

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Exatas
Programa de Pós-graduação em Física

Lucas Lafetá Prates da Fonseca

**PROPRIEDADES ÓPTICAS NÃO LINEARES EM SEMICONDUTORES
BIDIMENSIONAIS E MATERIAIS BIOLÓGICOS**

Belo Horizonte
2022

Lucas Lafetá Prates da Fonseca

**PROPRIEDADES ÓPTICAS NÃO LINEARES EM SEMICONDUTORES
BIDIMENSIONAIS E MATERIAIS BIOLÓGICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Malard Moreira

Belo Horizonte

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

F676p Fonseca, Lucas Lafeté Prates da.
Propriedades ópticas não lineares em semicondutores bidimensionais e materiais biológicos / Lucas Lafeté Prates da Fonseca. – 2022.
91f., enc. : il.

Orientador: Leandro Malard Moreira.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Departamento de Física.
Bibliografia: f. 85-91.

1. Óptica não-linear. 2. Espectroscopia de Raman. 3. Semicondutores.
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

ATA DE DEFESA DE TESE

ATA DA SESSÃO DE ARGUIÇÃO DA 398ª TESE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA, DEFENDIDA POR LUCAS LAFETÁ PRATES DA FONSECA orientado pelo professor Leandro Malard Moreira, para obtenção do grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de concentração física**. Às 13:30 horas de três de junho de dois mil e vinte e dois reuniu-se, por videoconferência, a Comissão Examinadora, composta pelos professores **Leandro Malard Moreira** (Orientador - Departamento de Física/UFMG), **Paulo Sérgio Soares Guimarães** (Departamento de Física/UFMG), **Ubirajara Agero Batista** (Departamento de Física/UFMG), **Jaqueline dos Santos Soares** (Departamento de Física/UFOP) e **Christiano José Santiago de Matos** (Mackenzie/MackGraphe) para dar cumprimento ao Artigo 37 do Regimento Geral da UFMG, submetendo o Mestre **LUCAS LAFETÁ PRATES DA FONSECA** à arguição de seu trabalho de Tese de Doutorado, que recebeu o título de "**Propriedades ópticas não lineares em semicondutores bidimensionais e materiais biológicos**". O candidato fez uma exposição oral de seu trabalho durante aproximadamente 50 minutos. Após esta, os membros da comissão prosseguiram com a sua arguição, e apresentaram seus pareceres individuais sobre o trabalho, concluindo pela aprovação do candidato.

Belo Horizonte, 03 de junho de 2022.

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

Profa. Jaqueline dos Santos Soares
Departamento de Física/UFOP

Prof. Paulo Sérgio Soares Guimarães
Departamento de Física/UFMG

Prof. Christiano José Santiago de Matos
Mackenzie/MackGraphe

Prof. Ubirajara Agero Batista
Departamento de Física/UFMG

Candidato: Lucas Lafetá Prates Da Fonseca



Documento assinado eletronicamente por **Ubirajara Agero Batista, Servidor(a)**, em 06/06/2022, às 11:33, 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 **Paulo Sergio Soares Guimaraes, Professor do Magistério Superior**, em 06/06/2022, às 12:03, 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 **Jaqueline dos Santos Soares, Usuário Externo**, em 06/06/2022, às 12:43, 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 06/06/2022, às 14:01, 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 **Lucas Lafeté Prates da Fonseca, Usuário Externo**, em 06/06/2022, às 14:30, 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 **Christiano José Santiago de Matos, Usuário Externo**, em 07/06/2022, às 15:19, 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 **1506697** e o código CRC **AF32415A**.

Agradecimentos

Quando saí do sertão do norte de Minas, ainda menino, em busca de saber, do meu sonho de ser cientista, jamais saberia o homem que voltaria para casa, não sabia, e ainda não sei, porque ainda sequer voltei. Não sabia o que encontraria, não sabia se tinha feito as escolhas certas, não sabia quem conheceria, não sabia dos sacrifícios que viriam apesar de saber que sempre os há, mas então aprendi que “o sertão é sem lugar, o sertão é do tamanho do mundo, o sertão está em toda parte, o sertão é dentro da gente, e esse sertão não é feito apenas de aridez e provocação, mas também de veredas, de estações de alívio e beleza em meio à solidão.”

Por isso agradeço a todos principalmente minha família pelo apoio mesmo quando não fossem claras as minhas escolhas e que rumo seguir; agradeço aos meus amigos, presentes, ausentes e que estão por vir, vocês são parte do que fui, sou e serei, obrigado pela companhia, pela paciência e pelos momentos que vivemos, sem vocês eu jamais teria conseguido; agradeço aos meus professores e colegas pelos conselhos, suporte e parceria no trabalho e estudos no meu caminho até aqui.

Agradeço sobretudo a todos do LabNS, em especial meu orientador Dr. Leandro Malard (Xubaka), por todo o apoio e motivação, por todos os anos como meu orientador e amigo, se tornou quase um irmão que levarei para a vida; ao Dr. Emerson com quem, além de todos os anos, dividindo o laboratório em trabalhos conjuntos, dividi moradia, experiências, e um pouco da minha vida; por fim ao Dr. Renan por todos os momentos de conversa e suporte na implementação do SRS, além das discussões sobre física muito prolíficas para o desenvolvimento do meu trabalho, muito obrigado a todos vocês.

Agradeço também aos órgãos de fomento por proporcionarem que eu me dedicasse unicamente ao meu objetivo, que sempre foi fazer ciência, obrigado CNPq, CAPES, FAPEMIG, FINEP e INCT da medicina molecular.

Por fim agradeço ao Departamento de Física e a Universidade Federal de Minas Gerais por ter me proporcionado grande parte do meu conhecimento e por ter sido onde vivi minha vida por mais de dez anos.

“Não sou nada.

Nunca serei nada.

Não posso querer ser nada.

À parte isso, tenho em mim todos os sonhos do mundo.”

(Álvaro de Campos - Fernando Pessoa - Tabacaria)

Resumo

Esta tese aborda as aplicações das técnicas de óptica não linear em diferentes tipos de materiais. Sobretudo abordamos as aplicações da geração de segundo harmônico e mistura de quatro ondas em materiais bidimensionais da família dos dicalcogenetos de metais de transição. Além disso, utilizamos técnicas de espectroscopia Raman e Raman estimulado para identificação de depósitos de proteína beta-amiloide no cérebro de camundongos geneticamente modificados para desenvolver a doença de Alzheimer.

No primeiro caso utilizamos a geração de segundo harmônico, que é um efeito de óptica não linear de segunda ordem, e da mistura de quatro ondas, fenômeno de terceira ordem, para identificar ressonâncias com os éxcitons de monocamadas de MoS₂, MoSe₂ e WS₂. Além disso, utilizamos essas mesmas técnicas para medir e caracterizar a susceptibilidade elétrica desses materiais dentro e fora da ressonância dos éxcitons. Esses resultados foram comparados com valores experimentais medidos por diferentes técnicas ópticas disponíveis na literatura.

Para o caso dos materiais biológicos, estudamos as placas formadas pelo acúmulo de beta-amiloide no cérebro dos camundongos. Realizamos além de medidas de Raman convencional para caracterizar as placas, a geração de segundo harmônico, a autofluorescência por excitação de dois fótons, a fluorescência por excitação de dois fótons utilizando marcadores, com o intuito de observar as placas bem como determinar sua composição. Além disso, utilizamos técnicas de Raman estimulado, nesse caso o SRS (*Stimulated Raman Scattering*) e o CARS (*Coherent anti-Stokes Raman Scattering*), com a finalidade de reduzir o tempo de exposição do material em relação ao hiperspectro Raman convencional para detectar placas relativas a picos Raman específicos. Com base nos resultados destas diferentes técnicas fomos capazes de diferenciar os animais por idade utilizando a técnica de análise de componente principal. Um outro aspecto do estudo foi combinar as análises de SRS com medidas de fluorescência por excitação de dois fótons marcando células da glia com o intuito de diferenciar as células que participam da formação da placa amiloide.

Palavras-chave: Óptica não linear. Materiais 2D. Materiais biológicos. Raman.

Abstract

This thesis addresses the applications of nonlinear optical techniques in different materials. We address the applications of second-harmonic generation and four-wave mixing in 2D materials belonging to the class of transition metal dichalcogenides. Moreover, we have used Raman Spectroscopy and Stimulated Raman techniques to identify deposits of beta-amyloid protein in the brain of mice genetically modified to develop Alzheimer's disease.

In the first case, we used the second-harmonic generation, a second-order optical effect, and four-wave mixing, a third-order optical phenomena, to identify the exciton resonances of monolayer MoS₂, MoSe₂, and WS₂. In addition, we have used these techniques to measure and characterize the electrical susceptibility of these materials in and out of resonance with exciton states in these materials.

In the case of biological materials, we have studied the plaques formed by the accumulation of beta-amyloid in the brain of mice. We have performed Raman Spectroscopy measurements to characterize the plaques, and, second-harmonic generation, two-photon excited autofluorescence, and two-photon excited fluorescence with fluorescent labels, to observe the plates and to determine their composition. In addition, we used stimulated Raman techniques, such as SRS (*Stimulated Raman Scattering*) and CARS (*Coherent anti-Stokes Raman Scattering*), to reduce the exposure time compared with conventional Raman spectroscopy measurements to detect plaques related to specific Raman peaks. Based on the application of the different techniques, we have differentiated the animals by age using the principal component analysis technique. Another aspect of the study was to combine SRS analysis with two-photon excited fluorescence measurements by labeling glial cells to determine which cells participate in the beta-amyloid plaque formation.

Keywords: Nonlinear optics. 2D materials. Biological materials. Raman.

Lista de Figuras

Figura 2.1.1: Dois campos elétricos de frequência ω gerando um sinal com o dobro da frequência e diagrama de energia do processo de SHG.

Figura 2.2.1: Três campos elétricos, dois de frequência ω_1 e um de frequência ω_2 , gerando um sinal com frequência ω_4 e diagrama de energia do processo do DFWM.

Figura 2.3.1: Ilustração do espalhamento Rayleigh e Raman incidindo sobre uma molécula vibrando e espalhando um feixe ω_p , um feixe ω_s e ω_{as} espalhados inelasticamente pela vibração molecular e diagrama de energia do espalhamento Rayleigh e dos espalhamentos Raman Stokes e anti-Stokes.

Figura 2.3.2: Ilustração dos processos de Raman estimulado CARS, CSRS e SRS.

Figura 2.3.3: Ilustração das transições ocorridas para o caso especial do CARS, onde $\omega_{CARS}=2\omega_p-\omega_s$.

Figura 2.3.4: Gráficos mostrando a relação da amplitude do sinal em relação à variação de Δ .

Figura 2.3.5: Diagrama de energia dos processos SRS.

Figura 2.4.1: Ilustração do diagrama de energia da PL e TPEF onde podemos ver o processo de excitação do nível “n” para o nível “m”.

Figura 3.2.1: Estrutura geral do TMDs com vista lateral e vista superior de uma monocamada de TMD.

Figura 3.2.2: Primeira zona de Brillouin para a monocamada dos TMDs destacando os pontos de alta simetria: $\Gamma = [0,0]$, $M = [1/2, 0]$ e $K = [1/2, -\sqrt{3}/3]$ e Estrutura das bandas eletrônicas para algumas monocamadas de TMDs.

Figura 3.2.3: Cálculo da relação de dispersão para o MoS_2 e para o WS_2 , demonstrando a mudança do regime de *gap* indireto para *gap* direto, quando reduzimos o número de camadas.

Figura 3.3.1: Representação dos estados ligados dos éxcitons A e B no ponto K dos TMDs.

Figura 3.3.2: Espectro de absorção levando em consideração a presença dos éxcitons.

Figura 3.3.3: Espectro da absorção linear de alguns TMDs.

Figura 3.3.4: Representação dos estados ligados de trión, positivo e negativo, e de biéxciton, no ponto K dos TMDs.

Figura 3.4.1: Sinal do SHG transmitido, dividido pelo sinal de SHG do quartzo, em um floco de MoS_2 sobre quartzo fundido, em relação a energia do fóton fundamental que gera o SHG e medidas de SHG em azul para o resultado experimental para poucas camadas, em verde o espectro teórico para uma tricamada (TL), em vermelho medidas de monocamada (ML) e roxo tricamada (TL), de MoS_2 , feitas por Malard *et al.*

Figura 3.4.2: Curva experimental obtida pela incidência do laser de 800 nm e da fibra fotônica de 800 a 1100 nm em poucas camadas de MoS_2 , em vermelho temos o FWM gerado pela amostra, em azul temos o aumento gerado pelo éxciton para o FWM e em verde temos o CARS para o MoS_2 .

Figura 3.5.1: Montagem simplificada para as medidas de PL, SHG e FWM

Figura 3.6.1: Representação da síntese de monocamadas de MoSe_2 via CVD.

Figura 3.6.2: (a) Representação da síntese de monocamadas de WS_2 com a rampa de temperatura usada nos experimentos de sulfurização.

Figura 3.7.1: Caracterização dos TMDs por espectroscopia Raman de MoS_2 e Espectros fotoluminescência para MoSe_2 e WS_2 .

Figura 3.7.2: Mapas de intensidade para SHG e FWM em MoSe₂, MoS₂ e WS₂ com valor médio (*mean*) e desvio padrão (*StdDev*).

Figura 3.8.1: Ilustração do SHG devido a incidência do laser Idler no TMD com diagrama da transição da energia do SHG fora e em ressonância com o éxciton, além da ilustração do FWM devido a incidência dos lasers Signal e 1064 no TMD e do diagrama da transição da energia do FWM fora e em ressonância com o éxciton.

Figura 3.8.2: Medidas de PL, SHG e FWM para MoSe₂, MoS₂ e WS₂.

Figura 3.9.1: Medidas de SHG, próximo as energias dos éxcitons dos TMDs

Figura 3.10.1: Medidas de FWM, próximo as energias dos éxcitons dos TMDs.

Figura 3.11.1: Efeitos gerados no MoS₂ devido a incidência de três lasers pulsados e a ilustração de diferentes processos não lineares gerados devido a incidência dos lasers na amostra.

Figura 4.2.1: Ilustração das principais células do sistema nervoso central, em amarelo temos os neurônios, em verde os astrócitos, em azul os oligodendrócitos e em marrom as micróglia.

Figura 4.2.2: Fotografia do Dr. Alzheimer e sua paciente Auguste Deter, com a imagem das lâminas histológicas post-mortem originais mostrando placas neuríticas impregnadas de prata e um emaranhado neurofibrilar do cérebro de Augusta Deter.

Figura 4.2.3: Imagem feita por imunocoloração usando o anticorpo MAC-1 para marcar a microglia de uma placa amiloide no cérebro de um camundongo transgênico.

Figura 4.3.2.1: Figura que ilustra a montagem experimental utilizada para varredura das placas amiloides.

Figura 4.4.1.1: Espectro Raman do cérebro de um camundongo transgênico de 6 meses de idade.

Figura 4.4.1.2: Em amarelo a esquerda temos o halo lipídico associado ao pico Raman de 2850 cm⁻¹; em vermelho temos a placa amiloide que forma o core associado ao pico Raman da Amida I em 1675 cm⁻¹; em azul temos o pico associado ao DNA em 792 cm⁻¹.

Figura 4.4.2.1: Figura de SRS feita utilizando o pico associado aos lipídios estimulando o pico em 2850 cm⁻¹ e imagem de SRS feita estimulando o pico Raman da Amida I em 1670 cm⁻¹.

Figura 4.4.2.2: Na linha superior temos medidas de espectroscopia Raman com o hiperespectro do core, lipídio e sobreposição das duas imagens. Na linha inferior temos as imagens de SRS.

Figura 4.4.2.3: Imagem do experimento realizando diferentes técnicas em tecidos cerebrais.

Figura 4.4.2.4: Espectro Raman do halo e core na região de alta frequência e visão geral da imagem SRS do hipocampo com várias placas Aβ.

Figura 4.4.3.1: Análise de PCA com animais Ctrl, Tg 6 e Tg 12 meses.

Figura 4.4.3.2: Espectro Raman de um animal Tg de 12 meses, e imagens do halo lipídico para diferentes frequências.

Figura 4.4.4.1: Imagens de placa amiloide onde podemos observar que na linha superior temos os resultados do PCA derivados de um mapa Raman. Na linha inferior temos as imagens de imunofluorescência corada com amylo-glo para peptídeo βA e GFAP para os astrócitos.

Figura 4.4.4.2: Imagens da placa amiloide, microglia, e neuritos distróficos.

Figura 4.4.4.3: Imagem SRS de borda lipídica e imunofluorescência de células da glia

Figura 4.4.4.4: Imagem SRS de borda lipídica e imunofluorescência de células da glia com quadrado delimitando as regiões com densas bordas de lipídio em torno de placas

Lista de Abreviações

2D - Bidimensional

SHG - Geração de segundo harmônico (*Second harmonic generation*)

FWM - Mistura de quatro ondas (*Four-wave mixing*)

DFWM - Mistura de quatro ondas degenerada (*Degenerated Four-Wave Mixing*)

TMD - Dicalcogenetos de metais de transição (*Transitional Metal Dichalcogenides*)

PL - Fotoluminescência (*Photoluminescence*)

SpRS - Espalhamento Raman convencional (*Raman Scattering*)

TPEF - Fluorescência por excitação de dois fótons (*Two-photon Excited Fluorescence*)

TPEA - Autofluorescência por excitação de dois fótons (*Two-photon Excited Autofluorescence*)

CARS - Espalhamento Raman anti-Stokes coerente (*Coherent anti-Stokes Raman Scattering*)

SRS - Espalhamento Raman estimulado (*Stimulated Raman Scattering*)

CSRS - Espalhamento Raman Stokes coerente (*Coherent Stokes Raman Scattering*)

SRL - Espalhamento Raman estimulado com perda (*Stimulated Raman Loss*)

SRG - Espalhamento Raman estimulado com ganho (*Stimulated Raman Gain*)

n.f.c. - Componentes negativos de frequência (*Negative frequency components*)

CVD - Deposição química em fase vapor (*Chemical Vapour Deposition*)

THG - Geração de terceiro harmônico (*Third-Harmonic Generation*)

SNC - Sistema nervoso central

DA - Doença de Alzheimer

βA - beta-amiloide

Tg - Camundongo transgênico

Wt ou Ctrl - Camundongo controle (*Wild type*)

PFA - Paraformaldeído

PBS - Tampão fosfato-salino (*phosphate buffered saline*)

PCA - Análise de componente principal (*Principal Component Analysis*)

PC1 - Primeira componente principal

Sumário

1. Introdução	13
2. Técnicas ópticas aplicadas	16
2.1. Geração de segundo harmônico (SHG)	16
2.2. Mistura de quatro ondas (FWM)	18
2.3. Raman convencional e estimulado (SpRS, CARS e SRS)	20
2.4. Fotoluminescência por excitação com dois fótons	29
3. Aplicações de óptica não linear em TMDs	31
3.1. Dicalcogenetos de metais de transição	31
3.2. Estrutura cristalina e eletrônica	31
3.3. Éxcitons em TMDs	34
3.4. SHG e FWM aplicado aos TMDs	37
3.5. Montagem experimental para realização das medidas	39
3.6. Preparação de amostras por CVD	42
3.7. Caracterização dos materiais por PL, Raman e homogeneidade	44
3.8. Energias dos éxcitons nos TMDs	47
3.9. Susceptibilidade elétrica de segunda ordem	50
3.10. Susceptibilidade elétrica de terceira ordem	52
3.11. Discussão dos resultados	54
3.12. Conclusões sobre os TMDs	57
4. Aplicações de óptica não linear em materiais biológicos	59
4.1. Preâmbulo	60
4.2. Os tipos celulares do SNC e a doença de Alzheimer	60
4.3. Metodologia	64
4.3.1. Preparação de amostras de cérebro	64
4.3.2. Montagem experimental para realização das medidas	65
4.4. Espectroscopia e imageamento das placas beta-amiloide	67
4.4.1. Espectroscopia Raman aplicada	67
4.4.2. Técnicas não lineares para identificação das placas	69
4.4.3. Determinação da idade dos modelos animais por PCA	73
4.4.4 TPEF e SRS para identificação das placas	77
4.5. Conclusões sobre os materiais biológicos	82
5. Considerações finais e perspectivas	83
6. Lista de publicações	85
Referências	86

1. Introdução

Desde o desenvolvimento dos lasers, iniciou-se a utilização dessa nova fonte de luz coerente em experimentos de óptica não linear [1,2]. A partir disso, nos últimos anos, com o desenvolvimento de novos tipos de fontes de luz e de detectores mais precisos, uma variedade de novos efeitos não lineares, sobretudo de segunda e terceira ordem, tiveram a possibilidade de ser realizados e, mais que isso, serem utilizados como uma nova ferramenta para o desenvolvimento tecnológico, seja nas aplicações de óptica não linear em sistemas de telecomunicações [3], seja como ferramenta de diagnóstico [4], fabricação de dispositivos [5], ou mesmo para caracterização de novos materiais [6,7].

Devido a esses avanços supracitados, o intuito deste trabalho é demonstrar as aplicações de alguns tipos de efeitos ópticos não lineares e como podemos extrair informações importantes de diferentes amostras utilizando-se dessa ferramentaria. Num primeiro momento este trabalho abordará o uso da geração de segundo harmônico (*Second-harmonic Generation*, SHG) e da mistura de quatro ondas (*Four-wave Mixing*, FWM), técnicas de segunda e terceira ordem respectivamente, para identificar as energias dos éxcitons e trions em semicondutores 2D pertencentes à família dos dicalcogenetos de metais de transição (*Transition Metal Dichalcogenides*, TMD).

Este tipo de estudo se revela importante pois os dicalcogenetos de metais de transição apresentam propriedades que podem ter aplicações na eletrônica e optoeletrônica, principalmente por serem semicondutores de *gap* direto quando estão na forma de monocamadas [8–13]. A presença de um *gap* de energia na região do visível e infravermelho próximo abrem portas para que diversas técnicas ópticas sejam usadas para determinar as propriedades físicas desses materiais, além de aplicações que explorem essa condição. Um outro ponto de destaque é que foi demonstrado que estes materiais apresentam fortes respostas ópticas não lineares [14], podendo ter aplicações na área da engenharia para a construção de fibras óptica, e amplificadores de sinais [5,15–17].

Dessa forma, um dos objetivos desta tese é estudar as mudanças nas propriedades ópticas não lineares desses materiais na presença de éxcitons. Verificamos que as susceptibilidades elétricas de segunda e terceira ordem são aumentadas próximas às energias dos éxcitons desses materiais. Além disso, a quantificação dessas susceptibilidades em

ressonância com éxcitons em monocamadas foi feita pela primeira vez na literatura. Medidas de fotoluminescência (*Photoluminescence*, PL) e espalhamento Raman convencional (*Raman Scattering*, SpRS) foram utilizadas para validar a posição da energia dos éxcitons e garantir a determinação do número de camadas dos materiais.

Num segundo momento, outras técnicas foram utilizadas para medidas de materiais biológicos, técnicas que utilizam os fenômenos de SHG, fluorescência por excitação com dois fótons (*Two-photon Excited Fluorescence*, TPEF), espalhamento Raman convencional, espalhamento Raman anti-Stokes coerente (*Coherent anti-Stokes Raman Scattering*, CARS) e o espalhamento Raman estimulado (*Stimulated Raman Scattering*, SRS) foram exploradas com esse intento. Neste trabalho foram realizadas medidas de placas beta-amiloide, associadas à doença de Alzheimer, em cérebros de camundongos geneticamente modificados. Para essa análise foi necessário medir o espectro Raman do tecido saudável e compará-lo ao tecido encontrado nas placas, com a finalidade de encontrar as diferenças no espectro desse tipo de estrutura que a diferenciam de um tecido saudável [18]. À partir desse resultado foi possível aplicar outras técnicas para a caracterização das placas, como a TPEF, SHG, CARS, SRS, e determinar o que cada um desses fenômenos pode nos informar a respeito da constituição dessas placas [19]. Posteriormente à esses experimentos usamos o TPEF e SRS para determinar quais os tipos células cerebrais que estão presentes no halo da placa formada pelo acúmulo de beta-amiloide, além disso foi possível, através de métodos computacionais, separar os animais por idade, pelas diferenças no espectro Raman das placas existentes em cada grupo.

Dessa maneira, este trabalho visa demonstrar a capacidade das técnicas ópticas não lineares de extrair informações relevantes em diferentes tipos de amostra, seja com um menor tempo de aquisição, ou devido a uma resposta mais intensa e com a capacidade de caracterizá-los através de suas propriedades específicas, demonstrando assim a utilidade dessas técnicas e sua capacidade de aplicação em diferentes áreas de estudo.

Este trabalho está organizado em cinco capítulos onde este é o primeiro capítulo introdutório, à seguir temos o segundo capítulo que aborda os princípios das técnicas ópticas não lineares usadas para realizar os experimentos. No capítulo três trataremos dos experimentos realizados em TMDs próximo às energias dos éxcitons nas monocamadas destes materiais. No capítulo quatro trataremos dos experimentos em tecidos biológicos, mais

especificamente em cortes de cérebro de camundongos geneticamente modificados para desenvolver a doença de Alzheimer, ou seja, que apresentam depósitos de placas beta-amiloide no cérebro. Por fim, no capítulo cinco serão apresentadas as considerações finais e as perspectivas deste trabalho.

2. Técnicas ópticas aplicadas

A interação da luz com a matéria pode ser descrita em termos da polarização que um, ou mais, campos elétricos incidentes causam no meio material. Em regimes de baixas intensidades dos campos elétricos predominam os efeitos de polarização lineares, porém quando em regimes de mais alta intensidade dos campos elétricos, podem existir termos associados a uma polarização não linear [20,21]. Seguindo a referência [22], temos as equações que se seguem à partir da equação 2.1.

$$\mathbf{P}(\mathbf{r},t) = \mathbf{P}_L(\mathbf{r},t) + \mathbf{P}_{NL}(\mathbf{r},t), \quad (2.1)$$

onde \mathbf{P} é a polarização total, \mathbf{P}_L é o termo linear e \mathbf{P}_{NL} é parte não linear. Podemos escrever essa última como:

$$P_{NL,i} = \epsilon_0 \left(\sum_{j,k} \chi_{ijk}^{(2)} E_j E_k + \sum_{j,k,l} \chi_{ijkl}^{(3)} E_j E_k E_l + \dots \right), \quad (2.2)$$

onde, temos a permissividade elétrica do vácuo (ϵ_0) no primeiro termo temos a polarização de segunda ordem, associado ao $\chi^{(2)}$ que é a susceptibilidade de segunda ordem, com seus respectivos campos elétricos incidentes (E_j e E_k). Este termo é responsável pelos efeitos de segunda ordem como, por exemplo, a geração de segundo harmônico. Já o segundo termo será a polarização de terceira ordem, associado ao $\chi^{(3)}$ que é a susceptibilidade de terceira ordem, com seus respectivos campos elétricos incidentes, que está associada aos fenômenos de terceira ordem, como a mistura de quatro ondas, o que inclui o espalhamento Raman anti-Stokes coerente (CARS) e o espalhamento Raman estimulado (SRS), “i, j, k” representam as coordenadas cartesianas.

2.1. Geração de segundo harmônico (SHG)

A técnica da geração de segundo harmônico (*second harmonic generation*, SHG) acompanha o surgimento do laser, que data de 1960 [1,23], pois só uma fonte de campo

elétrico intensa poderia gerar efeitos não lineares. Além disso o SHG foi o primeiro efeito de óptica não linear observado já em 1961 por Franken *et. al* quando foi observado uma emissão com o dobro da frequência (metade do comprimento de onda) ao focar um feixe intenso de laser de rubi de 694,3 nm em um cristal de quartzo e um feixe de 347,2 nm foi produzido [2]. De fato, observando a primeira parte da equação 2.2 temos o termo da polarização não linear de segunda ordem $P^{(2)}$, que, em termos escalares, podemos escrever como [20]:

$$P^{(2)} = \epsilon_0 \chi^{(2)} E^2 . \quad (2.1.1)$$

Admitindo que exista um campo elétrico incidente de alta intensidade com frequência ω da forma:

$$E(t) = E e^{-i\omega t} + E^* e^{i\omega t} , \quad (2.1.2)$$

se substituirmos então 2.1.2 em 2.1.1 temos que a polarização de segunda ordem assume a forma:

$$P^{(2)}(t) = 2\epsilon_0 \chi^{(2)} E E^* + \epsilon_0 \chi^{(2)} E^2 e^{-i2\omega t} + \text{c.c.} , \quad (2.1.3)$$

onde, c.c. é o complexo conjugado da expressão, já o primeiro termo da expressão é associado ao fenômeno da retificação óptica, ou seja, um campo estático do material, o segundo termo é a geração de um efeito com o dobro da frequência do campo incidido, que é conhecido como geração de segundo harmônico [20,24], esse efeito pode ser ilustrado pela figura 2.1.1, que mostra o fenômeno da geração de um feixe com o dobro da frequência, a partir da incidência de dois feixes, em (a) e o diagrama de energia do processo em (b) à seguir.

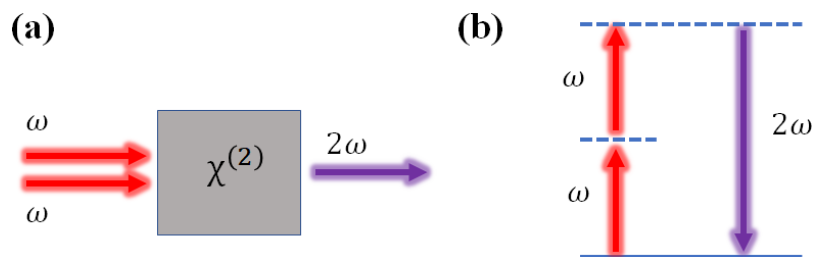


Figura 2.1.1: (a) Dois campos de frequência ω gerando um sinal com o dobro da frequência, quando interagem com um meio não linear. (b) Diagrama de energia do processo de SHG.

Pela equação 2.1.1 também podemos demonstrar porque a geração de segundo harmônico não ocorre em materiais centrossimétricos, pois, uma vez que aplicamos uma

inversão no campo elétrico $E(t) \rightarrow -E(t)$, as cargas vão se deslocar no sentido oposto, por isso, teremos $P(t) \rightarrow -P(t)$, então teríamos pela equação 2.1.1:

$$P^{(2)}(t) = \epsilon_0 \chi^{(2)} E^2(t), \quad (2.1.4)$$

$$-P^{(2)}(t) = \epsilon_0 \chi^{(2)} (-E(t))^2. \quad (2.1.5)$$

Porém, para materiais centrossimétricos a equação 2.1.4 deveria ser igual a 2.1.5 e para que ocorra essa igualdade, obrigatoriamente temos que $\chi^{(2)} = 0$ [20,21].

