequência vibracional de uma determinada ligação molecular, ocorre uma excitação ressonante dos modos vibracionais. Nesse regime, as oscilações dos dipolos moleculares passam a ser guiadas pela diferença de fase entre os campos incidentes, e não por flutuações aleatórias, como acontece no EREsp. Isso resulta em uma resposta coletiva e coerente do meio, que gera uma polarização macroscópica em fase e, conseqüentemente, um sinal óptico coerente e com maior intensidade [2, 21].

1.3.6 Coherent Stokes Raman Scattering e Coherent Anti-Stokes Raman Scattering

A nomenclatura dos processos CARS e CSRS segue a mesma lógica do caso do EREsp: na condição de ressonância, as ondas incidentes induzem uma transição vibracional na frequência ω_v . Esta mudança ocorre na forma de uma diminuição da menor frequência incidente (*redshift*) para o CSRS e um aumento da maior frequência incidente (*blueshift*)

para o CARS, como pode ser visto no diagrama de energia da Figura 14 e no diagrama espectral da Figura 15.

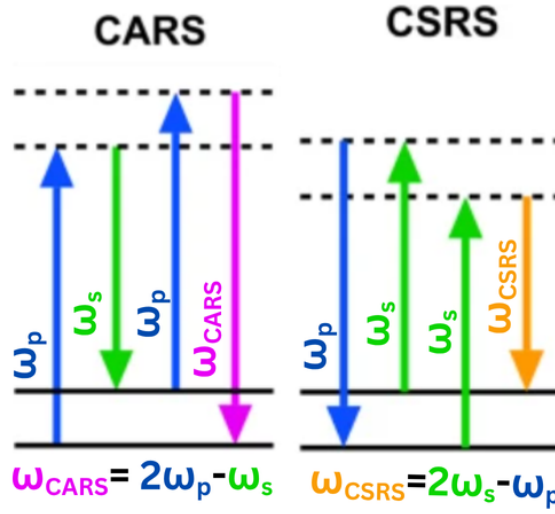


Figura 14 – Diagrama de energia para CARS e CSRS. Adaptado de [22].

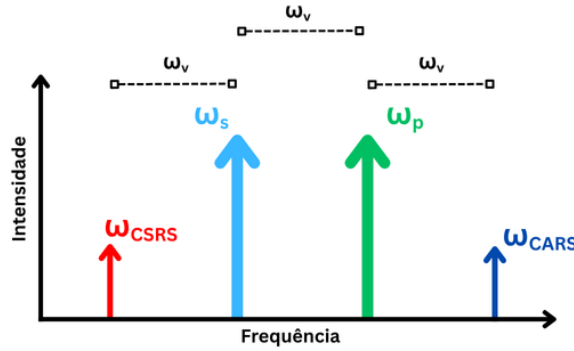


Figura 15 – Diagrama de *blueshift* e *redshift* em relação aos campos Pump e Stokes que dão origem ao CARS e CSRS. Autoria própria.

Dentre as polarizações explicitadas na seção 1.3.3.2, os fenômenos CARS e CSRS podem ser respectivamente referenciados pelas equações:

$$P(2\omega_P - \omega_S) \propto \chi^{(3)} E_P^2 E_S^* \quad (1.100)$$

e

$$P(2\omega_S - \omega_P) \propto \chi^{(3)} E_S^2 E_P^* \quad (1.101)$$

Embora ambos os processos sejam resultantes do surgimento de novas bandas de vibração, o CSRS ocorre em uma região onde o *background* fluorescente é muito alto, dificultando a separação dos dois sinais e dificultando sua aplicação em cenários

práticos. Por esta razão, o sinal CARS (que ocorre em uma região longe da fluorescência) é amplamente utilizado no cenário experimental, e por isto será o único considerado a partir daqui [21].

A intensidade do sinal CARS é dada por [23]

$$I_{CARS} \propto |\chi^{(3)}|^2 I_p^2 I_S \left| \sin^2\left(\frac{\Delta k z}{2}\right) \frac{\Delta k}{2} \right| \quad (1.102)$$

1.3.7 Stimulated Raman Scattering (SRS)

Enquanto CARS e CSRS se manifestam na geração de novas frequências com *shifts* $\pm\omega_\nu$, efeitos de SRS são detectados como mudanças nas intensidades das frequências ω_P e ω_S incidentes. Mais especificamente, o SRS pode ser dividido em dois fenômenos: a diminuição da intensidade do feixe *pump* (*Stimulated Raman Loss*, SRL) ou o aumento da intensidade do feixe *Stokes* (*Stimulated Raman Gain*, SRG) [2, 21].

Ao incidir sobre a ligação molecular, fótons *pump* ω_P são aniquilados e fótons ω_S são criados. Pela Lei de Conservação de Energia, a diferença energética entre os dois processos é então guardada no sistema. Como anteriormente, uma onda dicromática (1.87) se propaga por um meio em condição de ressonância e, por efeitos de DFWM, gera as ondas referentes aos processos de SRS: para o SRL, três ondas ω_P, ω_S e ω_p interagem entre si para gerar uma onda em ω_S , enquanto no SRL a frequência emitida ω_P é originada pela interação entre as frequências ω_S, ω_s e ω_P . Os processos são representados na Figura 16:

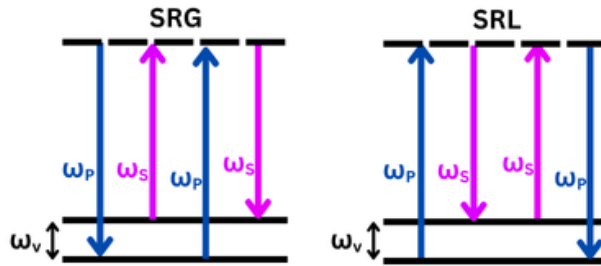


Figura 16 – Diagramas de DFWM representando SRG (Esq.), onde uma onda ω_S é gerada a partir da mistura $-\omega_P + \omega_S + \omega_P = \omega_S$, e SRL (Dir.), onde uma onda ω_P é gerada a partir da mistura $\omega_P - \omega_S + \omega_S = \omega_P$. Autoria Própria

Agora, explicitaremos as equações que explicam a fundo o aumento e diminuição das intensidades ligadas aos fenômenos do SRS. Considerando $E_S^{(3)}$ ($E_P^{(3)}$) e E_S (E_P) como as intensidades das ondas induzidas e incidentes, respectivamente, dos campos *Stokes* (*Pump*), podemos considerar que as intensidades totais podem ser dadas por [2, 21]

$$I(\omega_S) \propto |E_S^{(3)} + E_S| \quad (1.103)$$

$$I(\omega_P) \propto |E_P^{(3)} + E_P| \quad (1.104)$$

Como $|E_S^{(3)}|^2 \propto |P(\omega_s)|^2$ e $|E_P^{(3)}|^2 \propto |P(\omega_P)|^2$ e tais polarizações, como explicitado na seção 1.3.3.2, são dadas por

$$P(\omega_S) \propto \chi^{*(3)} E_P^2 E_S \quad (1.105)$$

$$P(\omega_P) \propto \chi^{*(3)} E_P E_S^2 \quad (1.106)$$

as intensidades podem ser reescritas como

$$I(\omega_S) \propto |\chi^{(3)}|^2 I_P^2 I_S + I_S + 2\text{Re}[E_S^{(3)} E_S^*] \quad (1.107)$$

$$I(\omega_P) \propto |\chi^{(3)}|^2 I_P I_S^2 + I_P + 2\text{Re}[E_P^{(3)} E_P^*] \quad (1.108)$$

Na prática, as intensidades induzidas são consideravelmente menores do que as incidentes ($|E_i^{(3)}| \ll |E_i|$ para $i=(S,P)$). Portanto, as equações podem ser reescritas como

$$I(\omega_S) \propto I_S + 2\text{Re}[E_S^{(3)} E_S^*] \quad (1.109)$$

$$I(\omega_P) \propto I_P + 2\text{Re}[E_P^{(3)} E_P^*] \quad (1.110)$$

O fator determinante se as intensidades induzidas serão menores do que as incidentes no caso do SRL ou maiores como no SRG é se as interferências entre os termos serão construtivas ou destrutivas [5, 21]. Considerando que as intensidades dos campos podem ser escritas como

$$E_S^{(3)} = iP(\omega_s) \quad (1.111)$$

$$E_P^{(3)} = iP(\omega_P) \quad (1.112)$$

podemos reescrever as intensidades como

$$I(\omega_s) \propto I_S + 2\text{Re}[iP(\omega_s) E_S^*] \quad (1.113)$$

$$I(\omega_P) \propto I_P + 2\text{Re}[iP(\omega_P) E_P^*] \quad (1.114)$$

Considerando as formas das polarizações em 1.105, temos

$$I(\omega_s) \propto I_S + 2I_S I_P \text{Re}[i\chi^{(3)*}] \quad (1.115)$$

$$I(\omega_s) \propto I_P + 2I_S I_P \text{Re}[i\chi^{(3)}] \quad (1.116)$$

Aqui, precisamos fazer um adendo sobre a polarizabilidade de terceira ordem. Em termo gerais, ela pode ser descrita como composta por uma parte ressonante ($\chi_R^{(3)}$) e outra não ressonante ($\chi_{NR}^{(3)}$), tal que $\chi^{(3)} = \chi_R^{(3)} + \chi_{NR}^{(3)}$ [21]. A parte ressonante é aquela ativa e associada aos modos vibracionais da ligação molecular, é a principal responsável pela indução dos efeitos desejados como CARS, CSRS etc, e possui formato $\chi_R^{(3)} = \text{Re}[\chi_R^{(3)}] + i\text{Im}[\chi_R^{(3)}]$ [5, 21]. Já a porção não ressonante é a que dá origem a outros processos de FWM independentes da ligação molecular, e por isto são comumente consideradas indesejadas e interferentes com o sinal Raman buscado. Considerando este novo formato da polarizabilidade, as intensidades são

$$I(\omega_s) = I_{SRG} \propto I_S + 2I_S I_P \text{Im}[\chi_R^{(3)}] \quad (1.117)$$

$$I(\omega_s) = I_{SRL} \propto I_P - 2I_S I_P \text{Im}[\chi_R^{(3)}] \quad (1.118)$$

Esta equação explicita como o sinal do SRL é medido pela diminuição da intensidade do sinal *Pump* e a do SRG, pelo aumento da intensidade do sinal Stokes quando comparados com as ondas incidentes.

1.4 Espalhamento Raman aplicado à Biomedicina

Até agora, nos preocupamos em explicar os mecanismos Físicos que regem o funcionamento de diversas iterações de Espalhamento Raman. Explicitando as principais aplicações da técnica e focando em aplicações biomédicas, veremos agora a sua importância para nosso projeto.

1.4.1 Imageamento e Microscopia com Espectroscopia Raman

Sob uma perspectiva generalizada, as técnicas de microscopia de varredura a laser utilizam um feixe altamente focalizado que percorre a amostra ponto a ponto ou linha por linha, com o auxílio de espelhos galvanométricos ou piezoelétricos. Em cada ponto iluminado, o sinal resultante é coletado por detectores sensíveis, como tubos fotomultiplicadores (*photomultiplier tubes*, PMTs), e posteriormente reconstruído para formar uma

imagem. Diferentemente da microscopia convencional de campo claro (*brightfield*), esses métodos permitem mapear propriedades químicas, estruturais e funcionais das amostras com alta resolução espacial, revelando contrastes e detalhes invisíveis a técnicas ópticas tradicionais [24].

Fotoluminescência é a técnica mais utilizada para este propósito, atualmente, devido ao seu relativo baixo custo. Entretanto, diversas biomoléculas, como aminoácidos, lipídeos, glucose e colesterol, não são naturalmente fluorescentes, e necessitam ser marcadas com corantes especiais. Estas substâncias, no entanto, possuem diversas desvantagens como toxicidade e tamanho molecular maior do que as moléculas alvo, muitas vezes providenciando resultados falso-positivos. Com isto, faz-se necessário o uso de métodos alternativos de imageamento sem marcadores, enquanto mantendo a alta sensibilidade e seletividade química [24].

Dentro destas necessidades, técnicas de espectroscopia vibracional, como CARS e SRS, surgiram como candidatas ideais nas últimas duas décadas, impulsionadas por avanços tecnológicos na geração de laser e processamento computacional. Por apresentarem excitação não linear, estas técnicas produzem sinais muito mais intensos do que o EREsp, este último que, se utilizado para esta finalidade, tornaria a aquisição de imagens um processo longo e ineficiente. A técnica ainda apresenta alta seletividade e resolução espacial.

Com discutido nas seções 1.3.6 e 1.3.7, efeitos não lineares ocorrem em locais de alta intensidade. Na microscopia Raman, estes locais basicamente se limitam aos focos do laser pelas lentes objetivas, sendo que a intensidade em outros locais é comparativamente negligente. Esta característica garante à microscopia Raman a habilidade de obter imagens com resolução similar à da microscopia confocal (Fig 17), mas sem a necessidade de instalação de *pinholes* [25].

