

LADY KATHERINE SOTO GÓMEZ

**Desenvolvimento e aplicações da técnica espectroscopia
Raman anti-Stokes coerente multiplex**
Dissertação de Mestrado

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

Orientador: LEANDRO MALARD MOREIRA

Belo Horizonte
2018

Aluna, Lady Katherine Soto Gómez

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Exatas ICEX. Programa de Pós-Graduação em Física.

Desenvolvimento e aplicações da técnica espectroscopia Raman anti-stokes coerente multiplex / Lady Katherine Soto Gómez. - Belo Horizonte, 2018- 71 páginas; 30 cm.

Orientador: Leandro Malard Moreira

1. Biofísica. 2. Espectroscopia. 3. Óptica não linear.

I. Leandro Malard Moreira.

II. Universidade Federal de Minas Gerais.

III. Instituto de Ciência Exatas.

IV. Desenvolvimento e aplicação de multiplex CARS em amostras biológicas

LADY KATHERINE SOTO GÓMEZ

**Desenvolvimento e aplicações da técnica espectroscopia
Raman anti-Stokes coerente multiplex**

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

LEANDRO MALARD MOREIRA
Orientador

Professor
Convidado 1

Professor
Convidado 2

Belo Horizonte, Brasil
2018

A minha família.

Agradecimentos

À minha família pelo carinho, especialmente meus pais Carlos e Myriam que sempre apoiam meus projetos.

Aos meus amigos, Luiz, Clara, Rafa, Gabi, Tiago, Luísa, Bela, Julian, Bruno, meu amor Thiago e todos aqueles que me brindaram seu apoio emocional nestes anos. Vocês fazem do Brasil um lugar fantástico.

Aos meus amigos na Colômbia, apesar do pouco convívio e a distância sempre estamos juntos.

Ao meu excelente orientador Leandro Malard, por seus conselhos e ensinamentos. Assim como ao pessoal do LabNS pelas suas orientações, particularmente o Filo que sempre teve tempo para me ajudar e Fredy por sua participação no projeto. À Universidade Federal de Minas Gerais, o departamento de física da UFMG, e os professores que me brindaram seus conhecimentos.

Aos órgãos de fomento CAPES, FAPEMIG, Cnpq, Finep e à Organização dos Estados Americanos (OEA), pelo financiamento da minha educação no Brasil.

Muito obrigada.

Resumo

Diversas técnicas de microscopia óptica com fluorescência, espectroscopia Raman e óptica não linear têm sido usadas para estudo de sistemas biológicos e até em diagnósticos de doenças. Por exemplo, através da espectroscopia Raman convencional pode-se gerar imagens de diferentes proteínas utilizando-se como marcador os modos de vibração característicos desta proteína. Porém devido à baixa eficiência do processo Raman em amostras biológicas, técnicas como CARS (do inglês, *Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy*) vêm sendo utilizadas para a obtenção de imagens livres de marcadores fluorescentes e em tempo real de amostras com modos normais de vibrações características. Estas imagens permitem o estudo do funcionamento de órgãos *in vivo*, o que faz dela uma ferramenta muito útil para estudos aplicados a biologia.

Nesta dissertação tratamos os efeitos ópticos lineares e não lineares, especialmente as teorias e as montagens experimentais das técnicas Raman convencional, CARS e Multiplex CARS. CARS e Multiplex CARS são técnicas de espectroscopia Raman estimulado, sendo um caso típico da mistura de quatro ondas (FWM, do inglês *four wave mixing*). Neste processo, dois feixes de bombeio ω_p e um feixe Stokes ω_s são combinados para gerar outro feixe CARS ω_{CARS} , onde a energia destes feixes de entrada é selecionada de forma que a diferença entre eles sejam os modos de vibração de uma amostra particular. Implementamos nesta dissertação dois tipos de montagens experimentais de multiplex CARS. Comparamos as duas montagens experimentais utilizando-se amostras de referência (acetonitrila, metanol e acetona) e escolhemos o sistema que melhor se adapta a nossas necessidades para realizar o mapeamento de amostras de poliestireno e tecido biológico. Com os desenvolvimentos feitos nesta dissertação, poderemos estudar problemas relacionados a biologia, como por exemplo a detecção de placas de proteína beta-amilóide relacionadas à doença de Alzheimer.

Palavras-chave: Biofísica, Espectroscopia, Óptica não linear.

Abstract

Different techniques of optical microscopy such as fluorescence, Raman spectroscopy and nonlinear optical have been used to study biological systems and also to diagnose diseases. For example, conventional Raman spectroscopy can generate images of different proteins using the characteristic vibration modes of this protein as a marker. However, due to the low efficiency of the Raman process in biological samples, techniques such as CARS (Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy) have been used to obtain images of fluorescent labels and in real time using molecular vibrations as label. These images allows the study of organ functioning *in vivo*, which makes it a very useful tool for studies applied to biology.

In this dissertation we deal with linear and non-linear optical effects, especially the theories of conventional Raman and experimental setup, CARS and multiplex CARS techniques. CARS and Multiplex CARS are stimulated Raman techniques, being a case of four wave mixing (FWM). In this process, two pump beams ω_p and one Stokes beam ω_s are combined to generate another CARS ω_{CARS} beam, where the energy of these input beams is selected so that the difference between them is the vibration modes of a particular sample. We implemented two types of experimental multiplex CARS experimental setup in this dissertation. We compared the two experimental assemblies using reference samples (acetonitrile, methanol and acetone) and chose the system that best suits our needs for the mapping of samples of polystyrene and biological tissue. With the developments made in this dissertation, we can study problems related to biology, such as the detection of beta-amyloid protein plaques related to Alzheimer's disease.

Keywords: Biophysics, Spectroscopy, Non-linear optics.