2.2. Mistura de quatro ondas (FWM)

A mistura de quatro ondas é a geração de um campo eletromagnético pela combinação de outros três, portanto é um fenômeno ligado à óptica não linear de terceira ordem. Todos os fenômenos dessa natureza são chamados de FWM, como por exemplo, o CARS. Agora utilizando a segunda parte da polarização não linear da equação 2.2, podemos descrevê-la como a polarização de terceira ordem e podemos escrevê-la da seguinte maneira, como observado na referência [22]:

$$P_{NL}^{(3)}(t) = \epsilon_0 \chi^{(3)} E^3(t). \quad (2.2.1)$$

Assumindo, um campo elétrico incidente de alta intensidade descrito como:

$$\mathbf{E}(t) = \mathbf{E}_1 e^{-i\omega_1 t} + \mathbf{E}_2 e^{-i\omega_2 t} + \mathbf{E}_3 e^{-i\omega_3 t} + \text{c.c.}, \quad (2.2.2)$$

onde $\omega_1, \omega_2, \omega_3$ são as frequências dos campos incidentes e c.c. é o complexo conjugado da expressão. Calculando então $E^3(t)$, obtemos várias combinações de frequências, que chamaremos de ω_4 , mostradas a seguir:

$$\begin{aligned} & \omega_1, \omega_2, \omega_3, 3\omega_1, 3\omega_2, 3\omega_3, \\ & (\omega_1 + \omega_2 + \omega_3), (\omega_1 + \omega_2 - \omega_3), (\omega_1 + \omega_3 - \omega_2), (\omega_2 + \omega_3 - \omega_1), \\ & (2\omega_1 \pm \omega_2), (2\omega_1 \pm \omega_3), (2\omega_2 \pm \omega_1), (2\omega_2 \pm \omega_3), (2\omega_3 \pm \omega_1), (2\omega_3 \pm \omega_2). \end{aligned} \quad (2.2.3)$$

Cada uma dessas combinações está associada a um processo não linear de terceira ordem diferente. Os tipos de “mistura” que vão nos interessar neste trabalho são os que geram a mistura de quatro ondas degenerada (*Degenerated Four-Wave Mixing*, DFWM), que são as combinações do tipo $(\omega_1 + \omega_3 - \omega_2)$, quando ω_1 e ω_3 são degenerados, transformando-se na combinação $(2\omega_1 - \omega_2)$ [22], como podemos ver na figura 2.2.1 que mostra em (a) o fenômeno

da geração de um campo de frequência $2\omega_1 - \omega_2$, a partir da incidência de três feixes intensos sendo dois deles degenerados, e em (b) temos o diagrama de energia do processo mostrado à seguir.

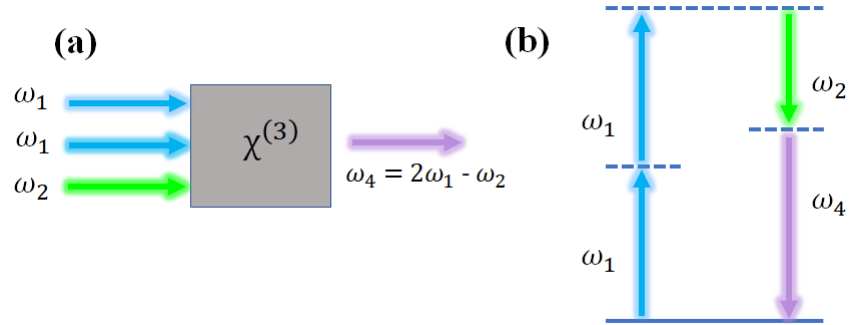


Figura 2.2.1: (a) Três campos, dois de frequência ω_1 e um de frequência ω_2 , gerando um sinal com frequência ω_4 , quando interagem com um meio não linear. (b) Diagrama de energia do processo do DFWM.

A partir das equações 2.2.1, 2.2.2 e 2.2.3, a polarização induzida com os termos de mistura de frequência ($\omega_1 + \omega_3 - \omega_2$, $2\omega_1 - \omega_2$, $2\omega_3 - \omega_2$) são dados por:

$$P_1^{(3)}(\omega_1 + \omega_3 - \omega_2) \propto \epsilon_0 \chi^{(3)} E_1 E_3 E_2^* , \quad (2.2.4)$$

$$P_2^{(3)}(2\omega_1 - \omega_2) \propto \epsilon_0 \chi^{(3)} E_1^2 E_2^* ,$$

$$P_3^{(3)}(2\omega_3 - \omega_2) \propto \epsilon_0 \chi^{(3)} E_3^2 E_2^* .$$

Porém, para o caso degenerado ($\omega_1 = \omega_3$) temos $\omega_1 + \omega_3 - \omega_2 = 2\omega_1 - \omega_2 = 2\omega_3 - \omega_2$, assim teremos uma polarização total que chamaremos de $P_T^{(3)}$ descrita como:

$$P_T^{(3)}(2\omega_1 - \omega_2) = P_1^{(3)} + P_2^{(3)} + P_3^{(3)} \propto \epsilon_0 \chi^{(3)} E_1^2 E_2^* , \quad (2.2.5)$$

A partir desse resultado podemos relacionar a intensidade da resposta não linear de terceira ordem que chamamos de FWM nesse trabalho com os campo incidentes juntamente com a susceptibilidade elétrica de terceira ordem.

2.3. Raman convencional e estimulado (SpRS, CARS e SRS)

O espalhamento Raman foi observado inicialmente pelo fisico indiano Chandrasekhara Venkata Raman em 1927 [25,26], que observou que uma fonte de luz que incide sobre um material espalha, não somente luz na mesma energia do campo incidente, mas, também, uma

parcela de luz com maior (espalhamento anti-Stokes) e menor (espalhamento Stokes) energia que o campo incidente, com energias diferentes para cada tipo de ligação do material, como podemos ver na figura 2.3.1-a, onde temos um campo ω_p incidente que gera o próprio ω_p (espalhamento Rayleigh) mas também os espalhamentos ω_s (Stokes) e ω_{as} (anti-Stokes). Este fenômeno ficou conhecido como espalhamento inelástico da luz, ou também, espalhamento Raman. O diagrama do espalhamento elástico (Rayleigh), inelástico Stokes e anti-Stokes Raman da figura 2.3.1-b mostra a transição de um elétron no nível eletrônico fundamental e , quando excitado por um campo eletromagnético ω_p , passa para um estado virtual excitado e em seguida decai para o nível eletrônico fundamental novamente, emitindo um outro campo eletromagnético com mesma energia ω_p (espalhamento Rayleigh).

Porém, no caso dos sólidos, dentro dos níveis eletrônicos, podem existir níveis vibracionais do material ativos em Raman. Portanto, o elétron pode voltar ao estado eletrônico fundamental, mas em um nível vibracional excitado dentro desse nível eletrônico. Por exemplo, o elétron pode ir de um estado vibracional mais baixo para um nível vibracional mais alto, que seria o espalhamento Raman Stokes, pois o campo eletromagnético emitido tem menor energia que o absorvido, nesse caso emitindo campo ω_s , ou partindo de um estado vibracional mais alto e no decaimento para um nível vibracional mais baixo, que seria o espalhamento Raman anti-Stokes, pois o campo eletromagnético emitido tem maior energia que o absorvido, emitindo ω_{as} [27,28].

Portanto, quando incidimos uma fonte de luz em um determinado material (feixe *Pump*, ω_p), a diferença de energia do campo incidente para os campos espalhados está associada ao modo de vibração da amostra, como pode ser visto na figura 2.3.1-c. No entanto, cada estrutura tem a sua energia de ligação diferente e, portanto, o espectro luminoso é particular a cada tipo de estrutura, sendo possível caracterizar os componentes químicos do material através do seu chamado espectro Raman, que traz consigo um pico no espectro associado a cada tipo de vibração de uma ligação atômica associado ao espalhamento.

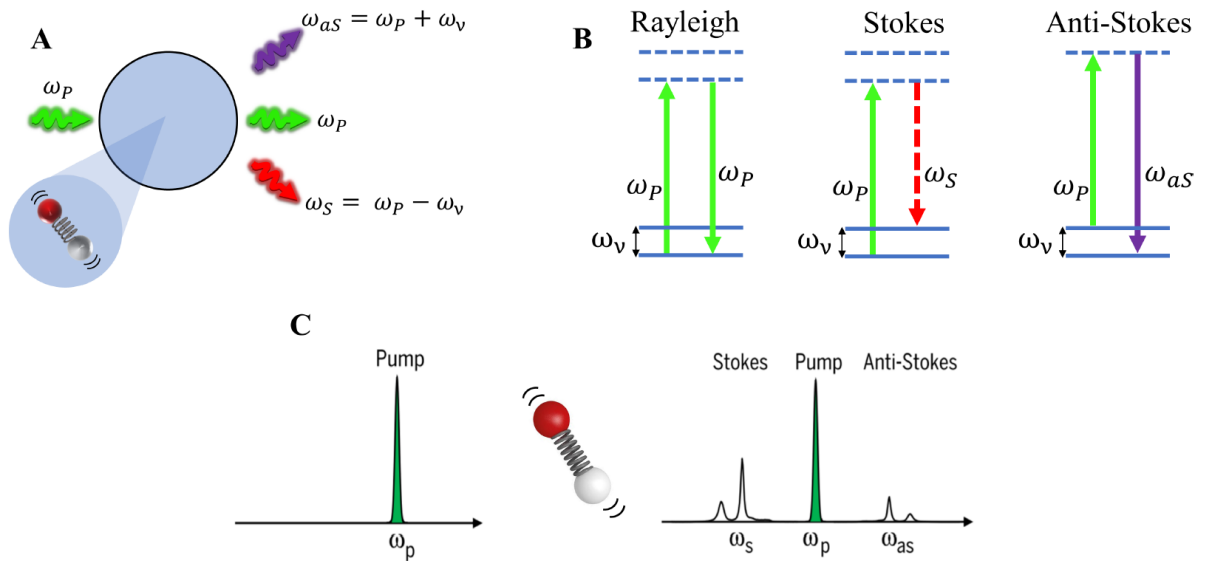


Figura 2.3.1: A) Ilustração do espalhamento Rayleigh e Raman, onde vemos um feixe incidente ω_p , incidindo sobre uma molécula vibrando e espalhando um feixe ω_p (espalhamento elástico Rayleigh), um feixe ω_s (espalhamento Raman Stokes) e um ω_{as} (espalhamento Raman anti-Stokes) espalhados inelasticamente pela vibração molecular. B) Diagrama de energia do espalhamento Rayleigh e dos espalhamentos Raman Stokes e anti-Stokes. C) Ilustração de um espectro de um laser incidente (*Pump*) em uma molécula vibrando, demonstrando como seriam os picos relacionados ao espalhamento Stokes e anti-Stokes. [29].

Podemos descrever esse fenômeno de uma forma clássica retomando a equação 2.1, onde a relação entre $\mathbf{P}(\mathbf{r},t)$ (polarização) e $\mathbf{E}(\mathbf{r},t)$ (campo elétrico) pode ser aproximada por uma correspondência linear para o caso de baixas intensidades da fonte. Então, a resposta espacial local, da polarização elétrica para baixas intensidades, poderá ser escrita como:

$$P_L(r, t) = \epsilon_0 \chi^{(1)} E(r, t), \quad (2.3.1)$$

onde, ϵ_0 é a permissividade elétrica do vácuo e $\chi^{(1)}$ é o tensor susceptibilidade elétrica linear ou de primeira ordem. Em geral, a relação entre $\mathbf{P}(\mathbf{r},t)$ e $\mathbf{E}(\mathbf{r},t)$ é uma entidade tensorial que pode ser escrita como:

$$P_{L,i} = \epsilon_0 \sum_j \chi_{ij}^{(1)} E_j, \quad (2.3.2)$$

onde “i” representa as coordenadas cartesianas e a soma é realizada sobre “j”, que também são coordenadas do plano cartesiano. A polarização linear é responsável por fenômenos ópticos tais como a refração, absorção da luz e também do espalhamento Raman. Se o material em questão apresenta uma vibração em um modo normal, que chamaremos de $\mathbf{Q}(\mathbf{r},t)$,

cujos modos de vibração têm uma frequência ω_q , podemos, então, escrever $\mathbf{Q}(\mathbf{r},t) = \mathbf{Q}_0 \cos(\omega_q t)$. Expandindo $\chi^{(1)}$ em uma série de Taylor em $\mathbf{Q}(\mathbf{r}, t)$, em torno do ponto de mínimo, temos [30]:

$$\chi^{(1)} = \chi_0^{(1)} + (\partial\chi^{(1)}/\partial Q)_0 Q(r, t) + \dots \quad (2.3.3)$$

Portanto, tomando apenas o termo da expansão em primeira ordem $(\partial\chi^{(1)}/\partial Q)_0$, caso ele seja não nulo, para a condição em que o campo eletromagnético é incidido no material, este modo será ativo em Raman. Se consideramos um campo eletromagnético incidente na forma abaixo.

$$E = E_0 \cos(\omega_i t) \quad (2.3.4)$$

Podemos, então, escrever a polarizabilidade linear como:

$$P_L = P_0(r, t) + P_{ind}(r, t, Q), \quad (2.3.5)$$

onde $\mathbf{P}_0(\mathbf{r},t) = \chi_0^{(1)} \mathbf{E}_0 \cos(\omega_i t)$ é a polarizabilidade em fase com o campo incidente e $\mathbf{P}_{ind}(\mathbf{r},t,\mathbf{Q}) = \mathbf{E}_0 \mathbf{Q}_0 (\partial\chi^{(1)}/\partial Q)_0 \cos(\omega_i t) \cos(\omega_q t)$ é a polarizabilidade induzida pelos modos vibracionais do material, que pode ser descrita como:

$$P_L(r, t, Q) = \chi_0^{(1)} E_0 \cos(\omega_i t) + E_0 Q_0 \left(\frac{\partial\chi^{(1)}}{\partial Q}\right)_0 \cos(\omega_i t) \cos(\omega_q t) \quad (2.3.6)$$

Usando as identidades trigonométricas apropriadas, podemos escrever a $\mathbf{P}_{ind}(\mathbf{r},t,\mathbf{Q})$ da seguinte forma:

$$P_{ind}(r, t, q) = \frac{1}{2} E_0 q_0 \left(\frac{\partial}{\partial Q}\right)_0 \{ \cos[(\omega_i - \omega_q)t] + \cos[(\omega_i + \omega_q)t] \} \quad (2.3.7)$$

Isso significa que, para as condições supracitadas em que o $(\partial\chi^{(1)}/\partial Q)_0$ é diferente de zero, há a possibilidade dos campos incidentes ganharem ou perderem energia devido aos modos de vibração. Esses modos de vibração estão associados ao tipo de ligação entre as moléculas do material, portanto, cada tipo de modo normal de vibração terá uma energia específica e um pico Raman diferente. Por esse motivo, a espectroscopia Raman pode ser usada como um método de caracterização de materiais usando apenas luz, pois cada material apresenta ligações interatômicas diferentes, seja alterando os átomos que estão ligados [31–33] ou mesmo alterando apenas a estrutura em que os mesmos átomos se apresentam na sua organização [34]. Dessa maneira, a espectroscopia Raman pode ser usada como uma

impressão digital de um determinado material. Além disso, as propriedades da amostra podem ser medidas sem a necessidade de destruir parte dela para análise, sendo assim uma técnica não destrutiva.

Entretanto, a técnica de espectroscopia Raman convencional, em algumas situações, se torna difícil de usar devido a sua baixa taxa de conversão de luz incidida em luz espalhada inelasticamente, pois é um fenômeno relativamente mais difícil de ocorrer que os efeitos estimulados [20]. Além disso, o imageamento utilizando o Raman convencional pode durar horas, dependendo da configuração de potência do laser e área a ser medida. Portanto, para sanar essas dificuldades que podem surgir, existem técnicas ópticas que podem ser utilizadas para amplificar essa resposta e encurtar esse tempo de aquisição. Neste trabalho abordaremos dois processos ópticos de terceira ordem que estão associados ao espalhamento Raman estimulado; são eles o CARS e o SRS.

Na figura 2.3.2-a, podemos ver que ao incidir campos eletromagnéticos em um material podemos ter efeitos de mistura de quatro ondas. Retomando a equação 2.2.3, das componentes do FWM, podemos dizer que temos os campos $\omega_1 = \omega_3 = \omega_p$ e $\omega_2 = \omega_s$, e reescrever as combinações possíveis da equação 2.2.3, entre elas teremos $2\omega_p - \omega_s$, $2\omega_s - \omega_p$, ω_p e ω_s , que são as que mais nos interessam agora.

Dada uma condição tal que a diferença de energia entre os campos for igual a um modo de vibração do material ($\omega_p - \omega_s = \omega_v$), temos alguns efeitos de Raman estimulado. Podemos observar o CARS quando temos as combinações $2\omega_p - \omega_s = \omega_{\text{CARS}}$; o espalhamento Raman Stokes coerente (*Coherent Stokes Raman Scattering*, CSRS), quando tomamos as combinações $2\omega_s - \omega_p = \omega_{\text{CSRS}}$; e o SRS que pode ser dividido em duas partes: o espalhamento Raman estimulado com perda (*Stimulated Raman Loss*, SRL) e o espalhamento Raman estimulado com ganho (*Stimulated Raman Gain*, SRG). Ambos são associados aos termos ω_p e ω_s e ocorrem devido ao aumento do campo eletromagnético Stokes, como consequência da perda de intensidade do campo eletromagnético de bombeio (*Pump*), mediado por um modo de vibração. Na figura 2.3.2-b fica mais claro como a incidência de dois campos eletromagnéticos, em ressonância com um modo vibracional, gera os efeitos supracitados.

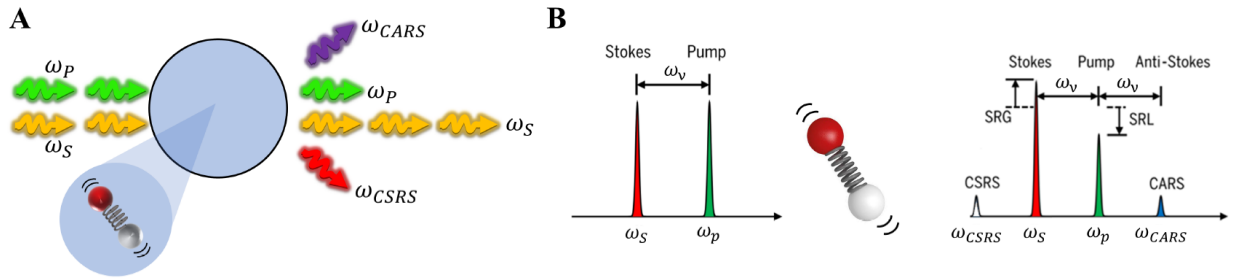


Figura 2.3.2: a) Ilustração dos processos de Raman estimulado CARS , CSRS e SRS onde vemos dois feixes incidentes ω_p e ω_s , incidindo sobre uma molécula vibrando e espalhando um feixe ω_p (SRL), um feixe ω_s (SRG), um feixe ω_{CARS} e um feixe ω_{CSRS} . b) Ilustração de um espectro de dois lasers incidentes (*Pump* e Stokes) em uma molécula vibrando, demonstrando como seriam os efeitos do CARS, CSRS, SRG e SRL. [29].

Para este trabalho, consideramos apenas os efeitos CARS e SRL (que chamaremos de SRS). A figura 2.3.3 abaixo é uma ilustração do diagrama de energia do processo ocorrido no CARS. Nela podemos observar a transição do laser de bombeio (ω_p) do estado fundamental para um nível eletrônico virtual, depois a transição do laser Stokes (ω_s) do nível eletrônico virtual para um nível vibracional real, posteriormente, ocorre novamente a transição do laser de bombeio do nível vibracional real para um outro nível eletrônico virtual e logo após o decaimento do elétron para o estado fundamental, com energia do bombeio mais a energia da vibração ($\omega_p + \omega_v$) com energia igual ao anti-Stokes (ω_{CARS}).

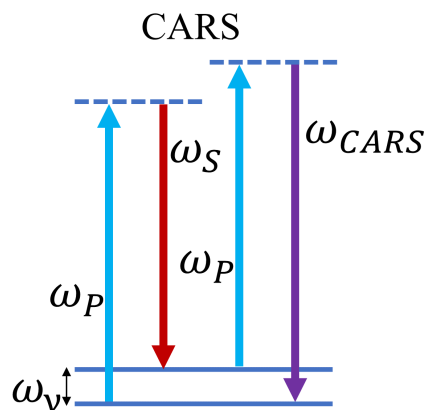


Figura 2.3.3: Ilustração das transições ocorridas para o caso especial do CARS, onde $\omega_{CARS} = 2\omega_p - \omega_s$ e $\omega_p - \omega_s = \omega_v$. [29]

A partir deste momento vamos descrever o efeito CARS e SRS com uma maior profundidade. Podemos escrever, para os fenômenos de Raman estimulado deste tipo, um campo elétrico da forma:

$$E(t) = E_p(t) + E_s(t) = E_p e^{-i\omega_p(t)} + E_s e^{-i\omega_s(t)} + c.c. \quad (2.3.8)$$

A partir das equações 2.2.1, 2.2.2 e 2.2.3, e fazendo as mudanças no índice das frequências, a polarização associada ao CARS, CSRS e SRS pode ser escrita como:

$$P_{(NL)}(t) = P(2\omega_p - \omega_s) e^{-i(2\omega_p - \omega_s)(t)} + P(2\omega_s - \omega_p) e^{-i(2\omega_s - \omega_p)(t)} \\ + P(\omega_p) e^{-i(\omega_p)(t)} + P(\omega_s) e^{-i(\omega_s)(t)} + n.f.c. \quad , \quad (2.3.9)$$

onde n.f.c. são os componentes negativos de frequência (*Negative frequency components*) e sabendo que a intensidade é dada por uma proporção ao quadrado da polarizabilidade temos a seguinte expressão:

$$I \propto |P|^2 \quad . \quad (2.3.10)$$

Analisando apenas o termo de polarização que dará origem ao efeito CARS temos que:

$$I_{\omega_{CARS}} \propto |P(2\omega_p - \omega_s)|^2 \quad , \quad (2.3.11)$$

$$I_{\omega_{CARS}} \propto |\chi^{(3)}|^2 |E_p|^2 |E_s^*|^2 \quad . \quad (2.3.12)$$

Sendo assim, a intensidade na frequência ω_{CARS} depende de três variáveis, são elas: a amplitude do campo elétrico do feixe de bombeio (E_p); do feixe Stokes (E_s); e da susceptibilidade de terceira ordem do material ($\chi^{(3)}$). Se variarmos, portanto, a frequência do feixe de bombeio (ou a frequência do feixe Stokes), admitindo que utilizamos os mesmos valores para a intensidade dos campos elétricos, o único parâmetro que pode mudar o valor da intensidade de ω_{CARS} é o $\chi^{(3)}$. Um modelo para explicar como $\chi^{(3)}$ depende da energia de excitação dos feixes pode ser visto na referência [35]. Nesse modelo admite-se que o $\chi^{(3)}$ pode ser escrito como uma soma entre uma parte ressonante ($\chi_r^{(3)}$) e outra não ressonante ($\chi_{nr}^{(3)}$), de forma que a intensidade será dada como:

$$I_{\omega_{CARS}} \propto |\chi^{(3)}|^2 \quad , \quad (2.3.13)$$

$$I_{\omega_{CARS}} \propto |\chi_r^{(3)} + \chi_{nr}^{(3)}|^2 \quad . \quad (2.3.14)$$

Supondo que não existam transições eletrônicas reais, podemos admitir que o $\chi_{nr}^{(3)}$ será

uma constante pois independe das configurações de frequência usadas. Já o $\chi_r^{(3)}$ pode ser descrito na forma da amplitude de um oscilador harmônico forçado, descrevendo a ressonância com estados vibracionais da seguinte maneira:

$$\chi_r^{(3)} = \frac{A}{(\Delta - i\gamma)} , \quad (2.3.15)$$

onde $\Delta = \omega_p - \omega_s - \Omega_R$, sendo ω_p a frequência do laser de bombeio, ω_s a frequência do laser Stokes e Ω_R a frequência do centro de um pico Raman relacionado a um modo de vibração do material, γ é relacionado ao tempo de vida de um nível vibracional e A é uma amplitude arbitrária. Desta maneira a intensidade pode ser escrita da seguinte forma:

$$I_{\omega_{CARS}} \propto |\chi_r^{(3)}|^2 + |\chi_{nr}^{(3)}|^2 + 2 \chi_{nr}^{(3)} \text{Re} \{ \chi_r^{(3)} \} . \quad (2.3.16)$$

Isso resulta nos gráficos da figura 2.3.4, em que a parte (a) mostra como cada termo da equação 2.3.16 se comporta, onde $|\chi_r^{(3)}|^2$ é a curva sólida relativa a ressonância com o modo vibracional; o termo $|\chi_{nr}^{(3)}|^2$ pontilhado é a constante relativa à parte não ressonante constante; e $2 \chi_{nr}^{(3)} \text{Re} \{ \chi_r^{(3)} \}$ é o termo cruzado relativo a curva tracejada antissimétrica do gráfico. A parte (b) mostra como a intensidade $I_{\omega_{CARS}}$ se comporta em função da variação do delta. Podemos concluir então que, devido à interferência entre os termos ressonantes e não ressonantes, a forma de linha do CARS não se apresenta como uma Lorentziana, sendo comum ter formas de linha assimétricas. De toda forma, existe um aumento de sinal próximo às condições de ressonância com os modos de vibração.

Isso torna o CARS uma ferramenta importante para o estudo de materiais que não podem ter uma exposição ao laser que se prolongue por horas, como no caso do hiperespectro Raman convencional. Com o CARS é possível amplificar o sinal anti-Stokes desejado, desde que usemos as configurações de lasers corretas.

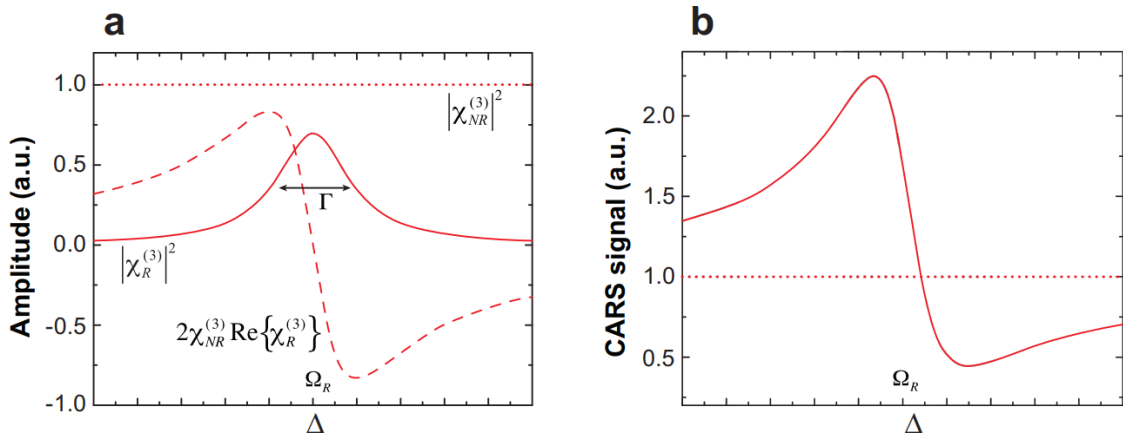


Figura 2.3.4: Gráficos mostrando a relação da amplitude do sinal em relação à variação de Δ , (a) de cada termo da intensidade separadamente; (b) da intensidade total do CARS em relação ao background não ressonante $|\chi_{nr}^{(3)}|^2$. Adaptado da ref. [35].

Como descrito anteriormente, o SRS envolve dois fenômenos o SRG e o SRL. Na figura 2.3.5 temos o diagrama de energia de ambos os processos, lembrando que para este trabalho chamaremos de SRS efeito SRL que é o que usamos nos nossos experimentos.

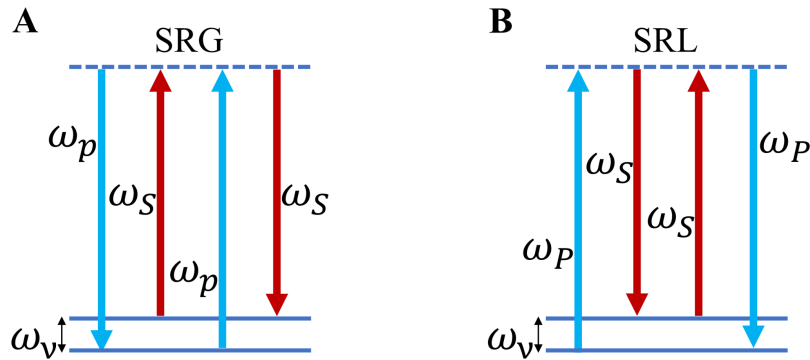


Figura 2.3.5: Diagrama de energia dos processos SRS. (A) Diagrama de energia do SRG, onde temos três campos ($-\omega_p$, ω_s , ω_p) gerando uma quarta onda (ω_s). (B) Diagrama de energia do SRL, onde temos três campos (ω_p , $-\omega_s$, ω_s) gerando uma quarta onda (ω_p). Ambos efeitos no SRS são mediados por um modo vibracional de frequência ω_v . [29]

Para o SRS, tomamos o termo do SRG e SRL na equação 2.3.9, e os campos elétricos associados ao SRG e SRL, podem ser escritos da seguinte maneira:

$$E_{SRG}^{(3)}(t) = E_S^{(3)} e^{-i\omega_s(t)} + c. c., \quad (2.3.17)$$

$$E_{SRL}^{(3)}(t) = E_P^{(3)} e^{-i\omega_p(t)} + c. c., \quad (2.3.18)$$

e as polarizações podem ser escritas como:

$$P_{SRG}^{(3)}(\omega_S) \propto \chi^{*(3)} E_P^2 E_S, \quad (2.3.19)$$

$$P_{SRL}^{(3)}(\omega_P) \propto \chi^{(3)} E_P E_S^2. \quad (2.3.20)$$

Sabendo que as intensidades são proporcionais ao campo elétrico ao quadrado temos que:

$$I(\omega_S) \propto |E_S^{(3)} + E_S|^2 \propto |E_S^{(3)}|^2 + |E_S|^2 + 2\text{Re}\{E_S^{(3)} E_S^*\}, \quad (2.3.21)$$

$$I(\omega_P) \propto |E_P^{(3)} + E_P|^2 \propto |E_P^{(3)}|^2 + |E_P|^2 + 2\text{Re}\{E_P^{(3)} E_P^*\}. \quad (2.3.22)$$

Também, podemos associar os campos com as polarizações através do termo:

$$iP(\omega_S) \propto E_S^{(3)}, \quad (2.3.23)$$

e substituindo a equação 2.3.23 nas equações 2.3.21 e 2.3.22 e fazendo as aproximações necessárias [29], podemos determinar a intensidade como sendo:

$$I(\omega_S) \propto I_S + 2\text{Re}\{iP(\omega_S) E_S^*\}, \quad (2.3.24)$$

$$I(\omega_P) \propto I_P + 2\text{Re}\{iP(\omega_P) E_P^*\}, \quad (2.3.25)$$

e substituindo pelas equações da polarização (2.3.19 e 2.3.20) temos a seguinte relação:

$$I(\omega_S) \propto I_S + 2 I_S I_P \text{Re}\{i\chi^{*(3)}\}, \quad (2.3.26)$$

$$I(\omega_P) \propto I_P + 2 I_S I_P \text{Re}\{i\chi^{(3)}\}, \quad (2.3.27)$$

relembrando que a susceptibilidade pode ser escrita como na equação 2.3.16, temos que:

$$I(\omega_S) \propto I_S + 2 I_S I_P \text{Im}\{\chi_r^{(3)}\}, \quad (2.3.28)$$

$$I(\omega_P) \propto I_P - 2 I_S I_P \text{Im}\{\chi_r^{(3)}\}. \quad (2.3.29)$$

Essa diferença entre a intensidade para o feixe de bombeio e para o feixe Stokes demonstra o porquê da intensidade do SRG ter um ganho e do SRL ter uma perda na intensidade.

2.4. Fotoluminescência por excitação com dois fótons

A fotoluminescência convencional consiste na excitação de um material por um campo eletromagnético, fazendo com que ocorra uma transição eletrônica para um nível eletrônico excitado. Porém, esse elétron promovido pode sofrer perdas de energia não radiativas e decair para um estado excitado de menor energia, emitindo um campo de menor energia que o campo incidente. Na figura 2.4.1, à esquerda, podemos ver o processo de excitação do nível “n” para o nível “m” onde sofre uma perda não radiativa e decai emitindo um campo de menor energia que o campo incidente [29].