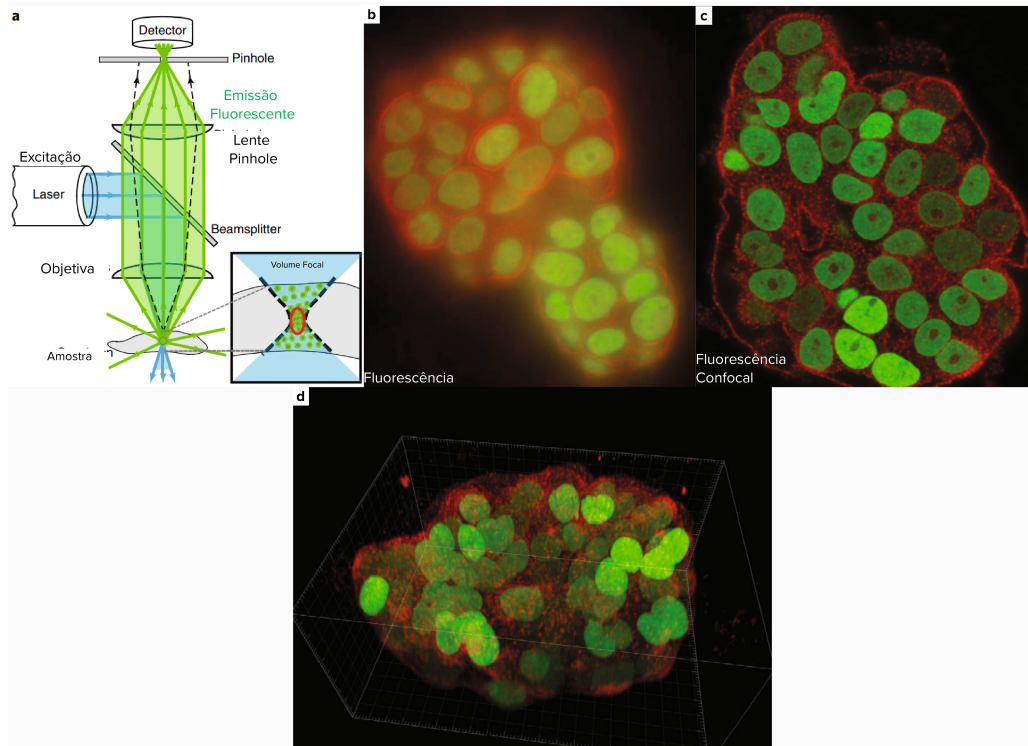


Figura 17 – Microscopia Confocal. (a) Diagrama de setup necessário para a realização de microscopia fluorescente confocal. A presença de um pinhole garante que apenas a luz proveniente do plano focal seja detectado, bloqueando a luz dos outros planos e oferecendo uma imagem com maior nitidez e resolução. (b) Imagem de microscopia fluorescente sem confocalidade de um organoide com marcadores fluorescentes para proteínas nucleares (verde) e membrana celular (vermelho). A imagem é uma superposição da imagem nítida do plano focal sobreposta por artefatos embaçados provenientes de pontos fora do foco do laser. (c) Mesmo organoide, mas sob microscopia fluorescente confocal, que permite o isolamento de apenas um plano da amostra num processo chamado seccionamento óptico, eliminando os artefatos embaçados e isolando a imagem nítida. Ao obter-se as imagens confocais de todos os planos, é possível utilizar processos computacionais para reorganizá-los em uma estrutura 3D (d). Adaptado de [25].

Com estas qualidades, o Espalhamento Raman Estimulado é cada vez mais utilizado em técnicas de microscopia de varredura. Algumas aplicações incluem:

- Cheng et al. [26] realizaram o imageamento em tempo real da condição da mielina, um revestimento lipídico presente em tecido nervoso cuja deterioração é um sinal precoce de diversas doenças neurodegenerativas (18). Para tal, o estudo realizou um imageamento em microscopia de varredura com lasers *Pump* e *Stokes* em ressonância a 2840 cm^{-1} , excitando as bandas vibracionais dos lipídeos.

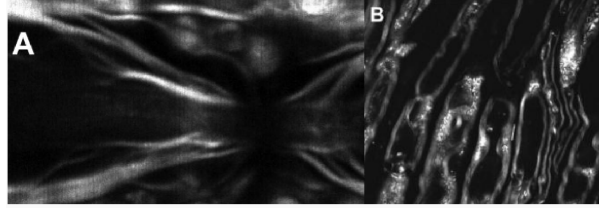


Figura 18 – Imagens CARS de axônios de camundongo em amostras *ex vivo* de tecido cerebral (a) e medula espinhal (b) de porcos-da-índia. Adaptado de [26].

- Mansfield et al. [27] usaram SRS para a identificação de células vivas em tecido *ex vivo* de cartilagem de camundongos mediante excitação de bandas CH_2 (lipídeo) em 2840 cm^{-1} , carbonato em 1070 cm^{-1} e fosfato em 959 cm^{-1} . Com isto, foram capazes de distinguir entre os diferentes tipos de tecido presentes na amostra, como pode ser visto na Figura 19:

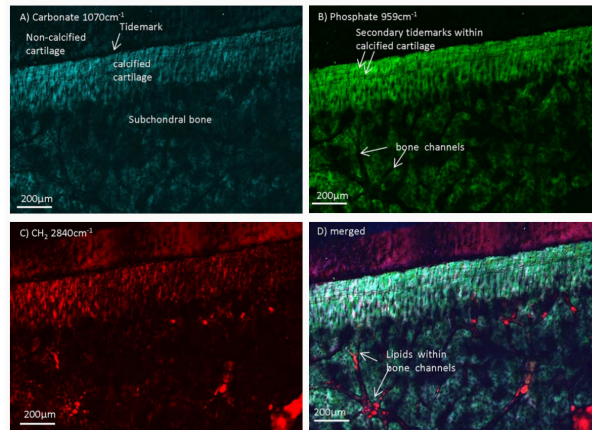


Figura 19 – Imagens de zona de cartilagem calcificada e osso subcondral. Imagens SRS de (a)carbonato em 1070 cm^{-1} , (b) fosfato em 959 cm^{-1} e lipídeos em 2840 cm^{-1} . As imagens foram então sobrepostas para a visualização dos locais de ocorrência de cada biomolécula, onde é possível verificar a intrusão de lipídeos nos canais ósseos (d). Fonte: [27]

Enquanto estas são aplicações que demonstram a versatilidade e eficácia da técnica de Microscopia Raman, nosso interesse se foca na caracterização de marcadores da Doença de Alzheimer, na qual nos aprofundaremos a seguir.

1.4.2 A Doença de Alzheimer e Métodos Diagnósticos Potenciais com o uso de Óptica Não Linear

A Doença de Alzheimer (DA) configura uma das maiores emergências médicas do século XXI, representando entre 60 e 80% dos 50 milhões de casos de demência existentes atualmente [28, 29]. Com o aumento da expectativa de vida da população devido aos avanços médicos e melhoria de condições em geral, espera-se que este número triplique até

2050 [30]. Além de causar dor e sofrimento ao paciente em si e às pessoas ao seu redor, estima-se que os custos de se lidar com a doença passem de \$305 bilhões de dólares para \$1.1 trilhão neste mesmo período nos EUA, o que engloba não apenas gastos diretos com apoio médico mas também perda de produtividade dos pacientes [29, 31].

A DA é uma doença neurodegenerativa progressiva, causando deficiências cognitiva, funcional e comportamental. A doença se caracteriza pela existência de três fases principais: uma fase assintomática com a presença de biomarcadores (DA Pré-Clínica, duração entre 6 e 10 anos), seguida por degenerescências cognitivas e/ou comportamentais (Deficiência Cognitiva Leve) e, por fim, a fase demencial (DA Demencial) [32]. Atualmente, o diagnóstico da DA é majoritariamente feito por análise clínica por um profissional de saúde mediante surgimento de sintomas demenciais. Entretanto, este método só é eficaz em detectar a doença em seus estágios finais, quando grande parte do cérebro e suas funções estão denegridas e a expectativa de vida do paciente é baixa [33]. Esta inabilidade faz com que o seu desenvolvimento em estágios primordiais seja amplamente desconhecido para a comunidade acadêmica atualmente, dificultando o desenvolvimento de intervenções terapêuticas eficazes. Além disso, a fase silenciosa da doença ainda pode causar dificuldades à vida do paciente ao longo de seu desenvolvimento, exacerbando ainda mais a necessidade de desenvolvimento de métodos precoces de diagnóstico [34].

Dois são os biomarcadores ditos serem presentes em células do sistema nervoso na fase assintomática da doença: placas extracelulares do peptídeo Beta Amiloide (βA) e emaranhamentos neurofibrilares intracelulares (ENI) [29]. Ambos os marcadores atraem muito interesse da comunidade científica devido ao fato de aparecerem ainda nos estágios iniciais da doença (20 anos antes do surgimento de sintomas demenciais para a βA e 10-15 anos antes para o ENI) [35, 36], representando valiosas oportunidades de diagnósticos precoces. Métodos atuais como o Imageamento de Ressonância Magnética (do inglês *MRI*) e a Tomografia por emissão de Pósitrons (do inglês *PET scan*) são utilizados, mas são altamente invasivos devido ao uso de tinturas exógenas tóxicas e/ou radioativas e apresentam resultados limitados devido à baixa capacidade de distinção entre βA e ENI e outras células, muitas vezes oferecendo um diagnóstico falso-positivo ou falso-negativo [33]. A capacidade de detectar a DA em seus estágios iniciais oferece a chance de melhor compreender sua evolução, desenvolver novas intervenções, oferecer ao paciente mais tempo para ajuste de seu estilo de vida para acomodar a doença e uma janela temporal maior para que intervenções atualmente sendo desenvolvidas tenham mais efeito [35, 36].

Tendo em vista este potencial, Cunha e Fonseca et al., da Universidade Federal de Minas Gerais, se propuseram a realizar imageamentos da βA em amostras autópticas de camundongos transgênicos, utilizando frequências de ressonância com ligações moleculares caracterizadas por Espalhamento Espontâneo [6, 37]. A placa em si é composta por um núcleo central composto por fenilalanina (ressonâncias em 1007 cm^{-1} , 1022 cm^{-1} , 1033

cm^{-1} e 1610 cm^{-1}), tirosina (1610 cm^{-1}), Amida III β (1233 cm^{-1}), Amida I β (1670 cm^{-1}) e Amida β (3070 cm^{-1}) e uma orla exterior (referenciada como "halo" pelo seu formato anelar) composta majoritariamente por lipídeos (bandas CH_2 em 2850 cm^{-1} , CH_3 em 2930 cm^{-1} e $=CH$ em 3016 cm^{-1}) [37]. O espectro e as imagens obtidas com as excitações destas bandas podem ser encontradas nas Figuras 20 e 21, respectivamente.

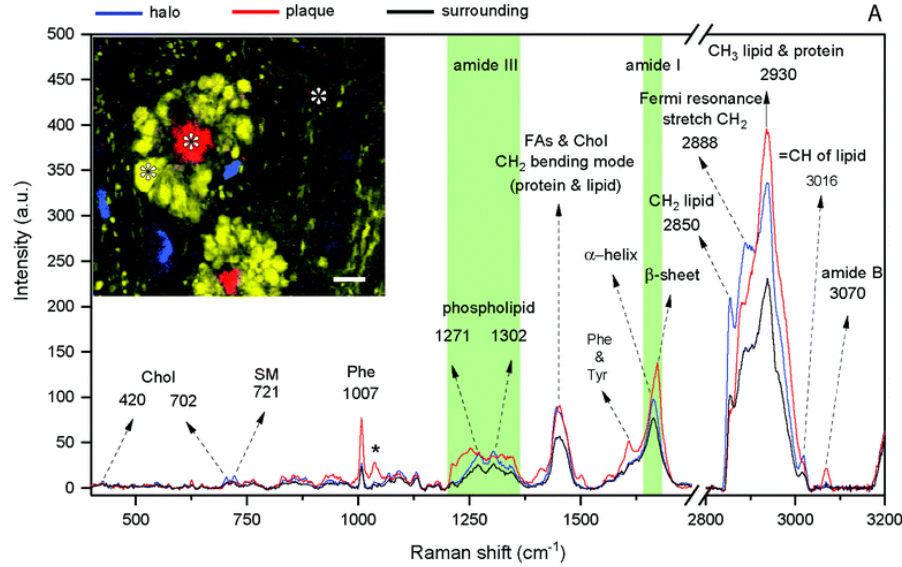


Figura 20 – Espectro Raman da placa βA presente em tecido nervoso de camundongo transgênico de 12 meses de idade. A estrutura do peptídeo é majoritariamente formada por um halo lipídico e um núcleo com fenilalanina e tirosina, destacados na imagem do canto superior esquerdo em verde e vermelho, respectivamente. [37]

Para efeito de comparação, as imagens foram também utilizadas com EREsp, demorando até 20 horas por imagem e demonstrando a ineficácia da técnica para situações *in vivo* e a necessidade de utilizar-se técnicas estimuladas [6].