Sumário

1.	Introdução	14
2.	Fenômenos ópticos lineares e não lineares	18
2.1	Espectroscopia Raman clássica	18
2.2	Espectroscopia Raman anti-stokes coerente (CARS)	21
2.2.1	Teoria do “ <i>Coherent Anti-stokes Raman Spectroscopy</i> ”	22
2.3	Multiplex CARS	29
3.	Montagem experimental	30
3.1	Coherent mira optima 900-f e optical parametric oscillator (OPO)	30
3.1.1	Teoria e funcionamento dos lasers pulsados	30
3.1.2	Montagem experimental	32
3.2	Coherent Mira optima 900-f e photonic crystal fibers (PCF)	34
3.2.1	Teoria e funcionamento da fibra de cristal fotônica (PCF)	34
3.2.2	Montagem experimental	37
4.	Resultados e discussão	43
4.1	Resultados de espectroscopia Raman	44
4.1.1	Acetona	45
4.1.2	Acetonitrila	46
4.1.3	Metanol	46
4.2	“Coherent Mira Optima 900-F” com “optical parametric oscillator”	47
4.3	“Coherent Mira Optima 900-F” com “Photonic Crystal Fiber”	52
4.4	Mapeamento	57
4.5	Discussão dos resultados	60
5.	Conclusões e próximos passos	62
5.1	Próximos passos	62
6.	Referências	64
	Apêndice A. Configuração “coherent mira optima 900-f” com “photonic crystal fiber”	67
	Apêndice B. Programa de mapeamento	71

Lista de figuras

<i>Figura 1.1. Proteínas causantes do mal de Alzheimer. (a) Proteína β-Amilóide, (b) Proteína TAU. [39].....</i>	<i>14</i>
<i>Figura 2.1: Esquema do espectro Raman. (a) espalhamento inelástico Raman Stokes, (b) espalhamento elástico Rayleigh, (c) espalhamento inelástico Raman Anti-Stokes. _____</i>	<i>19</i>
<i>Figura 2.2. Onda eletromagnética incidente ω interagindo com um fônon de frequência ω_0 que pertence ao material, o resultado é a criação de uma onda eletromagnética com três conjuntos de frequências que representam os espalhamentos, Rayleigh, Stokes e Anti-Stokes. _____</i>	<i>21</i>
<i>Figura 2.3. Esquema da geração do segundo harmônico, (a) Geometria da geração, (b) Diagrama dos níveis de energia para SHG (Adotado de [5]). _____</i>	<i>23</i>
<i>Figura 2.4. Diagramas de Feynman para processos não lineares de terceira ordem. a) Four Wave Mixing. (b) Frequência triplicada. (c) O efeito ótico de Kerr [4]. _____</i>	<i>24</i>
<i>Figura 2.5. Esquema da mistura de quatro ondas degenerada em condições de ressonância com nível vibracional ou CARS, definindo $\omega_4 = \omega_{CARS}$, $\omega_1 = \omega_3 = \omega_P$ e $\omega_2 = \omega_S$. _____</i>	<i>25</i>
<i>Figura 2.6. Diagrama do processo de espalhamento Raman anti-Stokes coerente (CARS), com a frequência CARS $\omega_{CARS} = 2\omega_P - \omega_S$ e a frequência de vibração molecular $\omega_{vib} = \omega_P - \omega_S$. _____</i>	<i>25</i>
<i>Figura 2.7. Espectros do FMW degenerado não ressonante (esquerda), ressonante com nível vibracional ou CARS (direita) [13]. _____</i>	<i>26</i>
<i>Figura 2.8. Gráficos da relação da amplitude do sinal em termos da variação Δ (a) Representação das três componentes da intensidade CARS, termos individuais; (b) Intensidade total CARS em relação ao termo não ressonante [14]. _____</i>	<i>28</i>
<i>Figura 2.9. Diagrama do processo de Multiplex CARS. _____</i>	<i>29</i>
<i>Figura 2.3. Esquema da montagem experimental para microscopia Raman. _____</i>	<i>44</i>
<i>Figura 2.4. Espectro Raman da acetona, apresentando os picos Raman Stokes da amostra. _____</i>	<i>45</i>
<i>Figura 2.5. Espectro Raman da acetonitrila, apresentando os picos Raman Stokes da amostra. _____</i>	<i>46</i>
<i>Figura 2.6. Espectro Raman do metanol, apresentando os picos Raman Stokes da amostra. _____</i>	<i>47</i>

Figura 3.1. Diagrama de intensidade em função da frequência envolvente do laser pulsado. O espectro de saída do laser Mode-locking consiste em um pente de n frequências ópticas, separadas pela frequência de repetição f_r que pode ou não ter um deslocamento δ .31

Figura 3.2. Diagrama experimental multiplex CARS com os lasers pulsados “Mira Optima 900-F” e o “optical parametric oscillator (OPO)”; Laser bombeio-laser (Verdi-V10) de Nd:YVO₄; EO2-Espelho dielétrico banda larga de 400-750 nm (BB1-EO2); EO3-Espelho dielétrico banda larga de 750-1100 nm (BB1-EO3); SP750-short pass filters 750 nm; SP600-short pass filters 600 nm; Filtro 800nm-Multiphoton filter 850/310; LTS300- estágio de translação linear “Thorlabs’LTS300(/M)”. 32

Figura 3.3. Diagrama da montagem experimental do microscópio Nikon eclipse Ti e a amostra.34

Figura 3.4. Fibra de cristal fotônica (PCF), FemtoWHITE CARS da NKT photonics [33]..... 35

Figura 3.5. a) Simulação de uma fibra multimodo micro estruturada, construída por um núcleo de Sílica e envolvido por um anel de furos de ar. b) Imagem de micrografia electrónica do revestimento interno e do núcleo da fibra de ar-sílica [34]. 35

Figura 3.6. Mapa de intensidade da luz de um super contínuo, dependente dos comprimentos de onda do laser de bombeio [33].36

Figura 3.7. Dependência da potência acoplada com respeito ao comprimento de onda do laser de bombeio 785 nm. Os espectros produzidos pelo laser “Coherent Mira Optima 900-F”. 37

Figura 3.8. Diagrama experimental multiplex CARS com o laser pulsado “Mira Optima 900-F” e a fibra de cristal fotônico (PCF); Laser bombeio-laser (Verdi-V10) de Nd:YVO₄; EO3-Espelho dielétrico banda larga de 750-1100 nm (BB1-EO3); SP750-short pass filters 750 nm; Beam Splitter 3- T760lpxr da chroma; SMR03-Lente; LP785- Filtro long pass LPO2-785RU-25 da Semrock.38

Figura 3.9. Imagem da montagem experimental da fibra de cristal fotônica.39

Figura 3.10. Diagrama experimental multiplex CARS com o laser pulsado “Mira Optima 900-F” e a fibra de cristal fotônico (PCF); Laser bombeio-laser (Verdi-V10) de Nd:YVO₄; EO3-Espelho dielétrico banda larga de 750-1100 nm (BB1-EO3); SP750-short pass filters 750 nm; Beam Splitter 3- T760lpxr da Chroma; SMR03-Lente; LP785- Filtro long pass LPO2-785RU-25 da Semrock; BP785- Filtro Band pass LLO1-785; D785- Dicroico DiO3-R785 da Semrock; IF-Isolador de Faraday da Newport (Broadband Faraday Optical Isolators), com faixa espectral de 720-950 nm..... 41