Para o caso da fotoluminescência por excitação com dois fótons (TPEF), incidimos dois campos de energia menor que a energia do nível excitado, que somados promovem a transição eletrônica. Sendo assim, é um processo de fotoluminescência que depende quadraticamente do campo incidente, porém, diferentemente do SHG, o elétron excitado pela incidência de dois campos também sofre perdas não radiativas, emitindo no seu decaimento uma radiação com energia menor que a soma dos campos incidentes, de maneira análoga à fotoluminescência convencional. Na figura 2.4.1 à direita podemos ver o processo de excitação do nível “n” para o nível “m” por dois campos, onde sofre uma perda não radiativa e decai emitindo um campo de menor energia que a soma dos campos incidentes [29].

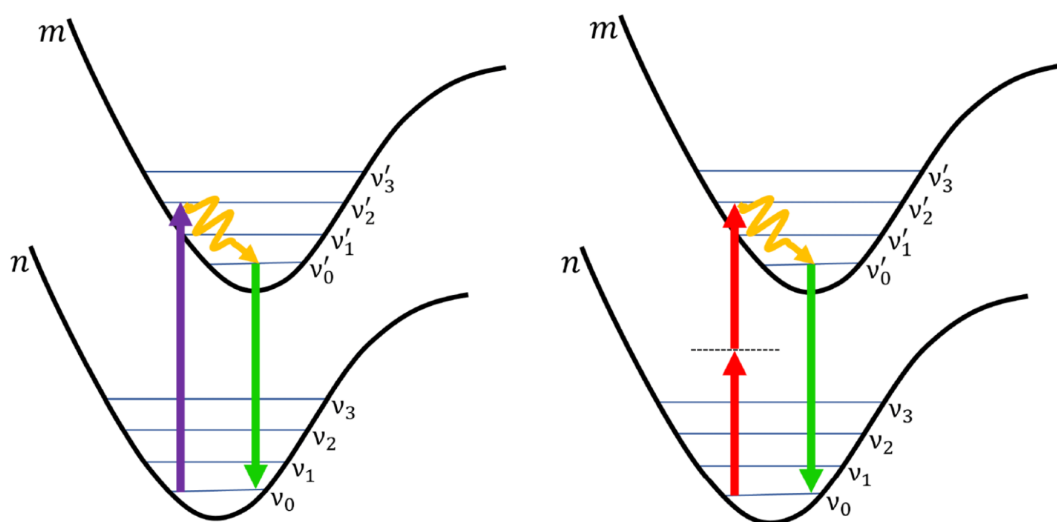


Figura 2.4.1: Ilustração do diagrama de energia da PL (a esquerda) e TPEF (a direita), onde podemos ver o processo de excitação do nível “n” para o nível “m”, sofrendo uma perda não radiativa e decai emitindo um campo de menor energia que o campo incidente. [29].

O fenômeno da fotoluminescência por excitação com dois fótons é associado à susceptibilidade elétrica de terceira ordem, sendo considerada, portanto, um efeito de terceira ordem [29].

3. Aplicações de óptica não linear em TMDs

3.1. Dicalcogenetos de metais de transição

A família dos dicalcogenetos de metais de transição (*Transition Metals Dichalcogenides*, TMDs) é formada por uma grande variedade de combinações de dois átomos da família dos calcogênios e um metal de transição. Esses materiais podem ter características diferentes entre si, como serem metálicos, semicondutores ou isolantes em temperatura ambiente. Devido a esse grande número de variedades, nos concentramos em materiais do tipo MX_2 , onde M é o metal de molibdênio (M) ou tungstênio (W), e X é o átomo de calcogênio, nesse caso enxofre (S) ou selênio (Se) [26].

3.2. Estrutura cristalina e eletrônica

A estrutura cristalina de uma monocamada desse tipo de material é formada por um átomo de metal de transição no centro ligado aos átomos de calcogênios, formando uma ligação covalente abaixo e acima, com uma espessura de aproximadamente 0,65 nm, para o MoS_2 como pode ser visto na figura 3.2.1-(a). Também para o MoS_2 , a rede real vista de cima apresenta uma forma hexagonal, com uma distância interatômica de $a = 3.16 \text{ \AA}$. Esse tipo de rede hexagonal é definida por dois vetores de rede, que estão relacionados com o parâmetro de rede a de forma que: $\mathbf{a}_1 = a/2 (1, \sqrt{3})$ e $\mathbf{a}_2 = a/2 (1, -\sqrt{3})$, como podemos ver na figura 3.2.1-(b) [36].

A forma predominante da organização dos TMDs, tanto os crescidos pela técnica de deposição química em fase vapor (*Chemical Vapour Deposition*, CVD), quanto os encontrados na natureza, é a trigonal prismática [37], como podemos ver na figura 3.2.1-(c). Quando organizados na forma de muitas camadas (*bulk*) esses materiais apresentam simetria de inversão, porém, quando reduzimos o número de camadas a uma monocamada a simetria de inversão é quebrada, e isso possibilita a geração de segundo harmônico como vimos na seção 2.1.

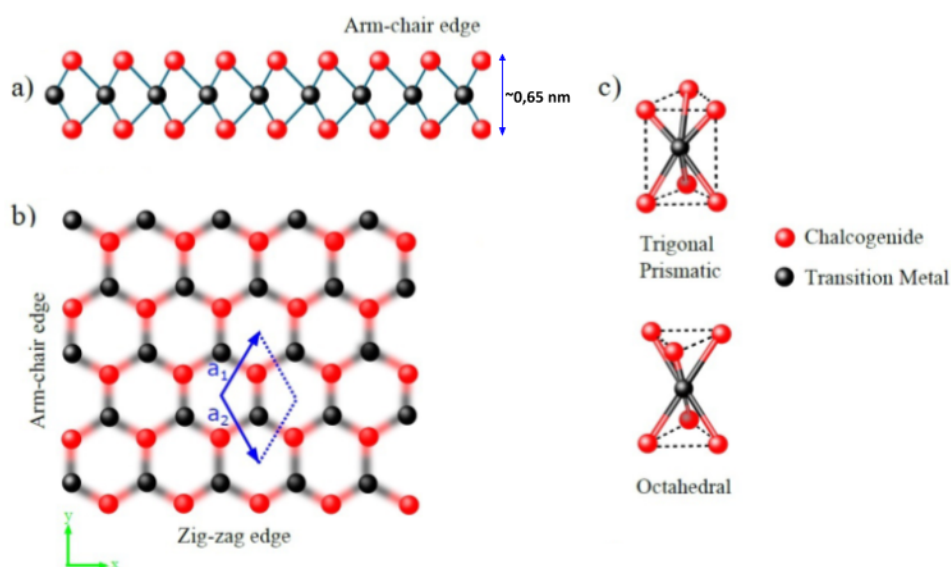


Figura 3.2.1: Estrutura geral dos TMDs, a) vista lateral e b) vista superior de uma monocamada de TMD. c) Tipos de organização atômica dos cristais. Adaptado da ref. [36].

Os vetores primitivos da rede recíproca para uma rede hexagonal bidimensional, como é o caso das monocamadas de TMD, são $\mathbf{b}_1 = 2\pi/a (1, 1/\sqrt{3})$ e $\mathbf{b}_2 = 2\pi/a (1, -1/\sqrt{3})$ [38]. A primeira zona de Brillouin dos TMDs monocamada pode ser vista na figura 3.2.2-(a), juntamente com seus pontos de alta simetria.

A estrutura de bandas em um cristal surge a partir da superposição dos níveis de energia atômicos, dando origem às bandas de energia. Os TMDs estudados têm um comportamento de semicondutores, com energias de *gap* que variam em torno de ~ 2 eV, e eles também apresentam uma mudança na estrutura de bandas que depende do seu número de camadas. Dizemos que um material possui *gap* direto, quando o valor mínimo de energia da banda de condução e máximo da banda de valência estão em um mesmo ponto K da primeira zona de Brillouin, e isso ocorre nas monocamadas dos TMDs estudados [39].

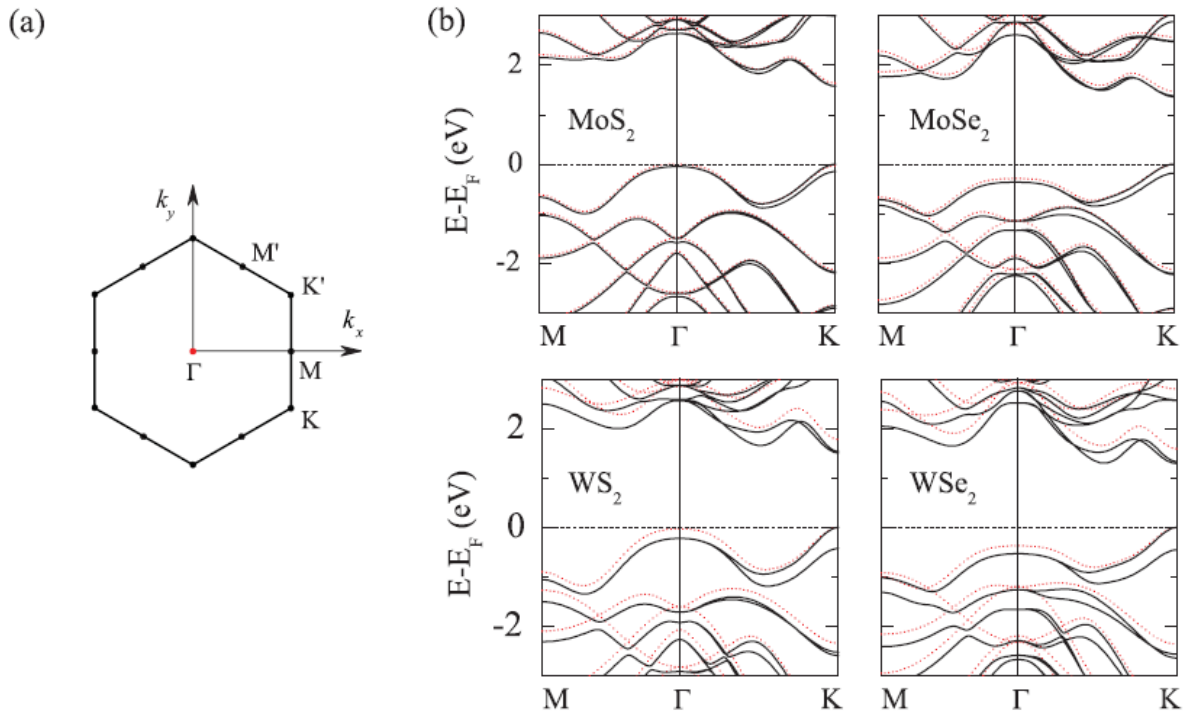


Figura 3.2.2: (a) Primeira zona de Brillouin para a monocamada dos TMDs destacando os pontos de alta simetria: $\Gamma = [0,0]$, $M = [1/2, 0]$ e $K = [1/2, -\sqrt{3}/3]$. (b) Estrutura de bandas eletrônicas para algumas monocamadas de TMDs, onde Γ , M e K são os pontos de simetria da figura (a) e E_F é a energia de Fermi. As linhas pretas incluem a separação devido ao forte acoplamento spin-órbita e as linhas vermelhas não. [40].

Quando o vetor de onda (k) entre a energia mínima da banda de condução é diferente da energia máxima da banda de valência temos então um *gap* indireto. Isso ocorre quando temos um número maior que uma camada nos TMDs, como podemos ver na figura 3.2.3, que mostra o comportamento das bandas de energia para o WS_2 e o MoS_2 variando com o número de camadas [41].

Além disso, esses materiais apresentam um forte acoplamento spin-órbita, principalmente na banda de valência. Isso implica numa separação em energia, devido ao acoplamento spin-órbita, que separa a banda de valência em duas, com uma diferença de energia da ordem de 200 a 400 meV a depender do TMD [40]. Isso pode ser visualizado na banda de valência no ponto K na na linha preta da figura 3.2.2-(b).

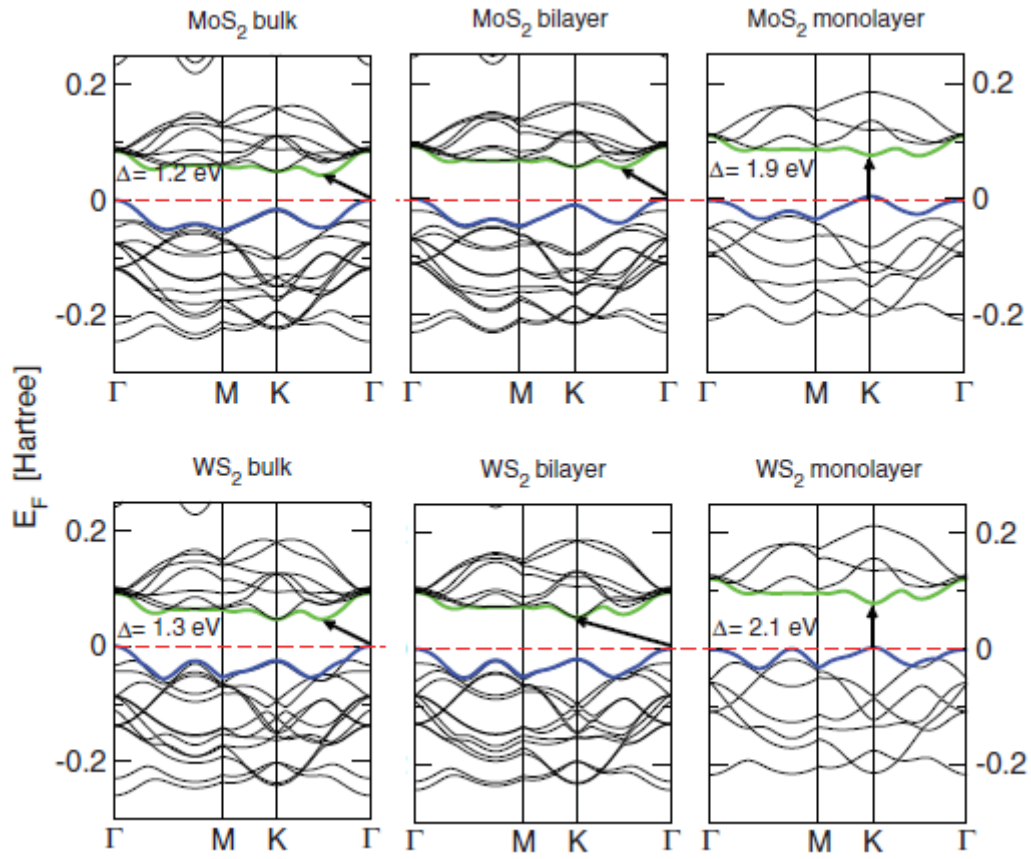


Figura 3.2.3: Cálculo da relação de dispersão para o MoS₂ (acima) e para o WS₂ (abaixo), demonstrando a mudança do regime de *gap* indireto, para *gap* direto, quando reduzimos o número de camadas a uma monocamada. As linhas vermelhas indicam a energia de Fermi, as linhas verdes a banda de condução de menor energia e as linhas azuis a banda de valência de maior energia, as setas indicam a transição do *gap*. [39].

3.3. Éxcitons em TMDs

Quando um elétron é promovido da banda de valência para a banda de condução de um sólido, a ausência de carga na banda de valência cria um análogo a uma partícula de carga positiva, chamada de buraco, nesta banda. A atração mediada por uma força de atração coulombiana entre o elétron, de carga negativa, na banda de condução; e o buraco, de carga positiva, na banda de valência, que geram um par elétron-buraco chamado de éxciton, como mostrado esquematicamente na figura 3.3.1.

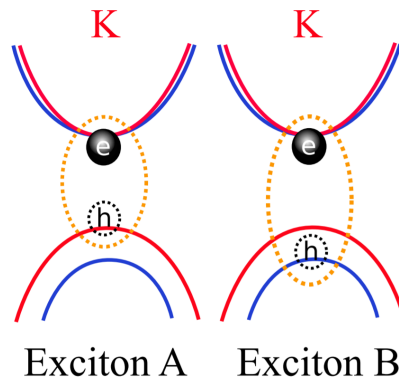


Figura 3.3.1: Representação dos estados ligados dos éxcitons A e B no ponto K dos TMDs. Adaptado da ref. [36].

O valor de energia do éxciton (E_n) é menor que a energia do *gap* (E_g), criando na estrutura de bandas do material um nível de energia interbandas localizado abaixo do *gap*. Assim, podemos escrever que a energia do éxciton é dada por $E_n = E_g - E_b$, onde E_b é a energia de ligação do éxciton. Podemos escrever a energia de ligação dos éxcitons de monocamadas de TMDs, de maneira simplificada, como um análogo ao átomo de hidrogênio em duas dimensões [42]. Dessa maneira, a energia de ligação do éxciton pode ser escrita como [43]:

$$E_b^{(n)} = \frac{\mu e^4}{2\hbar^2 \epsilon^2 (n - \frac{1}{2})^2}, \quad (3.3.1)$$

onde μ é a massa reduzida do éxciton, e é a carga do elétron, ϵ é a constante dielétrica do meio e o n faz referência ao nível de energia de interesse ($n=1,2,3,\dots$). Para as monocamadas de TMDs temos uma energia de ligação alta para os éxcitons, na ordem de centenas de meV. Isso se deve aos efeitos de confinamento quântico, devido a baixa dimensionalidade do material; e também por esses TMDs apresentarem uma constante dielétrica de valor baixo, o que amplifica a atração coulombiana entre o elétron e o buraco [44,45].

Sempre que a energia do fóton for igual a E_n , os éxcitons podem ser formados. Portanto, esperamos observar fortes linhas de absorção óptica em energias iguais a E_n . Eles aparecerão nos espectros ópticos com energias logo abaixo da energia do *gap*. O espectro de absorção esperado, quando efeitos excitônicos são incluídos, é ilustrado esquematicamente na figura 3.3.2 para os níveis $n=1$ e $n=2$. A interação coulombiana do elétron-buraco faz com que apareçam picos de absorção excitônica logo abaixo do *gap* [27].

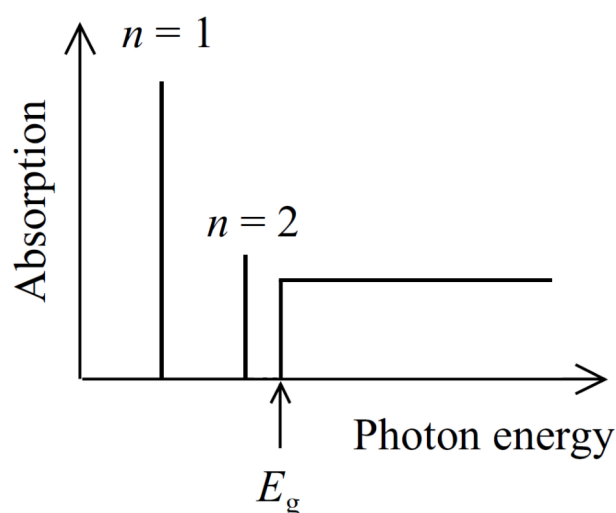


Figura 3.3.2: Espectro de absorção levando em consideração a presença dos éxcitons. Adaptado da ref. [27].

Experimentalmente, é possível observar os éxcitons de TMDs, em temperatura ambiente, através de medidas de absorção linear, que apresentam o comportamento visto na figura 3.3.3. Podemos observar a presença dos éxcitons A e B, criados pela separação na banda de valência, em virtude do forte acoplamento spin-órbita, nas monocamadas desses materiais. Além disso, um pico de absorção largo na região de 2.5-3 eV é atribuído a ressonância com estados próximos ao ponto Γ e é denominado na literatura como éxciton C.

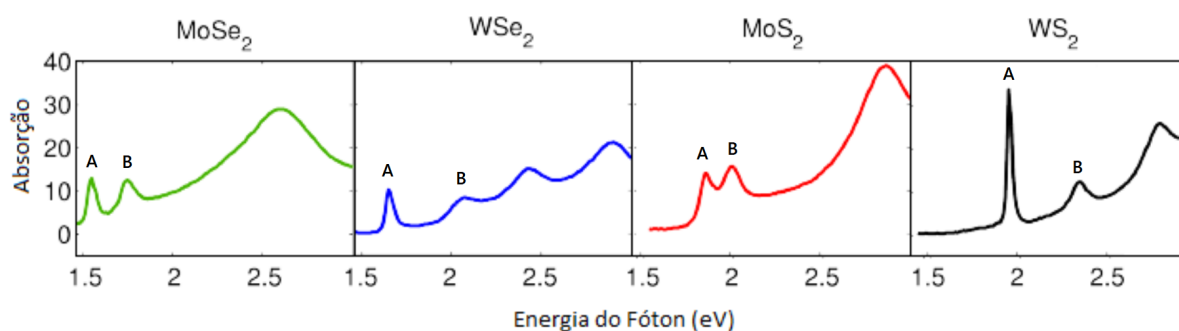


Figura 3.3.3: Espectro da absorção linear de alguns TMDs. A diferença de energia entre o éxciton A e B é devido a quebra da degenerescência causada pelo forte acoplamento spin-órbita. Adaptado da ref. [46].

Algumas outras quasipartículas também podem ser formadas pela interação entre elétrons e buracos. Podemos ter os tríons, quando temos dois elétrons interagindo com um buraco (tríon negativo) ou dois buracos interagindo com um elétron (tríon positivo). Há,

também, o caso quando dois éxcitons interagem entre si, que são os chamados biéxcitons, como podemos ver na figura 3.3.4 [36].

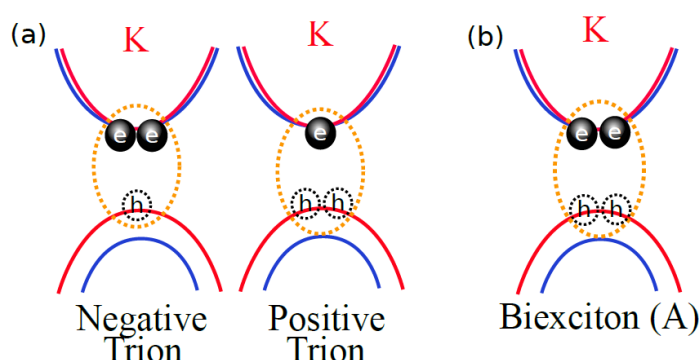


Figura 3.3.4: Representação dos estados ligados (a) de trion, positivo e negativo, e (b) de biéxciton, no ponto K dos TMDs. Adaptado da ref. [36].

3.4. SHG e FWM aplicado aos TMDs

A geração de segundo harmônico, tem papel fundamental no estudo das estruturas cristalinas e no número de camadas dos TMDs [47–49]. Já a mistura de quatro ondas, tem um papel importante para o desenvolvimento de equipamentos ópticos que se fazem valer de efeitos não lineares, podendo gerar sinal em um comprimento de onda menor a partir da incidência de dois feixes de comprimento de onda maiores [50–52]. A presença de éxcitons altera as propriedades ópticas do material, isso inclui o comportamento de efeitos ópticos não lineares. Alguns efeitos quando ocorrem próximo a energia dos éxcitons podem ser amplificados, como é o caso da Geração de Segundo Harmônico (SHG) e da Mistura de Quatro Ondas (FWM). Nosso estudo tem enfoque no regime de energia em que as respostas dos efeitos de segunda e terceira ordem estão em ressonância com os estados excitônicos em monocamadas de MoS₂, MoSe₂ e WS₂.

Efeitos não lineares em semicondutores e outros materiais, na região da energia dos éxcitons, já foram estudados anteriormente [53–58]. Porém, com a descoberta dos materiais bidimensionais, sobretudo dos TMDs, estes estudos têm se intensificado na última década [47–49,59–61]. Como estes materiais geralmente apresentam uma alta susceptibilidade elétrica de segunda e terceira ordem [62–64], eles podem apresentar diferentes aplicações em áreas de nanotecnologia e dispositivos, como a optoeletrônica e fotônica [5,65,66].

Alguns desses estudos mais recentes apresentam resultados na tentativa de verificar o aumento da resposta óptica não linear devido a presença de éxcitons nesses materiais. O trabalho de Trolle *et al.* [67] mostra o aumento da resposta da geração de segundo harmônico próximo às energias dos éxcitons em multicamadas de MoS₂ para o éxcitons A, B e C, como podemos ver na figura 3.4.1-(a), e compara com os resultados teóricos de tricamada e com os resultados obtidos por Malard *et al.* na figura 3.4.1-(b).

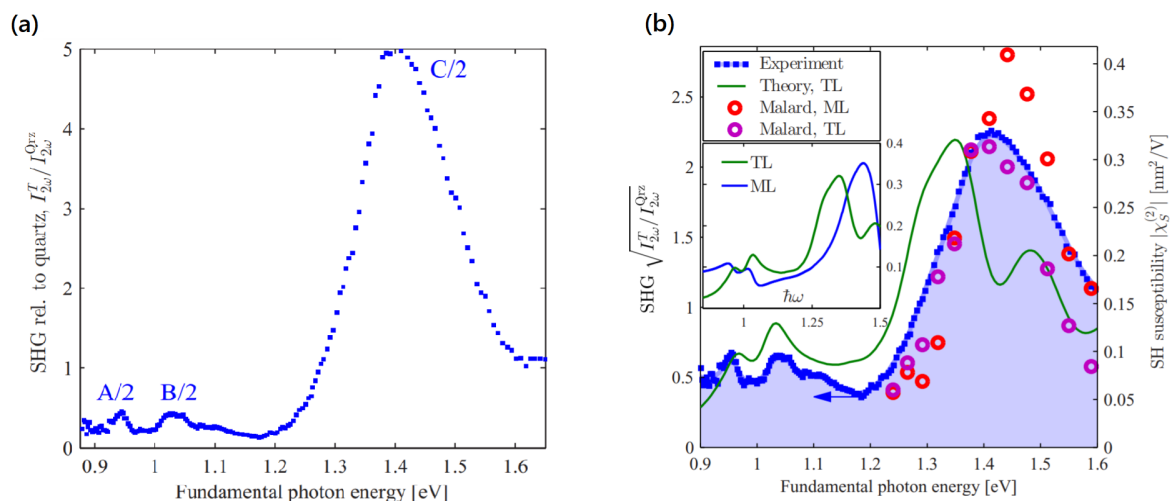


Figura 3.4.1: (a) Sinal do SHG transmitido dividido pelo sinal de SHG do quartzo cristalino em um floco de MoS₂, em relação a energia do fóton fundamental que gera o SHG. (b) Módulo da função resposta do SHG comparado com a raiz quadrada das medidas do espectro de transmissão do SHG.

Em azul o resultado experimental para poucas camadas, em verde o espectro teórico para uma tricamada (TL), em vermelho medidas de monocamada (ML) e roxo tricamada (TL) de MoS₂, feitas por Malard *et al.*[47]. Adaptado da ref. [67].

Outro trabalho que aborda o comportamento dos éxcitons em MoS₂ é de Ko *et al.* [60], que demonstra o aumento da resposta do FWM, quando a energia está próxima do éxciton A, em poucas camadas de MoS₂. Neste experimento foi usado um sistema com um laser de femtosegundos em 800 nm e uma fibra fotônica para gerar uma banda larga de 800 a 1100 nm, para obter os resultados da figura 3.4.2.

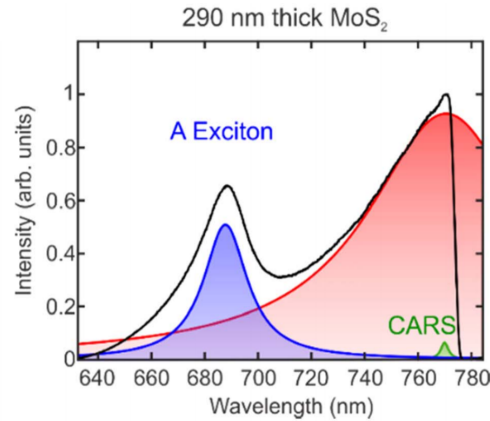


Figura 3.4.2: Em preto temos a curva experimental obtida pela incidência do laser de 800 nm e da fibra fotônica de 800 a 1100 nm em poucas camadas de MoS₂. Em vermelho, temos o FWM não ressonante gerado pela amostra; em azul, temos o aumento gerado pelo éxciton para o FWM e em verde, temos o CARS para o MoS₂. Adaptado da ref. [60].

Entretanto, esses artigos tratam de multicamadas de MoS₂, mas com base no artigo teórico de Pedersen *et al.* [68], sabemos que há também um aumento de sinal em monocamadas. O trabalho de Woodward *et al.* [62], demonstra que mesmo fora da ressonância com os éxcitons, nas monocamadas de TMD, há uma alta susceptibilidade elétrica de segunda e terceira ordem, com valores de $|\chi_{sheet}^{(2)}| = (2.0 \pm 0.4) \times 10^{-20} \text{ m}^2\text{V}^{-1}$ e $|\chi_{sheet}^{(3)}| = (1.7 \pm 0.6) \times 10^{-28} \text{ m}^3\text{V}^{-2}$ respectivamente, o que corresponde a $|\chi^{(2)}| = 3.1 \times 10^{-11} \text{ mV}^{-1}$ e $|\chi^{(3)}| = 2.6 \times 10^{-20} \text{ m}^2\text{V}^{-2}$, para monocamadas de aproximadamente 0.65 nm de espessura. Como base de comparação, um cristal de quartzo possui $|\chi^{(2)}| = 0.8 \times 10^{-12} \text{ mV}^{-1}$ e $|\chi^{(3)}| = 2 \times 10^{-22} \text{ m}^2\text{V}^{-2}$.

Portanto, nosso objetivo em relação aos TMDs é utilizar das técnicas não lineares SHG e FWM para estudar o comportamento do sinal emitido passando pela ressonância com os éxcitons e, além disso, medir a susceptibilidade elétrica de segunda e terceira ordem nesse mesmo regime, comparando estes resultados com a literatura.

3.5. Montagem experimental para realização das medidas

Para realizar as medidas e determinar as energias dos éxcitons e trions nos TMDs, utilizamos três técnicas diferentes, são elas: a fotoluminescência (*Photoluminescence*, PL), o SHG e o FWM, como mostrado na figura 3.5.1. Para as medidas de PL utilizamos um laser diodo contínuo (CW) de 561 nm, o feixe então é refletido por espelhos de prata (M1 e M2), com o espelho móvel (MF) abaixado, o que conduz o feixe para um divisor de feixes (do

inglês *beam-splitter*, BS) e então é focado na amostra (S) por um objetiva (O) Nikon apocromática de 60x, com NA de 0.95. A PL gerada é coletada em retroespalhamento pela mesma objetiva e, após passar pelo divisor de feixes novamente, é direcionado pelos espelho de prata (M4 e M5) ao espectrômetro, que conta com uma CCD acoplada. Adicionamos um filtro passa longo (do inglês *long-pass*, LP) para remover o sinal do laser, e uma lente para focar o sinal retroespalhado no espectrômetro, fazendo com que apenas o sinal acima do comprimento de onda do laser seja medido, como pode ser visto pela montagem da figura 3.5.1.