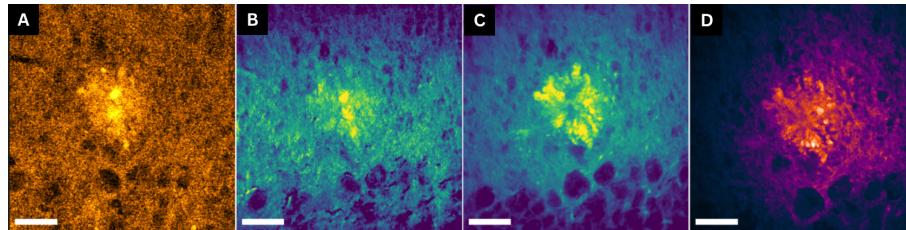


Figura 21 – Imageamento multimodal da βA em amostras *ex vivo* de cérebro de camundongo. (A) Imagem do núcleo com EREsp em 1675 cm^{-1} . A imagem levou mais de 20 horas para ser obtida. (B) Imagem SRS do núcleo em 1675 cm^{-1} . (C) Imagem SRS dos lipídeos presentes no halo da βA em 2850 cm^{-1} . (D) Imagem CARS dos lipídeos do halo em 2850 cm^{-1} . Todas as barras indicam uma escala de $20\text{ }\mu\text{m}$. Adaptado de [6]

1.4.3 Parâmetros de Segurança

A utilização de lasers em tecidos humanos, especialmente em tecidos oculares ou na pele, é controlada pela norma Z136.1 da American National Standards Institute (ANSI) [38]. Como o projeto eventualmente evoluirá para incluir o escaneamento retinal *in vivo* em humanos, é de suma importância que as medições sejam feitas dentro de valores compatíveis com os limites de segurança estabelecidos por tal norma.

Os valores de Exposição Máxima Permitida (MPE, em inglês) são definidos de acordo com a natureza do laser (pulsado ou contínuo), seu comprimento de onda e tempo de exposição da amostra. No caso em que vários comprimentos de onda estejam presentes, o menor limite permitido deve ser utilizado como parâmetro de segurança.

O laser PicoEmerald possui pulsos com taxa de repetição de 80MHz, e largura temporal $t = 2\text{ps}$ cada. Para lasers pulsados como este, ANSI Z136.1 estipula três regras de seleção, e define que o MPE, por segurança, deve ser o mais conservador [38]. As regras consideram uma duração de trem de pulsos T , tempo de exposição máxima T_{max}

- **Regra 1: MPE para Pulso Único.** A exposição proveniente de qualquer pulso único dentro de um trem de pulsos não deve exceder a MPE para um pulso único com a mesma duração. (A Regra 1 protege contra danos térmicos causados por qualquer pulso individual que possua energia acima da média.)
- **Regra 2: MPE para Potência Média (Perigos Térmicos e Fotoquímicos).** A exposição de qualquer grupo de pulsos (ou subgrupos de pulsos em um trem) entregue durante um intervalo de tempo T não deve exceder a MPE correspondente ao tempo T . Ou seja, a exposição radiante total de todos os pulsos dentro de qualquer parte do trem de pulsos não deve exceder a MPE para aquela duração. Devido à complexidade de um trem de pulsos, pode ser necessário calcular múltiplas MPEs potenciais (para diferentes agrupamentos de pulsos). A aplicação da Regra 2 geralmente resulta em uma MPE menor para lasers com alto ciclo de trabalho do que a aplicação da Regra 3. (A Regra 2 protege contra lesões cumulativas por mecanismos de dano fotoquímico e também contra o acúmulo de calor proveniente da potência média para lesões térmicas.)
- **Regra 3: MPE para Múltiplos Pulsos (Perigos Térmicos).** A exposição para qualquer pulso único ($t < 0,25\text{s}$) ou grupo de pulsos ($T < 0,25\text{s}$), com separação mínima entre os pulsos de pelo menos t_{min} , não deve exceder a MPE para pulso único (para $t \geq t_{min}$) multiplicada por um fator de correção para múltiplos pulsos C_P .

Comprimento de Onda (nm)	Duração de Exposição, t (s)	MPE	
		J.cm ²	W.cm ²
Near infrared			
700 a 1050	10 ⁻¹³ a 10 ⁻¹¹	1.5 x C _a x10 ⁻⁸	
700 a 1050	10 ⁻¹¹ a 10 ⁻⁹	2.7 x C _a x t ^{0.75}	
700 a 1050	10 ⁻⁹ a 18 x 10 ⁻⁶	5.0 x C _a x 10 ⁻⁷	
700 a 1050	18x10 ⁻⁶ a 10	1.8 x C _a t ^{0.75} x 10 ⁻³	
700 a 1050	10 a 3x10 ⁴		C _a x 10 ⁻⁴
1050 a 1400	50x10 ⁻⁶ a 10	C _c x 9 x t ^{0.75} x 10 ⁻³	

Considerando a detecção da βA via excitação de lipídeos a 2850 cm⁻¹, usaremos lasers sintonizados a 1064 e 816 nm com *dwell time* (ou tempo de permanência do laser sobre um ponto da amostra) de 1μs. ANSI Z136.1 estipula que, para tempos e exposição menores que $t_{min} = 18\mu s$ (700 < λ < 1050 nm) ou $t_{min} = 50\mu s$ (1050 < λ < 1400 nm) , este valor deve ser utilizado no cálculo da regra 2 em seu lugar. Os cálculos de MPE para tais parâmetros, portanto, são:

816nm

$$Ca_{816} = 1.708$$

Regra 1: MPE por pulso

$$H_{pulso} = C_a \times 5 \times 10^{-7} = 8.54 \times 10^{-7} J/cm^2 \quad (1.119)$$

Regra 2: média ao longo do tempo

$$H_{média} = C_a \times 1.8 \times 10^{-3} \times t_{min}^{0.75}/80 = 8.49 \times 10^{-7}/80 = 1.06 \times 10^{-8} J/cm^2 \quad (1.120)$$

Regra 3: correção para múltiplos pulsos

$$H_N = H_{pulso} \times N^{-0.25} = 8.54 \times 10^{-7} \times 80^{-0.25} = 2.85 \times 10^{-7} J/cm^2 \quad (1.121)$$

O mais restritivo é $1.06 \times 10^{-8} J/cm^2$. Z136.1 não considera a densidade de energia incidente sobre a retina, mas sobre a pupila do paciente, de área 0.385 cm² (o cristalino próximo à pupila é o responsável pela focalização do feixe, e tal compensação já é levada em consideração no cálculo). Convertendo para energia total, $E = MPE \times A = 1.06 \times 10^{-8} J/cm^2 \times 0.385 cm^2 = 4.08 \times 10^{-9} J$. Convertendo para potência, $P = \frac{E}{t} = \frac{4.08 \times 10^{-9} J}{10^{-6} s} = 4.08 mW$.

1064nm

$$Cc_{1064} = 1$$

$$Ca_{1064} = 5$$

Regra 1: MPE por pulso

$$H_{pulso} = C_a \times 5 \times 10^{-7} = 2.50 \times 10^{-6} J/cm^2 \quad (1.122)$$

Regra 2: média ao longo do tempo

$$H_{média} = C_a \times 1.8 \times 10^{-3} \times t^{0.75} / 80 \text{ pulsos} = 5.35 \times 10^{-6} J/cm^2 / 80 \text{ pulsos} = 6.68 \times 10^{-8} J/cm^2 \quad (1.123)$$

Regra 3: correção para múltiplos pulsos

$$H_N = H_{pulso} \times N^{-0.25} = 2.68 \times 10^{-6} \times 80^{-0.25} = 1.01 \times 10^{-7} J/cm^2 \quad (1.124)$$

O mais restritivo é $6.68 \times 10^{-8} J/cm^2$. Convertendo para energia total, $E = MPE \times A = 6.68 \times 10^{-8} J/cm^2 \times 0.385 cm^2 = 2.57 \times 10^{-8} J$. Convertendo para potência, $P = \frac{E}{t} = \frac{2.57 \times 10^{-8} J}{10^{-6} s} = 25.7 mW$

Parâmetro	816 nm	1064 nm
C_a	1.708	5
MPE [J/cm^2]	1.06×10^{-8}	6.68×10^{-8}
Energia total no Olho	$4.08 \times 10^{-9} J$	$2.57 \times 10^{-8} J$
Potência Permitida	4.08mW	25.7mW

Portanto, a teoria sustenta que a oftalmoscopia de varredura a laser com CARS/SRS é factível com os parâmetros estabelecidos pelo laser, desde que as potências dos lases 816 e 1064nm sejam mantidas abaixo de 4.08 e 25.7mW, respectivamente. No futuro, estudaremos possíveis modificações no caminho óptico que levem a um aumento do limite permissível de radiação incidente.

2 Aparato Experimental

O propósito do projeto é a construção de Oftalmoscópio de Varredura a Laser (OVL) integrado com tecnologia de Espalhamento Raman Estimulado, capaz de futuramente realizar escaneamentos retinais em busca da βA , fazendo uso da técnica para criar um novo método de diagnóstico precoce da DA. Embora o OVL em si não seja uma peça nova de tecnologia, sua implementação com tecnologia Raman, pelo conhecimento do autor e do grupo, ainda não foi adotada em massa.

Os principais objetivos incluem alcançar a obtenção de imagens com varreduras rápidas o suficiente de modo a minimizar aberrações devido ao movimento ocular de pacientes enquanto mantêm uma resolução de imagem satisfatória. Inicialmente, iremos descrever o funcionamento óptico geral de um OVL, passando em seguida para o protótipo desenvolvido ao longo do Mestrado. Depois, passaremos para a lógica computacional e eletrônica envolvida na operação do mesmo, com as alterações relevantes sendo explicadas na seção de Resultados.

2.1 O Oftalmoscópio de Varredura a Laser

O primeiro Oftalmoscópio de Varredura a Laser (OVL) foi desenvolvido na década de 80 por Webb, Hughes e Pomerantzeff [39]. Anos de aperfeiçoamentos de *hardware* e componentes ópticos resultaram na iteração moderna de tal equipamento, que foi a inspiração por trás do protótipo desenvolvido em laboratório. Um diagrama representando seus componentes principais pode ser encontrado na Figura 22.

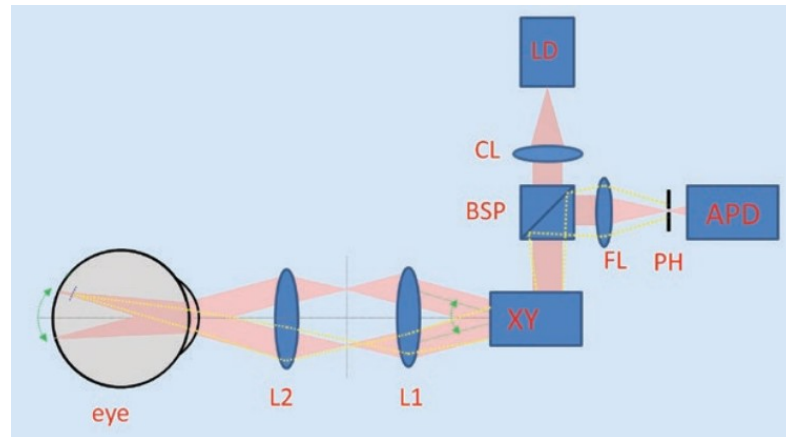


Figura 22 – Diagrama representativo do OVL. Seus componentes principais incluem uma fonte laser (LD), uma lente colimadora (CL), um *Beamsplitter* (BSP), um par de espelhos de varredura (XY) e um par de lentes focalizadoras (L1 e L2) que incidem o laser sobre a superfície retinal do olho (eye). O sinal emitido é então enviado pelo caminho de volta até incidir sobre o *beamsplitter*, onde é redirecionado até uma montagem de sistema confocal composto por uma lente focalizadora (FL) e um pinhole (PH) e detectado por um fotodiodo de avalanche (APD). Adaptado de [40]

A oftalmoscopia de varredura a laser se baseia na fluorescência de marcadores como a fluoresceína sódica para a obtenção de imagens. Este corante é injetado na corrente sanguínea do paciente e oferece melhor visualização dos vasos sanguíneos presentes na retina do paciente. Com isto, uma fonte laser (LD) simples é suficiente para a realização da prática. Com o uso de uma lente (CL), o laser é então colimado e incide sobre um *beamsplitter* (BSP), uma lâmina com revestimento especial em uma das superfícies que altera suas propriedades refletoras/transmissoras em determinados comprimentos de onda.

O laser então é encaminhado a um sistema de espelhos de varredura (XY), passando por um par de lentes (L1 e L2) que o colimam até incidir sobre o cristalino, a lente natural do olho humano que focaliza a luz incidente na retina humana. Os espelhos são responsáveis pela varredura do laser sobre a retina humana, direcionando-o a diversos pontos da mesma. Para cada um destes pontos, o sinal fluorescente emitido é coletado em retroespalhamento pelo sistema óptico até incidir sobre a superfície refletora do BSP, sendo então redirecionado para um detector fotodiodo de avalanche (APD). Um computador é então responsável por organizar estes pontos em uma matriz, ajustando sua coloração de acordo com a intensidade do sinal e efetivamente transformando-os em pixels e reconstruindo a imagem da amostra. O processo é análogo à construção de uma imagem a partir de diversos pixels em uma câmera comum, como pode ser visto na Figura 23.