<i>Figura 3.11. Sistema de mapeamento.....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 4.1. Esquema da montagem experimental para microscopia Raman.</i>	<i>44</i>
<i>Figura 4.2. Espectro Raman da acetona apresentando os modos normais de vibração molecular. Str (vibração por alongamento), s-str (vibração por alongamento simétrico), d-str (vibração por alongamento assimétrico), rock (vibração assimétrica por balanço), s-deform (vibração de deformação simétrico), d-deform (vibração de deformação assimétrico).....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 4.3. Espectro Raman da acetonitrila apresentando os modos normais de vibração molecular. Str (vibração por alongamento), s-str (vibração por alongamento simétrico), d-str (vibração por alongamento assimétrico), s-deform (vibração de deformação simétrico), d-deform (vibração de deformação assimétrico).</i>	<i>46</i>
<i>Figura 4.4. Espectro Raman do metanol apresentando os modos normais de vibração molecular. Str (vibração por alongamento), s-str (vibração por alongamento simétrico), d-str (vibração por alongamento assimétrico), rock (vibração assimétrica por balanço), s-deform (vibração de deformação simétrico), d-deform (vibração de deformação assimétrico).....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 4.5. Espectros CARS para amostra de Acetonitrila, (a) Espectros CARS gerados por a mistura do laser Stokes fixo em 800 nm (MIRA) e a variação do laser de bombeio (OPO), (b) Comparação de espectros CARS (vermelho e preto) com o espectro Raman (azul).</i>	<i>49</i>
<i>Figura 4.6. Espectros CARS para amostra de Metanol, (a) Espectros CARS gerados por a mistura do laser Stokes fixo em 800nm (MIRA) e a variação do laser de bombeio (OPO), (b) Comparação de espectros CARS (vermelho e preto) com o espectro Raman (azul).</i>	<i>50</i>
<i>Figura 4.7. Espectros CARS para amostra de Acetona, (a) Espectros CARS gerados por a mistura do laser Stokes fixo em 800nm (MIRA) e a variação do laser de bombeio (OPO), (b) Comparação de espectros CARS (vermelho e preto) com o espectro Raman (azul).</i>	<i>51</i>
<i>Figura 4.8. Espectro CARS para a amostra de acetonitrila, gerados pela mistura do laser de bombeio (fixo em 785 nm) e a fibra de cristal fotônica (contínua de 785 nm até 1100 nm). As múltiplas curvas representam os espectros CARS para diferentes valores de atraso de tempo.</i>	<i>53</i>
<i>Figura 4.9. Comparação de espectros CARS (vermelho e preto) com o espectro Raman (azul), para a amostra de acetonitrila.....</i>	<i>54</i>
<i>Figura 4.10. Espectro Raman (linha azul) comparada com os pontos de intensidade máxima (vermelhos) do espectro CARS a cada atraso de tempo, para a amostra de acetonitrila.</i>	<i>54</i>

<i>Figura 4.11. Espectro CARS para a amostra de metanol, gerados pela mistura do laser de bombeio (fixo em 785 nm) e a fibra de cristal fotônica (contínua de 785 nm até 1100 nm). As múltiplas curvas representam os espectros CARS para diferentes valores de atraso de tempo.</i>	55
<i>Figura 4.12. Comparação de espectros CARS (vermelho) com o espectro Raman (azul), para a amostra de metanol.</i>	55
<i>Figura 4.13. Espectro Raman (linha azul) comparada com os pontos de intensidade máxima (vermelhos) do espectro CARS a cada atraso de tempo, para a amostra de metanol.</i>	56
<i>Figura 4.14. Espectro CARS para a amostra de acetona, gerados pela mistura do laser de bombeio (fixo em 785 nm) e a fibra de cristal fotônica (contínua de 785 nm até 1100 nm). As múltiplas curvas representam os espectros CARS para diferentes valores de atraso de tempo.</i>	56
<i>Figura 4.15. Comparação de espectros CARS com o espectro Raman (azul), (a) na região de 900 a 1800 cm^{-1}, (b) na região de 2600 a 3000 cm^{-1}, para a amostra de acetona.</i>	57
<i>Figura 4.16. Espectro Raman (linha azul) comparada com os pontos de intensidade máxima (vermelhos) do espectro CARS a cada atraso de tempo, para a amostra de acetona.</i>	57
<i>Figura 4.17. Espectro CARS para amostra de poliestireno (vermelho), gerados pela mistura do laser de bombeio (fixo em 785 nm) e a fibra de cristal fotônica (contínua de 785 nm até 1100 nm), comparado com o espectro Raman (azul) da mesma amostra.</i>	58
<i>Figura 4.18. Processo de mapeamento das amostras (a) Imagem óptica de uma amostra de poliestireno de 3 μm de diâmetro (b) Matriz de Espectro 51x51, para a banda selecionada no pico de 3052 cm^{-1}.</i>	59
<i>Figura 4.19. Processo de mapeamento das amostras (a) Imagem óptica de uma amostra de tecido biológico (b) Matriz de Espectro 51 x 51 com tempo de exposição dos lasers de 3 segundos.</i>	59
<i>Figura 4.20. Espectros CARS em diferentes pontos da matriz de mapeamento 26 x 26. Em vermelho o espectro CARS sobre o tecido cerebral do camundongo. Em preto, raio cósmico sobressaindo do espectro CARS. Em azul, espectro CARS fora do tecido.</i>	60

Figura. A. 1. Espectro CARS para a amostra de metanol, gerados pela mistura do laser de bombeio (fixo em 806 nm) e a fibra de cristal fotônica (contínua de 785 nm até 1100 nm). As

<i>múltiplas curvas representam os espectros CARS para diferentes valores de atraso de tempo.</i>	67
<i>Figura. A. 2. Comparação de espectros CARS (vermelho e preto) com o espectro Raman (azul), para a amostra de metanol.</i>	68
<i>Figura. A. 3. Espectro Raman (linha azul) comparada com os pontos de intensidade máxima (vermelhos) do espectro CARS a cada atraso de tempo, para a amostra de metanol.</i>	68
<i>Figura. A. 4. Espectro CARS para a amostra de acetona, gerados pela mistura do laser de bombeio (fixo em 806 nm) e a fibra de cristal fotônica (contínua de 785 nm até 1100 nm). As múltiplas curvas representam os espectros CARS para diferentes valores de atraso de tempo.</i>	69
<i>Figura. A. 5. Comparação de espectros CARS (vermelho e preto) com o espectro Raman (azul), para a amostra de acetona.</i>	69
<i>Figura. A. 6. Espectro Raman (linha azul) comparada com os pontos de intensidade máxima (vermelhos) do espectro CARS a cada atraso de tempo, para a amostra de acetona.</i>	70
 <i>Figura. B. 1. Programa de mapeamento (diagrama de blocos), software LabVIEW.</i>	71

Capítulo 1

1. Introdução

Diversas técnicas de microscopia óptica como fluorescência, espectroscopia Raman convencional e técnicas de óptica não linear têm sido usadas para estudo de sistemas biológicos e até em diagnóstico de doenças [1,2]. Nesta dissertação iremos implementar um aparato experimental para se realizar medidas espectroscópicas e microscópicas, com o objetivo de no futuro ser possível diagnosticar a doença de Alzheimer por métodos ópticos.