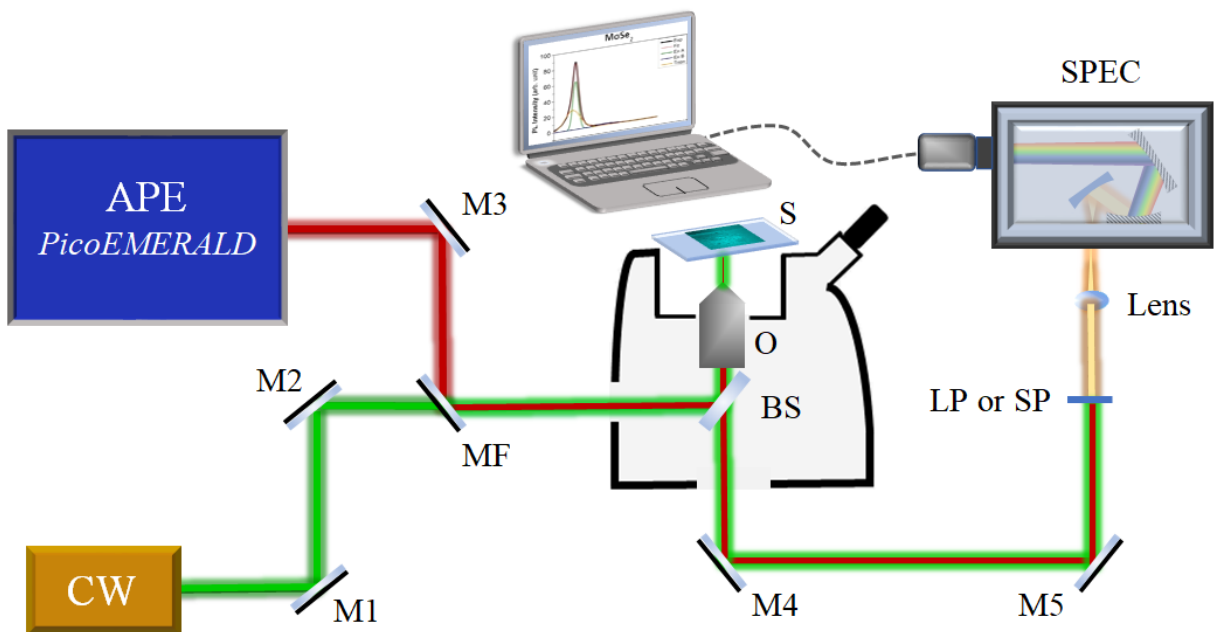


Figura 3.5.1: Montagem simplificada para as medidas de PL, SHG e FWM. [69].

Para realizar as outras medidas utilizamos um laser APE PicoEMERALD pulsado com pulsos de picosegundos (7 ps), que possui uma linha de laser com comprimento de onda fixo em 1064 nm (ω_{1064}) e uma cavidade OPO (*Optical Parametric Oscillator*) variável, de onde saem os feixes que chamamos de *Signal* (ω_{Signal}), que varia de 730 nm a 960 nm e *Idler* (ω_{Idler}), que varia de ~1193 a ~1961 nm. No sistema de controle do laser OPO podemos colocar diretamente o valor do comprimento de onda do *Signal* que queremos utilizar, e o valor para o *Idler* pode ser calculado pela eq. 3.5.1.

$$\lambda_{Idler} = \frac{1}{\frac{1}{532} - \frac{1}{\lambda_{Signal}}}, \quad (3.5.1)$$

onde 532 nm é o comprimento de onda de bombeio da cavidade OPO, λ_{idler} é o comprimento de onda do feixe *Idler* e λ_{signal} é o comprimento de onda do *Signal*, que podemos variar no sistema de controle do laser. Por exemplo, colocando o *Signal* do laser OPO em 900 nm, pela equação 3.5.1, obtemos o laser *Idler* em ~1301 nm. Sabendo que a frequência $\omega = 2\pi c/\lambda$, a frequência do laser *Idler* (ω_{idler}) pode ser encontrado.

No caso dos experimentos de SHG, utilizamos o feixe de laser que sai da cavidade OPO contendo o *Signal* e *Idler*, que ao passar por um filtro *long-pass* de 1064nm, remove o feixe *Signal*. O feixe *Idler* então é refletido por espelhos de prata (M3 e MF) que o leva a um separador de feixes (BS) 50:50 e, de forma análoga a medida da PL, é focado na amostra por um objetiva Nikon apocromática de 60x, com NA de 0.95. O SHG gerado é coletado em retroespalhamento pela mesma objetiva e, após passar pelo BS, é direcionado ao espectrômetro. Adicionamos um um filtro passa curto (do inglês *short-pass*, SP) de 1010 nm para cortar o sinal do *Idler* antes do espectrômetro, que conduz o sinal até a CCD, deixando apenas que o sinal do SHG seja medido, como pode ser visto pela montagem da figura 3.5.1.

A potência do laser *Idler*, utilizada para realizar as medidas, foi aferida após a objetiva, fazendo com que o valor de potência que chega ao material seja de ~5 mW. O valor do comprimento de onda do SHG gerado no material é dado pela equação 3.5.2 a seguir:

$$\lambda_{SHG} = \frac{\lambda_{Idler}}{2} . \quad (3.5.2)$$

O comprimento de onda do *Idler* foi variado com passos de 5 nm, cobrindo a faixa de interesse para cada TMD, ou seja, usando valores diferentes para o *Idler* de forma que passe pelas energias dos seus éxcitons.

As medidas de FWM foram feitas em um sistema análogo ao SHG, porém, agora os feixes que incidem na nossa amostra são o 1064 nm e o *Signal* do OPO e, para essas medidas, utilizamos a montagem da figura 3.5.1. De forma muito semelhante ao SHG, os feixes então passam por um BS 50:50 e são focados na amostra por um objetiva Nikon apocromática de 60x, com NA de 0.95. O FWM gerado é coletado em retroespalhamento pela mesma objetiva e, após passar pelo BS, é direcionado a CCD. Adicionamos um um filtro *short-pass*, ora de 842 nm, ora 750 nm, para cortar o sinal do 1064 nm e do *Signal* antes do espectrômetro,

deixando apenas que o sinal do FWM seja medido, como é mostrado na ilustração da figura 3.5.1.

Com os dois feixes chegando na amostra calibramos a potência, de forma que chegue na amostra um total de ~6 mW, sendo aproximadamente 3 mW de cada feixe. O valor do comprimento de onda do FWM gerado no material é dado pela equação 3.5.3 a seguir:

$$\lambda_{FWM} = \frac{1}{\frac{2}{\lambda_{OP0}} - \frac{1}{\lambda_{1064}}}. \quad (3.5.3)$$

Para obter o espectro variamos o comprimento de onda do laser *Signal* com um passo de 5 nm. Nessa medida, assim como no SHG, percorremos uma faixa em que a resposta λ_{FWM} passe pelas energias do éxcitons dos TMDs.

Para fazer a varredura do SHG e o FWM, com o intuito de verificar a homogeneidade das amostras, utilizamos um conjunto de espelhos galvanométricos (Lavision Biotec) em um microscópio Nikon invertido modificado, usando uma objetiva de 40X com 0,95 NA. O SHG foi feito com o laser de bombeio centrado em 810nm, e para o FWM, os lasers foram ajustados para 816 nm e 1064 nm. A mesma objetiva coleta o sinal retroespalhado, direcionado-o para um espelho dicróico (SP 700 nm) e filtro passa-faixa (do inglês *band-pass*, BP) para coletar apenas os sinais SHG ou FWM, que são detectados por uma fotomultiplicadora.

3.6. Preparação de amostras por CVD

Todas as nossas amostras foram crescidas por deposição química de fase vapor (*Chemical Vapour Deposition*, CVD). Essa técnica, de forma genérica, consiste em vaporizar compostos com os elementos de interesse, numa atmosfera conveniente, de forma que os elementos se combinem e depositem no substrato, formando monocamadas do material desejado. Com essa técnica é possível obter monocamadas com áreas relativamente grandes, se comparadas com as monocamadas obtidas por esfoliação micromecânica [70–72]. As amostras foram crescidas pelo grupo do Prof. Maurício Terrones da Penn State University e Swastik Kar da Northwestern University, e abaixo descreveremos seu processo de síntese.

No caso específico do MoSe₂, as monocamadas são sintetizadas por CVD em pressão atmosférica a 750 °C, usando pastilhas de selênio (Se, Sigma-Aldrich, 99.9%) e óxido de

molibdênio em pó (MoO_3 , Sigma-Aldrich, 99%) colocados em um barco de alumina, onde também é colocado um *wafer* de silício (Si), com 275 nm de óxido de silício (SiO_2) na superfície. O barco, com o substrato e os reagentes, é colocado em um tubo de quartzo fundido, a rampa de aquecimento sobe a uma taxa de $50^\circ\text{C}/\text{min}$, até atingir 750°C , onde deve permanecer por 20 minutos. Durante o processo utiliza-se uma atmosfera que mistura argônio (Ar, 85%) e hidrogênio (H, 15%) com um fluxo de 50 sccm [72], uma ilustração do processo pode ser vista na figura 3.6.1.

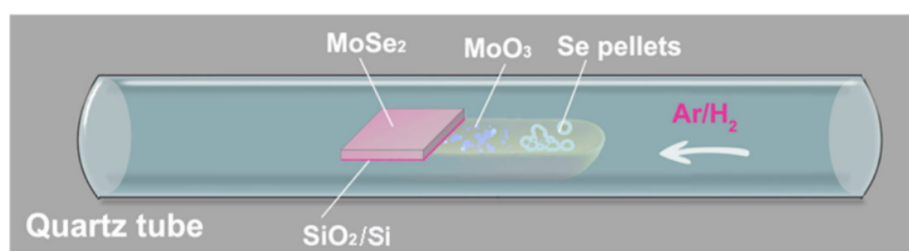


Figura 3.6.1: Representação da síntese de monocamadas de MoSe_2 via CVD. Pastilhas de Se e pó de MoO_3 estão posicionados no mesmo barco de alumina junto com o substrato de SiO_2/Si , que são colocados no centro do tubo de quartzo que vai ao forno. [72].

Para o caso do MoS_2 e do WS_2 , também foi usada a técnica de crescimento por CVD, com pressão atmosférica e a 700°C e ambas amostras foram crescidas sobre um substrato de 300 nm de SiO_2/Si . Para síntese do MoS_2 , foi colocado em um barco de alumina o óxido de molibdênio em pó (MoO_3 , Sigma-Aldrich, 99%), enquanto que para o WS_2 foi usado o óxido de tungstênio (WO_3 , Alfa Aesar, 99.998%), este barco de alumina é colocado em um tubo de quartzo dentro do forno, no mesmo tubo colocamos um barco de alumina com enxofre (S, Alfa Aesar, 99.5%), porém, fica fora do forno, e será aquecido por uma cinta térmica, que atinge 200°C , em ambos os casos é usada uma atmosfera de Ar ultra puro finalizando o processo [73], na figura 3.6.2 podemos ver a montagem e as curvas de aquecimento deste crescimento.

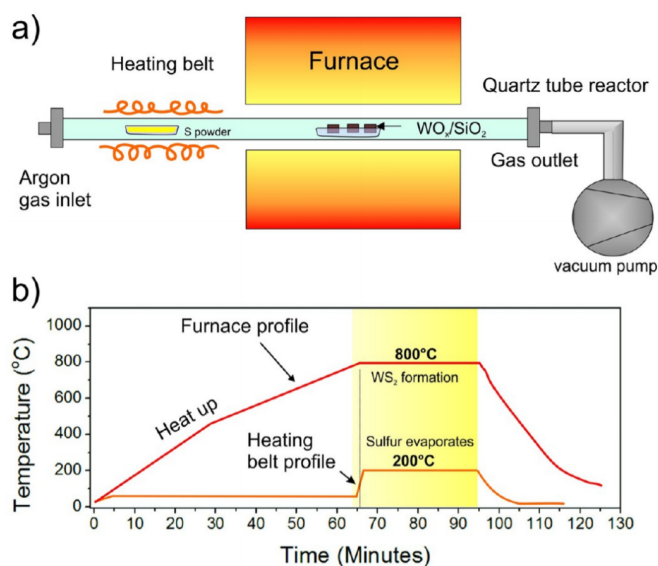


Figura 3.6.2: (a) Representação da síntese de monocamadas de WS_2 . O barco de alumina com o WO_3 vai no mesmo barco cerâmico que o substrato do SiO_2/Si no centro do tubo que vai ao forno, porém o enxofre fica separado e é aquecido por uma cinta térmica externa, na extremidade do mesmo tubo de quartzo. (b) Rampa de temperatura usada nos experimentos de sulfurização. Monocamadas de MoS_2 são feitas de forma análoga, substituindo WO_3 por MoO_3 . [73].

Após a síntese o $MoSe_2$, o MoS_2 e o WS_2 que estavam sobre um substrato de SiO_2/Si , são transferidos para um substrato de quartzo fundido, utilizando poli(metacrilato de metila) (PMMA) [74].

3.7. Caracterização dos materiais por PL, Raman e homogeneidade

Para caracterizar as monocamadas utilizamos a mesma amostra, com a mesma configuração que usamos para medir SHG e FWM, e medimos os espectros Raman para MoS_2 , como mostrado na figura 3.7.1-(a), e podemos ver a diferença de valor entre os picos, em torno de $18,4\text{ cm}^{-1}$, que demonstra que estamos medindo uma monocamada, como reportado na referência [75]. Além disso, para o $MoSe_2$, figura 3.7.1-(b), e o WS_2 , figura 3.7.1-(c), medimos a posição da fotoluminescência (PL) e comparamos com os resultados presentes na referência [76], para o $MoSe_2$ e na referência [73], para o WS_2 . Os espectros Raman e PL foram coletados pela mesma configuração experimental descrita na seção anterior.

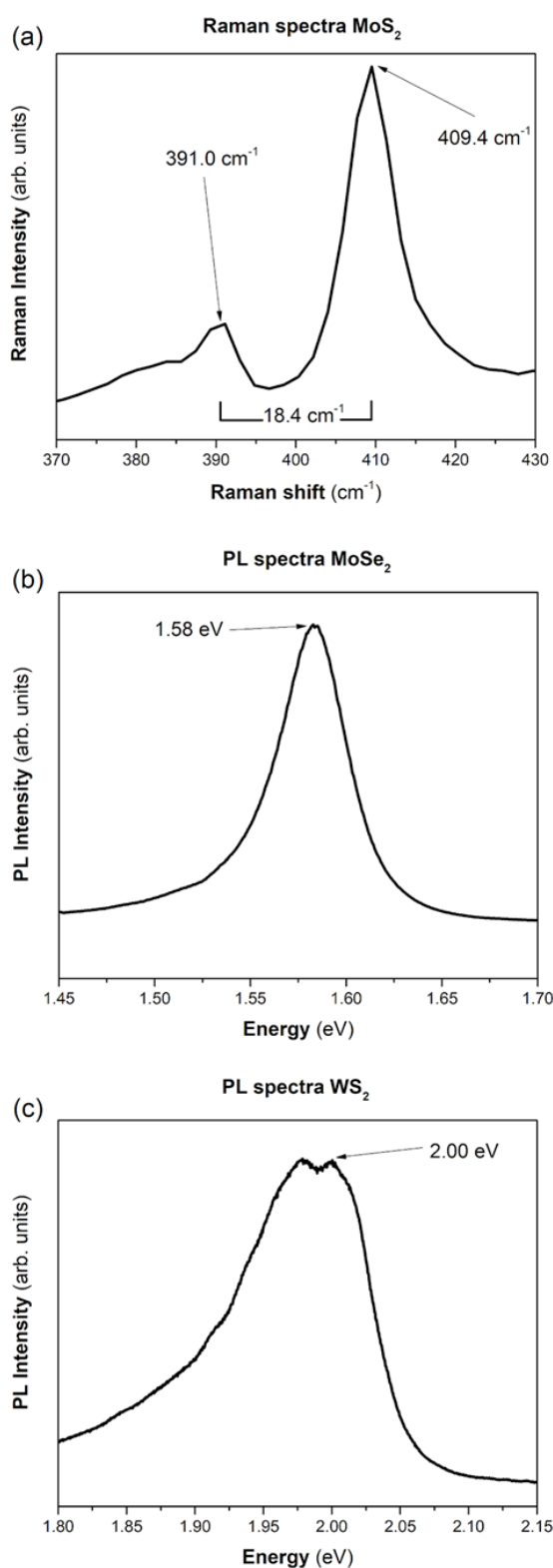


Figura 3.7.1: Caracterização dos TMDs por: (a) Espectro Raman de MoS₂, onde a diferença de frequência entre os principais picos Raman confirma se tratar de uma monocamada, de acordo com a ref. [75]. Espectros PL para (b) MoSe₂ e (c) WS₂, onde sua intensidade aumentada, posição de pico e largura confirmam sua natureza de monocamada [73,76]. Adaptado do material suplementar da ref. [69].

Para verificar a homogeneidade da amostra, fizemos imagens de intensidade de geração de segundo harmônico (SHG) e mistura de quatro ondas (FWM) para as três amostras diferentes (MoS_2 , MoSe_2 e WS_2), conforme mostrado na figura 3.7.2. Para realizar essas medidas usamos o sistema mostrado adiante no capítulo 4.3.2, para medidas de varredura nos materiais biológicos. Nessas imagens é possível observar que a intensidade ao longo da amostra varia entre ~ 1 a 5%, como pode ser visto comparando o valor médio (*Mean*) com desvio padrão (*StdDev*) retirados da análise dos histogramas das imagens.

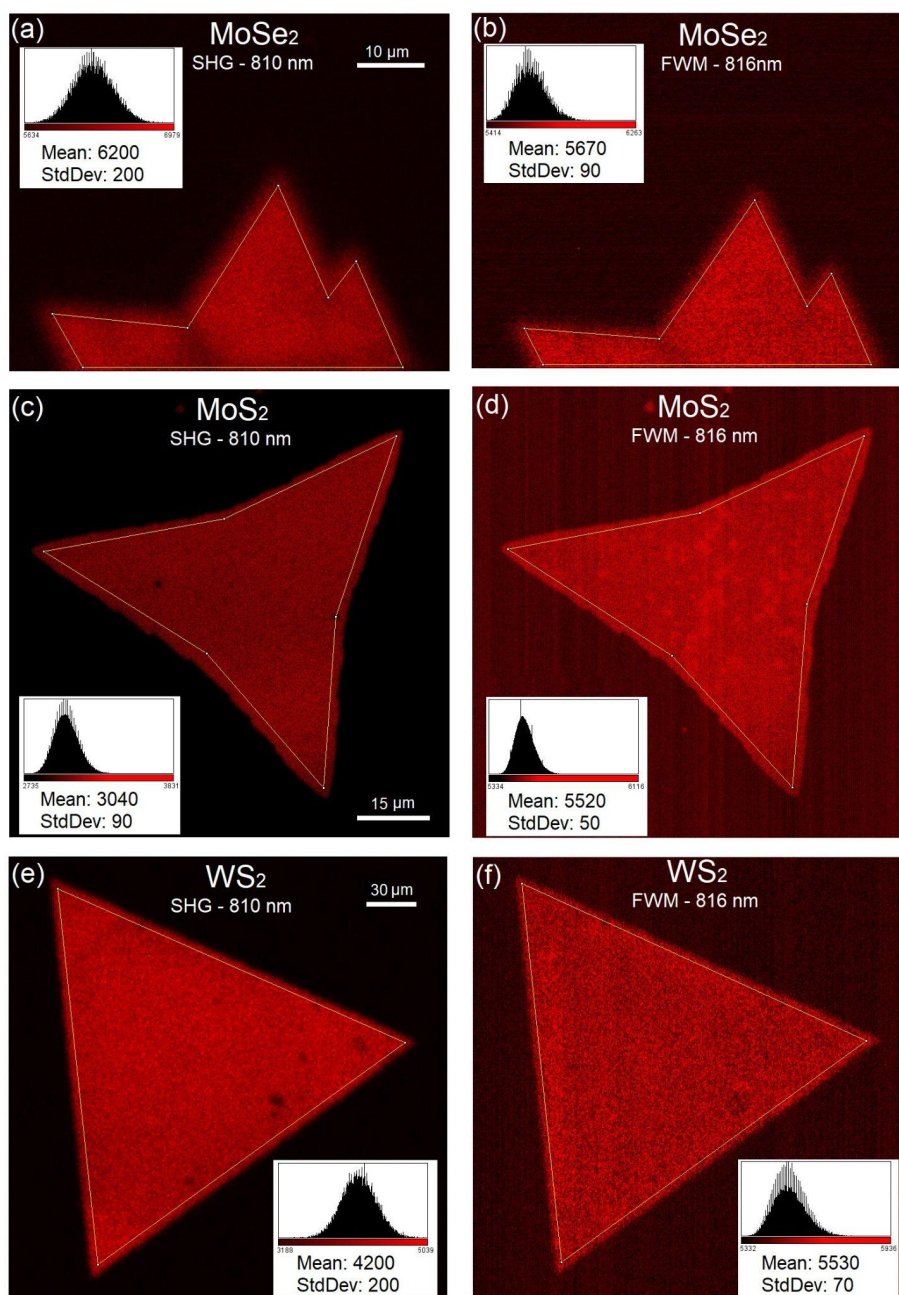


Figura 3.7.2: Mapas de intensidade para: (a) SHG e (b) FWM em MoSe_2 ; (c) SHG e (d) FWM em MoS_2 ; (e) SHG e (f) FWM em WS_2 , com valor médio (*mean*) e desvio padrão (*StdDev*). Adaptado do material suplementar da ref. [69].

3.8. Energias dos éxcitons nos TMDs

Como descrito anteriormente, quando incidimos lasers com energias diferentes em um determinado TMD, podemos observar efeitos lineares como a PL ou não lineares como o SHG e o FWM. No caso do SHG, quando incidimos um laser de frequência ω_{Idler} obtém-se um sinal de $2\omega_{Idler}$ (figura 3.8.1-(a)), e quando ocorre uma ressonância em que $2\hbar\omega_{Idler}$ é igual a energia do éxciton, temos um aumento no sinal (figura 3.8.1-(b)). De forma análoga as medidas usando o FWM (figura 3.8.1-(c)), podemos perceber que a medida que variamos o laser *Signal* (ω_{Signal}), mantendo o laser 1064 nm (ω_{1064}) fixo, o valor da emissão do FWM (ω_{FWM}) gerado é dado pela equação 3.6.3, em termos da frequência $\omega_{FWM}=2\omega_{Signal}-\omega_{1064}$. Portanto, nesse caso, temos a ressonância com o éxciton quando $2\hbar\omega_{Signal} - \hbar\omega_{1064} = E_n$ (figura 3.8.1-(d)). Com a finalidade de investigarmos o impacto da presença dos éxcitons nas medidas de SHG e FWM, vamos apresentar um estudo mais detalhado em amostras de MoS₂, MoSe₂ e WS₂ para os primeiros níveis excitônicos A e B, ainda pouco estudados na literatura.

Na figura 3.8.2-(a,b,c) observamos os espectros de PL (preto) e as curvas de ajuste do trion relativo ao éxciton A (amarelo), do éxciton A (verde) e éxciton B (azul) que juntos compõem a curva de ajuste total (vermelho) para os TMDs. As curvas de ajuste da PL são feitas utilizando curvas gaussianas [77,78]. Para o SHG fizemos as medidas sintonizando o laser do *Idler* de forma que $2\omega_{Idler}$ é próximo as energias dos éxcitons A e B para o MoS₂ e MoSe₂, e da energia do éxciton A para o caso do WS₂, como pode se observar na figura 3.8.2-(d,e,f). De forma análoga, medimos o FWM utilizando os feixes ω_{Signal} e ω_{1064} de forma que a diferença entre eles ($2\omega_{Signal} - \omega_{1064} = \omega_{FWM}$) esteja próximo das energias dos éxcitons, conforme mostrado na figura 3.8.2-(g,h,i). Os espectros de SHG e FWM foram então ajustados por Lorentzianas [79,80] para o trion, éxciton A e B, utilizando o mesmo padrão de cores do gráfico da PL. Tais resultados demonstram que a espectroscopia de SHG e o FWM podem ser úteis também para o estudo dessas pseudo-partículas.

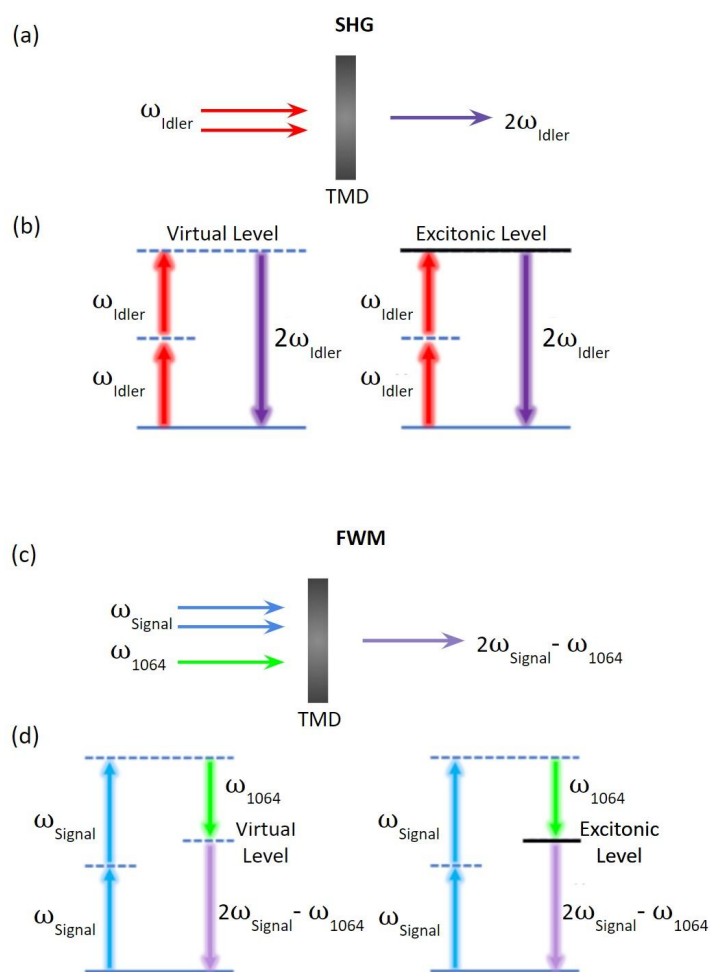


Figura 3.8.1: (a) Ilustração do SHG devido a incidência do laser Idler no TMD. (b) Diagrama da transição da energia do SHG fora e em ressonância com o éxciton. (c) Ilustração do FWM devido a incidência dos lasers Signal e 1064 no TMD. (d) Diagrama da transição da energia do FWM fora e em ressonância com o éxciton. [69].

A partir da figura 3.8.2, podemos observar que os estados de éxcitons observados pela PL se aproximam bem das energias aferidas pelo SHG e pelo FWM, também podemos observar que os ajustes de curva são compatíveis para os trions. A partir dos valores dessas medidas, é possível montar a Tabela 3.8.1, onde comparamos os valores obtidos através dos ajustes dos dados experimentais para PL, SHG e FWM, para os éxcitons A, B e trions. Além disso, nossos valores são comparáveis com os resultados obtidos da literatura. É interessante notar a pouca variação entre as energias dos éxcitons e trions medidos com diferentes técnicas (PL, SHG e FWM) em nossas medidas, e que, também, se aproximam bem dos resultados da literatura, mesmo em materiais depositados sobre diferentes substratos e com diferentes formas de crescimento (Tabela 3.8.1). As pequenas variações nos valores de energia também

podem estar relacionadas ao fato de que a energia de ligação dos éxcitons é sensível a temperatura e carga presentes na amostra [78,81,82]. Outro ponto interessante de notar é que os valores teóricos das energias dos éxcitons são compatíveis com os apresentados nas referências [68,83–86].

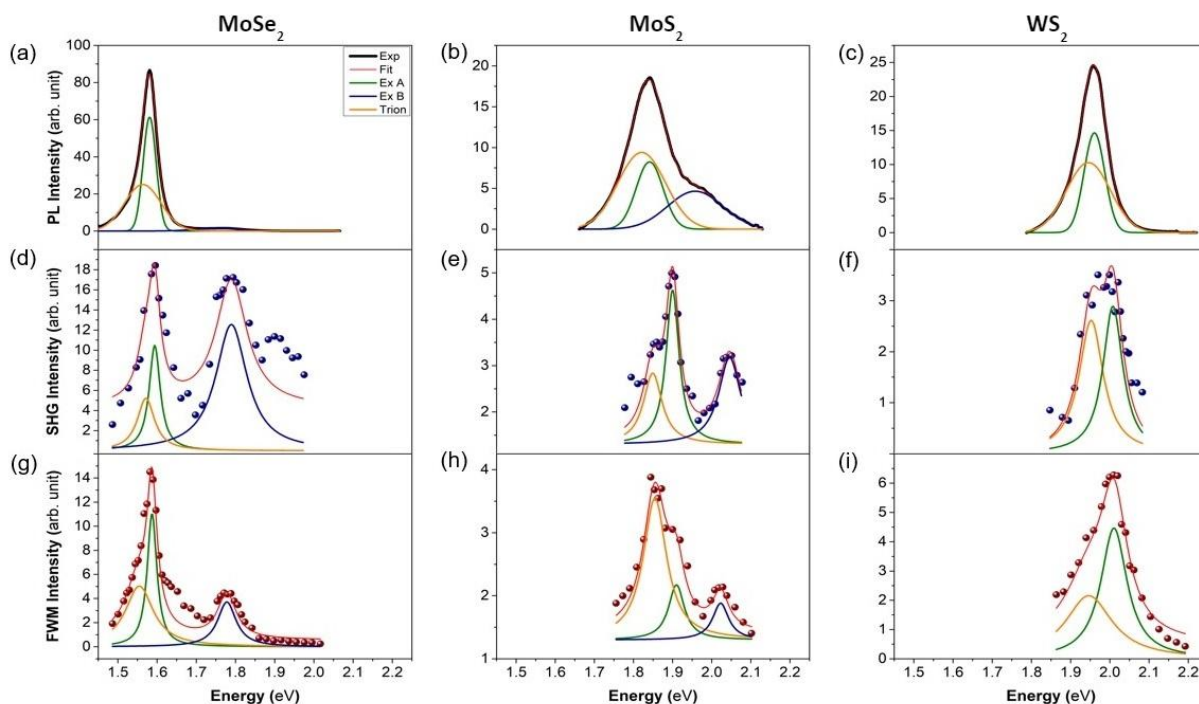


Figura 3.8.2: Medidas de PL para: (a) MoSe_2 , (b) MoS_2 e (c) WS_2 ; medidas de SHG para: (d) MoSe_2 , (e) MoS_2 e (f) WS_2 ; medidas de FWM para: (g) MoSe_2 , (h) MoS_2 e (i) WS_2 . Os gráficos apresentam os ajustes das curvas: em verde para o éxciton A, em azul para o éxciton B, em amarelo para o trión e em vermelho o fit total. Na PL (a,b,c) os ajustes foram feitos usando curvas gaussianas, no SHG (d,e,f) os ajustes foram feitos com lorentzianas, assim como no FWM (g,h,i). [69].

A figura 3.8.2 mostra o aumento de várias vezes a intensidade do sinal gerado para o SHG e FWM na condição de ressonância com os éxcitons e trions. Isso se deve ao fato de podermos considerar os níveis excitônicos como níveis reais nas transições para o SHG e FWM, o que proporciona um aumento do sinal em relação à transição eletrônica que ocorre fora de um nível real [27], conforme mostrado esquematicamente na figura 3.8.1-(b,d). Portanto, a presença de éxcitons ou trions torna a transição mais provável de ocorrer, conforme mostrado pelas referências [47,67,87–90] para o SHG. No caso do FWM nos estudos da referência [60], também mostrou-se o aumento do sinal na condição de ressonância.

Tabela 3.8.1: Valores medidos para as energias dos éxcitons A, B e trión nos TMDs.

TMD	Método	trión (eV)	éxciton A (eV)	éxciton B (eV)	Ref.
MoSe₂					
CVD	PL	1.55	1.58	1.75	this work
ME	PL	1.55	1.58	-	[91]
CVD	SHG	1.57	1.59	1.79	this work
PLD	SHG	1.50	1.54	1.77	[89]
CVD	FWM	1.55	1.59	1.78	this work
MoS₂					
CVD	PL	1.86	1.91	2.01	this work
ME	PL	1.87	1.91	2.06	[91]
CVD	SHG	1.85	1.90	2.04	this work
CVD	SHG	-	1.85	2.00	[87]
ME	SHG	-	1.91	2.07	[67]
CVD	SHG	-	1.87	2.07	[88]
CVD	FWM	1.86	1.91	2.02	this work
ME	FWM	-	1.82	2.07	[60]
CVD	R	-	1.87	2.02	[92]
WS₂					
CVD	PL	1.94	2.00	-	this work
ME	PL	1.98	2.01	-	[91]
CVD	SHG	1.96	2.01	-	this work
CVD	FWM	1.95	2.01	-	this work
ME	Abs.	-	2.02	2.40	[93]

ME: Esfoliação mecânica; Abs.: Absorção; R: Reflectância; PLD: Deposição por pulso de laser.