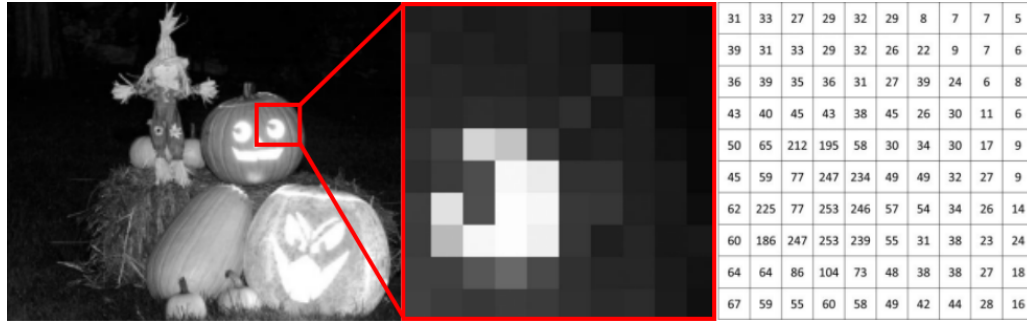


Figura 23 – Imagens digitais (esquerda) são formadas por pixels (centro). Em imagens preto e branco, a imagem pode ser interpretada como uma matriz de valores representando o preto absoluto (0) e o branco puro (255), como visto na direita. Adaptado de [41].

Um sistema de confocalidade é ainda inserido entre o BSP e a APD para melhoria da resolução espacial, composto por uma lente focalizadora (FL) e um *pinhole* (PH). A razão pela qual isto é feito foi discutida na seção 1.4.1.

2.2 O Protótipo Desenvolvido

Iremos agora detalhar a construção de nosso protótipo, especificando as partes utilizadas e detalhando suas características. O objetivo inicial era validar a montagem óptica e otimizar o hardware e software operacionais antes de utilizá-lo para medições com Espalhamento Raman Estimulado, visto que sua implementação é consideravelmente mais complexa. Para isto, o sistema foi inicialmente montado para a obtenção de imagens com fluorescência como mostrado na Figura 24.

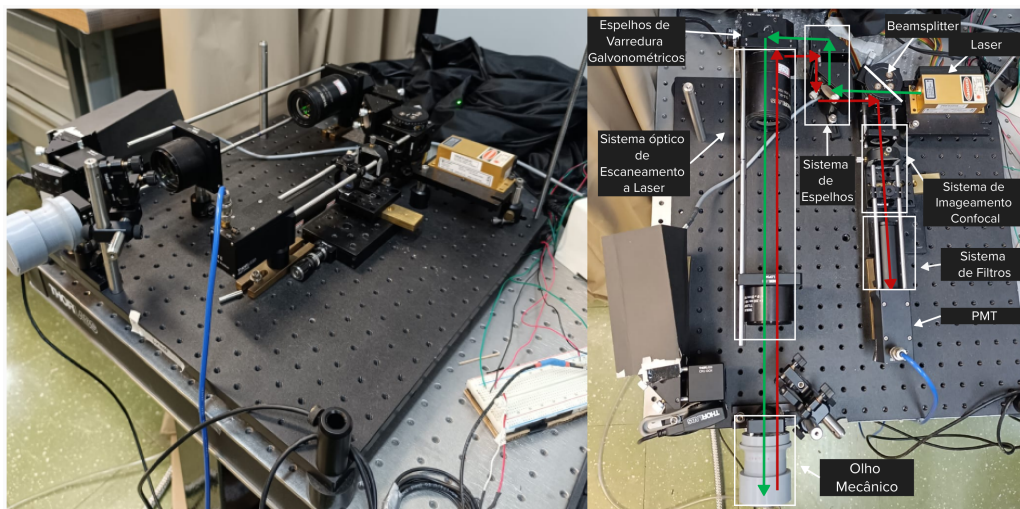


Figura 24 – (Esquerda) Protótipo do OVL desenvolvido e montado para imageamento com fluorescência. (Direita) Componentes utilizados na montagem e caminhos percorridos pelo laser incidente e pelo sinal fluorescente emitido. Autoria própria.

2.2.1 Fonte Laser 562nm

Utilizamos um laser Coherent 561-20 (20mW emitindo a um comprimento de onda de 561 nm) para iluminação da amostra. Como a fluorescência é um fenômeno que não depende de nenhum tipo de Mistura de Ondas, a utilização de um laser monocromático é suficiente para esta aplicação inicial.

2.2.2 Beamsplitter

Beamsplitters são elementos ópticos capazes de separar um feixe luminoso incidente em dois em uma proporção específica, como mostrado na Figura 25. Para a montagem, utilizou-se um BSN10R da Thorlabs, que reflete 90% do sinal incidente enquanto transmite os 10% restantes.



Figura 25 – (Esquerda) BSP utilizado na montagem. (Direita) Diagrama indicando o funcionamento do BSP. Adaptado de [42]

O laser emitido inicialmente incide sobre a superfície não-refletora, e portanto possui a maior parte do seu sinal transmitida sem nenhuma interferência. A fluorescência, ao retornar, no entanto, incide sobre tal superfície e tem a maior parte do seu sinal redirecionado para a fotomultiplicadora.

2.2.3 Sistema de Espelhos

O sistema consiste em dois espelhos montados em posicionadores cinemáticos, o que permite ao usuário ajustar o alinhamento do laser no caminho óptico. A escolha dos espelhos deve ser feita tendo em mente os índices de reflexão para os comprimentos de onda envolvidos na medição, e suas características de transmissão são explicitados na figura 26.

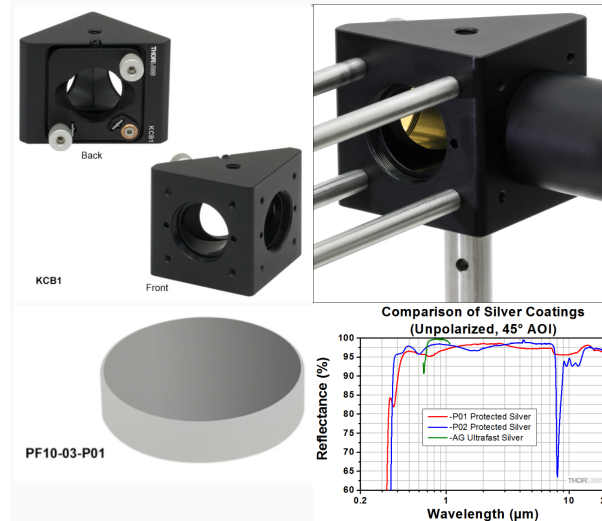


Figura 26 – (Superior Esquerdo) Suporte KCB1 de ajuste para espelhos de diâmetro 1". Os parafusos metálicos permitem o ajuste fino horizontal e vertical do laser. (Superior Direito) Exemplo do KCB1 com espelho em uma montagem óptica. (Inferior Esquerdo) Espelhos PF10-03-P01 de 1" de diâmetro compatíveis com o KCB1. O revestimento da superfície refletora otimiza o uso do espelho no intervalo de comprimento de onda entre 350 e 8000 nm ao refletir cerca de 97% do sinal incidente, como indicado pelo gráfico (Inferior Direito). Adaptado de [43]

2.2.4 Espelhos de Varredura

Utilizando-se o sistema de espelhos descrito anteriormente, o laser é ajustado para incidir sobre um sistema de espelhos de varredura GVS002 bidimensional. O aparelho é formado por dois espelhos, um responsável por variar o ângulo de incidência horizontal do laser e o outro, o vertical. Quando utilizados em conjunto, o sistema é responsável por realizar o padrão de escaneamento do laser sobre a amostra, como mostra a Figura 27.

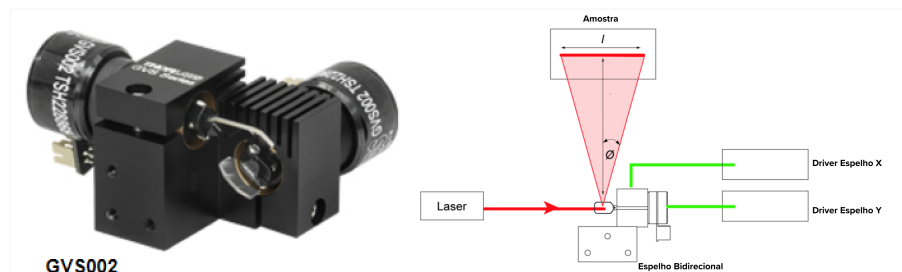


Figura 27 – (Esquerda) Espelhos de varredura GVS002 sem o adaptador de montagem. (Direita) Diagrama representando o funcionamento dos espelhos: o feixe laser é desviado sequencialmente pelos espelhos nos eixos X e Y, controlados por *drivers* independentes, permitindo a varredura da amostra em uma área específica. Adaptado de [44]

A escolha dos espelhos é crucial para o bom funcionamento do sistema e a obtenção

de um resultado satisfatório em quesitos de segurança para o paciente no futuro. O escaneamento deve ser feito o mais rápido possível para evitar exposição prolongada da retina a potências muito altas e, para tal, os espelhos devem ser capazes de realizar varreduras a altas velocidades. O Dr. Alexandre Barbosa, colaborador do projeto e Doutor em Oftalmologia, recomenda que as medidas sejam limitadas a 0.3 segundos para evitar aberrações ópticas devido ao movimento ocular dos pacientes. O sistema em questão é capaz de realizar varreduras a uma frequência máxima de 1 kHz quando limitado a pequenos ângulos (ou seja, é capaz de realizar a leitura de 1000 linhas por segundo). O sistema, portanto, é capaz de escanear um máximo de

$$\frac{0.3 \text{ segundos}}{0.001 \frac{\text{segundos}}{\text{linha}}} = 300 \text{ linhas} \quad (2.1)$$

no limite de tempo e parâmetros fornecidos, nos oferecendo uma resolução de imagem máxima de 300 pixels x 300 pixels quando limitados a pequenos ângulos de oscilação.

2.2.5 Sistema Óptico de Escaneamento a Laser

Após serem defletidos pelos espelhos de varredura, os feixes laser são direcionados para um sistema composto por uma *scan lens* (CLS-SL) e uma *tube lens* (TTL200), dispostos em configuração de lente telecêntrica. O propósito desse arranjo é preservar a trajetória colimada e paralela dos raios durante o movimento angular dos espelhos, evitando desvios indesejados no ponto de foco sobre a amostra.

Em sistemas de varredura a laser, pequenas variações angulares nos espelhos galvânicos, quando não corrigidas opticamente, podem se traduzir em grandes deslocamentos laterais no plano da amostra — um fenômeno particularmente problemático em aplicações que exigem alta precisão espacial, como imageamento confocal ou Raman. A *scan lens* transforma a deflexão angular em uma varredura linear do feixe em seu plano focal, enquanto a *tube lens* recompõe a colimação do feixe antes de atingir o plano de focalização final, mantendo a posição focal constante ao longo da área varrida. O processo é mostrado na Figura 28:

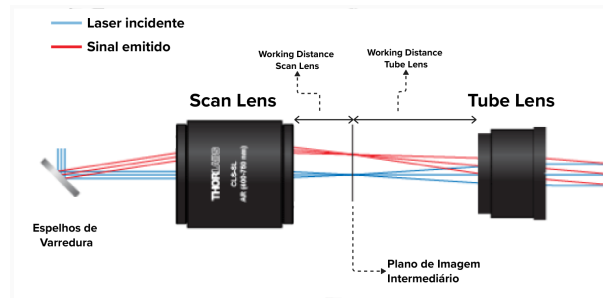


Figura 28 – Representação esquemática do sistema óptico de varredura a laser. O feixe laser colimado incidente (em azul) é desviado pelos espelhos de varredura e focalizado pela *scan lens* em um plano de imagem intermediário, localizado a uma distância igual à sua *working distance*. A *tube lens*, posicionada a uma distância equivalente à sua própria *working distance* desse plano, reconstrói a colimação do feixe, garantindo que ele permaneça bem definido ao longo do eixo óptico. O caminho óptico do sinal (em vermelho) segue o caminho reverso, seguindo para posterior detecção. Esse arranjo é essencial para confinar a área de varredura e manter a fidelidade espacial da imagem. Adaptado de [45]

Este sistema óptico garante que a posição do ponto focal sobre a amostra dependa somente da deflexão angular dos espelhos, e não da distância até a amostra, permitindo a formação de imagens com resolução uniforme e livre de distorções geométricas.

2.2.6 Olho Mecânico e Amostra

Resumidamente, a estrutura do olho humano é composta, entre outros elementos, pelo cristalino e pela retina. O cristalino atua como uma lente natural, focalizando os raios de luz colimados sobre a retina. É nessa região que células fotorreceptoras são estimuladas, gerando sinais elétricos que são enviados ao cérebro, onde a imagem visual é formada.

Considerando que o objetivo futuro deste projeto envolve aplicações oftalmológicas em seres humanos, é essencial que o sistema óptico desenvolvido reproduza, de forma realista, as condições encontradas no olho humano. Para isso, o doutorando e colaborador do LabNS, Vítor Monken, projetou e fabricou em impressora 3D uma estrutura anatômica análoga ao olho humano, denominado "Olho Mecânico"(OM) e mostrado na Figura29. O modelo, de formato cilíndrico, é composto por duas metades rosqueáveis: a primeira apresenta uma cavidade côncava que representa a retina, onde as amostras podem ser fixadas; a segunda abriga um suporte para lente focalizadora, simulando a função do cristalino.