O Alzheimer é a forma mais comum de demência, de acordo com estatísticas publicadas em 2015 pela “*Alzheimer's Disease International*” (ADI), estima-se que 46 milhões atualmente sofrem desse problema, o que acarreta um custo global total de um bilhão de dólares. Se a tendência continua na mesma taxa em 2050, os portadores da doença crescerão para 131,5 milhões. [1]

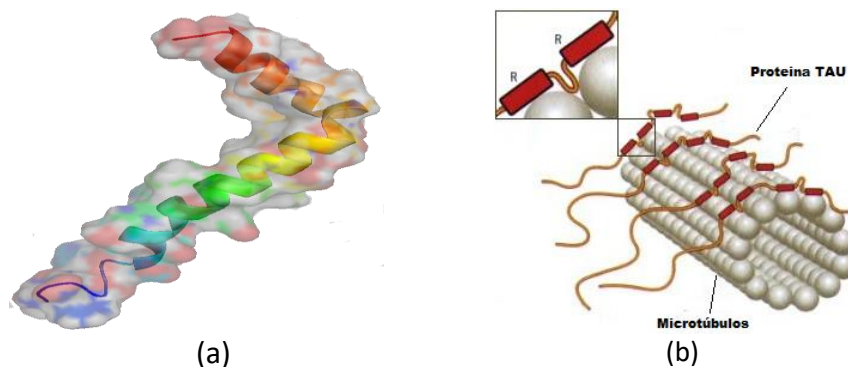


Figura 1.1. Proteínas causadoras do mal de Alzheimer. (a) Proteína β -Amilóide, (b) Proteína TAU. [39]

O principal problema desta doença é que suas causas não são conhecidas, portanto também não existe uma maneira de combatê-la. Os estudos se concentram no diagnóstico precoce através de duas linhas de ação, sendo a primeira a detecção do acúmulo de placas da proteína β -Amilóide (figura 1.1 (a)) na superfície dos neurônios, as quais causam lesões neuronais que são típicas da doença de Alzheimer. A segunda busca o excesso de fósforo, centrado na proteína do citoesqueleto TAU (figura 1.1 (b)) [2]. Métodos de diagnóstico incluem PET scan (pósitron emission tomography), porém são invasivos (paciente toma

contraste) e possuem valor elevado para ser aplicado no âmbito de políticas públicas e saúde. Dessa forma, métodos alternativos têm sido procurados para que essa detecção seja não invasiva, por exemplo, métodos ópticos.

São muitos os fenômenos ópticos presentes na interação da luz com a matéria. A luz, ao incidir sobre o material, pode sofrer processos de absorção, reflexão e espalhamento, e a importância deles depende do tipo de material e da intensidade da luz incidente [3]. Uma das técnicas usadas para a caracterização de materiais é a espectroscopia Raman, processo óptico linear que implica no espalhamento inelástico de luz devido aos modos normais de vibração do material [4]. Dessa forma o espectro Raman de um determinado material pode ser visto como a impressão digital do mesmo. No entanto para obter imagens hiper espectrais é uma técnica lenta e pouco eficiente para ser aplicada na análise de amostras biológicas, em nosso caso, β -Amilóide. Portanto, uma das alternativas é trabalhar com óptica não linear.

As técnicas de óptica não linear nasceram com a invenção do laser, em 1960. Estas se caracterizam pela mudança nos comportamentos das propriedades ópticas dos materiais, em presença da alta intensidade de luz [5]. Em nossos experimentos as fontes de luz vêm da radiação de lasers pulsados, do tipo “*Coherent Mira Optima 900-F*” (MIRA) e “*optical parametric oscillator*” (OPO) da empresa “*Coherent*”.

A “*Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy*” (CARS), uma técnica do tipo Raman estimulado presente em óptica não linear. É um processo de terceira ordem e um caso especial da “*Degenerated Four Wave Mixing*” (DFWM), onde dois feixes, um de bombeio ω_P e um feixe Stokes ω_S são combinados para gerar outro feixe ω_{CARS} obedecendo a regra de conservação de energia $\omega_{CARS} = 2\omega_P - \omega_S$ [6,7]. Neste processo a energia dos dois feixes de entrada é selecionada de forma que $\omega_{Vib} = \omega_P - \omega_S$, onde ω_{Vib} é o conjunto de frequências correspondentes aos modos normais de vibração de uma amostra particular.

Em comparação com a espectroscopia Raman, a intensidade do feixe CARS aumenta várias ordens de grandeza ($\approx 10^5$) devido à ressonância com estados vibracionais, o que faz da técnica CARS um método espectroscópico muito útil para a análise de substâncias

químicas e tecidos biológicos. No entanto, para caracterizar todo o espectro vibracional dos materiais é importante acessar as diferentes energias de vibração, processo chamado de Multiplex CARS. A particularidade do Multiplex CARS está em que o feixe de Stokes é espectralmente largo, portanto, ele irá acessar uma maior amplitude espectral de energias de vibração.

O objetivo principal desta dissertação foi implementar a técnica *Multiplex Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy* (Multiplex CARS). Para o desenvolvimento desta aplicação, traçamos as seguintes metas:

1) Elaboração da configuração experimental para a implementação do método multiplex CARS, utilizando dois conjuntos experimentais diferentes.

1.1) Acoplamento do laser pulsado "*Coherent Mira Optima 900-F*" (MIRA) fixo em 800nm e do laser do tipo "*optical parametric oscillator*" (OPO) com variação no comprimento de onda de 630nm a 720nm, ambas linhas de laser com pulsos da ordem de 150 fs.

1.2) Acoplamento das linhas laser geradas pelo "*Coherent Mira Optima 900-F*" (120 fs) fixo em 785nm, e a fibra óptica "*Photonic Crystal Fiber*" (PCF) com largura espectral de 785nm a 1050nm.

2) Comparação dos espectros de Multiplex CARS obtidos por meio das montagens experimentais.

3) Aplicação do método experimental para gerar imagens de microscopia CARS.