Uma vez realizadas as medidas de SHG e FWM podemos usar os valores obtidos para calcular a susceptibilidade não linear de segunda e terceira ordem ($\chi^{(2)}$ e $\chi^{(3)}$) para os TMDs. A obtenção desses valores tem importância, uma vez que essa é uma característica intrínseca do material e revela o quão responsivo ele é aos fenômenos não lineares de segunda e terceira ordem em função da energia de excitação.

3.9. Susceptibilidade elétrica de segunda ordem

Para obtermos os valores da susceptibilidade elétrica de segunda ordem ($\chi^{(2)}$) medimos, também, o SHG do quartzo cristalino nos mesmos parâmetros das amostras. Após finalizarmos as medidas, montamos uma tabela dos máximos das intensidades de cada comprimento de onda do SHG em função da energia do segundo harmônico gerado, para cada TMD e para a medida do quartzo. A partir desses valores de intensidade podemos obter o

valor de $\chi^{(2)}$ para os TMDs, utilizando a equação 3.9.1 retirada do material suplementar da referência [47].

$$\left| \chi_{TMD}^{(2)} \right| = \left| \chi_{qtz}^{(2)} \right| \left(\frac{I_{TMD}}{I_{qtz}} \right)^{\frac{1}{2}} \frac{(NA)^2 \pi \hbar c f}{4 E_{idler} n} , \quad (3.9.1)$$

onde o índice de refração $n=1.45$ e o $\chi_{qtz}^{(2)} = 0,8 \times 10^{-12} \text{ mV}^{-1}$ para o quartzo cristalino, $NA = 0.95$ é a abertura numérica da objetiva utilizada, $f = 0.056$ é uma constante de integração, I_{TMD} é a intensidade do SHG medida para o TMD, I_{qtz} é a intensidade medida para o quartzo cristalino e E_{idler} é a energia do laser de excitação *Idler* [47]. Multiplicamos estes valores pela espessura da monocamada e fizemos um gráfico de $\chi^{(2)}$ versus energia do SHG correspondente, como podemos ver na figura 3.9.1.

O erro calculado foi feito medindo-se cada amostra três vezes, utilizando os mesmo parâmetros, assim como o quartzo. Obtivemos então nove gráficos para o $\chi_{sheet}^{(2)}$, fazendo uma média dos resultados obtidos, construímos os gráficos mostrados na figura 3.9.1, com seu respectivo desvio padrão.

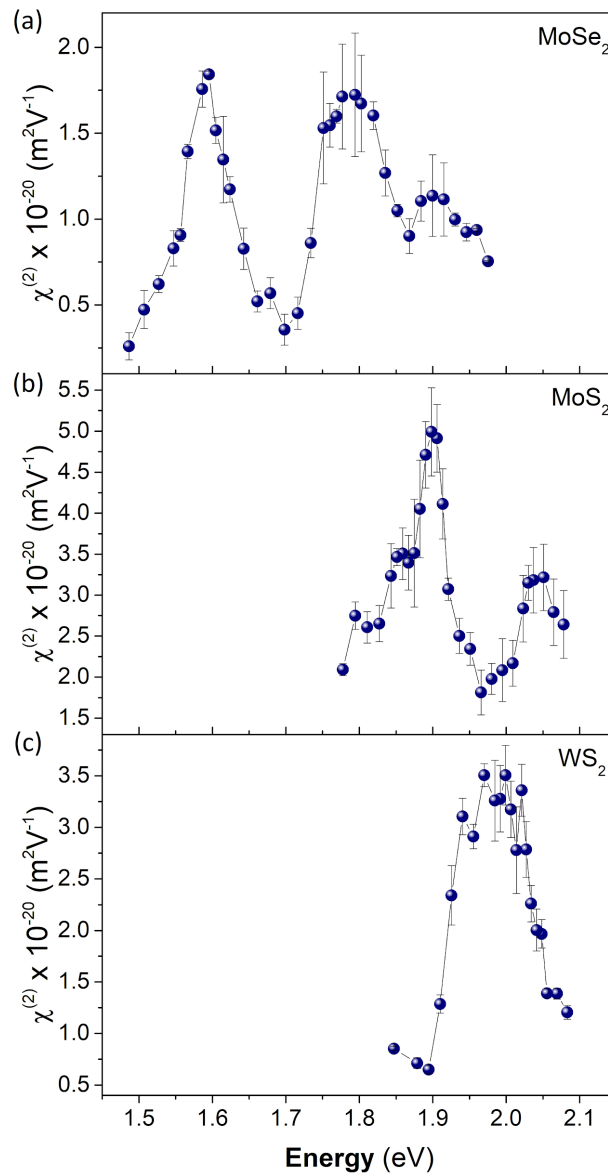


Figura 3.9.1: Gráfico das medidas de SHG em relação a susceptibilidade elétrica de segunda ordem para a monocamada ($\chi_{sheet}^{(2)}$), próximo as energias dos éxcitons dos TMDs, podemos observar o aumento da resposta SHG próximo as energias de ressonância. Adaptado da ref. [69].

3.10. Susceptibilidade elétrica de terceira ordem

De forma análoga as medidas de segunda ordem, realizamos as medidas para encontrar a susceptibilidade elétrica de terceira ordem ($\chi^{(3)}$) por meio do FWM. Para isso medimos o FWM para o quartzo fundido com os mesmos parâmetros dos TMDs. Uma vez finalizadas as medidas, como no caso do SHG, montamos uma tabela dos máximos das intensidades de cada comprimento de onda do FWM e da energia desse comprimento de onda, para o TMD e para a medida do quartzo fundido. A partir da tabela podemos obter os valores do $\chi^{(3)}$ do MoS₂

utilizando o mesmo método descrito no material suplementar da referência [6], de onde é possível escrever a equação 3.10.1:

$$\left| \chi_{TMD}^{(3)} \right| = \left| \chi_{qtz}^{(3)} \right| \left(\frac{I_{TMD}}{I_{qtz}} \right)^{\frac{1}{2}} \frac{\hbar c (1+n)^3}{16 (2 E_{signal} - E_{1064}) n^{\frac{5}{2}}}, \quad (3.10.1)$$

onde o $n=1.45$ e o $\chi_{qtz}^{(3)} = 2 \times 10^{-22} \text{ m}^2\text{V}^{-2}$ para o quartzo fundido [94], I_{TMD} é a intensidade medida para os TMDs, I_{qtz} é a intensidade medida para o quartzo fundido, E_{signal} é a energia do laser de excitação *Signal* e E_{1064} é a energia do laser de excitação 1064nm. Dessa maneira, podemos formar um gráfico de $\chi^{(3)}$ *versus* energia do sinal de FWM do TMD, como podemos ver na figura 3.10.1.

De maneira análoga às medidas de SHG, foi feito o mesmo procedimento para obter os gráficos do $\chi_{sheet}^{(3)}$, para o FWM, com seu respectivo desvio padrão.

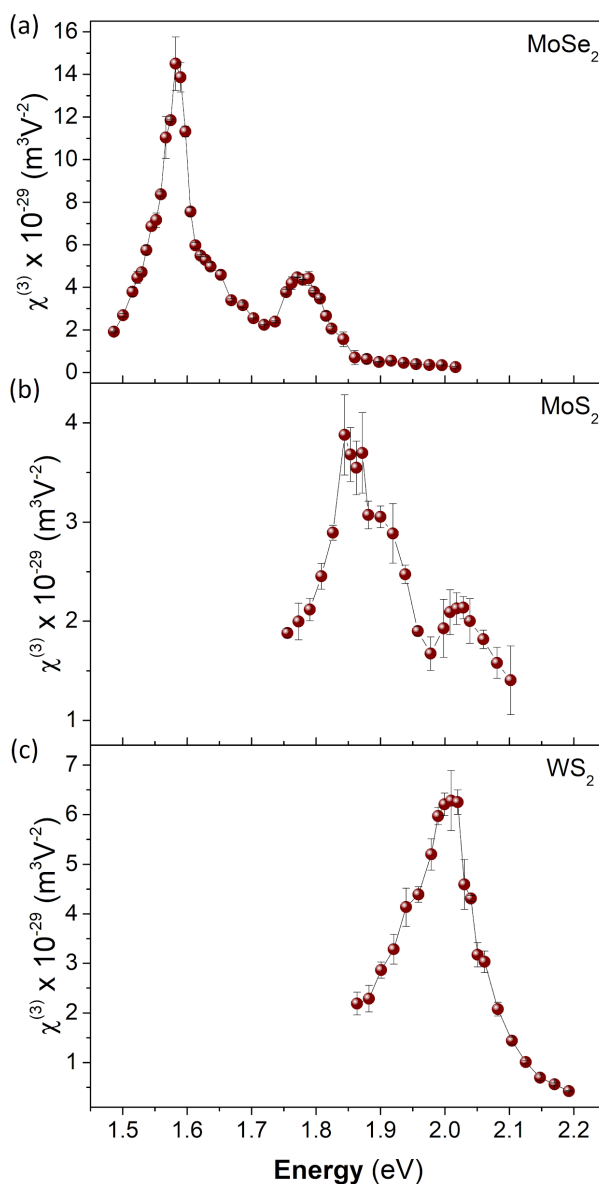


Figura 3.10.1: Gráfico das medidas de FWM em relação a susceptibilidade elétrica de terceira ordem para monocamada ($\chi_{sheet}^{(3)}$), próximo as energias dos éxcitons dos TMDs. Podemos observar o aumento da resposta FWM próximo às energias de ressonância. Adaptado da ref. [69].

3.11. Discussão dos resultados

Podemos observar, como mostrado pelas figuras 3.9.1 e 3.10.1, que existe um aumento nas susceptibilidades de segunda e terceira ordem, próximo à energia dos éxcitons. Outros estudos de óptica não linear apresentam resultados semelhantes, principalmente no caso do SHG, mas também reportados para o caso do FWM, como pode ser visto nos trabalhos [95,96]. Em uma análise teórica, Pedersen *et al.* [97] demonstra esse aumento devido à presença de éxcitons.

Os valores da susceptibilidade elétrica não linear de segunda ordem $\chi_{sheet}^{(2)}$ para os diferentes materiais; e sua comparação com valores encontrados na literatura podem ser observados na Tabela 3.11.1. Podemos observar que os valores obtidos nas referências [47,62,83] para o MoS₂ são bem próximos aos valores encontrados pelo nosso experimento. Por outro lado, as referências [48,98] se diferenciam em algumas ordens de grandeza. Já nos demais materiais, os resultados obtidos foram bem próximos dos resultados da literatura, o que demonstra uma boa correlação entre nosso experimento e os demais, ressaltando que o nosso experimento abrange uma faixa maior de comprimentos de onda, dentro da ressonância e fora de ressonância com os estados excitônicos, como pôde ser observado na figura 3.9.1.

Tabela 3.11.1: Valores encontrados na literatura para a susceptibilidade elétrica não linear de segunda ordem para a monocamada do MoS₂, MoSe₂, WS₂, contendo: a técnica de obtenção da amostra, o valor de $\chi^{(2)}$ para a monocamada, o método de segunda ordem para obter o valor, o comprimento de onda do laser de excitação e o substrato em que a amostra se encontrava.

TMD	$\chi^{(2)} \times 10^{-20} \text{ (m}^2\text{V}^{-1}\text{)}$	Método	λ laser (μm)	Substrato	Ref.
MoSe₂					
CVD	0.2-2.3	SHG	1.26-1.67	SiO ₂	this work
ME	2.4	SHG	1.56	SiO ₂ /Si	[83]
PLD	0.6-4.0	SHG	1.2-1.8	SiO ₂ /Si	[89]
MoS₂					
CVD	1.7-5.1	SHG	1.19-1.40	SiO ₂	this work
CVD	0.3-2.9	SHG	1-1.8	SiO ₂ /Si	[87]
CVD	3.3×10^2	SHG	0.81	SiO ₂	[48]
CVD	2.0	SHG	1.56	BOD	[62]
CVD	0.4-4.2	SHG	1.06-1.6	SiO ₂	[88]
ME	1.1-8.0	SHG	0.68-1.08	quartz	[47]
ME	6.5×10^3	SHG	0.81	SiO ₂	[48]
ME	21	SHG	0.81	glass	[98]
ME	0.35	SHG	1.56	SiO ₂ /Si	[83]
WS₂					
CVD	1.2-4.2	SHG	1.2-1.24	SiO ₂	this work
CVD	5.9	SHG	0.832	SiO ₂ /Si	[99]
ME	1.1	SHG	1.56	SiO ₂ /Si	[83]

BOD: Borosilicato.

Na Tabela 3.11.2 comparamos os valores para o caso da susceptibilidade elétrica não linear de terceira ordem $\chi_{sheet}^{(3)}$. É a primeira vez que estes valores foram obtidos na faixa dos

éxcitons, por meio de FWM, mas podemos compará-los com outros valores obtidos por meio da Geração de Terceiro Harmônico (*Third-Harmonic Generation*, THG), por serem técnicas não lineares de terceira ordem que dependem igualmente de $\chi^{(3)}$ para que ocorram. Como é possível observar na Tabela 3.11.2, nossos valores e os da literatura estão na mesma ordem de grandeza, mesmo levando em conta que foram utilizadas técnicas de medida diferente e em outros comprimentos de onda de excitação.

Tabela 3.11.2: Valores encontrados na literatura para a susceptibilidade elétrica não linear de terceira ordem para a monocamada do MoS₂, MoSe₂, WS₂, contendo: a técnica de obtenção da amostra, o valor de $\chi^{(3)}$ para a monocamada, o método de terceira ordem para obter o valor, o comprimento de onda do laser de excitação e o substrato em que a amostra se encontrava.

TMD	$\chi^{(3)} \times 10^{-29} \text{ (m}^2\text{V}^{-1}\text{)}$	Método	λ laser (nm)	Substrato	Ref.
MoSe₂					
CVD	0.1-14.7	FWM	780-820*	SiO ₂	this work
ME	14.3	THG	1560	SiO ₂ /Si	[83]
MoS₂					
CVD	1.3-4.0	FWM	760-850*	SiO ₂	this work
CVD	17	THG	1560	BOD	[62]
CVD	7.8	THG	1560	SiO ₂ /Si	[100]
ME	23.4	THG	1560	SiO ₂ /Si	[83]
ME	7.7	THG	1758	SiO ₂ /Si	[101]
WS₂					
CVD	0.2-6.5	FWM	740-820*	SiO ₂	this work
ME	15.6	THG	1560	SiO ₂ /Si	[83]

* Os valores de λ do laser são referentes ao laser *Signal* usado como bombeamento, em conjunto com um laser fixo em 1064 nm.

Por fim, à partir dos resultados obtidos, decidimos aplicar os três lasers (ω_{Signal} , ω_{1064} e ω_{Idler}), simultaneamente, em uma amostra de MoS₂ para expandir a faixa de energias de operação e também os possíveis efeitos não lineares. Como podemos observar na ilustração da figura 3.11.1-(a) é possível gerar Segundo harmônico ($2\omega_{\text{Signal}}$, $2\omega_{1064}$ e $2\omega_{\text{Idler}}$), soma de frequência ($\omega_{\text{Signal}} + \omega_{1064}$, $\omega_{\text{Signal}} + \omega_{\text{Idler}}$ e $\omega_{1064} + \omega_{\text{Idler}}$) e a mistura de quatro ondas ($2\omega_{\text{Signal}} - \omega_{\text{Idler}}$ e $2\omega_{\text{Signal}} - \omega_{1064}$). Na figura 3.11.1-(b) observamos estes diferentes efeitos não lineares em quase toda região do espectro visível (400 a 720 nm) ao variarmos o laser signal com passos de 10 nm. Esses efeitos não lineares ocorrem dentro da faixa de absorção do éxcitons A, B e C nesse material, conforme indicado pelos retângulos na figura 3.11.1-(b), e devido a

isso, os efeitos não lineares são amplificados, possibilitando a utilização desses materiais em uma larga faixa espectral e por meio de diferentes processos não lineares.

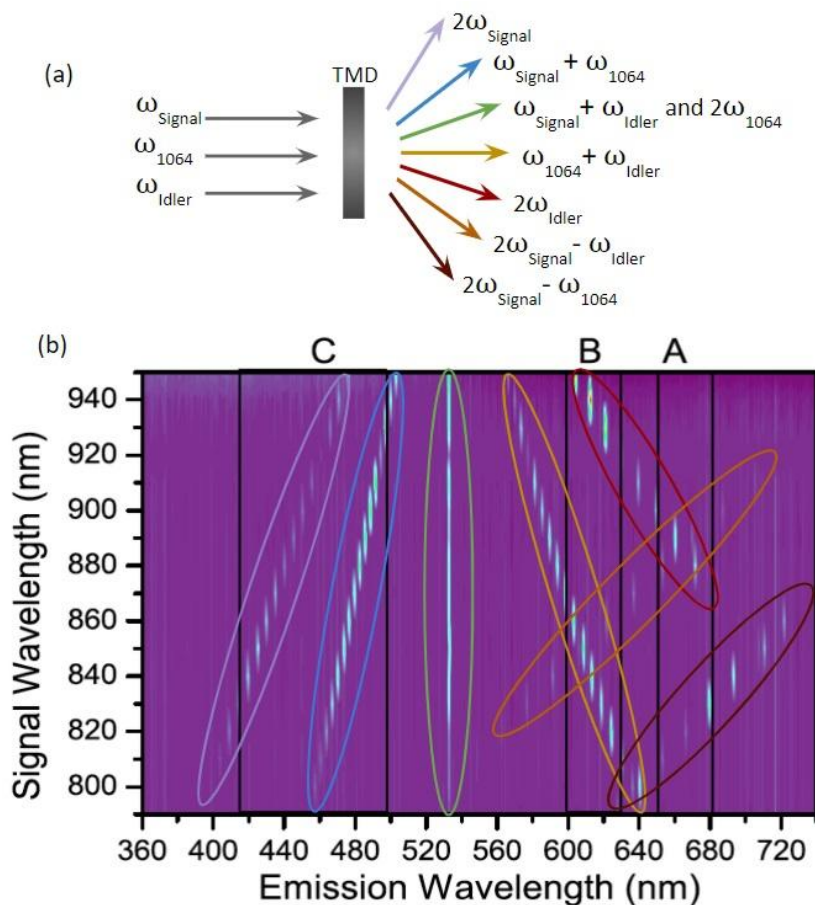


Figura 3.11.1: Efeitos gerados no MoS₂ devido a incidência de três lasers pulsados (*Signal*, *Idler* e 1064). (a) Ilustração de diferentes processos não lineares gerados devido a incidência dos lasers na amostra. (b) Mapa de intensidade dos efeitos não lineares variando o comprimento de onda do *Signal*. As regiões circundadas de diferentes cores, refere-se aos processos não lineares de mesma cor indicados na parte (a). [69].

3.12. Conclusões sobre os TMDs

Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que as técnicas de SHG e FWM nos permitem fazer um estudo dos éxcitons e trions desses tipos de materiais, sendo bem útil para localizar o seu valor de energia, bem como observar que os TMDs apresentam de fato uma alta resposta óptica não linear próximos as energias dos éxcitons e trions.

Podemos notar que, mesmo em materiais obtidos de forma distinta, no caso esfoliação micromecânica e CVD, e mesmo medindo usando técnicas ópticas de ordens diferentes - absorção (primeira ordem), SHG (segunda ordem) e FWM (terceira ordem) - podemos

encontrar valores próximos para a energia dos éxcitons nos TMDs. Além disso, mostramos a possibilidade de medir a presença de trions utilizando SHG e FWM nos TMDs, comparando e fazendo um ajuste das curvas em relação à fotoluminescência destes materiais.

Foi possível, também, quantificar as susceptibilidades de segunda e terceira ordem destes materiais em ressonância com as energias excitônicas. Outro ponto a se destacar é a capacidade de se obter informações à partir do FWM, compatíveis com resultados obtidos por THG da literatura [62,83,100,101]. Ademais, demonstramos a possibilidade de gerar diferentes efeitos não lineares simultâneos em uma larga faixa espectral de operação. Tal caracterização é importante para futuros desenvolvimentos destes materiais na área de fotônica e optoeletrônica, para criação de novos dispositivos, ou no uso de técnicas de imageamento. Por fim, os resultados desse trabalho foram publicados em forma de artigo, que pode ser visto na referência [69].

4. Aplicações de óptica não linear em materiais biológicos

O uso de efeitos físicos aplicados a biologia ou biomedicina vem de uma longa história, passando pelas aplicações de raio-x [102], ressonância magnética [103] e tomografia por emissão de pósitrons [104], que se utilizam de avanços na física para criar métodos diagnósticos hoje imprescindíveis na área médica. Na área da óptica não é diferente com avanço das técnicas ópticas de detecção e microscopia. Com o desenvolvimento das técnicas de microscopia, cada vez mais a área biológica vem se utilizando dessas técnicas para caracterização de materiais biológicos. Dentro desse escopo técnicas de microscopia Raman e de óptica não linear vem ganhando espaço para o avanço do estudo nessa área. A exemplo dessas técnicas não lineares descritas no capítulo 2, existem trabalhos com aplicações em biologia que utilizam o TPEF, o SHG e técnicas de Raman convencional ou estimulado [4,19,105–107].

Este trabalho é parte de um conjunto de publicações multidisciplinares, realizado no Laboratório de nanoespectroscopia da UFMG, que visa o desenvolvimento de um equipamento de diagnóstico pré-clínico da doença de Alzheimer. O foco específico nesta tese foi a utilização das técnicas supracitadas para caracterização de estruturas biológicas em fatias de cérebros de camundongos transgênicos para a doença de Alzheimer e, sobretudo, a identificação da placa formada pelo acúmulo de beta-amiloide. A importância deste trabalho é contribuir com abordagens de técnicas ópticas para o estudo destas estruturas. Adiante vamos descrever os fundamentos do nosso trabalho, apresentando trabalhos já publicados. A partir dessa análise prévia, desenvolvemos a discussão sobre os mecanismos da doença de Alzheimer. Discutimos as diferenças que surgem no espectro Raman pela diferença de idade (seção 4.4.3). Também abordamos a caracterização de células presentes no processo de formação da placa amiloide (seção 4.4.4). O estudo da progressão da doença carece da identificação dos tipos celulares envolvidos no processo de formação da placa amiloide, portanto esta caracterização é de amplo interesse da comunidade científica [108,109], seja para o desenvolvimento de novos fármacos, seja para o aprofundamento da dinâmica dessa

enfermidade, com a finalidade de melhorar a qualidade de vida dos seus portadores, bem como seu diagnóstico precoce.

4.1. Preâmbulo

No ano de 2014 teve início no Laboratório de Nanoespectroscopia (LabNS) o grupo multidisciplinar de estudo e desenvolvimento de um diagnóstico pré-clínico da doença de Alzheimer. Desde então, houve um desenvolvimento substancial das técnicas de espectroscopia, tanto no que diz respeito ao Raman convencional, quanto nas técnicas não lineares como SRS e CARS, conseguindo resultados relevantes para a literatura.

Em conjunto, desde o início do nosso trabalho, foram publicados três artigos, descritos nas seções 4.4.1 [18] (no qual sou segundo autor), 4.4.2 [19] (no qual tenho autoria com contribuição equivalente) e 4.4.3 [110] (no qual também tenho autoria equivalente), além de um trabalho em fase final apresentado na seção 4.4.4. Além disso, estes trabalhos são parte relevante de duas teses de doutorado [29,111], um capítulo de livro submetido para publicação e um registro de *know-how*. Minha contribuição principal, dentro do grupo, foi a implementação das técnicas não lineares, a realização das medidas não lineares nos trabalhos publicados, a discussão dos resultados obtidos, além da participação no direcionamento dos trabalhos para a realização de novas medidas e do desenvolvimento do que futuramente se pretende ser um equipamento de diagnóstico pré-clínico da doença de Alzheimer. Nas próximas seções, serão abordadas às bases desses trabalhos, juntamente com a apresentação dos resultados obtidos, que visam demonstrar como as técnicas ópticas apresentam uma grande relevância para a caracterização de tecidos biológicos, bem como elas podem ser exploradas como uma ferramenta capaz de trazer novas informações a respeito da análise das placas beta-amiloide formadas no cérebro.

4.2. Os tipos celulares do SNC e a doença de Alzheimer

O sistema nervoso central (SNC) apresenta duas classes de células: os neurônios, que são mais conhecidos, sendo os responsáveis pela atividade cognitiva e pelas sinapses; mas além dos neurônios, temos outra classe de células, que se chamam células da glia. As células da glia se dividem principalmente entre: os astrócitos, os oligodendrócitos e as micróglias.

Elas são responsáveis por manter a estrutura e sustentação do sistema nervoso, além da defesa contra inflamações e proteção do encéfalo, como veremos a seguir.

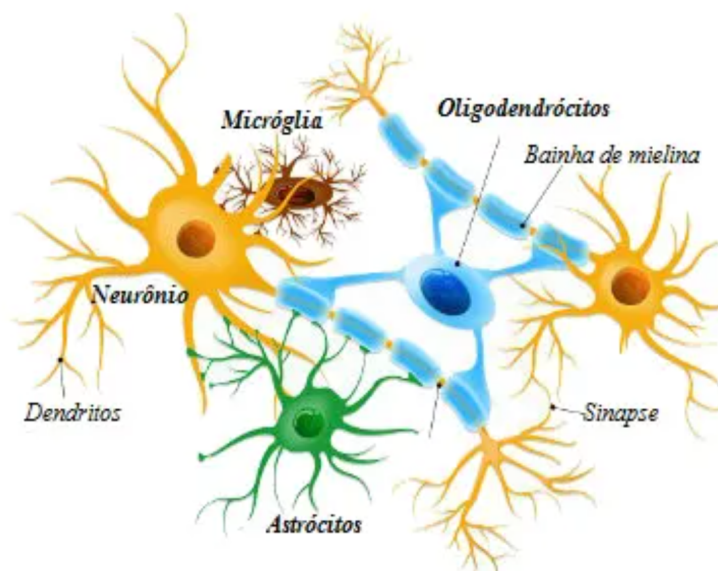


Figura 4.2.1: Ilustração das principais células do sistema nervoso central: em amarelo temos os neurônios, em verde os astrócitos, em azul os oligodendrócitos e em marrom as micróglias. [112].

A figura 4.2.1 ilustra as principais células do cérebro. Em amarelo temos os neurônios, responsáveis por conduzir os impulsos elétricos que realizam as sinapses. Eles geralmente se dividem em três partes principais: o corpo celular, onde está presente o núcleo; os dendritos, que são os prolongamentos do corpo celular, e que recebem os impulsos elétricos e os transmitem ao corpo celular; e os axônios, que são a “cauda” do neurônio, que em sua extensão é recoberta pela bainha de mielina e na sua extremidade emite os impulsos elétricos, que são responsáveis pela sinapse com os dendritos de um outro neurônio. Na cor verde podemos ver os astrócitos, que são células de formato estrelado, com prolongamentos nas suas extremidades. Eles tem a função de sustentação, controle da composição iônica e molecular do ambiente onde estão localizados os neurônios, transferência de substâncias para os neurônios, resposta a sinais químicos, entre outras atividades. Em azul temos os oligodendrócitos, que são células responsáveis pela produção da bainha de mielina dos neurônios do sistema nervoso central. Essas células enrolam-se em volta do axônio, formando a bainha de mielina, que funciona como um isolante elétrico. Em marrom vemos as micróglias, que são as menores células da glia, com pequenos prolongamentos que se destacam por sua capacidade fagocitária. Elas localizam-se no sistema nervoso central e atuam em processos inflamatórios reparando esse sistema [112,113].

Neste trabalho nosso foco será naturalmente nos neurônios que estão envolvidos no processo da formação da placa amiloide, que está associada ao acúmulo da proteína beta-amiloide, bem como nos astrócitos e nas micróglias, que são células que compõem o mecanismo de defesa do encéfalo contra inflamações.

As placas relacionadas ao acúmulo de beta-amiloide foram observadas desde a descoberta da doença de Alzheimer, como pode ser visto na figura 4.2.2, que mostra em (A) uma fotografia do Dr. Alzheimer, em (B) sua paciente Augusta Deter, em (C) as lâminas com tecido cerebral da paciente Augusta Deter *post-mortem*, em (D) vemos varias placas amiloide impregnadas de prata e em (E) uma única placa isolada no tecido cerebral da paciente.

Ainda hoje há um grande debate na literatura sobre sua relação com a doença de Alzheimer e sobre seu caráter de causa ou consequência da evolução desse tipo de enfermidade [114]. Fato é que as placas formadas pelo acúmulo de beta-amiloide estão diretamente relacionadas à doença de Alzheimer e, portanto, reconhecê-las e caracterizá-las é um passo importante para o avanço no estudo desse tipo de neuropatologia.

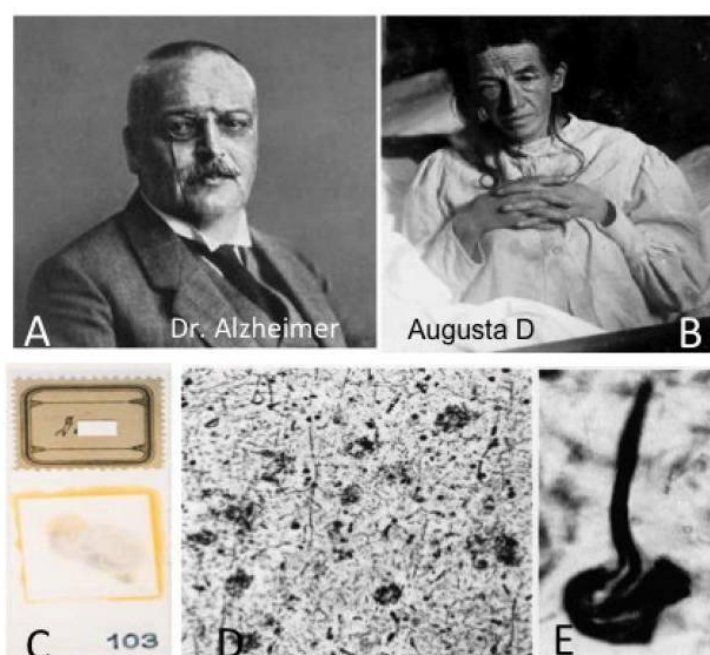


Figura 4.2.2: (A) Fotografia do Dr. Alzheimer e (B) sua paciente, Auguste Deter. (C) Imagem das lâminas histológicas *post-mortem* originais. (D) Placas neuríticas impregnadas de prata e em (E) um emaranhado neurofibrilar no cérebro de Auguste Deter. [115].

Como podemos ver na figura 4.2.3, as placas formadas pelo acúmulo de beta-amiloide possuem um núcleo, que também é chamado de *core* (num tom azulado, mais claro) que é circundado por uma borda (em um tom roxo, mais escuro) que chamamos de halo.