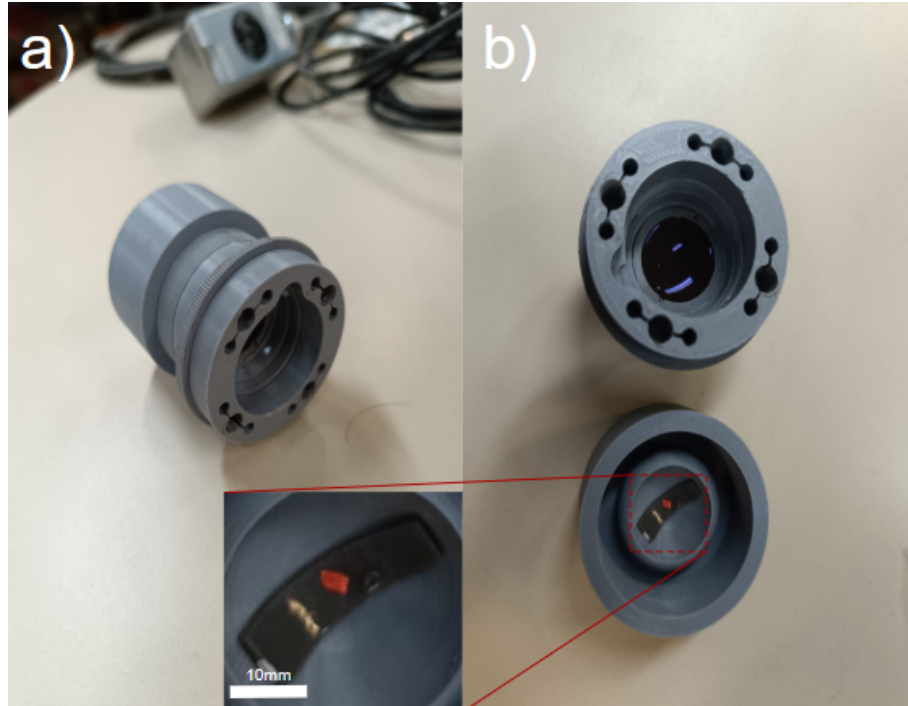


Figura 29 – (a) Olho Mecânico impresso em 3D completamente montado. Em destaque, o fragmento fluorescente utilizado como amostra é fixado na "retina". (b) As duas partes do OM separadas. A parte frontal possui uma lente com foco de 25mm fixada, representando o cristalino humano, responsável por focalizar os raios colimados incidentes na amostra. Autoria própria.

Para o imageamento com fluorescência, um fragmento de lâmina de alinhamento FSK4 da Thorlabs (Figura30) foi fixado na cavidade do OM com fita dupla face, representando a amostra a ser detectada. O material possui fluorescência majoritariamente na região dos 550-600 nm.

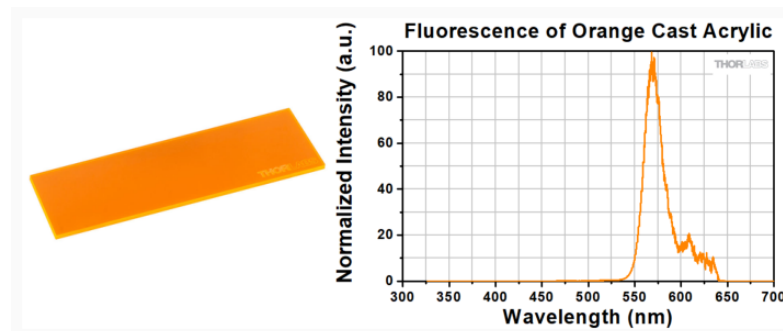


Figura 30 – (Esquerda) Modelo FSK4 de lâmina fluorescente de alinhamento, da qual um fragmento foi retirado como amostra. (Direita) Gráfico de fluorescência do FSK4, destacando a alta emissão de fluorescência nas vizinhanças de 600 nm. Adaptado de [46]

2.2.7 Sistema Confocal

O sinal emitido pela amostra é transmitido de volta pelo mesmo caminho percorrido pelo laser incidente, até atingir a superfície refletora do BSP e sofrer desvio em direção ao detector, antes passando por um sistema de confocalidade. O objetivo de tal sistema é melhorar a resolução da imagem obtida, como explicado na seção 1.4.1.

O sistema é composto por uma duas lentes e um *pinhole* (Figura 31). A primeira lente focaliza o sinal colimado incidente sobre o pinhole, que bloqueia os sinais de fora do plano focal da amostra. Em seguida, o feixe é novamente colimado e enviado em direção à PMT.

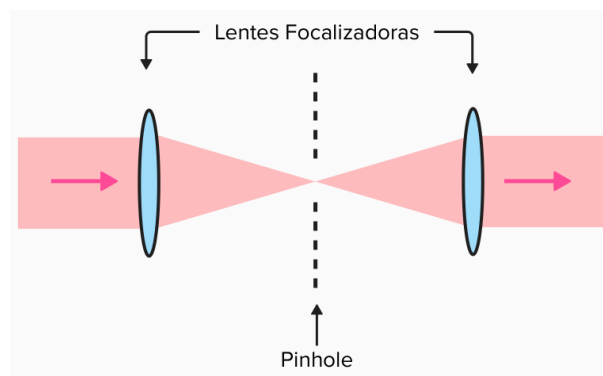


Figura 31 – Diagrama representando a passagem do sinal pelo sistema confocal. Autoria própria.

Um ponto de destaque é que este sistema é apenas empregado para o caso de fluorescência: como discutido na seção 1.4.1, fenômenos CRS e SRS ocorrem apenas em locais de alta intensidade dos lasers *Pump* e *Stokes*, isto é, no local de focalização dos feixes sobre a amostra. Com isto, estes fenômenos possuem confocalidade natural, e o sistema óptico de confocalidade pode ser retirado para aplicações Raman.

2.2.8 Filtros e Fotomultiplicadora

Por fim, o sinal fluorescente passa por um sistema de filtros (longpass 561 nm + bandpass 600/30) montados em um tubo de lentes, efetivamente eliminando quaisquer resquícios da fonte de laser de excitação e garantindo que apenas o sinal fluorescente seja transmitido. Em seguida, uma lente focaliza os raios na superfície detectora do Tubo Fotomultiplicador (PMT), realizando a leitura do sinal.

2.3 Hardware e Software

O protótipo foi construído baseando-se em arquitetura de software e hardware de sistemas controladores da National Instruments.

2.3.1 Placa DAQ PCI-6251 + Bloco Conector BNC 2120

Para o controle do sistema, uma placa DAQ PCI-6251, da National Instruments, foi instalada diretamente na placa-mãe de um computador pessoal, a partir do qual o usuário é capaz de programá-la e controlar os parâmetros experimentais. Essa placa é então conectada a um bloco conector BNC-2120, que fornece as entradas e saídas dos sinais a serem gerados ou adquiridos durante a operação do sistema. A representação do sistema pode ser encontrada na Figura 32:

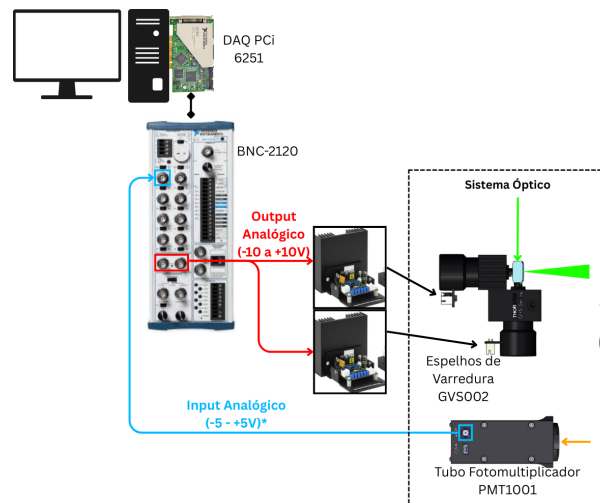


Figura 32 – Diagrama esquemático do sistema de aquisição e controle. Autoria própria.

As saídas analógicas emitem os sinais de controle dos espelhos de varredura (GVS002) para seus respectivos motores, enquanto as entradas analógicas recebem o sinal proveniente do tubo fotomultiplicador (PMT), que coleta a luz emitida pela amostra no sistema óptico. O sistema permite o controle preciso da posição do feixe laser e a aquisição síncrona dos sinais ópticos.

Alguns parâmetros da placa são especialmente importantes para o bom funcionamento do sistema e para garantir uma velocidade de processamento de dados adequada. Os sinais gerados para o controle dos espelhos de varredura, por exemplo, são convertidos de digital para analógico e emitidos pelas saídas de Analog Output (AO). A alta resolução dos DACs (16 bits) garante um controle preciso da posição dos espelhos, resultando em varreduras suaves e estáveis. Além disso, a placa possui uma taxa de atualização (update

rate) de até 2 MSamples/s por canal, o que permite gerar formas de onda senoidais ou triangulares com alta fidelidade, mesmo em altas frequências.

Da mesma forma, os sinais provenientes do tubo fotomultiplicador (PMT) são adquiridos pelas entradas de Analog Input (AI) da placa. Com uma taxa de amostragem de até 1,25 MSamples/s por canal - onde a obtenção de uma amostra equivale à leitura de intensidade em um pixel - é possível registrar com precisão as variações rápidas do sinal óptico, assegurando uma reconstrução confiável das imagens obtidas.

Para a obtenção de imagens com resolução de 300×300 pixels, como discutido anteriormente, uma taxa de amostragem de:

$$\frac{300 \times 300 \text{ pixels}}{0,3 \text{ segundos}} = 300.000 \text{ pixels/s} \quad (2.2)$$

é necessária — valor consideravelmente abaixo do limite máximo da placa.

Entretanto, essa capacidade deve ser reavaliada caso, no futuro, deseje-se realizar medições com resoluções maiores. Mantendo-se o tempo de aquisição em 0,3 segundos por imagem, e assumindo que os demais componentes do sistema sejam capazes de operar sob tais condições, a resolução máxima suportada pela placa DAQ seria de aproximadamente 612×612 pixels. Acima desse valor, a taxa de amostragem exigida ultrapassaria os 1,25 MSamples/s, representando um limite técnico a ser considerado no projeto.

O uso do conector BNC-2120 permite uma interface prática e blindada com os canais analógicos da placa, oferecendo maior proteção contra ruídos e facilitando a organização e acesso aos sinais durante o experimento.

2.3.2 Software LabVIEW

Com a utilização de hardware terceirizado da National Instruments, a programação do sistema foi feita pelo LabVIEW, uma plataforma de programação visual projetada para utilização com equipamentos da própria empresa. O programa foi criado baseando-se em um programa de microscopia de varredura a laser *open source* GPScan, desenvolvido pelo Dr. Patrick Ferrand, da Universidade de Aix-Marseille [47].

O software é dividido em quatro subprogramas principais:

2.3.2.1 Init.vi

O *Init.vi* é o primeiro subprograma a ser executado no processo de varredura, sendo responsável por definir funções essenciais e receber os parâmetros de escaneamento fornecidos pelo usuário, que serão utilizados pelos demais módulos do sistema.

O bloco **DAQmx Timing (Sample Clock)** define o número total de amostragens a serem adquiridas durante o escaneamento. Esse valor corresponde ao produto do número de pixels na horizontal pelo número de pixels na vertical, ou seja, à resolução da imagem final. A taxa de aquisição dos dados - parâmetro essencial para garantir a sincronização entre o movimento dos espelhos e a aquisição do sinal óptico - também é determinada nesta etapa, com base nos parâmetros *dwelt time* (tempo durante o qual os espelhos mantêm o laser focalizado em um ponto da amostra) e *low time* (tempo necessário para mover o feixe de um ponto ao próximo). A relação entre esses parâmetros é dada pela equação 2.3:

$$f_{\text{amostragem}} = \frac{1}{t_{\text{dwell}} + t_{\text{low}}} \quad (2.3)$$

Os canais analógicos de saída (*Analog Output, AO*) e de entrada (*Analog Input, AI*), respectivamente responsáveis por gerar as tensões de controle para os espelhos de varredura e por adquirir os sinais analógicos emitidos pela amostra (que serão posteriormente digitalizados), são criados usando o bloco **DAQmx Create Channel**. Cada canal é configurado de acordo com o tipo de sinal (neste caso, voltagem) e com o intervalo de operação esperado.

Além da definição das formas de onda, é fundamental que a aquisição de dados e a geração dos sinais de controle ocorram de forma sincronizada. Para isso, o bloco **DAQmx Start Trigger (Digital Edge).vi** é utilizado para garantir que a aquisição no canal AI se inicie exatamente no mesmo instante em que a geração de sinais no canal AO começa.

Em seguida, as tarefas AO e AI são enviadas para o próximo subprograma, *Scan.vi*.

2.3.3 Scan.vi

A tarefa AI é enviada para o bloco **DAQmx Start Task.vi**, que prepara a aquisição do sinal para começar a partir da geração do sinal AO. Os parâmetros do usuário de número de pixels, voltagens mínima e máxima são enviados para o subprograma *RasterScanXY.vi*, onde são utilizados para gerar as ondas de controle de voltagem dos espelhos. Anteriormente, as voltagens máxima e mínima permitidas foram estabelecidas, mas aqui o usuário é capaz de definir exatamente quais potenciais serão aplicados a partir dos painéis da Figura 33.