Sendo assim, neste trabalho, construímos os dois conjuntos experimentais de multiplex CARS já mencionados, que foram testados e comparados com quatro amostras de referência: Acetonitrila, Metanol e Acetona; das quais realizamos medidas de espectroscopia Raman e Multiplex CARS. Mostra-se também que foi possível gerar imagens de multiplex CARS em microesferas de poliestireno e em tecidos biológicos.

No seguinte capítulo, chamado de “Fenômenos ópticos lineares e não lineares”, apresentamos uma revisão bibliográfica dos processos lineares, como a espectroscopia Raman, os processos ópticos não lineares como a espectroscopia Raman anti-stokes coerente (CARS) e multiplex CARS, além dos parâmetros necessários para a construção dos setups experimentais e os resultados obtidos da espectroscopia Raman dos materiais de referência.

No capítulo três titulado “Montagem experimental de multiplex CARS”, relatamos a construção dos *setups* experimentais (o primeiro com os dois lasers de femtosegundos o “MIRA” e o “OPO”, o segundo com o “MIRA” e a “PCF”).

No capítulo quatro “Resultados e discussão”, apresentamos os resultados experimentais obtidos nas duas configurações, definindo qual é a montagem ideal para a análise de proteínas e tecido biológico. Neste capítulo mostramos um resultado preliminar de multiplex CARS obtido de tecidos biológicos, assim como os problemas nas medidas com suas possíveis causas e consequências.

Finalmente, o capítulo 5 apresenta a conclusão do trabalho realizado e passos futuros.

Capítulo 2

2. Fenômenos ópticos lineares e não lineares

Este capítulo é dedicado a uma revisão bibliográfica das técnicas espectroscópicas que utilizamos neste trabalho: espectroscopia Raman convencional, CARS e Multiplex CARS. Após isso, introduziremos a espectroscopia CARS e a Multiplex CARS.

O espalhamento Raman pode ser estudado desde duas teorias principais: a macroscópica, que trabalha com espalhamento de luz em meios contínuos; e a microscópica, onde temos uma abordagem de mecânica quântica. Neste capítulo nos concentraremos na abordagem macroscópica ou clássica, o qual será suficiente para explicar as técnicas de CARS e multiplex CARS.

2.1 Espectroscopia Raman clássica

A espectroscopia Raman foi observada experimentalmente por C. V. Raman, com a aparição de frequências diferentes da frequência da luz incidente sobre líquidos em 1928. Foi observada que a luz espalhada pelo benzeno líquido gerou duas bandas laterais simetricamente espaçadas em relação com uma banda central que corresponde ao espalhamento elástico ou Rayleigh. Essas bandas laterais são as chamadas de espalhamento inelástico ou Raman [8,9].

A técnica tem um papel importante na caracterização de materiais, já que é um método eficiente e não danifica a amostra pois utiliza a luz como sonda. O processo de espalhamento Raman convencional é um efeito óptico linear e acontece quando um feixe de luz monocromática incide no material. Cada fóton desta luz monocromática, ao incidir na amostra pode perder (ou ganhar) energia criando (ou destruindo) um fônon do material. É assim que a luz espalhada, tem um comprimento de onda diferente com respeito ao comprimento de onda do fóton incidente [3,4]. A frequência de excitação elementar do material está relacionada com a frequência Raman, e é o que dá origem aos tipos de espalhamento (figura 2.1).

O espalhamento Rayleigh não tem perda ou ganho de energia, por isso sua intensidade no espectro Raman sempre será o maior (parte superior da figura 2.1). O espalhamento Rayleigh mostra a transição do elétron desde seu nível eletrônico fundamental ou de mais baixa energia até um nível virtual, quando este é excitado por um fóton (figura 2.1 (b)). Quando o elétron decai de novo ao nível fundamental emite um fóton com a mesma energia incidente, cumprindo a conservação da energia.

O espalhamento Stokes (fóton emitido com menor energia que o absorvido), está relacionado à criação de fônons no material, por conseguinte, a frequência no estado final é menor que no estado inicial (figura 2.1 (a)). Por outro lado, o espalhamento Anti-Stokes (fóton emitido com maior energia que o absorvido), corresponde com a destruição de fônons no material, então sua frequência final é maior que a frequência inicial (figura 2.1 (c)) [10].

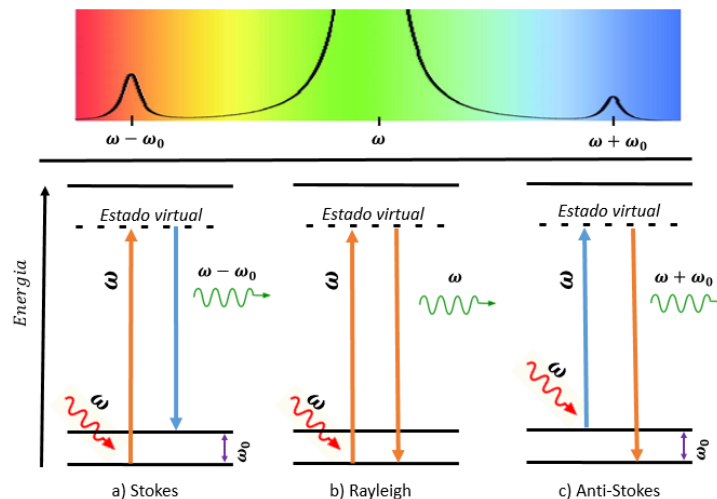


Figura 2.1: Esquema do espectro Raman. (a) espalhamento inelástico Raman Stokes, (b) espalhamento elástico Rayleigh, (c) espalhamento inelástico Raman Anti-Stokes.

Esse processo de espalhamento Raman pode ser apresentado através de uma abordagem macroscópica, com base na ação da luz incidente ou o campo eletromagnético incidente \vec{E}_i no meio contínuo que cria uma polarização macroscópica induzida no meio. Quando a onda eletromagnética incide na amostra, o campo elétrico oscilante desta onda faz que os íons do material se desloquem, ocasionando momentos dipolares que geram polarização induzida no meio. A polarização ($\vec{P}(\vec{r}, t)$) é expressa como a soma dos termos lineares ($\vec{P}_L(\vec{r}, t)$) e não lineares ($\vec{P}_{NL}(\vec{r}, t)$) [11].