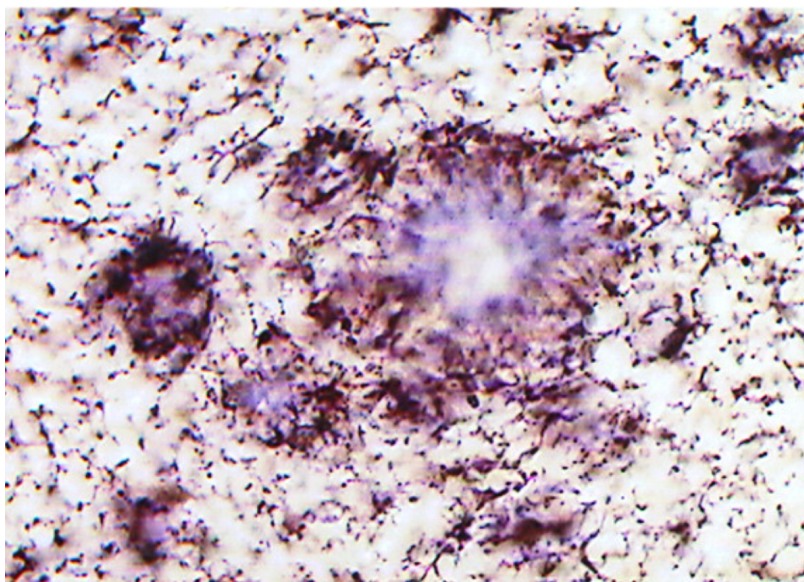


Figura 4.2.3: Imagem feita por imunocoloração usando o anticorpo MAC-1 para marcar a microglia de uma placa amiloide no cérebro de um camundongo transgênico. Adaptado da ref. [116].

Apenas a microscopia convencional, sem o envolvimento de marcadores ou corantes, são incapazes de diferenciar as placas amiloide do tecido saudável, e identificar os componentes dessas estruturas. Por exemplo, veremos mais adiante que essas estruturas são, no caso do halo, predominantemente de composição lipídica, e no core de composição proteica, por essa razão se faz necessário a aplicação de outras técnicas de microscopia para identificação e caracterização das placas amiloides.

4.3. Metodologia

4.3.1. Preparação de amostras de cérebro

Nos nossos trabalhos usamos camundongos bitransgênicos da linhagem APPswePS1 Δ E9 adquiridos na *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME. USA). Esse modelo APP/PS1 é duplamente transgênico que expressa uma proteína precursora de amiloide associada à doença de Alzheimer de início precoce. Essa linhagem APPswePS1 Δ E9 apresenta deposição de placas de beta-amiloide (β A) na retina a partir de dois meses e meio, e no cérebro a partir do 5º mês [117,118]. A colônia foi estabelecida no biotério de experimentação

da faculdade de Medicina da UFMG através de cruzamento entre o híbrido bitransgênico, com fêmeas do Biotério Central da UFMG. O cruzamento foi feito por 8 gerações (N), em seguida, os cruzamentos passaram a ser isogênicos entre irmãos, sempre com macho Transgênico (Tg) e fêmea *Wild type* (Wt ou Ctrl).

Cortes histológicos de cérebro foram usados para caracterização e identificação da assinatura Raman das placas amiloide do tecido. Animais com 6 e 12 meses de idade foram anestesiados com cetamina 80 mg e xilazina 15 mg/kg via IP, perfundidos com PBS (*phosphate buffered saline*), seguido de fixação em paraformaldeído (PFA) 4%. A seguir, os cérebros são removidos e incubados em PFA 4% a 8°C. Após esse processo, os cérebros são fatiados em criostato (30 e 40 μm) para varreduras de hiperspectro. Todo o trabalho com as colônias e preparação de amostras foi realizado pelo biólogo Dr. Emerson Fonseca e pode ser visto na referência [111].

4.3.2. Montagem experimental para realização das medidas

Para realizar medidas de Raman convencional utilizamos o sistema de medida comercial WITec Alpha 300 Series do Laboratório Institucional de Pesquisa de Caracterização e de Processamento de Nanomateriais (LCPNano), que está localizado no departamento de Física da UFMG. Nossa montagem experimental, para as medidas de varredura não lineares (SRS, CARS, SHG TPEF) nos materiais biológicos, se assemelha com a da seção 3.5, com algumas modificações, que podem ser vistas na figura 4.3.2.1. Nela temos um microscópio invertido Nikon e um laser pulsado de picossegundos (APE picoemerald), porém, agora incluímos o sistema de varredura por um conjunto de espelhos galvanométricos (Lavision Biotec), usando objetivas de 20x (NA 0.75), ou de 60x a ar (NA 0.95), ou 60x a óleo (NA 1.4), este sistema de varredura é muito similar ao usado para realizar as medidas da figura 3.7.2, como dito no capítulo 3.7. As medidas de SHG foram feitas com o laser de bombeio centrado em um comprimento de onda de 810 nm, e para o CARS de lipídios os lasers foram ajustados para 816 nm e 1064 nm. Nessa configuração experimental, a mesma objetiva coleta o sinal retroespalhado, direcionado para um filtro passa-faixa para coletar apenas os sinais SHG ou CARS, que são detectados por uma fotomultiplicadora. O SRS, por sua vez, usa o feixe de 1064 nm modulado por um modulador eletro-óptico (EOM) e o sinal

transmitido é coletado por um condensador (C), direcionando-o a um fotodiodo (PD) conectado a um amplificador *lock-in* (LIA).

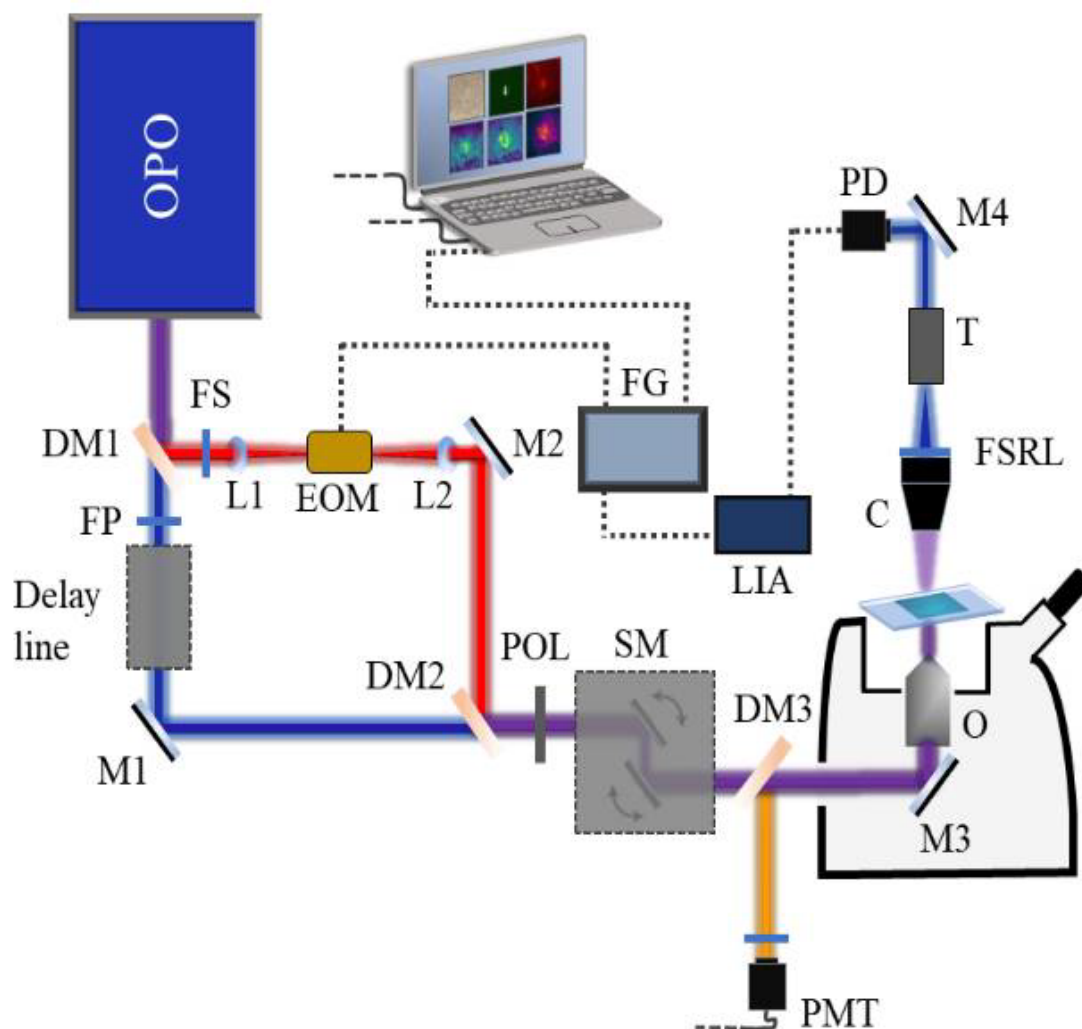


Figura 4.3.2.1: Figura ilustrando a montagem experimental utilizada para varredura das placas amiloides. Nela vemos a luz pulsada proveniente do laser com cavidade OPO, que opera com um comprimento de onda fixo (1064 nm) e um sintonizável (pump, de menor comprimento de onda); (DM1) espelho dicróico *short-pass* de 1000 nm; (FS) filtro *long-pass* de 1020 nm; (L1) lente plano-convexa de distância focal 100 mm; (EOM) modulador electro-óptico resonante em 10 MHz; (L2) lente plano-convexa de distância focal 100 mm; (M2) espelho plano de prata; (FP) filtro *short-pass* de 1010 nm; (*delay line*) plataforma composta por uma linha de atraso com 4 espelhos planos de prata; (M1) espelho plano de prata; (DM2) espelho dicróico *short-pass* de 1000 nm; (POL) polarizador radial; (SM) sistema de varredura; (DM3) espelho dicróico *long-pass* substituível; microscópio invertido; (M3) espelho plano de prata; (O) objetiva; amostra; (C) condensador; (FSRL) filtro *band-pass* de 830/310 nm; (T) telescópio; (M4) espelho plano de prata; (PD) fotodiodo; (LIA) amplificador *lock-in* sincronizado em 10 MHz; (FG) gerador de função com onda de 10MHz; (PMT) fotomultiplicadora. Adaptado da ref. [111].

Uma vez obtidas no programa do microscópio (Lavisision), as imagens são processadas e coloridas artificialmente no programa ImageJ. Nele podemos colocar na mesma escala de intensidades, fazendo uma normalização entre imagens, o que torna a comparação, ou mesmo a geração de imagens por subtração ou outra operação matemática entre figuras, mais confiável e com os mesmos parâmetros.

4.4. Espectroscopia e imageamento das placas beta-amiloide

4.4.1. Espectroscopia Raman aplicada

A técnica de espectroscopia Raman como ferramenta de identificação de materiais é amplamente conhecida na física. Como visto no capítulo 2, a espectroscopia Raman pode ser utilizada para caracterizar materiais baseado nas suas ligações moleculares, pois cada tipo de ligação tem uma energia de vibração específica, sendo assim, é possível diferenciar os materiais baseados no espectro Raman. Portanto, podemos medir o espectro Raman da placa amiloide e comparar com tecido saudável com o intuito de diferenciá-los e encontrar picos relacionados aos modos de vibração específicos da placa amiloide, baseados na espectroscopia Raman.

O artigo de Fonseca *et al.* [18] descreve as mudanças presentes no espectro Raman devido a presença ou não de placas amiloides no tecido. Na figura 4.4.1.1 podemos ver alguns picos Raman associados aos modos de vibração, que diferenciam o tecido saudável do halo lipídico e do core proteico. Os picos de maior destaque são o das ligações de CH_2 (2850 cm^{-1}) e da amida I (1670 cm^{-1}). Como veremos na seção a seguir, esses picos foram utilizados por nós, para imagear as placas, utilizando o processo de Raman estimulado. Porém, outros picos também podem diferenciar o halo, o núcleo (*core*) e o tecido saudável, como será abordado mais à frente, tais como o pico relacionado à amida B.

Neste trabalho, em específico, fui o responsável por executar o imageamento por autofluorescência para localização das placas amiloide no tecido e da discussão do hiperespectro Raman, com o intuito de identificar picos associados a placa amiloide, para que pudessemos aplicar as técnicas de Raman estimulado, como o CARS e o SRS que serão discutidos na próxima seção.

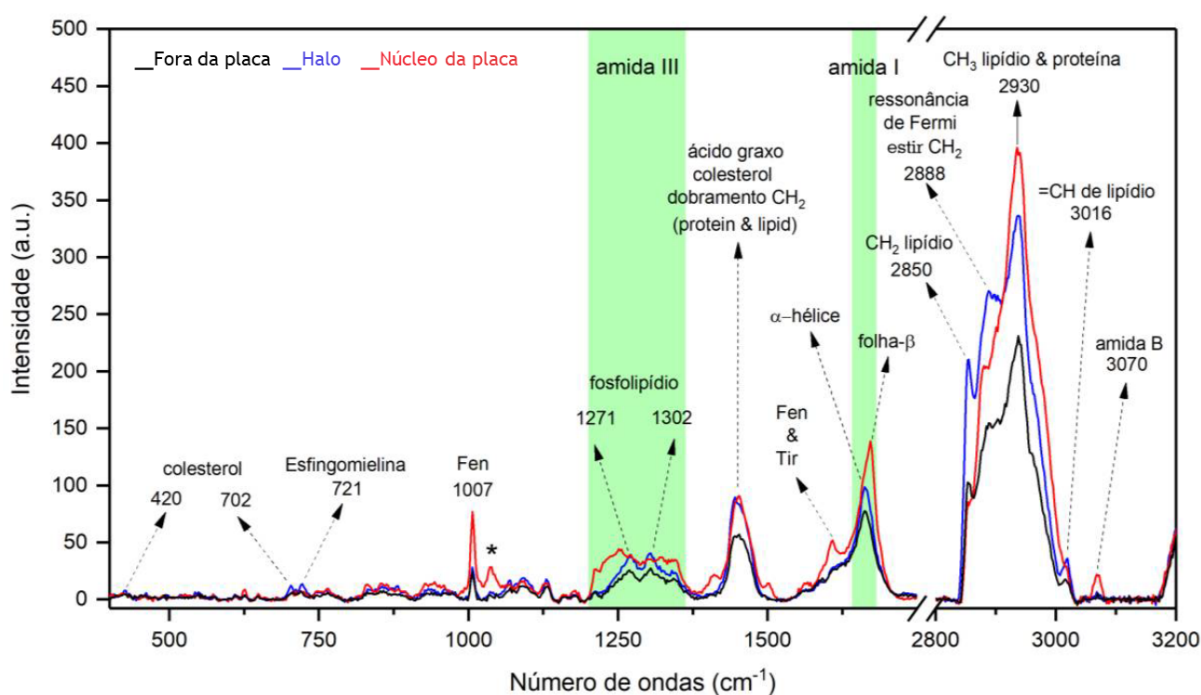


Figura 4.4.1.1: Espectro Raman de fatias de cérebro de camundongos transgênicos de 6 meses de idade. Em vermelho temos o espectro sobre placa amiloide (Core). Em azul está a região circundante à placa (Halo) e em preto uma região distante da borda da placa amiloide. As regiões dos picos associados às amidas I e III estão destacadas em verde. Adaptado da ref. [18].

Para este estudo, realizamos imagens hiperespectrais Raman dos tecidos, onde foi possível classificar quais os tipos de alteração estão presentes na estrutura da placa através da análise dos diferentes picos no espectro Raman presentes na amostra. Na figura 4.4.1.2 apresentamos as imagens hiperespectrais Raman, onde mapeamos a intensidade do pico Raman associado aos lipídios em 2850 cm^{-1} , que formam o halo da placa, e o pico associado a amida I em 1670 cm^{-1} , que forma o core proteico [111].

Dessa forma, a partir da espectroscopia Raman e de imagens hiperespectrais Raman foi possível estabelecer quais são as assinaturas espectrais que caracterizam a placa amiloide no tecido cerebral. Porém, as medidas de hiperespectro demandam algumas horas para sua aquisição, impossibilitando experimentos em cortes frescos ou medidas *in vivo*, que apesar de não estarem neste trabalho são a intenção deste projeto. Por isso, se fez necessário avançar para técnicas como o CARS e o SRS que conseguem varrer uma mesma área em um tempo de alguns segundos ou poucos minutos.

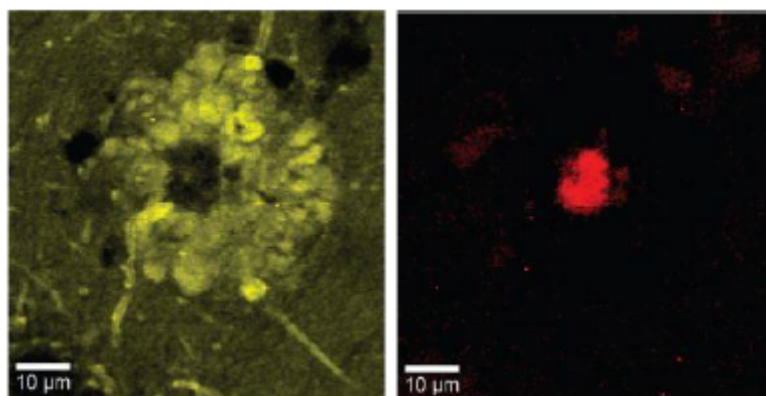


Figura 4.4.1.2: Em amarelo à esquerda temos o halo lipídico associado ao pico Raman de 2850 cm^{-1} ; em vermelho à direita temos a placa amiloide que forma o core associado ao pico Raman da Amida I em 1675 cm^{-1} . Adaptado da ref. [111].

4.4.2. Técnicas não lineares para identificação das placas

Ao longo dos últimos anos foram utilizadas diferentes técnicas ópticas com o intuito de medir placas amiloides no cérebro. Diferentes trabalhos abordam esse tipo de análise, como os trabalhos de Kwan *et al.* [119] onde foram feitas medidas de SHG e autofluorescência. Por outro lado, o trabalho de Condello *et al.* [108] utiliza marcações de imunofluorescência para marcar células cerebrais e usa microscopia confocal de alta resolução e TPEF para imagear placas amiloides. Já em outros trabalhos, técnicas de Raman estimulado como CARS e SRS foram feitas, como mostram os trabalhos do grupo liderado por Sunney Xie. Um exemplo é o trabalho de Ji *et al.* [120] para identificação dessas placas amiloides, utilizando SRS, como podemos ver na figura 4.4.2.1.

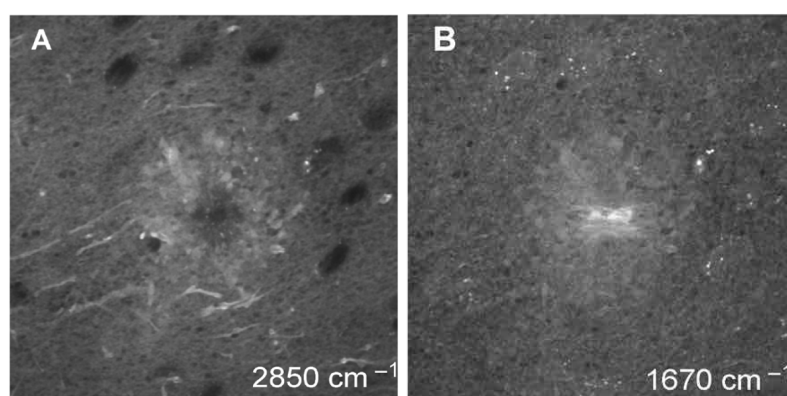


Figura 4.4.2.1: Imagens de SRS: (A) feita utilizando o pico associado aos lipídios estimulando o pico em 2850 cm^{-1} ; (B) feita estimulando o pico Raman da amida I em 1670 cm^{-1} . Adaptado da ref. [120].

A fim de realizarmos experimentos de SRS nas placas amiloide em tecidos, primeiramente, realizamos um hiperespectro Raman como mostrado na primeira linha da figura 4.4.2.2. Podemos observar nas medidas de hiperespectro Raman o core e o halo na placa, destacando a imagem formada pelo pico da amida I em 1670 cm^{-1} , pelo pico associado aos lipídios com o valor de 2850 cm^{-1} e a sobreposição das imagens. Na parte inferior da figura temos a mesma placa medida pela técnica de SRS, utilizando os mesmos picos de amida I, lipídios e uma sobreposição. Podemos perceber que, uma vez conhecido o pico Raman que queremos utilizar, o SRS pode ser usado para fazer aquisições de imagens com um tempo que reduz as horas de experimento, necessarias para fazer um hiperespectro Raman (aproximadamente 14 horas para essas figuras), para alguns minutos usando o SRS (em geral 5 minutos para as medidas mais longas neste trabalho). Também usamos um laser pulsado com comprimento de onda maior e que tem uma maior penetração no tecido. Além disso, as imagens de SRS, pela natureza do método, não apresentam sinal não ressonante (ver seção 2.3), produzindo imagens mais nítidas, como pode ser visto no exemplo a seguir ou nas ref [29,111].

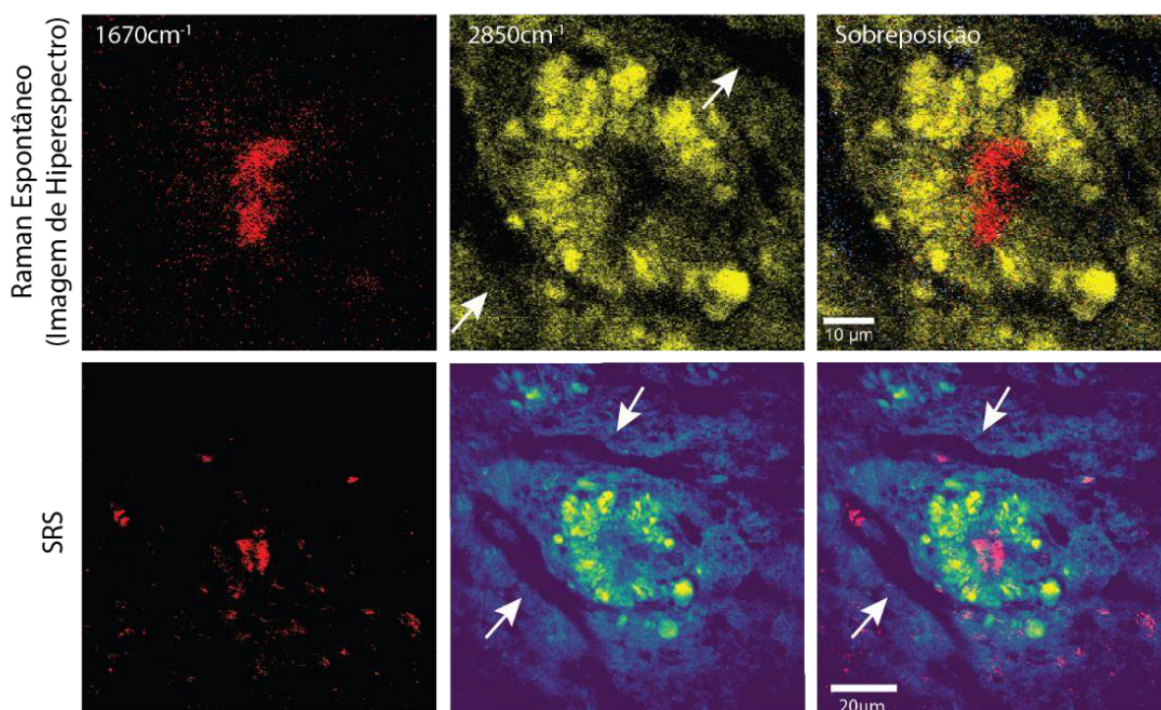


Figura 4.4.2.2: Na linha superior temos medidas de espectroscopia Raman com o hiperespectro do core (amida I) em 1670 cm^{-1} (vermelho), lipídio 2850 cm^{-1} (amarelo) e sobreposição das duas imagens. Na linha inferior temos as imagens de SRS para as mesmas frequências, em que é possível observar alguns vasos sanguíneos apontados pelas setas. Adaptado da ref. [111].

A fim de comparar diferentes técnicas de óptica não linear para caracterização de placas amiloide, realizamos um trabalho conforme a Ref. [19]. Neste trabalho possuo a primeira autoria, compartilhada com outros dois membros do grupo, e realizei os experimentos apresentados no artigo. Na figura 4.4.2.3, podemos ver em “A” uma imagem de campo claro de microscópio convencional, onde não é possível ver nenhuma característica da presença de uma placa amiloide em um tecido cerebral de camundongos transgênicos para doença de Alzheimer.

Na fig. 4.4.2.3-B temos a comprovação da placa amiloide pela marcação com Thioflavina S, que é um marcador fluorescente específico para placa amiloide, estimulada por TPEF, que foi feita ao final para confirmar a presença da placa amiloide. Na fig. 4.4.2.3-C temos uma imagem de TPEA, e em “D” temos uma imagem de SHG, ambas realizadas em uma placa amiloide. Em “E” vemos uma imagem formada selecionando o pico da amida I do hiperespectro Raman, já em “F” temos o SRS em ressonância com o pico da amida I. Por outro lado em “G” pode ser vista a imagem de SRS em ressonância com o pico associado aos lipídios em 2850 cm^{-1} e em “H” temos a imagem feita por CARS, que também está em ressonância com o pico associado aos lipídios. Todas as imagens foram realizadas na mesma placa amiloide e as setas indicam alguns vasos sanguíneos presentes no tecido.

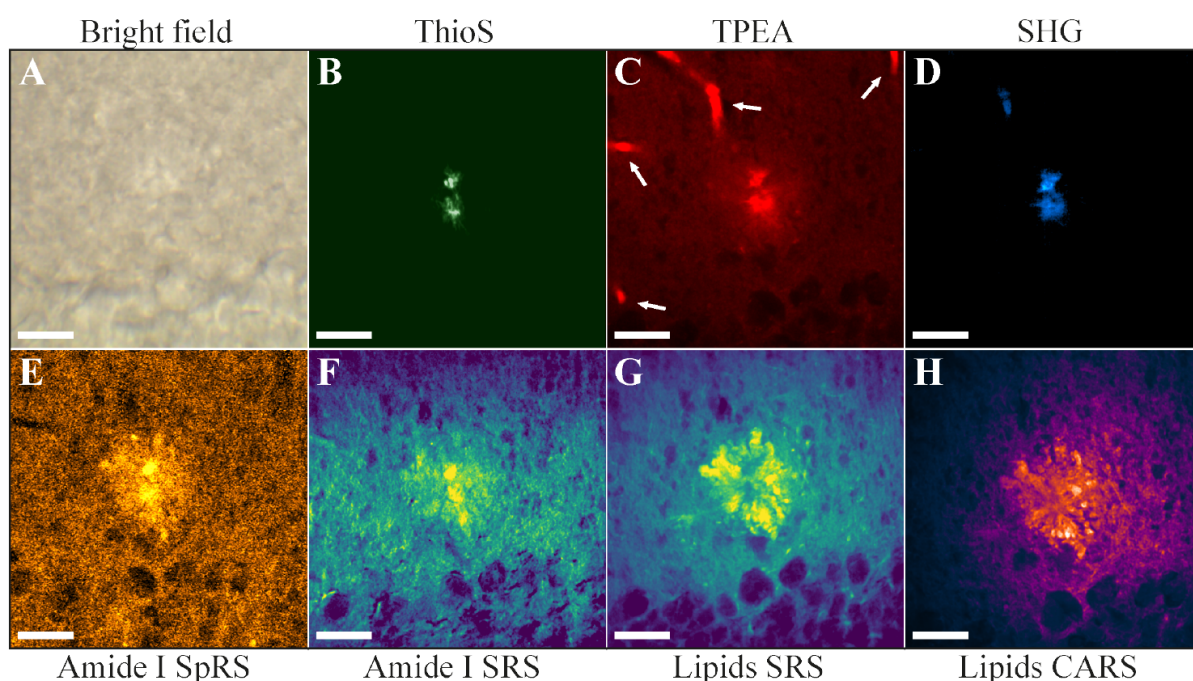


Figura 4.4.2.3: Imagens dos experimentos realizados com diferentes técnicas ópticas em tecido cerebral. Temos a imagem de campo claro em (A); tecido corado com Thioflavina S usando 830 nm (B); TPEA usando 830 nm em C; SHG usando laser de 810 nm em D; imagem do hiperespectro Raman da amida I relativo ao pico 1675 cm^{-1} , usando o laser de 532 nm em E; imagem de SRS ressonante com o pico da amida I usando dois feixes, um em 1064 nm e 903 nm em F; imagem de SRS ressonante com o halo lipídico em 2850 cm^{-1} , usando dois feixes pulsados em 1064 nm e 816 nm em G; por fim, temos uma imagem feita por CARS ressonante com o mesmo comprimento de onda que foi usado em G, mostrado em H. Adaptado da ref. [19].

Outro ponto a se destacar nesse trabalho foi o uso de outros marcadores associadas aos picos Raman, para fazer as imagens de SRS e que ainda não tinham sido explorados na literatura para a caracterização das placas. Estas medidas foram comparadas às imagens de SRS feitas em ressonância com os picos em 2850 cm^{-1} e 1670 cm^{-1} , demonstrados anteriormente. Na figura 4.4.2.4 em “A” temos o espectro Raman do halo e do core da placa amiloide do cérebro de um camundongo Tg. Podemos perceber na barra vermelha um pico que pode ser associado aos lipídios insaturados e a barra azul ao pico associado a amida B.

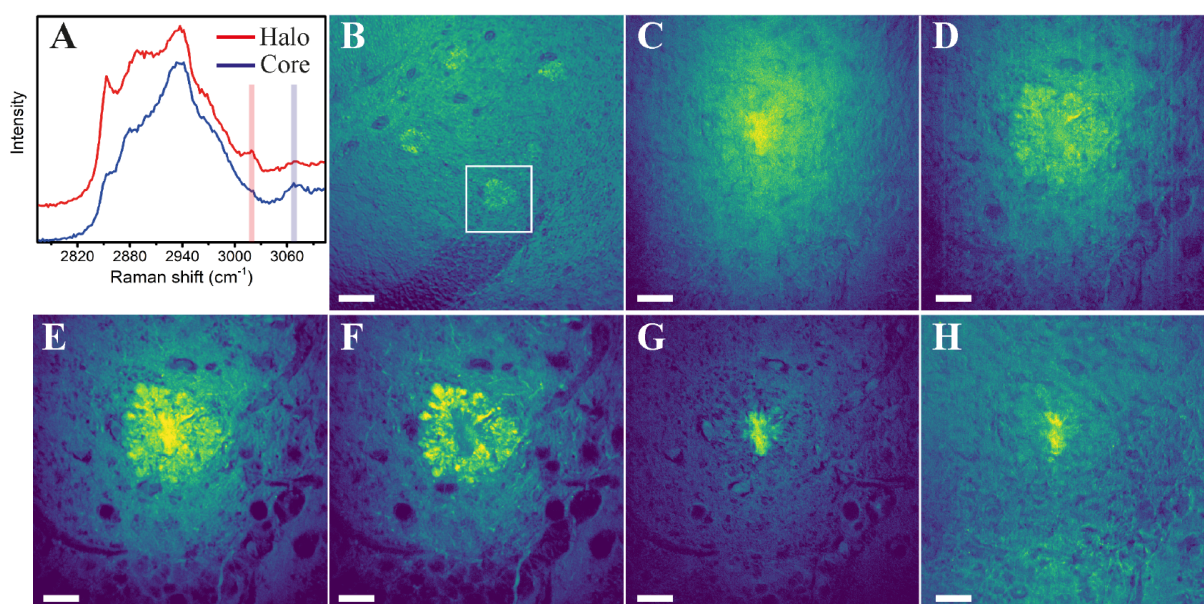


Figura 4.4.2.4: (A) Espectro Raman do halo (vermelho) e core (azul) na região de alta frequência. A barra vertical, em azul no espectro Raman, identifica a região de frequência da imagem de SRS mostrada em (C), enquanto a barra vermelha identifica a região de frequência da imagem em (D). (B) Visão geral da imagem SRS do hipocampo com várias placas β A. O retângulo branco identifica a placa em (C–H), a escala é de 60 μ m. (C) Imagem SRS realizada usando a frequência em 3070 cm^{-1} , atribuída à vibração da amida B. (D) imagem SRS tomada em 3019 cm^{-1} , atribuída aos lipídios insaturados. (E) Imagem SRS tirada a 2930 cm^{-1} (proteína/lipídios), (F) imagem SRS medida usando a frequência 2850 cm^{-1} (lipídios) e (G) a subtração das imagens em (E) e (F). (H) Imagem SRS feita usando a frequência em 1675 cm^{-1} , atribuída à vibração da amida I. Todas as barras de escala em (C)–(H) são 20 μ m. [19].