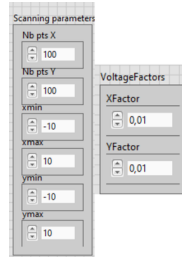


Figura 33 – (Esq.) Controles de parâmetros das ondas controladoras dos espelhos, permitindo ao usuário definir o número de pixels do eixo horizontal e vertical (Nb pts X e Nb Pixel Y, respectivamente) e o intervalo de voltagens que serão aplicadas aos espelhos X e Y (xmin xmax e ymin ymax, respectivamente). Como o ângulo dos espelhos aumenta de acordo com a tensão aplicada, este último é efetivamente um controle da área de escaneamento da amostra. (Dir.) Controle de fator de voltagens. Os valores inseridos nestes campos servem para um ajuste fino do sistema, representando um índice pelo qual os valores de voltagem serão multiplicados. No exemplo da figura, um índice XFactor 0.01 e os valores de xmin e xmax de -10 e 10V resultariam em voltagens finais emitidas entre $(-10, 10)V * 0.01 = -0.1V$ e $0.1V$. [47]

Após a geração das ondas em *RasterScan.vi*, elas são enviadas para os canais de saída analógica por meio do bloco **DAQmx Write (Analog 1D Wfm NChan NSamp).vi**. Em seguida, a tarefa é iniciada pelo bloco **DAQmx Start Task**, que dá início à emissão dos sinais de controle para os espelhos de varredura.

Conforme explicado anteriormente, o envio do sinal analógico também atua como gatilho para a aquisição simultânea dos dados no canal de entrada analógica (AI). Essa aquisição é realizada pelo bloco **DAQmx Read (Analog 2D DBL NChan NSamp).vi**. Os valores coletados são armazenados em uma lista e, posteriormente, reorganizados em uma matriz com as dimensões correspondentes à resolução definida pelo usuário. Por fim, essa matriz é convertida em um mapa de intensidade, onde cada valor é representado por uma cor, permitindo assim a reconstrução da imagem final da amostra (como demonstrado na figura 23).

2.3.3.1 RasterScan.vi

Como explicado na seção anterior, *RasterScan.vi* é um subprograma dentro de *Scan.vi*, responsável por produzir as ondas analógicas responsáveis pelo controle dos espelhos de varredura.

2.3.3.2 Close.vi

O objetivo do programa é que as varreduras sejam feitas continuamente, com a imagem sendo atualizada sem que haja a necessidade de intervenção do usuário. Para tal,

é necessário que os canais contendo as tarefas de leitura e escrita dos sinais analógicos sejam liberados ao fim de cada ciclo para que sejam reutilizados no seguinte. Isto é feito ao mandar todas estas tarefas ao bloco **DAQmx Clear Task.vi**.

Embora o *GPScan.vi* tenha servido como base para o funcionamento do sistema, algumas modificações foram realizadas com o objetivo de corrigir limitações observadas nas imagens adquiridas. No entanto, essas alterações serão discutidas com maior profundidade na seção Resultados, onde será possível estabelecer um paralelo mais claro entre cada modificação implementada e as melhorias proporcionadas na qualidade das imagens obtidas.

3 Resultados

3.1 Imagens Iniciais

No início da montagem, tentamos posicionar uma lente objetiva de microscopia com uma amostra de cérebro de camundongo, que possui auto-fluorescência (como ocorre em diversos tecidos biológicos), posicionada em seu ponto focal, efetivamente transformando o sistema em um microscópio de varredura a laser. As imagens obtidas para este *setup* podem ser vistas na Figura 34:

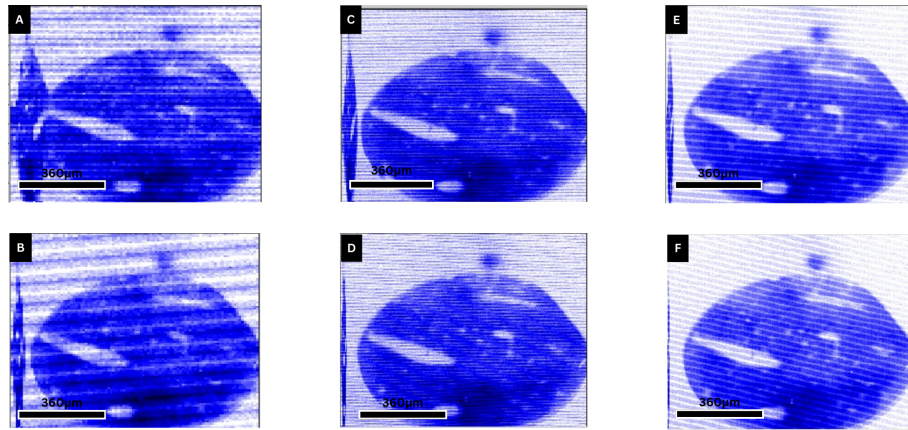


Figura 34 – Imagens obtidas com o setup com objetiva de microscopia de lâminas de cérebro de camundongo. Imagens obtidas com resolução de 100x100 pixels com *Dwell Times* de 50 (A) e 150 μs (B), 250x250 pixels a 50 (C) e 100 μs (D) e 500x500 pixels a 150 (E) e 250 μs (F). Autoria própria

Ao analisar as imagens da Figura 34, nota-se a presença de artefatos visuais sob a forma de distorções no lado esquerdo, que se tornam progressivamente mais evidentes à medida que o tempo de integração é reduzido, e na forma de listras que se sobrepõem à imagem.

Após investigação, identificou-se que essas distorções estão relacionadas ao padrão de escaneamento adotado, conhecido como varredura do tipo *raster*, demonstrado na Figura 35. Nesse modo, o espelho responsável pela varredura horizontal move-se continuamente em um único sentido durante a leitura de cada linha. Ao final de cada linha, ele precisa retornar rapidamente à posição inicial para iniciar a linha seguinte — movimento conhecido como *flyback* [48].

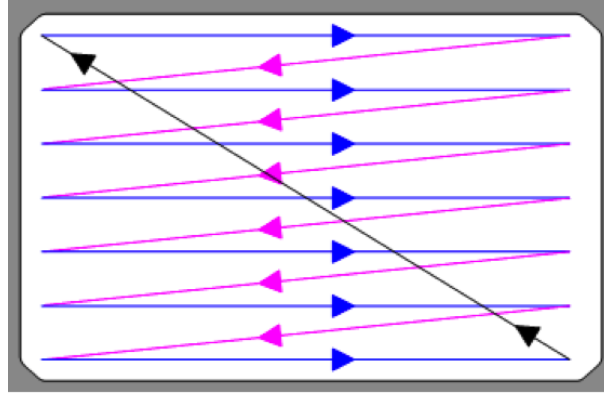


Figura 35 – Padrão de escaneamento do tipo *raster*. O movimento de *flyback* está destacado em rosa. Adaptado de [49].

Esse retorno abrupto impõe uma forte aceleração sobre o sistema mecânico, e a inércia associada ao espelho de varredura leva a desvios transitórios de posicionamento. Como consequência, ocorre uma perda de sincronização entre a posição espacial esperada do feixe e o instante da aquisição do sinal, resultando nas distorções observadas.

A causa das listras ainda precisa ser determinada, e sua eliminação é uma prioridade de trabalhos futuros.

3.2 Melhoria das Imagens

Para resolver este problema, foi necessário adaptar o código para alterar o padrão de varredura. Originalmente, a onda do eixo X, chegando ao final do percurso de uma linha de varredura (ponto representado pela linha verde na Figura 36), reiniciava a tensão para que o espelho voltasse à posição inicial e escaneasse a próxima linha no mesmo sentido, causando o movimento de *flyback*. No código reformulado, ao chegar no limite máximo de uma linha de varredura, a tensão no espelho decresce gradativamente de volta ao seu valor inicial, substituindo o padrão *Raster* por um de zigue-zague, eliminando o movimento de *flyback* e a distorção na imagem (veja Figura 36). Para acomodar a mudança de direção, foi necessário inverter a ordem de cada segunda linha da matriz de intensidade, evitando assim o *slicing* da imagem. O autor agradece ao Prof. Elmo Alves pela ajuda na otimização do código.

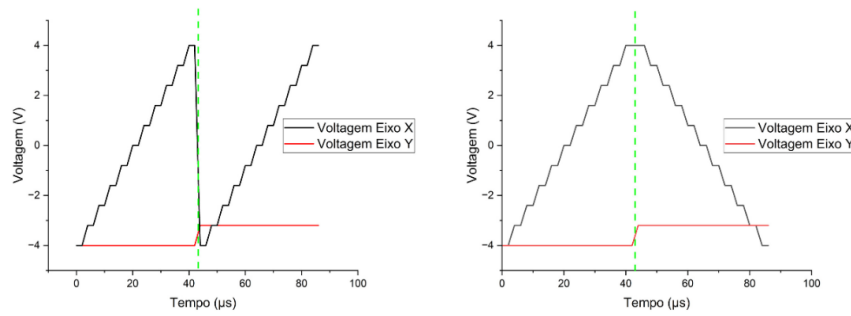


Figura 36 – Representação gráfica dos comportamentos das ondas geradas para o controle dos espelhos de varredura. (Esq.) Ondas que originam o padrão *raster* e levam ao surgimento das distorções. (Dir.) Ondas do código reformulado, que substituem o padrão *raster* por um de zigue-zague e eliminam as distorções na imagem. Autoria própria.

A melhoria da imagem pode ser observada na figura 37. A amostra foi trocada do tecido neural de camundongo para o fragmento FSK4 como indicado anteriormente na figura 29 devido ao maior sinal fluorescente, ausência de decomposição e maior distinguibilidade do objeto sob imageamento.

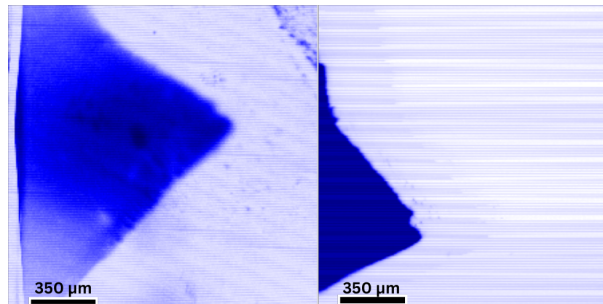


Figura 37 – À esquerda, uma imagem do fragmento com distorção devido ao *flyback*. À direita, uma imagem do mesmo fragmento, já não apresentando tal distorção devido à implementação do padrão de zigue-zague. Autoria própria.

A amostra também foi analisada sob um sistema de imageamento de fluorescência presente no LabNS para efeito comparativo da eficácia do protótipo desenvolvido, mostrado na Figura 38.

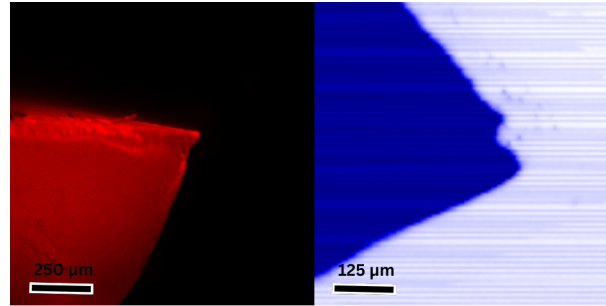


Figura 38 – Comparação de imagens de fluorescência obtidas com sistema óptico laboratorial (esq.) vs. protótipo do OVL (dir.). Autoria própria.

3.3 Ajuste para Correção de Deformações Refrativas no Olho Mecânico

A presença da rosca no OM permite ajustar a distância entre a lente e a amostra, o que confere ao sistema a capacidade de simular diferentes condições refrativas do olho humano. Essa funcionalidade é particularmente útil para reproduzir casos de miopia e hipermetropia, distúrbios visuais comuns que afetam uma parcela significativa da população e que devem ser levados em consideração na construção do sistema.

A miopia ocorre quando o globo ocular é mais alongado ou o poder de convergência do cristalino é maior do que o normal, fazendo com que os raios de luz colimados se focalizem antes da retina, resultando em dificuldade para enxergar objetos distantes. Já a hipermetropia é caracterizada por um globo ocular mais curto ou menor convergência do cristalino, fazendo com que o foco da imagem se forme além da retina, o que dificulta a visão de objetos próximos. Ambas estas condições são apresentadas na Figura 39

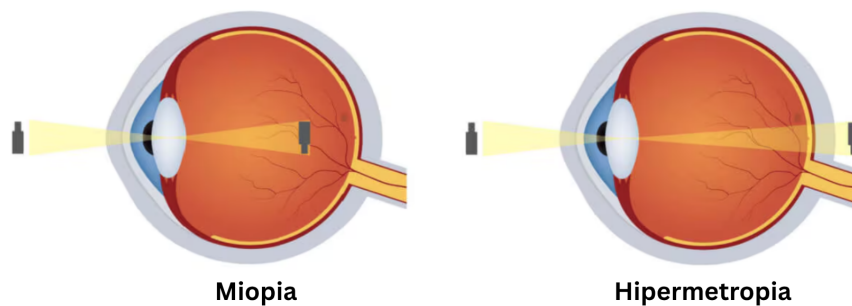


Figura 39 – Diagramas representando plano focal sendo projetado à frente da retina para a Miopia em um olho alongado (Esquerda) e atrás da retina para a Hipermetropia em um olho achatado (Direita). Adaptado de [50]

Ao ajustar a distância entre a lente focalizadora (simulando o cristalino) e a amostra (simulando a retina), é possível reproduzir esses desvios de foco, permitindo testar

a robustez do sistema óptico frente a variações fisiológicas reais e avaliar o impacto dessas condições na qualidade da imagem adquirida.