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

No caso do espalhamento Raman, que é um processo linear, deve-se supor uma baixa intensidade da fonte de luz ou qual permite desconsiderar o termo da polarização não linear, assim a relação da polarização pode ser dada por:

$$\vec{P}_L(\vec{r}, t) = \epsilon_0 \chi^{(1)} \vec{E}(\vec{r}, t). \quad 2.2$$

Em geral a relação da polarização com respeito ao campo eletromagnético incidente $\vec{E}_j(\vec{r}, t)$, a permissividade no vacuo ϵ_0 , e à tensor de susceptibilidade elétrica de primeira ordem $\chi^{(1)}$, em coordenadas cartesianas pode ser escrita como

$$\vec{P}_{L,i}(\vec{r}, t) = \epsilon_0 \sum_j \chi_{i,j}^{(1)} \vec{E}_j(\vec{r}, t). \quad 2.3$$

Observamos que $\vec{P}_{L,i}$ dependente linearmente do tensor susceptibilidade elétrica $\chi_{i,j}^{(1)}$ (Eq. 2.4), o tensor está associado com os modos normais de vibração do material. É assim que a espectroscopia Raman pode ser usada para a caracterização de materiais, já que cada um destes modos de vibração têm uma energia específica, o que gera um espectro Raman diferente para cada material. Dado um modo normal de vibração Q_l no material, podemos descrever o impacto desta vibração na susceptibilidade elétrica através de:

$$\chi_{i,j} = (\chi_{i,j})_0 + \sum_l \left(\frac{\partial \chi_{i,j}}{\partial Q_l} \right)_0 Q_l + O^{(2)}, \quad 2.4$$

onde i, j são coordenadas cartesianas, por onde o tensor $\chi^{(1)}$ terá 9 componentes (xx, xy, xz, yx, yy, yz, zx, zy, zz), o termo \vec{E}_l é o vetor amplitude do campo elétrico; ω a frequência do campo incidente; \vec{k}_l é o vetor de onda incidente; \vec{Q}_l é o deslocamento relativo à posição de equilíbrio dos centros atômicos com \vec{q} sendo seu vetor de onda [12]. Substituindo as expressões 2.4 e usando que o campo elétrico escrito por $\vec{E}_l e^{i(\vec{k}_l \cdot \vec{r} - \omega t)}$ na equação 2.2, temos:

$$\begin{aligned} \vec{P}_L = & \epsilon_0 \vec{\chi} \cdot \vec{E}_l e^{i(\vec{k}_l \cdot \vec{r} - \omega t)} + \epsilon_0 \vec{E}_l \cdot \vec{Q}_l e^{i[(\vec{k}_l \pm \vec{q}) \cdot \vec{r} - (\omega \pm \omega_l)t]} \frac{d\vec{\chi}}{dQ} + \\ & \frac{1}{2} \epsilon_0 \vec{E}_l^2 \cdot \vec{Q}_l^2 e^{i[(\vec{k}_l \pm 2\vec{q}) \cdot \vec{r} - (\omega \pm 2\omega_l)t]} \frac{d^2\vec{\chi}}{dQ^2} + \dots, \end{aligned} \quad 2.5$$

A equação 2.5 pode ser reduzida a:

$$\vec{P}_L = \vec{P}_e(\vec{r}, t) + \vec{P}_{in}(\vec{r}, t, \vec{Q}) + O^{(2)} + \dots, \quad 2.6$$

onde o primeiro termo ($\vec{P}_e(\vec{r}, t)$) corresponde o espalhamento Rayleigh, já que a polarização oscila com a mesma frequência que a radiação incidente (Fig 2.2); o segundo termo ($\vec{P}_{in}(\vec{r}, t, \vec{Q})$) representa o espalhamento anti-Stokes (+ ω) ou Stokes (- ω). Isso significa então que para condições em que $d\vec{\chi}/d\vec{Q}$ seja diferente de zero, existe a possibilidade que em determinado modo de vibração os fótons incidentes criem ou absorvem fônons [13]; e os termos a seguir descrevem espalhamentos Raman de ordens maiores.

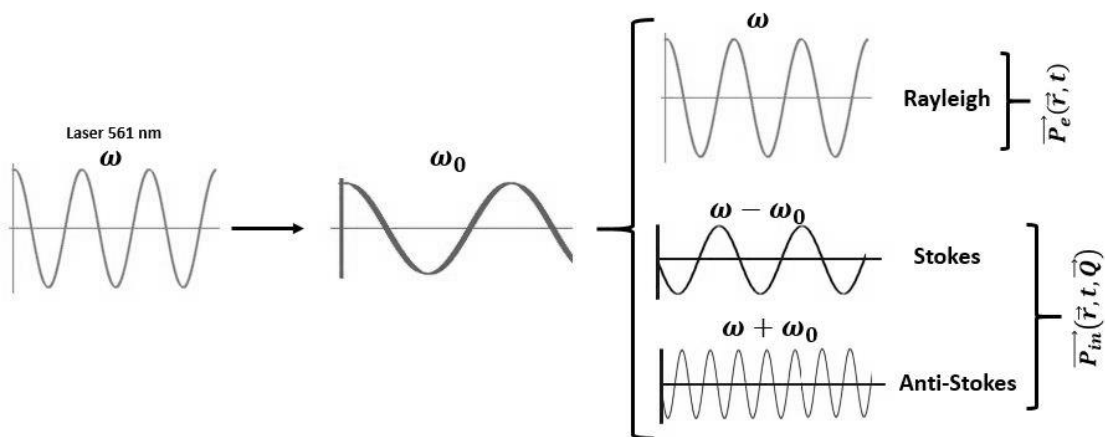


Figura 2.2. Onda eletromagnética incidente ω interagindo com um fônon de frequência ω_0 que pertence ao material, o resultado é a criação de uma onda eletromagnética com três conjuntos de frequências que representam os espalhamentos, Rayleigh, Stokes e Anti-Stokes.

2.2 ESPECTROSCOPIA RAMAN ANTI-STOKES COERENTE (CARs)

O avanço na tecnologia melhora nossa capacidade de estudar o mundo microscópico, técnicas de microscopia vibracional como é o caso da espectroscopia Raman, oferecem seletividade química para caracterizar os materiais, já que as frequências vibracionais das moléculas são específicas. Esta técnica tem sido amplamente utilizada em aplicações biomédicas, no entanto, é muito limitada já que a intensidade do espalhamento Raman convencional é baixa, precisando assim de ter tempos de aquisição muito longos, com tempos de integração de 100ms a 1s por pixel, e altas potências do laser. Isso se torna desvantajoso para o estudo de sistemas biológicos vivos [14].