Pela primeira vez na literatura foi feito o imageamento por SRS dos picos associados à amida B em 3070 cm^{-1} (figura 4.4.2.4-C) e aos lipídios insaturados em 3019 cm^{-1} (figura 4.4.2.4-D). Nas demais figuras temos, em “B”, uma medida com SRS ressonante com o pico de lipídio (2850 cm^{-1}), com uma magnificação de 20x, mostrando algumas placas próximo ao hipocampo. Em “E” temos um pico lipoproteico associado ao pico Raman em 2930 cm^{-1} , em “F” temos a imagem associada ao pico Raman em 2850 cm^{-1} , em “G” vemos a subtração das imagens “E”-“F”, onde aparece o núcleo proteico e em “H” temos a imagem do SRS da amida I em 1675 cm^{-1} [19,29].

4.4.3. Determinação da idade dos modelos animais por PCA

Como já dito anteriormente, um dos objetivos do nosso trabalho foi diferenciar os animais por idade baseado nas medidas do espectro Raman das placas amiloides. Neste trabalho, minha contribuição foi realizar todas as medidas de óptica não linear e o auxílio na

interpretação dos dados de microscopia Raman. A partir dos nossos resultados foi possível perceber que há uma quantidade de placas maior no animal de 12 meses em relação ao de 6 meses, como esperado na literatura[121].

Com a finalidade de diferenciar os animais de 6 e 12 meses aplicamos a Análise de Componente Principal (PCA) nas varreduras de hiperespectro Raman das placas. Como pode ser visto na tese de Fonseca (2020) [111], a análise por componente principal tem sido amplamente utilizada em estudos por espectroscopia Raman [122–124] como ferramenta para se determinar os picos associados aos modos de vibração de componentes biológicos baseados no espectro Raman. Utilizamos a PCA para analisar faixas de espectros específicas, onde selecionamos regiões espectrais com um intervalo de 10 cm^{-1} em torno das seguintes frequências: 424 cm^{-1} , 707 cm^{-1} , 725 cm^{-1} , 1007 cm^{-1} , 1670 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} , 2930 cm^{-1} , que podem ser vistas na figura 4.4.1.1 mostrada no capítulo 4.4.1. [110,111].

Das sete frequências analisadas, foi possível identificar qual dessas frequências é mais efetiva para diferenciar os animais controle dos animais transgênicos, e dentre os animais transgênicos, os de 6 meses e os de 12 meses de idade. Na figura 4.4.3.1-a podemos observar a quantidade de espectros pelo desvio da primeira componente principal (PC1) e vemos uma clara tendência de diferenciação. Esta diferenciação fica mais clara quando observamos a figura 4.4.3.1-b onde temos os desvios dos valores da PC1 em relação ao número de onda relativo que, da esquerda para a direita, são os valores 424 cm^{-1} , 707 cm^{-1} , 725 cm^{-1} , 1007 cm^{-1} , 1670 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} , 2930 cm^{-1} . Os resultados demonstram que há uma tendência de variação entre animais Tg de 6 e 12 meses para todas as frequências analisadas. Em valores absolutos da PC1 se destaca a região espectral centrada em 2930 cm^{-1} , relacionada ao estiramento de CH_3 que constituem os lipídios e proteínas [111].

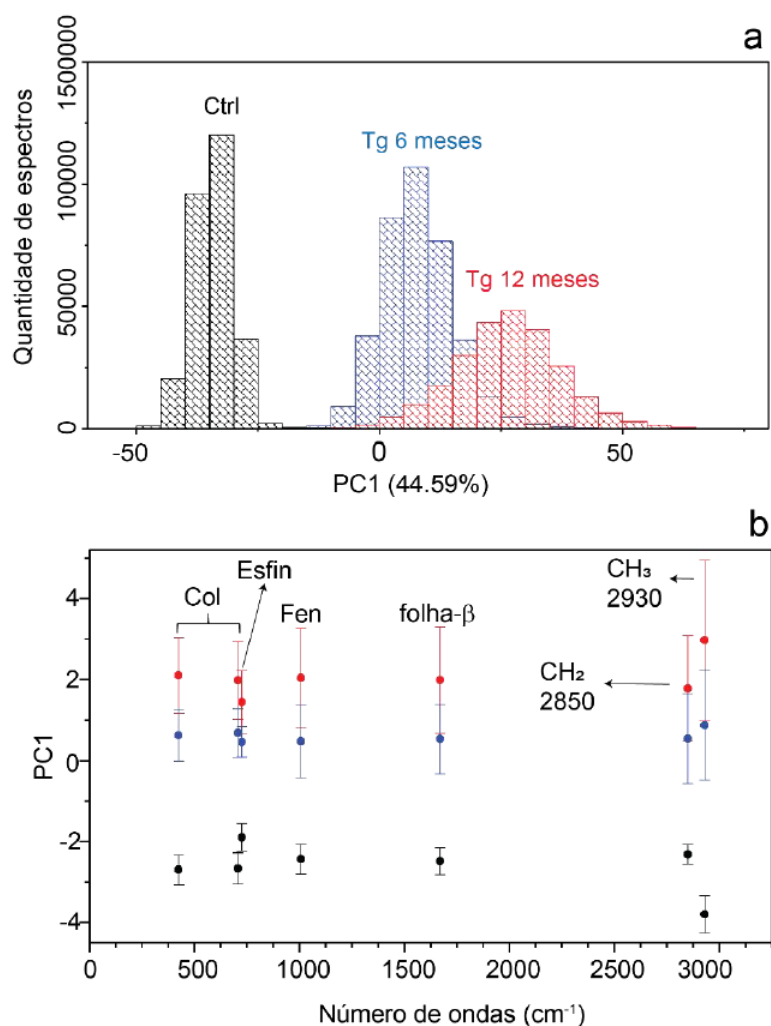


Figura 4.4.3.1: Análise de PCA com animais Ctrl, Tg 6 e Tg 12 meses onde vemos (a) Diferença PC1 entre camundongos controles (barras pretas), entre camundongos Tg de 6 meses (barras azuis) e 12 meses de idade (barras vermelhas). b) Histograma mostrado a PC1 para cada frequência (424 cm^{-1} , 707 cm^{-1} , 725 cm^{-1} , 1007 cm^{-1} , 1670 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} , 2930 cm^{-1}). As varreduras do Ctrl são representadas em preto, Tg de 6 meses de azul e Tg de 12 meses em vermelho. Adaptado da ref. [111].

Devido a prevalência de lipídios no halo da placa, como visto nas seções anteriores analisamos, também, as frequências de 424 cm^{-1} e 707 cm^{-1} , relacionadas ao colesterol, e 725 cm^{-1} , relacionada à esfingomiélna (lipídio muito presente na membrana celular, sobretudo na bainha de miélna das células do tecido nervoso), e observamos que são modos Raman capazes de diferenciar os animais Tg 6 meses e Tg 12 meses, como pode ser visto na figura 4.4.3.1.

Na figura 4.4.3.2-A temos os espectros comparando a medida na placa amiloide, no halo lipídico e no tecido saudável adjacente ao halo, destacando as frequências de colesterol (chol) 424 cm^{-1} e 707 cm^{-1} ; esfingomiélna (SM) 725 cm^{-1} e fenilalanina (Phe) 1004 cm^{-1} . Na figura 4.4.3.2-B temos imagens geradas pelo hiperespectro Raman, relacionados ao halo

lipídico da placa amiloide, para camundongos Tg de 6 e 12 meses. Podemos perceber que há uma maior nitidez nas imagens formadas nos animais Tg de 12 meses, o que sugere uma maior intensidade e, portanto, acúmulo de lipídios [111].

Uma análise visual dos nossos resultados sugere que o acúmulo de lipídios nos animais mais velhos seja maior que nos animais mais jovens, porém, não foi possível precisar quantitativamente essa diferença. Uma análise biológica mais aprofundada pode ser encontrada na referência de Fonseca *et al.* [110].

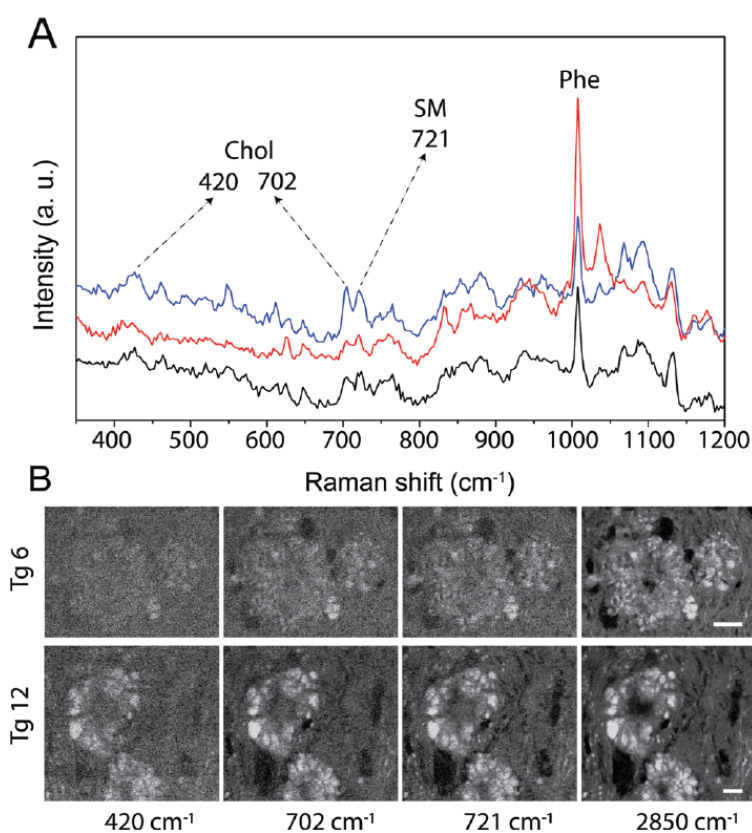


Figura 4.7.2: (A) Espectro Raman de uma animal Tg de 12 meses mostrando as frequências de colesterol (424 cm^{-1} , 707 cm^{-1}), esfingomielina (725 cm^{-1}) e fenilalanina (1004 cm^{-1}). Medidas no halo (em azul), no core da placa amiloide (em vermelho) e no tecido saudável (em preto). (B) Imagens de hiperespectro Raman da placa amiloide em animais de 6 e 12 meses mostrando o halo lipídico para diferentes frequências. Nos animais de 12 meses a imagem apresenta maior nitidez e intensidade do halo, sugerindo maior concentração de lipídio. A barra de escala usada foi de $20\text{ }\mu\text{m}$ para Tg de 6 meses e $10\text{ }\mu\text{m}$ Tg de 12 meses. [110].

4.4.4 TPEF e SRS para identificação das placas

Existe um interesse científico em determinar quais componentes celulares estão associados à placa amiloide. Na seção 4.2 deste capítulo abordamos brevemente os tipos de células que compõem o SNC, agora nos interessa saber quais destes tipos celulares estão

associados à placa amiloide, e como formariam o halo lipídico. Alguns trabalhos sugerem que neurônios distróficos, ou neuritos (partes do neurônio) distróficos, são parte do halo que é formado em torno da placa. Neste caso, eles se apresentariam com grande inchaço, em função de interrupção do transporte vesicular, devido a alguma disfunção na estrutura da célula [125,126]. Isso é sugerido no trabalho de Condello *et al.* [108], que associa o halo formado nas placas amiloide a neuritos distróficos. No entanto, como se sabe, células da glia participam de processos inflamatórios como os decorrentes da formação da placa amiloide, o que sugere que também deveriam participar da formação da placa [109].

Paralelamente, no trabalho de Palombo *et al.* [109] foi sugerido que a borda lipídica observada por espectroscopia Raman é formada por astrócitos reativos, como podemos ver na figura 4.4.4.1, que apresenta mapas derivados de espectroscopia Raman na linha superior referentes ao core da placa (a) e ao halo lipídico (b), e na linha inferior temos imagens de imunofluorescência usando um marcador para a placa amiloide (c) e anti-GFAP para marcar os astrócitos (d). Porém, como pode ser observado na referência [109], as placas usadas na linha superior são diferentes da linha inferior, não permitindo portanto, fazer uma correlação direta entre as duas imagens.

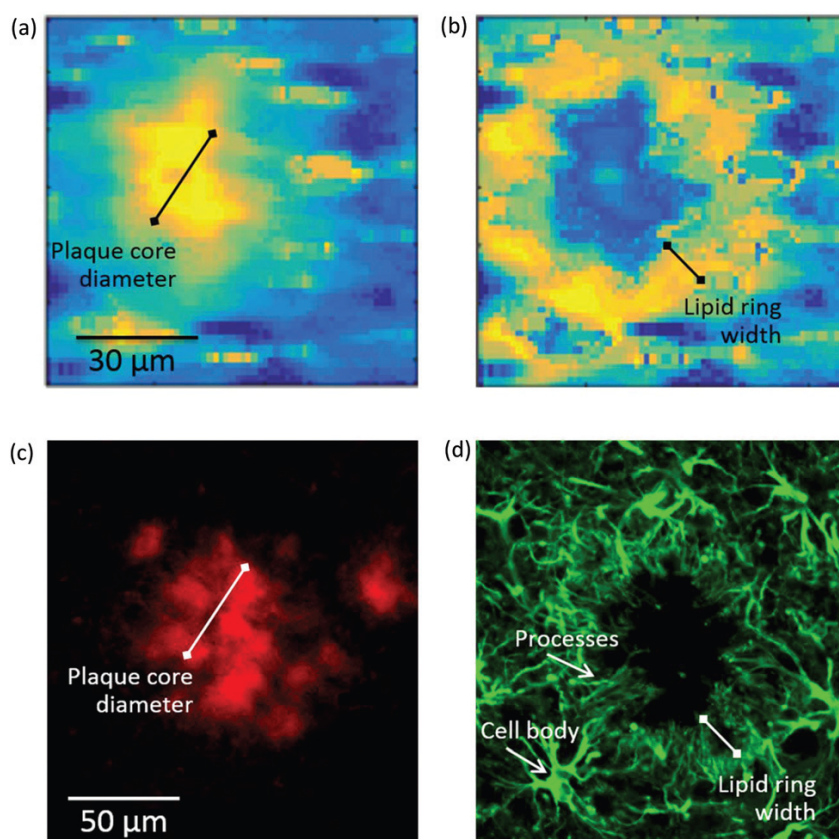


Figura 4.4.4.1: Imagens de placa amiloide de um camundongo transgênico onde podemos observar na linha superior os resultados da PCA derivados de um mapa Raman. Em (a) temos a PCA que denota o núcleo proteico da placa, e em (b) mostrando o halo lipídico ao redor do núcleo da placa. Na linha inferior temos as imagens de imunofluorescência corado com (c) amylo-glo para peptídeo β A e (d) anti-GFAP para os astrócitos. A placa representada em (a) e (b) é diferente daquela em (c) e (d). As setas indicam a localização dos processos e corpos celulares. [109].

Já no trabalho de Condello *et al.* [108] o tecido é marcado com imunomarcadores para detectar a presença de neuritos distróficos (Lamp1 e Ubiquitin) e microglia (Iba-1). Na figura 4.4.4.2-a pode ser observada a marcação dos neuritos distróficos, a esquerda, com Lamp1 (em roxo) com a placa amiloide marcada por tioflavina S (em azul), na segunda imagem, ao centro, podemos observar a marcação das microglias na mesma placa com Iba-1 (em verde) com a placa amiloide (em azul), na terceira imagem, a direita, mostra uma superposição entre as duas imagens anteriores. Na figura 4.4.4.2-b vemos em uma outra placa a marcação dos neuritos distróficos com ubiquitina (em cinza) com a placa amiloide marcada por tioflavina S (em azul), a esquerda, na segunda imagem, ao centro, temos a marcação das microglias na mesma placa com Iba-1 (em verde) com a placa amiloide (em azul) e a terceira, a direita, vemos a superposição entre a primeira e a segunda imagens. Percebemos pela

imunomarcação, que esses neuritos distróficos se apresentam como uma massa amorfa de grandes bolhas de membranas [108].

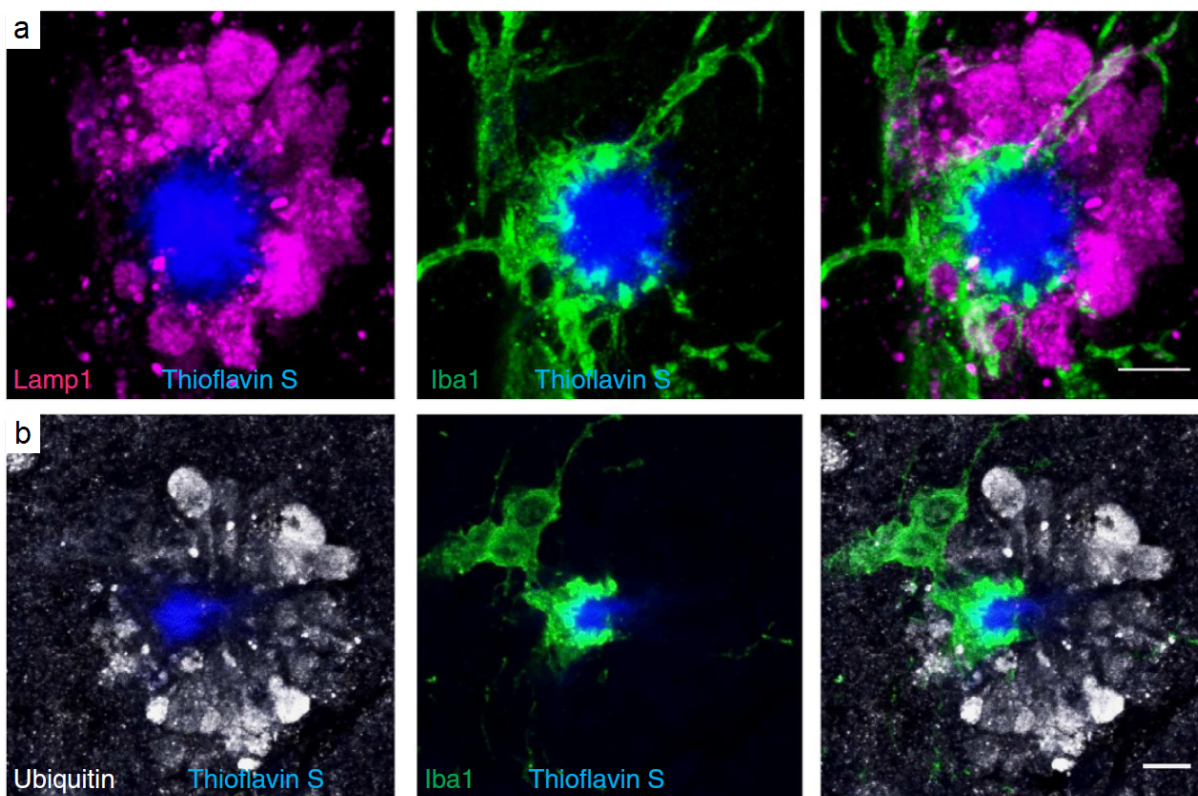


Figura 4.4.4.2: Imagens da placa amiloide (azul), microglia (verde), e neuritos distróficos (roxo e cinza). A escala de todas as barras em Condello *et al.* é de 5 μm . Adaptado da ref. [108].

Com o intuito de explorar essa divergência na literatura, fizemos a imunomarcação dos tecidos, após aquisição de imagem SRS. Na imagem 4.4.4.3 podemos ver a sequência de medidas em que desenvolvemos nosso trabalho. Primeiramente, medimos a placa amiloide com SRS, em ressonância com o pico dos lipídios (2850 cm^{-1}), onde podemos observar o halo e delimitamos a área da placa com uma linha branca, logo após, marcamos os astrócitos com anti-GFAP (em verde), as microglias foram marcadas com anti-Iba1 (em vermelho), em seguida marcamos o core com Thioflavina S, para garantir que de fato era uma placa amiloide, e por fim fizemos uma superposição das imagens. Podemos observar que os astrócitos (em verde) próximos a placa não correspondem à área de borda lipídica que observamos no SRS. Este também é o caso das micróglias (em vermelho), que muitas vezes são associadas às placas, porém, não explicam toda essa borda densa de lipídio.

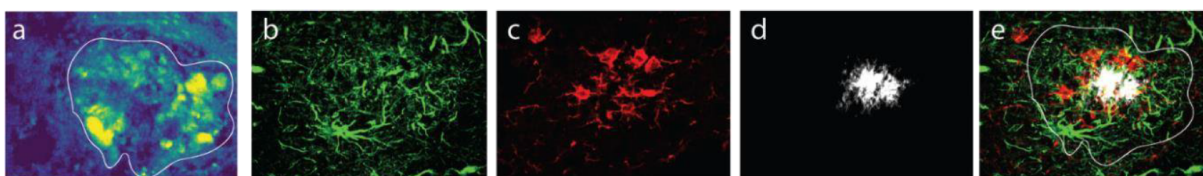


Figura 4.4.4.3: Imagem SRS de borda lipídica e imunofluorescência de células da glia (a) SRS de lipídio. Imagem de TPEF mostrando células da glia imunomarcadas; (b) imunopositividade para GFAP em astrócitos, (c) imunopositividade para Iba-1 em micróglia, (d) placa amiloide marcada por Thio S, (e) Sobreposição das imagens de imunofluorescência. Objetiva 60x de imersão em óleo. Barra de escala 10 μm . [111].

Podemos observar a partir dos nossos resultados que, diferente do que foi sugerido por Palombo *et al.* [109], a borda lipídica não é formada apenas por astrócitos reativos, já que o conjunto deles não reproduz a área lipídica observada por SRS. E embora haja muita microglia intimamente ligada à placa, e que, mesmo associadas aos astrócitos, não explicam completamente a área delimitada pela densa borda lipídica identificada pelas vibrações de CH_2 e CH_3 . Esse resultado é corroborado em uma segunda medida, mostrada na figura 4.4.4.4, onde podemos observar uma imagem de placas próximas ao hipocampo. Na figura 4.4.4.4 (a), podemos ver a região do hipocampo com uma magnificação de 20x, onde temos duas regiões: na região I temos uma placa cujas medidas correspondem às figuras de (b) a (e); na região II temos três placas que correspondem às medidas das figuras (f) a (i), que se referem às imagens feitas por SRS, TPEF da microglia, TPEF do astrócito e a superposição dessas três imagens com uma magnificação de 60x.

O que fica sugerido pelas medidas de SRS é que existem estruturas celulares disformes formando bolhas de membrana lipídica, que apresentam a morfologia muito semelhante à observada por Condello *et al.* [111]. Analisando os dados e a literatura, podemos concluir que a borda lipídica que se observa nas imagens de hiperespectro e SRS seria composta por neuritos distróficos, além de microglias ativadas e astrócitos reativos que circundam as placas amiloide.

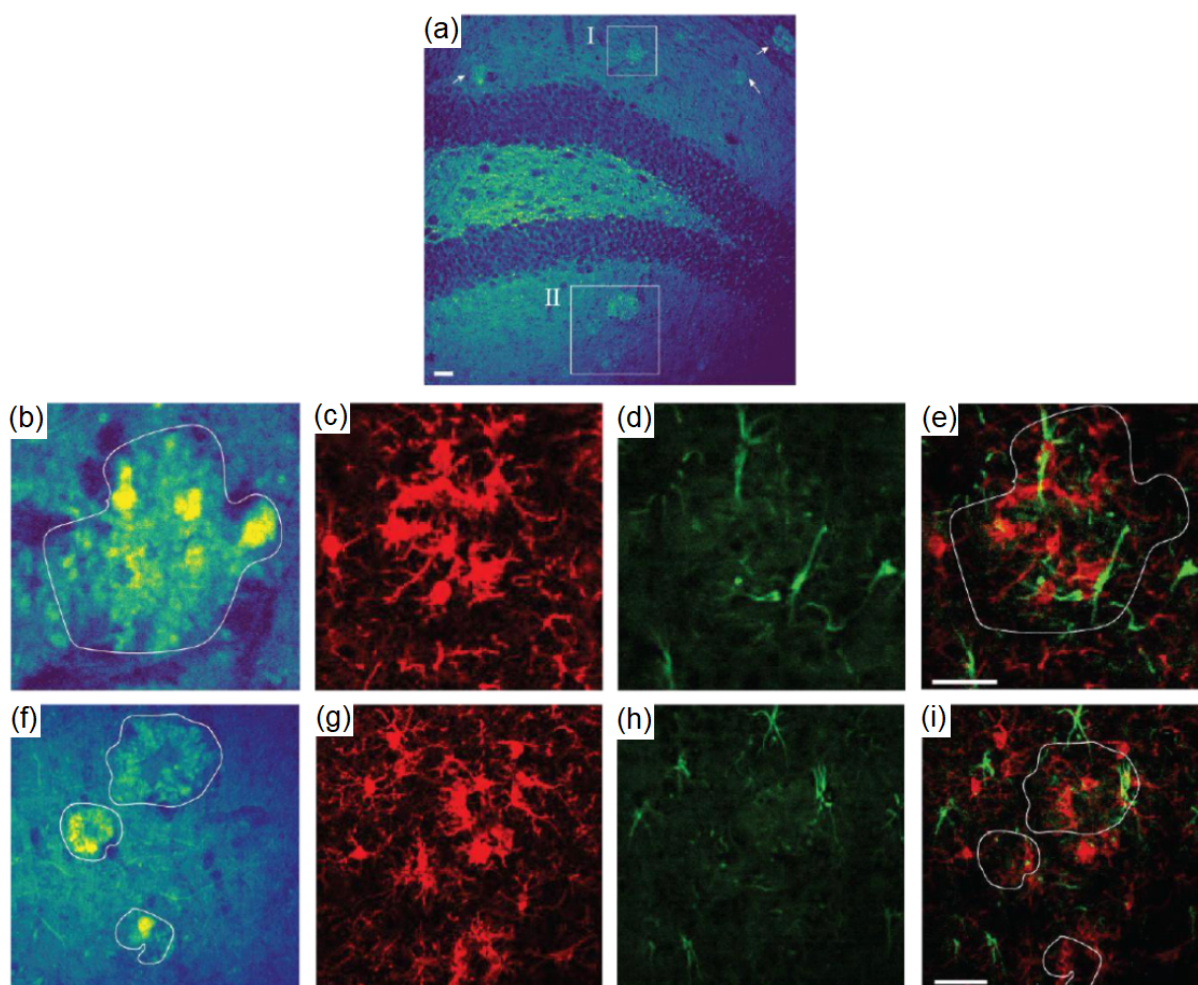


Figura 4.4.4.4: Imagem SRS de borda lipídica e imunofluorescência de células da glia; em (a) SRS de lipídio cujos quadrados delimitam as regiões com densas bordas de lipídio em torno de placas, destacadas em maior aumento em (b) (I) e (f) (II); (c, g) imunopositividade para Iba-1 em micrógliã; (d, h) imunopositividade para GFAP em astrócitos; (e, i) sobreposição da imunomarcacão para micrógliã e astrócito. Note que a área delimitada referente à borda lipídica observada no SRS não corresponde à área onde se encontram as células da glia. Objetiva 20x (a); objetiva 60x (b-i). Barra de escala 20 μm . Adaptado da ref. [111].

Para confirmar de forma inequívoca que as medidas de SRS se relacionam com neurônios distróficos, para além de uma análise apenas baseada na semelhança das imagens, como as apresentadas na figura 4.4.4.2 e as realizadas neste trabalho, seria necessário a medida de SRS e subsequente marcação com um anticorpo, que poderia ser o Lamp1, para a visualização dos neurônios, o que deve ser realizado em breve, uma vez confirmada essa análise dos neuritos distróficos fica demonstrado a eficiência do nosso método, o que abre uma nova possibilidade para o estudo de neurodegeneração na doença de Alzheimer pelo uso do SRS.

4.5. Conclusões sobre os materiais biológicos

Em relação as amostras biológicas podemos afirmar que as técnicas não lineares tem de fato uma contribuição relevante para o avanço da área. Além disso, é importante frisar a eficiência do Raman convencional como ferramenta de caracterização dos tecidos a partir da sua composição bioquímica. Tendo em mãos os resultados do Raman e sabendo os picos de interesse, o CARS e o SRS se apresentam como técnicas de mapeamento importantes para o desenvolvimento de tecnologias para imageamento e livres de marcadores fluorescentes. Isso pode ser um ganho imenso para área diagnóstica, pois dá uma maior possibilidade para que sejam realizados estudos *in vivo*, uma vez que não necessitam de outros componentes que não sejam a própria luz do laser.

Dessa maneira, podemos concluir que as técnicas ópticas já são capazes de proporcionar imagens de alta resolução espacial e espectral, onde podemos fazer análises mais elaboradas da morfologia, bem como diferenciar amostras de animais com Alzheimer em diferentes estágio da evolução da doença. Além disso, foi possível demonstrar a capacidade do SRS em imagear diferentes tipos de marcadores bioquímicos das placas amiloide, o que nos dá uma nova ferramenta de análise para o estudo desses tipos de materiais.

5. Considerações finais e perspectivas

No que diz respeito às técnicas não lineares de forma geral, podemos dizer que foi possível demonstrar como essas técnicas puderam evoluir ao longo dos últimos anos, se tornando, não somente um fenômeno físico a ser estudado, mas também uma ferramenta muito útil e capaz de nos fornecer novas informações que as técnicas convencionais não nos fornecem, com a mesma qualidade, ou em um tempo de aquisição menor. Além disso, pudemos perceber a versatilidade desses fenômenos, que tem aplicações tanto em nanomateriais, quanto em materiais biológicos, alterando apenas alguns parâmetros dentro do mesmo sistema.

No que diz respeito aos nanomateriais, demonstramos a capacidade do SHG e do FWM de identificar a energia dos éxcitons, devido a sua ressonância, bem como de medir as susceptibilidades elétricas de segunda e terceira ordem. Foi, também neste trabalho, a primeira vez que o FWM foi usado para medir a susceptibilidade elétrica de terceira ordem em monocamadas de TMD, e apresentou resultados compatíveis com experimentos que utilizaram THG. Além disso, foi a primeira vez que o FWM foi usado para medir a ressonância com os éxcitons em monocamadas de TMDs, demonstrando ser uma excelente ferramenta para esse tipo de medida, inaugurando mais uma possibilidade de estudo com óptica não linear de terceira ordem para análise e classificação de materiais.

Em relação aos materiais biológicos, podemos dizer que as técnicas não lineares associadas ao Raman puderam trazer grandes contribuições na análise das amostras estudadas. A espectroscopia Raman de fato é uma técnica que tem muito a ser explorada na área biológica e seus efeitos estimulados não lineares, como o SRS, podem fazer com que a maior barreira para estudos em amostras biológicas seja superada, que é o tempo de exposição das amostras, que pode ser reduzido de várias horas para apenas alguns minutos ou até segundos. Além disso, ficou demonstrado como outras técnicas podem nos fornecer diferentes respostas do mesmo material, mas sem dúvida as técnicas de Raman, seja convencional ou estimulado, são as que demonstram ser mais assertivas e versáteis no que diz respeito a extrair informações das amostras.

Sendo assim, acredito que nossa proposta foi cumprida, permitindo outros caminhos a serem explorados, como por exemplo, na área de materiais onde podemos realizar estudos dos éxcitons usando técnicas não lineares em baixa temperatura, ou mesmo dopando com vacâncias ou outros materiais, ou aplicar essas técnicas ao estudo de heteroestruturas. Por outro lado, a parte do estudo de Alzheimer deve ter continuidade com o estudo de beta-amiloide na retina, algo que já havia iniciado há algum tempo, porém ainda sem grandes avanços. Os próximos passos devem, no entanto, ser no sentido de migrarmos para tecido humano e no aprimoramento da técnica e do desenvolvimento de protótipos que, futuramente, possibilitem o desenvolvimento de um aparelho de diagnóstico.