Em situações nas quais a qualidade da imagem é comprometida por condições refrativas simuladas, é possível restaurar o foco ajustando a distância entre a *scan lens* e a *tube lens*, deslocando-as de sua configuração de foco ideal. Esse desvio introduz uma aberração óptica compensatória, que pode contrabalancear o desvio de foco causado por miopia ou hipermetropia no modelo ocular, como mostra a Figura 40. Dessa forma, o sistema permite não apenas a simulação dessas condições, mas também a avaliação de estratégias de correção óptica passiva frente a variações anatômicas reais que podem ser encontradas em um cenário clínico.

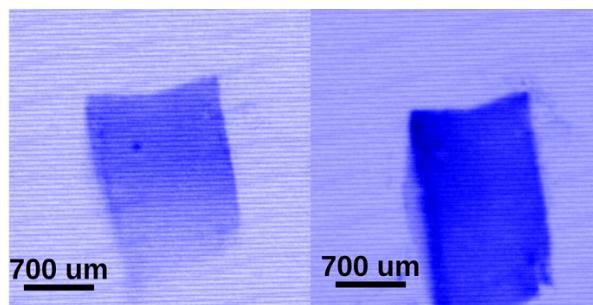


Figura 40 – (Esq.) Imagem do fragmento com o OM configurado para simulação de olho miópico com o sistema óptico alinhado — ou seja, *scan lens* e *tube lens* posicionadas em suas respectivas distâncias focais.. (Dir.) Imagem do mesmo fragmento, ainda sob configuração miópica, mas com o sistema óptico propositalmente desalinhado. A introdução dessa nova aberração óptica, quando ajustada corretamente, compensa o desvio de foco original e permite a formação de uma imagem nítida. Imagens de autoria própria.

3.3.1 Ajustes no programa

Ao longo do programa GPScan, percebe-se a presença de outros módulos referentes à operação alternativa do sistema via de *counters*. Este método não nos interessa, e portanto os elementos da interface do usuário associados foram removidos para manter apenas o imageamento por meio da entrada analógica de uma única PMT e aumentar a usabilidade amigável para usuários. O comparativo entre antes e depois pode ser encontrado na Figura 41

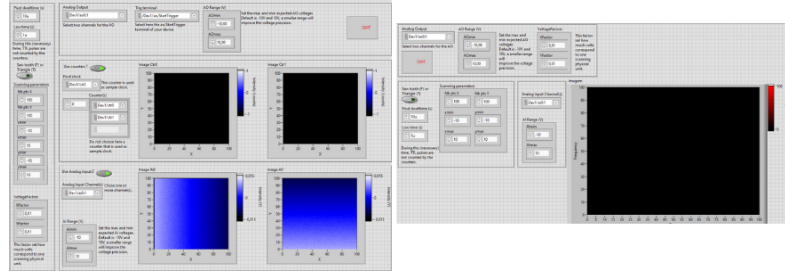


Figura 41 – (Esq.) Painel frontal do programa do GPScan original, incluindo o método de escaneamento de *counters* e duas entradas analógicas para PMTs. (Dir.) Painel frontal do programa final, sem a presença dos componentes referentes ao método *counters* e com apenas uma entrada analógica para a PMT. Autoria própria.

3.3.2 Acoplamento da Espectroscopia Raman ao Sistema e Obtenção de Imagens com a Técnica

Finalmente, o sistema adaptado foi alinhado a uma fonte de laser PicoEmerald (APE Berlin), capaz de emitir ondas simultaneamente em duas frequências (uma fonte constante a 1064 nm e outra variável entre 700 e 1950 nm). Este aparelho é capaz de controlar a sincronização temporal entre as duas frequências, uma característica essencial para garantir que os fótons interajam com a amostra simultaneamente e aumentar a eficácia dos fenômenos não lineares.

Outras modificações à montagem incluem o reposicionamento do BS e PMT para um ponto mais próximo da amostra (Fig. 42). Esta mudança foi feita com o intuito de reduzir a perda do já fraco sinal CARS durante o percurso de volta, fazendo-o passar por menos elementos ópticos que, embora otimizados, ainda promovem pequenas perdas de intensidades que, quando combinadas, não são desprezíveis.

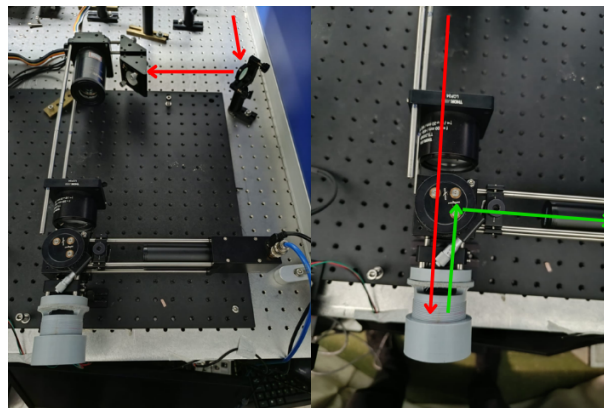


Figura 42 – (Esq.) Montagem do OVL sobre a mesa óptica para integração com Espalhamento Raman Estimulado. (Dir.) Nova posição do BS e PMT. Setas vermelhas e verdes representam lasers de excitação e sinal CARS, respectivamente. Autoria própria.

Inicialmente, tentou-se obter imagens com fios de nylon de sutura cirúrgicos, devido à abundância de bandas C-H, suas pequenas dimensões e formato distinguível. No entanto, a base do OM, feito de resina plástica de impressão 3D, também apresenta tais bandas, o que acaba por interferir na medida do sinal. Com isto em mente, decidimos trocá-los por açúcar cristal (Fig 43), rico em bandas O-H enquanto ainda mantendo as vantagens dimensionais.

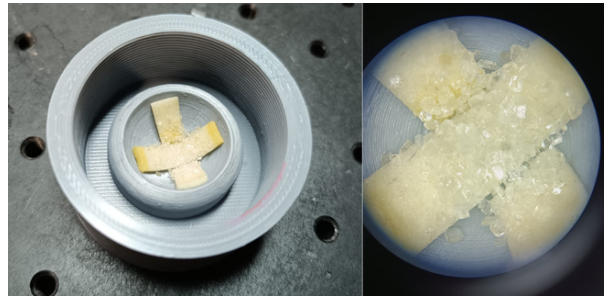


Figura 43 – (Esq.) Amostra de açúcar cristal fixada no fundo do OM usando-se fita dupla face. (Dir.) Amostra sob microscópio óptico. Autoria própria.

Configurando o laser Pump a 810 nm e 20 mW de potência e o Stokes a 1064 nm e 10 mW (ambas medidas na entrada do OM), a amostra foi estimulada, e as imagens obtidas podem ser vistas na Figura 44:

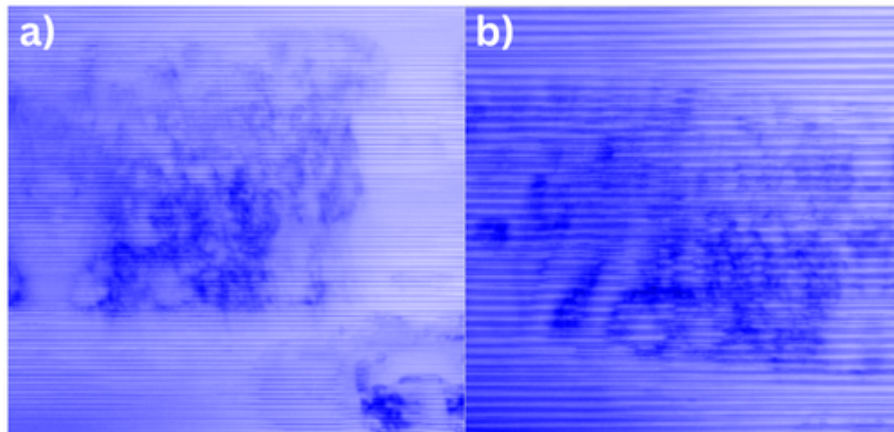


Figura 44 – Imagens obtidas com o escaneamento em diferentes pontos da amostra. A imagem (a) foi obtida com resolução de 700 x 700 pixels e (b), 1000 x 1000 pixels. Autoria própria.

No entanto, ao realizar a variação controlada da sincronização temporal entre os pulsos - um procedimento utilizado para verificar se o sinal obtido corresponde ao processo CARS, uma vez que a dessincronização provoca a chegada dos fótons na amostra em instantes diferentes e impossibilita a geração de fenômenos não-lineares - observou-se que as imagens não se alteraram. Este comportamento sugere que o sinal detectado provém da fluorescência, e não do processo CARS. As próprias imagens levantam dúvidas quanto ao que de fato é mostrado, pois há uma amplificação natural da amostra durante o processo

(como visto na figura 37) ; ainda assim, as dimensões dos elementos observados são muito pequenas para corresponderem aos grãos de açúcar da amostra. Esta incerteza também nos levou a não indicar uma escala na Figura 44 até que obtenhamos imagens mais claras dos conteúdos.

É importante ressaltar que estes resultados são ainda preliminares, visto que um extenso período de manutenção da fonte laser limitou o tempo disponível para a medição via Raman Estimulado aos últimos dois meses antes do fechamento desta dissertação. A obtenção de imagens com o uso de CARS e a implementação de técnicas de melhoria de imagem serão focos a serem desenvolvidos durante o Doutorado.

Mesmo com estas limitações, a obtenção de sinais de fluorescência demonstra o funcionamento do *setup* óptico, *hardware* e *software* do protótipo, abrindo as portas para o desenvolvimento de um equipamento final mais refinado e sofisticado. Os baixos limites de potência dos lasers permitidos podem representar um obstáculo devido à baixa intensidade natural do sinal Raman estimulado. Por esta razão, estudos futuros devem ser direcionados para a melhoria de captação de sinal da amostra e melhoria das imagens obtidas. Algumas opções incluem processamento das imagens com ferramentas de Inteligência Artificial, uso de óptica adaptativa para a eliminação de aberrações ópticas e alteração dos componentes ópticos para a mudança de uma fonte pontual de laser para uma de fonte estendida (o que permitiria a aplicação de potências maiores, mas ainda não se sabe se é compatível com a geração de fenômenos não-lineares).

4 Conclusão

O desenvolvimento do protótipo de OVL foi alcançado com êxito, atingindo assim o objetivo primário deste projeto. Os resultados obtidos demonstram a capacidade do sistema em adquirir imagens com qualidade satisfatória em experimentos de fluorescência, mas um maior aprofundamento na implementação de técnicas não-lineares ainda é necessário. O sistema possui alta flexibilidade, garantindo ao usuário pleno controle sobre os parâmetros de medição como tempo de aquisição, área de varredura e resolução, permitindo-o otimizar condições experimentais de acordo com as necessidades específicas de cada experimento.

A dependência de *hardware* e *software* terceirizados é um obstáculo para a ampla adoção da tecnologia, especialmente em cenários acadêmicos ou clínicos. Abordar este problema é o próximo passo do projeto, com o desenvolvimento e automação de um sistema embarcado sendo desenvolvido em parceria com o Departamento de Ciência da Computação (DCC) e o Departamento de Engenharia Eletrônica (DEE) da UFMG.

Também é necessário avaliar o desempenho do sistema em modalidades baseadas em CARS/SRS. Esses métodos exigem intensidades ópticas elevadas e são caracterizados por sinais relativamente fracos, o que impõe desafios adicionais ao projeto. Será necessário otimizar os parâmetros de varredura, utilizar potências que garantam geração de sinal dentro dos limites de segurança estabelecidos pela norma ANSI Z136.1 e otimizar o caminho óptico e os componentes utilizados para minimizar a perda de sinal.

O avanço na implementação de um sistema de imageamento baseado em espectroscopia Raman estimulada representa uma contribuição significativa para o desenvolvimento de ferramentas ópticas aplicadas à medicina de precisão. Os resultados obtidos, embora necessitando mais tempo e refinamento, demonstram uma viabilidade técnica do sistema para fluorescência que esperamos ser capazes de expandir para Imageamento Raman durante os próximos passos do projeto, abrindo caminho para sua aplicação em contextos biomédicos reais e enfrentamento de desafios clínicos contemporâneos.