A solução a este problema surge com a amplificação dos sinais vibracionais, aplicando a técnica conhecida como espalhamento Raman anti-Stokes coerente (CARS). Descoberta em 1965 por Maker e Terhune na “*Ford Motor Company*”, mas só aplicada em 1999 por “*Pacific Northwest National Laboratory*” [14], a técnica consiste no uso de dois feixes um chamado de bombeio ω_P , e outro de Stokes ω_S , que interagem com a amostra gerando um processo de mistura de quatro ondas, sendo CARS um caso especial desta mistura conhecido por suas siglas em inglês (DFWM) ou “*degenerated four wave mixing*”, na qual a frequência CARS tem que obedecer a regra de conservação de energia:

$$\omega_{CARS} = 2\omega_P - \omega_S. \quad 2.7$$

Alguns exemplos mostram que a microscopia CARS é uma ferramenta importante para o estudo de tecidos biológicos [15,16], além da visualização de células vivas, discriminando suas partes graças aos diferentes modos vibracionais, como a vibração do DNA, a proteína amida I [17], o OH (água) [18], e as vibrações dos lípidos [19,20]. Podemos então resumir as características da espectroscopia CARS [14]:

1. O contraste das imagens é baseado nos modos normais de vibração da amostra, evitando precisar de marcadores fluorescentes externos como o uso de corantes usado amplamente na biologia.
2. É mais sensível que a espectroscopia Raman convencional, permitindo a coleta de imagens com baixas potências o que evita o dano da amostra.
3. O sinal anti-Stokes está deslocado das frequências de bombeio e Stokes, portanto facilmente detectável.
4. Em comprimentos de onda perto do infravermelho (como é nosso caso), a profundidade de penetração na amostra é maior.

2.2.1 Teoria do “*Coherent Anti-stokes Raman Spectroscopy*”

A diferença com o espalhamento Raman; que é um fenômeno linear e, portanto, funcional a baixa intensidades de luz. O CARS é uma técnica que age em um regime de maiores intensidades, fazendo dele um fenômeno não linear associado a tensores de susceptibilidade

de ordens superiores. Voltando na equação 2.1, mas desta vez abrindo a equação para o termo não linear $\vec{P}_{NL}(\vec{r}, t)$, temos:

$$\vec{P}(\vec{r}, t) = \vec{P}_L(\vec{r}, t) + \vec{P}_{NL}(\vec{r}, t),$$

$$\vec{P}_{NL,l} = \epsilon_0 \left(\sum_{j,k} \chi_{i,j,k}^{(2)} \vec{E}_j \vec{E}_k + \sum_{j,k,l} \chi_{i,j,k,l}^{(3)} \vec{E}_j \vec{E}_k \vec{E}_l + \dots \right), \quad 2.8$$

$$\vec{P}_{NL,l} = P^{(2)} + P^{(3)} + \dots, \quad 2.9$$

onde $P^{(2)}$ e $P^{(3)}$ são respostas não lineares de segundo e terceiro ordem para meios anisotrópicos, descrita pelos tensores $\chi^{(2)}$ e $\chi^{(3)}$ de dimensões maiores (27 e 81 termos) que no caso linear (9 termos), posto que estão representados por parâmetros i,j,k,l dos diversos campos e que devem assumir as direções x,y e z no somatório. No caso dos cristais, muitos destes termos são zero por causa de regras de simetria [4].

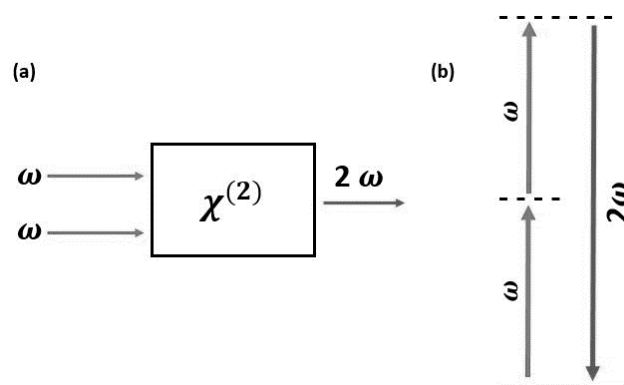


Figura 2.3. Esquema da geração do segundo harmônico, (a) Geometria da geração, (b) Diagrama dos níveis de energia para SHG (Adotado de [5]).

O termo de segunda ordem é responsável por efeitos como a geração de segundo harmônico (SHG), descrito na figura 2.3, geração de soma de frequências (SFG), geração de diferença de frequências (DFG), entre outras. O uso comum destes efeitos é converter a saída de um laser de frequência fixa para uma região espectral diferente, processo que usaremos com os lasers “Mira” e “OPO”. As teorias destes efeitos de segunda ordem não vão ser explicadas em profundidade, mas, na figura 2.3 se mostra como ocorre o processo de geração de segundo harmônico. Nesta se considera a interação ou troca de fótons entre os componentes do campo elétrico, onde dois fótons de frequência ω geram excitações entre estados virtuais (linhas tracejadas), e ao acontecer a recombinação, cria-se um fóton de frequência 2ω .

O termo de terceira ordem é mais importante para a análise deste projeto. Este está associado com os processos de *Four Wave Mixing (FWM)* e o *Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy (CARS)*. A polarizabilidade não linear de terceira ordem depende dos campos eletromagnéticos incidentes e a susceptibilidade elétrica de terceira ordem, como se mostra na equação 2.10.

$$\overrightarrow{P}_{NL,t}^{(3)}(t) = P^{(3)}(t) = \epsilon_0 \chi^{(3)} \vec{E}^3(t). \quad 2.10$$

Com o campo elétrico escrito como:

$$\vec{E}(t) = \vec{E}_1 e^{-i\omega_1 t} + \vec{E}_2 e^{-i\omega_2 t} + \vec{E}_3 e^{-i\omega_3 t} + c.c., \quad 2.11$$

onde $c.c.$ é o complexo conjugado da expressão e \vec{E}_1, \vec{E}_2 e \vec{E}_3 são os campos elétricos das três ondas, com suas correspondentes frequências ω_1, ω_2 e ω_3 . Ao substituir a Eq. 2.11 em 2.10, obtém-se uma série de configurações de frequência que será chamada de ω_4 . Todas as configurações, com frequência positiva são mostradas abaixo:

$$\begin{aligned} & \omega_1, \omega_2, \omega_3, 3\omega_1, 3\omega_2, 3\omega_3 \\ & (\omega_1 + \omega_2 + \omega_3), (\omega_1 + \omega_2 - \omega_3), (\omega_1 - \omega_2 + \omega_3), (-\omega_1 + \omega_2 + \omega_3) \\ & (2\omega_1 \pm \omega_2), (2\omega_1 \pm \omega_3), (2\omega_2 \pm \omega_1), (2\omega_2 \pm \omega_3), (2\omega_3 \pm \omega_1), (2\omega_3 \pm \omega_2). \end{aligned} \quad 2.12$$

Desta maneira a combinação dos três fótons de entrada pode gerar diferentes processos (figura 2.4), nos quais a frequência de saída tem que ser a soma das frequências de entrada cumprindo assim a regra de conservação da energia.