6. Lista de publicações

As minhas principais publicações que tiveram impacto direto na escrita da tese foram:

1. **Lafeta, L.**, Corradi, A., Zhang, T., Kahn, E., Bilgin, I., Carvalho, B. R., Kar, S., Terrones, M., Malard, L. M.* (2021): Second- and third-order optical susceptibilities across exciton states in 2D monolayer transition metal dichalcogenides. In: 2D Materials. 8, 035010.
2. Cunha, R.¹, **Lafeta, L.**¹, Fonseca, E. A.¹, Barbosa, A., Romano-Silva, M. A., Vieira, R., Jorio, A., Malard, L. M.* (2021): Nonlinear and vibrational microscopy for label-free characterization of amyloid- β plaques in Alzheimer's disease model. In: Analyst. 146, 2945–54. ¹ Igual contribuição.
3. Fonseca, E. A.*¹, **Lafeta, L.**¹, Campos, J., Cunha, R., Barbosa, A., Romano-Silva, M. A., Vieira, R., Malard, L. M., Jorio, A. (2021): Micro-Raman spectroscopy of lipid halo and dense-core Amyloid plaques: aging process characterization in the Alzheimer's disease APPswePS1 Δ E9 mouse model. In: Analyst. 146, 6014–25. ¹ Igual contribuição.
4. Fonseca, E. A., **Lafeta, L.**, Cunha, R., Miranda, H., Campos, J., Medeiros, H. G., Romano-Silva, M. A., Silva, R. A., Barbosa, A. S., Vieira, R. P., Malard, L. M., Jorio, A.* (2019): A fingerprint of amyloid plaques in a bitransgenic animal model of Alzheimer's disease obtained by statistical unmixing analysis of hyperspectral Raman data. In: Analyst. 144, 7049–56.

Outras publicações feitas durante o meu doutoramento:

5. Sousa, F. B., **Lafeta, L.**, Cadore, A. R., Sahoo, P. K. and Malard, L. M.* (2021): Revealing atomically sharp interfaces of two-dimensional lateral heterostructures by second harmonic generation. In: 2D Materials. 8, 035051.
6. Malard, L. M.*, **Lafeta, L.**, Cunha, R., Nadas, R., Gadelha, A., Cancado, L. G.*, Jorio, A.* (2021): Studying 2D materials with advanced Raman spectroscopy: CARS, SRS and TERS. Accepted manuscript in: Phys. Chem. Chem. Phys. 23, 23428-23444.
7. Gadelha, A. C., Cadore, A. R., **Lafeta, L.**, Paula, A. M. de, Malard, L. M., Lacerda, R. G., Campos, L. C.* (2020): Local photodoping in monolayer MoS₂. In: Nanotechnology. 31, 255701.

Referências

- [1] Maiman T H 1960 Stimulated Optical Radiation in Ruby *Nature* **187** 493–4
- [2] Franken P A, Hill A E, Peters C W and Weinreich G 1961 Generation of Optical Harmonics *Phys. Rev. Lett.* **7** 118–9
- [3] Schneider T 2004 *Nonlinear Optics in Telecommunications* (Springer Science & Business Media)
- [4] Tuchin V V, Popp J and Zakharov V 2020 *Multimodal Optical Diagnostics of Cancer* (Springer Nature)
- [5] Ngo G Q, George A, Schock R T K, Tuniz A, Najafidehaghani E, Gan Z, Geib N C, Bucher T, Knopf H, Saravi S, Neumann C, Lühder T, Schartner E P, Warren-Smith S C, Ebendorff-Heidepriem H, Pertsch T, Schmidt M A, Turchanin A and Eilenberger F 2020 Scalable Functionalization of Optical Fibers Using Atomically Thin Semiconductors *Adv. Mater.* **32** 2003826
- [6] Lafetá L, Cadore A R, Mendes-de-Sa T G, Watanabe K, Taniguchi T, Campos L C, Jorio A and Malard L M 2017 Anomalous Nonlinear Optical Response of Graphene Near Phonon Resonances *Nano Lett.* **17** 3447–51
- [7] Malard L M, Lafeta L, Cunha R S, Nadas R, Gadelha A, Cançado L G and Jorio A 2021 Studying 2D materials with advanced Raman spectroscopy: CARS, SRS and TERS *Phys. Chem. Chem. Phys.* **23** 23428–44
- [8] Li X, Wu L, Hao L and Fu Y 2018 Chapter 5 - Emerging 2D Nanomaterials for Supercapacitor Applications *Emerging Materials for Energy Conversion and Storage* ed K Y Cheong, G Impellizzeri and M A Fraga (Elsevier) pp 155–83
- [9] Eftekhari A 2017 Tungsten dichalcogenides (WS_2 , WSe_2 , and WTe_2): materials chemistry and applications *J. Mater. Chem. A* **5** 18299–325
- [10] Splendiani A, Sun L, Zhang Y, Li T, Kim J, Chim C-Y, Galli G and Wang F 2010 Emerging Photoluminescence in Monolayer MoS_2 *Nano Lett.* **10** 1271–5
- [11] Radisavljevic B, Radenovic A, Brivio J, Giacometti V and Kis A 2011 Single-layer MoS_2 transistors *Nat. Nanotechnol.* **6** 147–50
- [12] Sundaram R S, Engel M, Lombardo A, Krupke R, Ferrari A C, Avouris Ph and Steiner M 2013 Electroluminescence in Single Layer MoS_2 *Nano Lett.* **13** 1416–21
- [13] Lopez-Sanchez O, Lembke D, Kayci M, Radenovic A and Kis A 2013 Ultrasensitive photodetectors based on monolayer MoS_2 *Nat. Nanotechnol.* **8** 497–501
- [14] Lin Y 2014 *Optical properties of two-dimensional transition metal dichalcogenides* Thesis (Massachusetts Institute of Technology)
- [15] Marhic M E, Hsia C H and Jeong J-M 1991 Optical amplification in a nonlinear fibre interferometer *Electron. Lett.* **27** 210–1
- [16] Dudley J M and Taylor J R 2010 *Supercontinuum Generation in Optical Fibers* (Cambridge University Press)
- [17] Bikorimana S, Lama P, Walser A, Dorsinville R, Anghel S, Mitioglu A, Micu A and Kulyuk L 2016 Nonlinear optical responses in two-dimensional transition metal dichalcogenide multilayer: WS_2 , WSe_2 , MoS_2 and $Mo_{0.5}W_{0.5}S_2$ *Opt. Express* **24** 20685–95

- [18] Fonseca E A, Lafetá L, Cunha R, Miranda H, Campos J, Medeiros H G, Romano-Silva M A, Silva R A, Barbosa A S, Vieira R P, Malard L M and Jorio A 2019 A fingerprint of amyloid plaques in a bitransgenic animal model of Alzheimer's disease obtained by statistical unmixing analysis of hyperspectral Raman data *Analyst* **144** 7049–56
- [19] Cunha R, Lafeta L, Fonseca E A, Barbosa A, Romano-Silva M A, Vieira R, Jorio A and Malard L M 2021 Nonlinear and vibrational microscopy for label-free characterization of amyloid- β plaques in Alzheimer's disease model *Analyst* **146** 2945–54
- [20] Boyd R W 2003 *Nonlinear Optics* (Elsevier)
- [21] Shen Y R 2002 *The Principles of Nonlinear Optics* (Hoboken, N.J: Wiley-Interscience)
- [22] Lucas Lafetá Prates da Fonseca. 2017 *Propriedades ópticas não-lineares de terceira ordem em materiais bi-dimensionais*, Dissertação de mestrado (Programa de Pós graduação em Física da UFMG)
- [23] Maiman T H 1960 Stimulated Optical Radiation in Ruby *Nature* **187** 493–4
- [24] Adriana Quintero Rojas G 2005 *Polarização eletrotérmica de vidros e fibras ópticas*. Tese de doutorado (Rio de Janeiro, Brazil: PUC-RJ)
- [25] Raman C V and Krishnan K S 1928 A New Type of Secondary Radiation *Nature* **121** 501–2
- [26] Raman C V 1928 A Change of Wave-length in Light Scattering *Nature* **121** 619–619
- [27] Fox M 2010 *Optical Properties of Solids 2/e* (Oxford ; New York: Oxford University Press, U.S.A.)
- [28] Jorio A, Dresselhaus M S, Saito R and Dresselhaus G 2011 *Raman Spectroscopy in Graphene Related Systems* (Weinheim, Germany: Wiley-VCH)
- [29] Renan Souza Cunha. 2021 *Nonlinear optics in Alzheimer's disease and two-dimensional materials*, Tese de doutorado (Programa de Pós graduação em Física da UFMG)
- [30] Yu P Y and Cardona M 2010 *Fundamentals of Semiconductors* (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg)
- [31] Jenaina Ribeiro Soares . 2014 *Group theory and Raman spectroscopy applied to the study of vibrational properties of two-dimensional materials*, Tese de doutorado (Programa de Pós graduação em Física da UFMG)
- [32] Perkowitz S 2012 *Optical Characterization of Semiconductors: Infrared, Raman, and Photoluminescence Spectroscopy* (Elsevier)
- [33] Gorbachev R V, Riaz I, Nair R R, Jalil R, Britnell L, Belle B D, Hill E W, Novoselov K S, Watanabe K, Taniguchi T, Geim A K and Blake P 2011 Hunting for Monolayer Boron Nitride: Optical and Raman Signatures *Small* **7** 465–8
- [34] Leandro Malard Moreira. 2009 *Raman spectroscopy of graphene: probing phonons, electrons and electron-phonon interactions*, Tese de doutorado (Programa de Pós graduação em Física da UFMG)
- [35] Evans C L and Xie X S 2008 Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy: Chemical Imaging for Biology and Medicine *Annu. Rev. Anal. Chem.* **1** 883–909
- [36] Rafael Ricardo Rojas López. 2018 *Optical properties of transition metal dichalcogenides on GaAs*, Dissertação de mestrado (Programa de Pós graduação em Física da UFMG)
- [37] Lv R, Robinson J A, Schaak R E, Sun D, Sun Y, Mallouk T E and Terrones M 2015 Transition Metal Dichalcogenides and Beyond: Synthesis, Properties, and Applications of Single- and Few-Layer Nanosheets *Acc. Chem. Res.* **48** 56–64
- [38] Anna Carolina Marx Gonçalves. 2019 *Optical properties of suspended and supported MoS₂ monolayers*, Dissertação de mestrado (Programa de Pós graduação em Física da UFMG)

- [39] Kuc A, Zibouche N and Heine T 2011 Influence of quantum confinement on the electronic structure of the transition metal sulfide TS_2 *Phys. Rev. B* **83** 245213
- [40] Zhu Z Y, Cheng Y C and Schwingenschlögl U 2011 Giant spin-orbit-induced spin splitting in two-dimensional transition-metal dichalcogenide semiconductors *Phys. Rev. B* **84** 153402
- [41] Sun Y, Wang D and Shuai Z 2016 Indirect-to-Direct Band Gap Crossover in Few-Layer Transition Metal Dichalcogenides: A Theoretical Prediction *J. Phys. Chem. C* **120** 21866–70
- [42] Yang X L, Guo S H, Chan F T, Wong K W and Ching W Y 1991 Analytic solution of a two-dimensional hydrogen atom. I. Nonrelativistic theory *Phys. Rev. A* **43** 1186–96
- [43] Chernikov A, Berkelbach T C, Hill H M, Rigosi A, Li Y, Aslan O B, Reichman D R, Hybertsen M S and Heinz T F 2014 exciton Binding Energy and Nonhydrogenic Rydberg Series in Monolayer WS_2 *Phys. Rev. Lett.* **113** 076802
- [44] Mueller T and Malic E 2018 exciton physics and device application of two-dimensional transition metal dichalcogenide semiconductors *Npj 2D Mater. Appl.* **2** 29
- [45] Kaviraj B and Sahoo D 2019 Physics of excitons and their transport in two dimensional transition metal dichalcogenide semiconductors *RSC Adv.* **9** 25439–61
- [46] Li Y, Chernikov A, Zhang X, Rigosi A, Hill H M, van der Zande A M, Chenet D A, Shih E-M, Hone J and Heinz T F 2014 Measurement of the optical dielectric function of monolayer transition-metal dichalcogenides: MoS_2 , MoSe_2 , WS_2 , and WSe_2 *Phys. Rev. B* **90** 205422
- [47] Malard L M, Alencar T V, Barboza A P M, Mak K F and de Paula A M 2013 Observation of intense second harmonic generation from MoS_2 atomic crystals *Phys. Rev. B* **87** 201401
- [48] Kumar N, Najmaei S, Cui Q, Ceballos F, Ajayan P M, Lou J and Zhao H 2013 Second harmonic microscopy of monolayer MoS_2 *Phys. Rev. B* **87** 161403
- [49] Wang G, Marie X, Gerber I, Amand T, Lagarde D, Bouet L, Vidal M, Balocchi A and Urbaszek B 2015 Giant Enhancement of the Optical Second-Harmonic Emission of WSe_2 Monolayers by Laser Excitation at exciton Resonances *Phys. Rev. Lett.* **114** 097403
- [50] Nodop D, Jauregui C, Schimpf D, Limpert J and Tünnermann A 2009 Efficient high-power generation of visible and mid-infrared light by degenerate four-wave-mixing in a large-mode-area photonic-crystal fiber *Opt. Lett.* **34** 3499–501
- [51] Stolen R 1975 Phase-matched-stimulated four-photon mixing in silica-fiber waveguides *IEEE J. Quantum Electron.* **11** 100–3
- [52] Stolen R and Bjorkholm J 1982 Parametric amplification and frequency conversion in optical fibers *IEEE J. Quantum Electron.* **18** 1062–72
- [53] Nair S V and Takagahara T 1997 Theory of exciton pair states and their nonlinear optical properties in semiconductor quantum dots *Phys. Rev. B* **55** 5153–70
- [54] Abe S, Schreiber M, Su W P and Yu J 1992 excitons and nonlinear optical spectra in conjugated polymers *Phys. Rev. B* **45** 9432–5
- [55] Kumagai M and Takagahara T 1989 excitonic and nonlinear-optical properties of dielectric quantum-well structures *Phys. Rev. B* **40** 12359–81
- [56] Kramer S D and Bloembergen N 1976 Third-order nonlinear optical spectroscopy in CuCl *Phys. Rev. B* **14** 4654–69
- [57] Kramer S D, Parsons F G and Bloembergen N 1974 Interference of third-order light mixing and second-harmonic exciton generation in CuCl *Phys. Rev. B* **9** 1853–6
- [58] Haueisen D C and Mahr H 1973 Resonant Second-Harmonic Generation in the exciton Region of CuCl and ZnO *Phys. Rev. B* **8** 734–45

- [59] Balla N K, O'Brien M, McEvoy N, Duesberg G S, Rigneault H, Brasselet S and McCloskey D 2018 Effects of excitonic Resonance on Second and Third Order Nonlinear Scattering from Few-Layer MoS₂ *ACS Photonics* **5** 1235–40
- [60] Ko B A, Sokolov A V, Scully M O, Zhang Z and Lee H W H 2019 Enhanced four-wave mixing process near the excitonic resonances of bulk MoS₂ *Photonics Res.* **7** 251–9
- [61] Jakubczyk T, Delmonte V, Koperski M, Nogajewski K, Faugeras C, Langbein W, Potemski M and Kasprzak J 2016 Radiatively Limited Dephasing and exciton Dynamics in MoSe₂ Monolayers Revealed with Four-Wave Mixing Microscopy *Nano Lett.* **16** 5333–9
- [62] Woodward R I, Murray R T, Phelan C F, Oliveira R E P de, Runcorn T H, Kelleher E J R, Li S, Oliveira E C de, Fechine G J M, Eda G and Matos C J S de 2016 Characterization of the second- and third-order nonlinear optical susceptibilities of monolayer MoS₂ using multiphoton microscopy *2D Mater.* **4** 011006
- [63] Rosa H G, Ho Y W, Verzhbitskiy I, Rodrigues M J F L, Taniguchi T, Watanabe K, Eda G, Pereira V M and Gomes J C V 2018 Characterization of the second- and third-harmonic optical susceptibilities of atomically thin tungsten diselenide *Sci. Rep.* **8** 10035
- [64] Säynätjoki A, Karvonen L, Rostami H, Autere A, Mehravar S, Lombardo A, Norwood R A, Hasan T, Peyghambarian N, Lipsanen H, Kieu K, Ferrari A C, Polini M and Sun Z 2017 Ultra-strong nonlinear optical processes and trigonal warping in MoS₂ layers *Nat. Commun.* **8** 1–8
- [65] Salehi S and Saffarzadeh A 2018 Optoelectronic properties of defective MoS₂ and WS₂ monolayers *J. Phys. Chem. Solids* **121** 172–6
- [66] Wang Q H, Kalantar-Zadeh K, Kis A, Coleman J N and Strano M S 2012 Electronics and optoelectronics of two-dimensional transition metal dichalcogenides *Nat. Nanotechnol.* **7** 699–712
- [67] Trolle M L, Tsao Y-C, Pedersen K and Pedersen T G 2015 Observation of excitonic resonances in the second harmonic spectrum of MoS₂ *Phys. Rev. B* **92** 161409
- [68] Taghizadeh A and Pedersen T G 2019 Nonlinear optical selection rules of excitons in monolayer transition metal dichalcogenides *Phys. Rev. B* **99** 235433
- [69] Lafeta L, Corradi A, Zhang T, Kahn E, Bilgin I, Carvalho B R, Kar S, Terrones M and Malard L M 2021 Second- and third-order optical susceptibilities across excitons states in 2D monolayer transition metal dichalcogenides *2D Mater.* **8** 035010
- [70] Ly T H, Chiu M-H, Li M-Y, Zhao J, Perello D J, Cichocka M O, Oh H M, Chae S H, Jeong H Y, Yao F, Li L-J and Lee Y H 2014 Observing Grain Boundaries in CVD-Grown Monolayer Transition Metal Dichalcogenides *ACS Nano* **8** 11401–8
- [71] You J, Hossain M D and Luo Z 2018 Synthesis of 2D transition metal dichalcogenides by chemical vapor deposition with controlled layer number and morphology *Nano Converg.* **5** 26
- [72] Wang X, Gong Y, Shi G, Chow W L, Keyshar K, Ye G, Vajtai R, Lou J, Liu Z, Ringe E, Tay B K and Ajayan P M 2014 Chemical Vapor Deposition Growth of Crystalline Monolayer MoSe₂ *ACS Nano* **8** 5125–31
- [73] Elías A L, Perea-López N, Castro-Beltrán A, Berkdemir A, Lv R, Feng S, Long A D, Hayashi T, Kim Y A, Endo M, Gutiérrez H R, Pradhan N R, Balicas L, Mallouk T E, López-Urías F, Terrones H and Terrones M 2013 Controlled Synthesis and Transfer of Large-Area WS₂ Sheets: From Single Layer to Few Layers *ACS Nano* **7** 5235–42
- [74] Carvalho B R, Wang Y, Fujisawa K, Zhang T, Kahn E, Bilgin I, Ajayan P M, de Paula A M, Pimenta M A, Kar S, Crespi V H, Terrones M and Malard L M 2020 Nonlinear Dark-Field Imaging of One-Dimensional Defects in Monolayer Dichalcogenides *Nano Lett.* **20** 284–91

- [75] Lee C, Yan H, Brus L E, Heinz T F, Hone J and Ryu S 2010 Anomalous Lattice Vibrations of Single- and Few-Layer MoS₂ *ACS Nano* **4** 2695–700
- [76] Zhang X 2019 Characterization of Layer Number of Two-Dimensional Transition Metal Diselenide Semiconducting Devices Using Si-Peak Analysis *Adv. Mater. Sci. Eng.* **2019** 1–7
- [77] Ardekani H, Younts R, Yu Y, Cao L and Gundogdu K 2019 Reversible Photoluminescence Tuning by Defect Passivation via Laser Irradiation on Aged Monolayer MoS₂ *ACS Appl. Mater. Interfaces* **11** 38240–6
- [78] Korn T, Heydrich S, Hirmer M, Schmutzler J and Schüller C 2011 Low-temperature photocarrier dynamics in monolayer MoS₂ *Appl. Phys. Lett.* **99** 102109
- [79] Varin C, Emms R, Bart G, Fennel T and Brabec T 2018 Explicit formulation of second and third order optical nonlinearity in the FDTD framework *Comput. Phys. Commun.* **222** 70–83
- [80] Varin C, Bart G, Fennel T and Brabec T 2019 Nonlinear Lorentz model for the description of nonlinear optical dispersion in nanophotonics simulations [Invited] *Opt. Mater. Express* **9** 771–8
- [81] Dai Y, Wang Y, Das S, Xue H, Bai X, Hulkko E, Zhang G, Yang X, Dai Q and Sun Z 2020 Electrical Control of Interband Resonant Nonlinear Optics in Monolayer MoS₂ *ACS Nano* **14** 8442–8
- [82] Lin Z, Carvalho B R, Kahn E, Lv R, Rao R, Terrones H, Pimenta M A and Terrones M 2016 Defect engineering of two-dimensional transition metal dichalcogenides *2D Mater.* **3** 022002
- [83] Autere A, Jussila H, Marini A, Saavedra J R M, Dai Y, Säynätjoki A, Karvonen L, Yang H, Amirsolaimani B, Norwood R A, Peyghambarian N, Lipsanen H, Kieu K, de Abajo F J G and Sun Z 2018 Optical harmonic generation in monolayer group-VI transition metal dichalcogenides *Phys. Rev. B* **98** 115426
- [84] Trolle M L, Seifert G and Pedersen T G 2014 Theory of excitonic second-harmonic generation in monolayer MoS₂ *Phys. Rev. B* **89** 235410
- [85] Khorasani S 2018 Third-Order Optical Nonlinearity in Two-Dimensional Transition Metal Dichalcogenides *Commun. Theor. Phys.* **70** 344
- [86] Mkrtchian G F, Knorr A and Selig M 2019 Theory of second-order excitonic nonlinearities in transition metal dichalcogenides *Phys. Rev. B* **100** 125401
- [87] Le C T, Clark D J, Ullah F, Jang J I, Senthilkumar V, Sim Y, Seong M-J, Chung K-H, Kim J W, Park S, Rhim S H, Kim G and Kim Y S 2017 Impact of Selenium Doping on Resonant Second-Harmonic Generation in Monolayer MoS₂ *ACS Photonics* **4** 38–44
- [88] Clark D J, Le C T, Senthilkumar V, Ullah F, Cho H-Y, Sim Y, Seong M-J, Chung K-H, Kim Y S and Jang J I 2015 Near bandgap second-order nonlinear optical characteristics of MoS₂ monolayer transferred on transparent substrates *Appl. Phys. Lett.* **107** 131113
- [89] Le C T, Clark D J, Ullah F, Senthilkumar V, Jang J I, Sim Y, Seong M-J, Chung K-H, Park H and Kim Y S 2016 Nonlinear optical characteristics of monolayer MoSe₂ *Ann. Phys.* **528** 551–9
- [90] Wang G, Gerber I C, Bouet L, Lagarde D, Balocchi A, Vidal M, Amand T, Marie X and Urbaszek B 2015 exciton states in monolayer MoSe₂ : impact on interband transitions *2D Mater.* **2** 045005
- [91] Lorchat E, López L E P, Robert C, Lagarde D, Froehlicher G, Taniguchi T, Watanabe K, Marie X and Berciaud S 2020 Filtering the photoluminescence spectra of atomically thin semiconductors with graphene *Nat. Nanotechnol.* **15** 283–8
- [92] Park S, Mutz N, Schultz T, Blumstengel S, Han A, Aljarb A, Li L-J, List-Kratochvil E J W, Amsalem P and Koch N 2018 Direct determination of monolayer MoS₂ and WSe₂ exciton binding energies on insulating and metallic substrates *2D Mater.* **5** 025003

- [93] Zhu B, Chen X and Cui X 2015 exciton Binding Energy of Monolayer WS₂ *Sci. Rep.* **5** 9218
- [94] Gubler U and Bosshard C 2000 Optical third-harmonic generation of fused silica in gas atmosphere: Absolute value of the third-order nonlinear optical susceptibility $\chi^{(3)}$ *Phys. Rev. B* **61** 10702–10
- [95] Autere A, Jussila H, Dai Y, Wang Y, Lipsanen H and Sun Z 2018 Nonlinear Optics with 2D Layered Materials *Adv. Mater.* **30** 1705963
- [96] Wen X, Gong Z and Li D 2019 Nonlinear optics of two-dimensional transition metal dichalcogenides *InfoMat* **1** 317–37
- [97] Pedersen T G 2015 Intraband effects in excitonic second-harmonic generation *Phys. Rev. B* **92** 235432
- [98] Li Y, Rao Y, Mak K F, You Y, Wang S, Dean C R and Heinz T F 2013 Probing Symmetry Properties of Few-Layer MoS₂ and h-BN by Optical Second-Harmonic Generation *Nano Lett.* **13** 3329–33
- [99] Janisch C, Wang Y, Ma D, Mehta N, Elías A L, Perea-López N, Terrones M, Crespi V and Liu Z 2014 Extraordinary Second Harmonic Generation in Tungsten Disulfide Monolayers *Sci. Rep.* **4** 1–5
- [100] Karvonen L, Säynätjoki A, Huttunen M J, Autere A, Amirsolaimani B, Li S, Norwood R A, Peyghambarian N, Lipsanen H, Eda G, Kieu K and Sun Z 2017 Rapid visualization of grain boundaries in monolayer MoS₂ by multiphoton microscopy *Nat. Commun.* **8** 1–8
- [101] Wang R, Chien H-C, Kumar J, Kumar N, Chiu H-Y and Zhao H 2014 Third-harmonic generation in ultrathin films of MoS₂ *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6** 314–8
- [102] Babić R R, Babić S G, Babić S R and Babić N R 2016 120 years since the discovery of X-rays *Med. Pregl.* **69** 323–30
- [103] Lauterbur P C 1973 Image Formation by Induced Local Interactions: Examples Employing Nuclear Magnetic Resonance *Nature* **242** 190–1
- [104] Phelps M E 2000 Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97** 9226–33
- [105] Cheng J-X and Xie X S 2015 Vibrational spectroscopic imaging of living systems: An emerging platform for biology and medicine *Science* **350** 6264
- [106] Cheng Q, Miao Y, Wild J, Min W and Yang Y 2021 Emerging applications of stimulated Raman scattering microscopy in materials science *Matter* **4** 1460–83
- [107] Xiong H, Qian N, Miao Y, Zhao Z, Chen C and Min W 2021 Super-resolution vibrational microscopy by stimulated Raman excited fluorescence *Light Sci. Appl.* **10** 87
- [108] Condello C, Yuan P, Schain A and Grutzendler J 2015 Microglia constitute a barrier that prevents neurotoxic protofibrillar A β 42 hotspots around plaques *Nat. Commun.* **6** 6176
- [109] Palombo F, Tamagnini F, Jeynes J C G, Mattana S, Swift I, Nallala J, Hancock J, Brown J T, Randall A D and Stone N 2018 Detection of A β plaque-associated astrogliosis in Alzheimer's disease brain by spectroscopic imaging and immunohistochemistry *Analyst* **143** 850–7
- [110] Fonseca E A, Lafeta L, Campos J L, Cunha R, Barbosa A, Romano-Silva M A, Vieira R, Malard L M and Jorio A 2021 Micro-Raman spectroscopy of lipid halo and dense-core amyloid plaques: aging process characterization in the Alzheimer's disease APPswePS1 Δ E9 mouse model *Analyst* **146** 6014–25

- [111] Emerson Alberto da Fonseca. 2020 Identificação e caracterização de proteína β -amiloide em camundongos bitransgênicos para Alzheimer através de espectroscopia Raman: *Primeiro passo para o estabelecimento de uma plataforma de espectroscopia intraocular para fins de diagnóstico precoce*, Tese de doutorado (Programa de Pós-Graduação em Inovação Tecnológica e Biofarmacêutica da UFMG)
- [112] Células da glia *Mundo Educação* (<https://mundoeducacao.uol.com.br/biologia/celulas-glia.htm>)
- [113] Penney J, Ralvenius W T and Tsai L-H 2020 Modeling Alzheimer's disease with iPSC-derived brain cells *Mol. Psychiatry* **25** 148–67
- [114] Wang S, Mims P N, Roman R J and Fan F 2016 Is Beta-Amyloid Accumulation a Cause or Consequence of Alzheimer's Disease? *J. Alzheimers Park. Dement.* **1** 007
- [115] Mufson E J, Mahady L, Waters D, Counts S E, Perez S E, DeKosky S T, Ginsberg S D, Ikonovic M D, Scheff S W and Binder L I 2015 Hippocampal plasticity during the progression of Alzheimer's disease *Neuroscience* **309** 51–67
- [116] Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold K-H, Mistl C, Rothacher S, Ledermann B, Bürki K, Frey P, Paganetti P A, Waridel C, Calhoun M E, Jucker M, Probst A, Staufenbiel M and Sommer B 1997 Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94** 13287–92
- [117] Koronyo-Hamaoui M, Koronyo Y, Ljubimov A V, Miller C A, Ko M K, Black K L, Schwartz M and Farkas D L 2011 Identification of amyloid plaques in retinas from Alzheimer's patients and noninvasive in vivo optical imaging of retinal plaques in a mouse model *NeuroImage* **54** S204–17
- [118] Borchelt D R, Ratovitski T, Lare J van, Lee M K, Gonzales V, Jenkins N A, Copeland N G, Price D L and Sisodia S S 1997 Accelerated Amyloid Deposition in the Brains of Transgenic Mice Coexpressing Mutant Presenilin 1 and Amyloid Precursor Proteins *Neuron* **19** 939–45
- [119] Kwan A C, Duff K, Gouras G K and Webb W W 2009 Optical visualization of Alzheimer's pathology via multiphoton-excited intrinsic fluorescence and second harmonic generation *Opt. Express* **17** 3679–89
- [120] Ji M, Arbel M, Zhang L, Freudiger C W, Hou S S, Lin D, Yang X, Bacskai B J and Xie X S Label-free imaging of amyloid plaques in Alzheimer's disease with stimulated Raman scattering microscopy *Sci. Adv.* **4** eaat7715
- [121] Garcia-Alloza M, Robbins E M, Zhang-Nunes S X, Purcell S M, Betensky R A, Raju S, Prada C, Greenberg S M, Bacskai B J and Frosch M P 2006 Characterization of amyloid deposition in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer disease *Neurobiol. Dis.* **24** 516–24
- [122] Noothalapati H, Iwasaki K and Yamamoto T 2017 Biological and Medical Applications of Multivariate Curve Resolution Assisted Raman Spectroscopy *Anal. Sci.* **33** 15–22
- [123] Sacré P-Y, De Bleye C, Chavez P-F, Netchacovitch L, Hubert Ph and Ziemons E 2014 Data processing of vibrational chemical imaging for pharmaceutical applications *J. Pharm. Biomed. Anal.* **101** 123–40
- [124] Kumamoto Y, Harada Y, Takamatsu T and Tanaka H 2018 Label-free Molecular Imaging and Analysis by Raman Spectroscopy *Acta Histochem. Cytochem.* **51** 101–10
- [125] Tsai J, Grutzendler J, Duff K and Gan W-B 2004 Fibrillar amyloid deposition leads to local synaptic abnormalities and breakage of neuronal branches *Nat. Neurosci.* **7** 1181–3
- [126] Grutzendler J, Helmin K, Tsai J and Gan W-B 2007 Various Dendritic Abnormalities Are Associated with Fibrillar Amyloid Deposits in Alzheimer's Disease *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1097** 30–9