REFERÊNCIAS

- [1] Ware, M. e J. Peatross: *Physics of Light and Optics (Black & White)*. Brigham Young University, Department of Physics, 2015, ISBN 9781312929272. <https://books.google.com.br/books?id=Cw2LDwAAQBAJ>. Citado 2 vezes nas páginas 13 e 14.
- [2] Boyd, R. W.: *Nonlinear Optics*. Academic Press, 2008. Citado 14 vezes nas páginas 13, 14, 23, 24, 26, 27, 28, 31, 32, 33, 34, 37, 38 e 40.
- [3] Fox, Mark: *Optical properties of solids*, volume 3. Oxford university press, 2010. Citado 5 vezes nas páginas 14, 17, 21, 26 e 27.
- [4] StellarNet Inc.: *Vibrational Spectroscopy: Infrared vs Raman*. <https://www.stellarnet.us/vibrational-spectroscopy-infrared-vs-raman/>, n.d. Accessed: 2025-07-09. Citado na página 15.
- [5] Rigneault, Hervé e Pascal Berto: *Tutorial: Coherent Raman light matter interaction processes*. APL Photonics, 3(9):091101, julho 2018, ISSN 2378-0967. <https://doi.org/10.1063/1.5030335>. Citado 7 vezes nas páginas 14, 15, 17, 35, 36, 41 e 42.
- [6] Cunha, Renan Souza: *Nonlinear optics in amyloid plaques and two-dimensional materials*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Nov. 2021. Citado 8 vezes nas páginas 14, 15, 30, 32, 35, 36, 46 e 47.
- [7] Mohammad, J.: *Application of Vibrational Spectroscopy in Organic Electronics*. Tese de Doutorado, Linköping University, novembro 2017. Citado 2 vezes nas páginas 16 e 22.
- [8] Madeira, Camilla, Mário Sérgio Piantavini e Angela Trindade: *Application Of Infrared Spectroscopy Copupled With Multivariate Calibration For Drug Quality Control - Revision*. Visão Acadêmica, 16, fevereiro 2015. Citado na página 16.
- [9] Staufer, Markus, Uwe Birkenheuer, Thomas Belling, Folke Noertemann, Notker Rösch, Wolf Widdra, Krassimir Kostov, Thomas Moritz e Dietrich Menzel: *The vibrational structure of benzene adsorbed on Si(001)*. The Journal of Chemical Physics, 112:2498–2506, fevereiro 2000. Citado na página 17.
- [10] University of Bielefeld: *Spontaneous Raman*. <https://www.physik.uni-bielefeld.de/biopho/index.php/en/research/raman-spectroscopy/spontaneous-raman>, n.d. Accessed: 2025-07-09. Citado 3 vezes nas páginas 17, 18 e 19.

- [11] McKinnon, Katherine M: *Flow Cytometry: An Overview*. Current protocols in immunology, 2018. Citado na página 18.
- [12] Cho, Young e Sung Ahn: *Fabricating a Raman spectrometer using an optical pickup unit and pulsed power*. Scientific Reports, 10, julho 2020. Citado na página 19.
- [13] Krawczyk, Coleman M: *The Raman Effect*. 2009. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:14007132>. Citado 3 vezes nas páginas 19, 20 e 21.
- [14] Singh, Swapnil, Harshita Singh, Karthick Thangavel e Poonam Tandon: *A role of DFT and spectroscopy to study phase transition: Bent-Core Liquid Crystals*, páginas 43–47. março 2017, ISBN 978-93-5267-364-3. Citado na página 21.
- [15] Keresztury, Gábor: *Raman Spectroscopy: Theory*. John Wiley Sons, Ltd, 2006, ISBN 9780470027325. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/0470027320.s0109>. Citado na página 22.
- [16] Mosca, Sara, Claudia Conti, Nick Stone e Pavel Matousek: *Spatially Offset Raman Spectroscopy*. Nature Reviews Methods Primers, 1(1):1–24, 2021. <https://www.nature.com/articles/s43586-021-00025-2>. Citado 2 vezes nas páginas 22 e 23.
- [17] S, Fathima i, Manish Mohanta e Abir De Sarkar: *Insights into selected 2D piezo Rashba semiconductors for self-powered flexible piezo spintronics: material to contact properties*. Journal of Physics: Condensed Matter, 35, abril 2023. Citado na página 27.
- [18] Zhang, Jiantian, Weina Zhao, Peng Yu, Guowei Yang e Zheng Liu: *Second Harmonic Generation in 2D Layered Materials*. 2D Materials, 7, setembro 2020. Citado na página 31.
- [19] Araujo, Cid de, Anderson Gomes e Georges Boudebs: *Techniques for nonlinear optical characterization of materials: A review*. Reports on progress in physics. Physical Society (Great Britain), 79:036401, fevereiro 2016. Citado 2 vezes nas páginas 31 e 34.
- [20] Li, Lizhu: *Chalcogenide microwires cladded with hydrogen and fluorine-based polymers and their applications*. PhD thesis, McGill University, abril 2017. Thesis for: PhD. Citado na página 34.
- [21] Cheng, Ji Xin e X. Sunney Xie: *Coherent Raman scattering microscopy*. The Journal of Physical Chemistry B, 108(3):827–840, 2004. Citado 6 vezes nas páginas 35, 36, 38, 40, 41 e 42.

- [22] Heuke, Stefan e Hervé Rigneault: *Coherent Stokes Raman scattering microscopy (CSRS)*. Nature Communications, 14(1):3337, 2023. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38941-4>. Citado na página 39.
- [23] Li, Shuang, Yanhua Li, Ruoyu Yi, Liren Liu e Junle Qu: *Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy and Its Applications*. Frontiers in Physics, 8:598420, 2020. <https://doi.org/10.3389/fphy.2020.598420>. Citado na página 40.
- [24] Ranjan, Rajeev e Luigi Sirleto: *Stimulated Raman Scattering Microscopy: A Review*. Photonics, 11(6), 2024, ISSN 2304-6732. <https://www.mdpi.com/2304-6732/11/6/489>. Citado na página 43.
- [25] Jonkman, Brown, Wright et al: *Tutorial: guidance for quantitative confocal microscopy*. 2020. Citado 2 vezes nas páginas 43 e 44.
- [26] Wang, H., Y. Fu, P. Zickmund, R. Shi e J. X. Cheng: *Coherent anti-stokes Raman scattering imaging of axonal myelin in live spinal tissues*. Biophysical Journal, 89(1):581–591, 2005. Citado 2 vezes nas páginas 44 e 45.
- [27] Mansfield, Jessica, Julian Moger, Ellen Green, Charlotte Moger e C. Peter Winlove: *Chemically specific imaging and in-situ chemical analysis of articular cartilage with stimulated Raman scattering*. Journal of Biophotonics, 6(10):803–814, 2013. <https://doi.org/10.1002/jbio.201200213>. Citado na página 45.
- [28] Hughes, J: *This is one of the biggest global health crises of the 21st century*. Em *World Economic Forum*, volume 21, 2017. Citado na página 45.
- [29] Association, Alzheimer's, William Thies e Laura Bleiler: *2013 Alzheimer's disease facts and figures*. Alzheimer's & dementia, 9(2):208–245, 2013. Citado 2 vezes nas páginas 45 e 46.
- [30] International, D: *World Alzheimer Report 2019: Attitudes to Dementia; World Alzheimer Report 2019: Attitudes to Dementia*. 2019. Citado na página 46.
- [31] Deb, Arijita, James Douglas Thornton, Usha Sambamoorthi e Kim Innes: *Direct and indirect cost of managing Alzheimer's disease and related dementias in the United States*. Expert review of pharmacoeconomics & outcomes research, 17(2):189–202, 2017. Citado na página 46.
- [32] Porsteinsson, A.P., R.S. Isaacson, Sean Knox, M.N. Sabbagh e I. Rubino: *Diagnosis of Early Alzheimer's Disease: Clinical Practice in 2021*. The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease, 8(3):371–386, 2021, ISSN 2274-5807. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2274580724005302>. Citado na página 46.

- [33] Sabbagh, Marwan N, Lih Fen Lue, Daniel Fayard e Jiong Shi: *Increasing precision of clinical diagnosis of Alzheimer's disease using a combined algorithm incorporating clinical and novel biomarker data*. *Neurology and therapy*, 6:83–95, 2017. Citado na página 46.
- [34] Balasa, M, E Gelpi, A Antonell, MJ Rey, R Sanchez-Valle, JL Molinuevo, A Llado e Neurological Tissue Bank/University of Barcelona/Hospital Clínic NTB/UB/HC Collaborative Group: *Clinical features and APOE genotype of pathologically proven early-onset Alzheimer disease*. *Neurology*, 76(20):1720–1725, 2011. Citado na página 46.
- [35] Bateman, Randall J., Chengjie Xiong, Tammie L.S. Benzinger, Anne M. Fagan, Alison Goate, Nick C. Fox, Daniel S. Marcus, Nigel J. Cairns, Xianyun Xie, Tyler M. Blazey, David M. Holtzman, Anna Santacruz, Virginia Buckles, Angela Oliver, Krista Moulder, Paul S. Aisen, Bernardino Ghetti, William E. Klunk, Eric McDade, Ralph N. Martins, Colin L. Masters, Richard Mayeux, John M. Ringman, Martin N. Rossor, Peter R. Schofield, Reisa A. Sperling, Stephen Salloway e John C. Morris: *Clinical and Biomarker Changes in Dominantly Inherited Alzheimer's Disease*. *New England Journal of Medicine*, 367(9):795–804, 2012. <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1202753>. Citado na página 46.
- [36] Jack Jr., Clifford R., David A. Bennett, Kaj Blennow, Maria C. Carrillo, Billy Dunn, Samantha Budd Haeberlein, David M. Holtzman, William Jagust, Frank Jessen, Jason Karlawish, Enchi Liu, Jose Luis Molinuevo, Thomas Montine, Creighton Phelps, Katherine P. Rankin, Christopher C. Rowe, Philip Scheltens, Eric Siemers, Heather M. Snyder, Reisa Sperling, Contributors, Cerise Elliott, Eliezer Masliah, Laurie Ryan e Nina Silverberg: *NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease*. *Alzheimer's & Dementia*, 14(4):535–562, 2018. <https://alz-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1016/j.jalz.2018.02.018>. Citado na página 46.
- [37] Fonseca, Emerson A., Lucas Lafeta, João Luiz Campos, Renan Cunha, Alexandre Barbosa, Marco A. Romano-Silva, Rafael Vieira, Leandro M. Malard e Ado Jorio: *Micro-Raman spectroscopy of lipid halo and dense-core amyloid plaques: aging process characterization in the Alzheimer's disease APPswePS1E9 mouse model*. *Analyst*, 146:6014–6025, 2021. <http://dx.doi.org/10.1039/D1AN01078F>. Citado 2 vezes nas páginas 46 e 47.
- [38] American National Standards Institute: *American National Standard for Safe Use of Lasers*. ANSI Z136.1-2007, 2007. American National Standards Institute. Citado na página 48.

- [39] Webb, Robert H. e George W. Hughes: *Scanning laser ophthalmoscope*. IEEE Transactions on Biomedical Engineering, BME-28(7):488–492, 1981. Citado na página 51.
- [40] Fischer, J., T. Otto, F. Delori *et al.*: *Scanning Laser Ophthalmoscopy (SLO)*. Em Bille, J. F. (editor): *High Resolution Imaging in Microscopy and Ophthalmology: New Frontiers in Biomedical Optics*. Springer, Cham, Switzerland, agosto 2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554371/>, Fig. 2.2, basic set-up of a SLO. Citado na página 52.
- [41] Corrêa, J.R.: *Microscopia Confocal Básica*. Apostila disponível em: <https://www2.ufjf.br/pgcbio/files/2018/10/Apostila.pdf>, março 2015. Acesso em: 3/5/2025. Citado na página 53.
- [42] Thorlabs, Inc.: *BSW10R 25 × 36 mm 50:50 UVFS Plate Beamsplitter (400–700 nm)*. Página de produto da Thorlabs, 2025. <https://www.thorlabs.com/thorproduct.cfm?partnumber=BSW10R>, Inclui imagem e diagrama esquemático do funcionamento do BSP. Citado na página 54.
- [43] Thorlabs, Inc.: *PF10-03-P01 - Espelho protegido em prata - diametro=25,4mm*. Página de produto da Thorlabs, 2025. https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=903. Citado na página 55.
- [44] Thorlabs, Inc.: *GVS002 - Sistema Galvanômetro 2D*. Página de produto da Thorlabs, 2025. https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=3770&pn=GVS002#4419. Citado na página 55.
- [45] Thorlabs, Inc.: *Lente dde Varredura Scan Lens*. Página de produto da Thorlabs, 2025. https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=2910. Citado na página 57.
- [46] Thorlabs, Inc.: *Fluorescent Microscope Slide, Orange, 1.7 mm Thick*. Página de produto da Thorlabs, 2025. <https://www.thorlabs.com/search/thorsearch.cfm?search=fsk4>. Citado na página 58.
- [47] Ferrand, Patrick: *GPScan.VI: A general-purpose LabVIEW program for scanning imaging or any application requiring synchronous analog voltage generation and data acquisition*. Computer Physics Communications, 192:342–347, 2015, ISSN 0010-4655. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010465515001095>. Citado 2 vezes nas páginas 61 e 63.
- [48] Zengin, Berk: *Instrumentation of an Opto-Digital Confocal Microscope and Development of a DMD-Based Imaging Setup*. Master's Thesis, Koç University, Istanbul, Turkey, 2018. Citado na página 65.

-
- [49] Ripcord Designs: *Who Needs Rasters Anyway?*, 2021. <https://ripcorddesigns.com/blog-news/who-needs-rastas-anyway>, Accessed: 2025-06-23. Citado na página 66.
- [50] Debrowski, A., McManes A.: *Nearsightedness vs. Farsightedness*, 2023. <https://www.allaboutvision.com/conditions/myopia/nearsightedness-vs-farsightedness/>, Accessed: 2025-06-30. Citado na página 68.

Apêndices

APÊNDICE A - **Prêmios**

- Melhor pôster do VII Encontro Brasileiro de Espectroscopia Raman, Sociedade Brasileira de Física (EnBraER - 2024), Belo Horizonte - MG, Brasil, 2024.