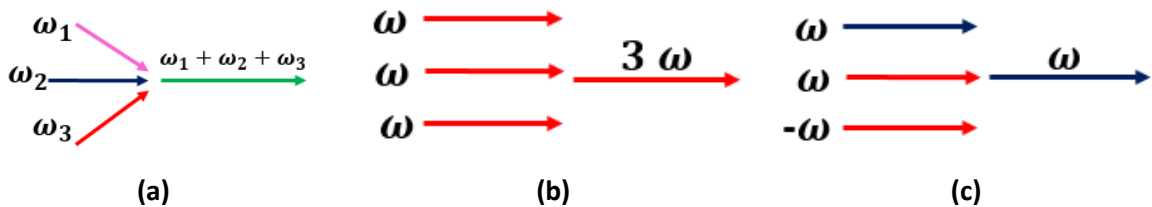


Figura 2.4. Diagramas de Feynman para processos não lineares de terceira ordem. a) *Four Wave Mixing*. (b) Frequência triplicada. (c) O efeito óptico de Kerr [4].

A mistura de ondas que interessa neste trabalho, é representada no processo de *Four Wave Mixing* (Fig 2.5), onde $\omega_4 = \omega_1 + \omega_3 - \omega_2$, e mais especificamente estaremos tratando o caso degenerado onde $\omega_1 = \omega_3$, dessa forma temos:

$$\omega_4 = 2\omega_1 - \omega_2. \tag{2.13}$$

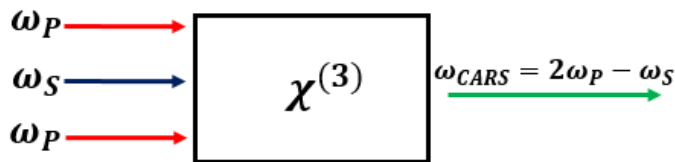


Figura 2.5. Esquema da mistura de quatro ondas degenerada em condições de ressonância com nível vibracional ou CARS, definindo $\omega_4 = \omega_{CARS}$, $\omega_1 = \omega_3 = \omega_P$ e $\omega_2 = \omega_S$.

O efeito CARS acontece quando a energia dos feixes de entrada é selecionada de forma que sua diferença seja igual aos modos normais de vibração da amostra ω_{vib} (ou seja, $\omega_{vib} = \omega_P - \omega_S$), como é mostrado na figura 2.6. As somas das frequências dos lasers criam uma frequência CARS (ω_{CARS}) que é igual a $\omega_{CARS} = \omega_P + \omega_{vib}$, a intensidade deste feixe CARS aumenta várias ordens de grandeza, devido à ressonância com estados vibracionais. Portanto, o sinal CARS pode ser usado para caracterizar diferentes tipos de amostras.

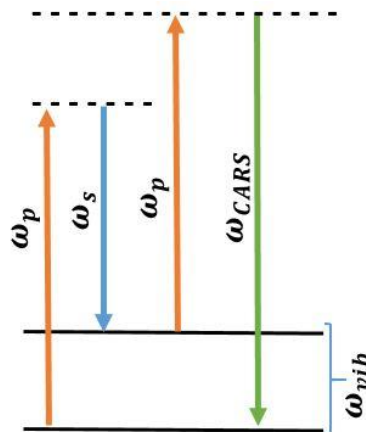


Figura 2.6. Diagrama do processo de espalhamento Raman anti-Stokes coerente (CARS), com a frequência CARS $\omega_{CARS} = 2\omega_P - \omega_S$ e a frequência de vibração molecular $\omega_{vib} = \omega_P - \omega_S$.

Para que a técnica CARS seja eficiente, precisa ter a condição especial da mistura de quatro ondas ressonante, e para isso tem que cumprir a condição de ter transições vibracionais reais, as quais só acontecem quando a energia vibracional é igual a diferença entre as energias dos lasers. A comparação entre o processo ressonante e não ressonante é mostrado na figura 2.7. No caso de não ressonância (esquerda), o laser de bombeio ($2\omega_1$) gera um Raman convencional mostrando-se os picos Stokes e anti-Stokes, e o laser Stokes (ω_2) que

junto com o laser de bombeio gera o pico de FWM (ω_4). No caso ressonante ou CARS (direita), onde a diferença das energias dos lasers é igual à energia vibracional Interatômica da amostra, se gera um só pico de FWM que tem a mesma energia do pico Raman anti-Stokes [13].

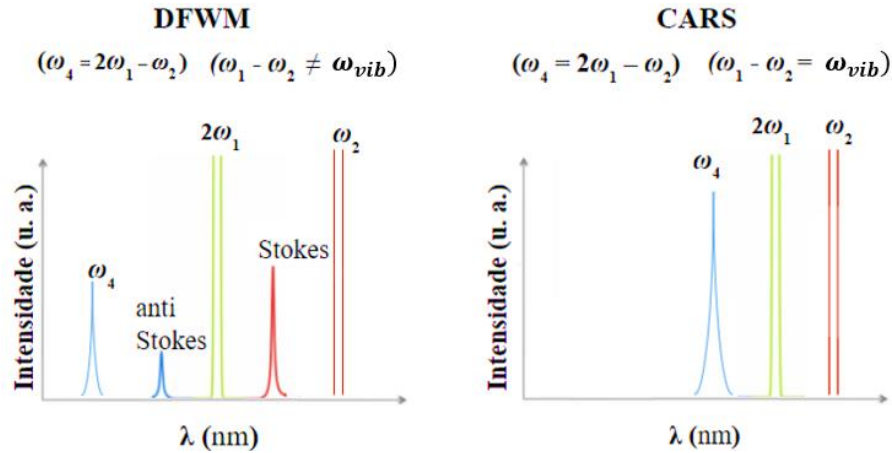


Figura 2.7. Espectros do FWM degenerado não ressonante (esquerda), ressonante com nível vibracional ou CARS (direita) [13].

A partir deste caso de mistura de ondas ressonante, vamos fazer uma análise da polarizabilidade. Da equação 2.12, só são importantes para a técnica CARS três configurações de mistura de frequências $(\omega_1 - \omega_2 + \omega_3)$, $(2\omega_1 - \omega_2)$ e $(2\omega_3 - \omega_2)$, com $\omega_1 = \omega_3$. É assim que a polarização em termos da mistura das frequências é dada por [5]:

$$P_1^{(3)}(\omega_1 - \omega_2 + \omega_3) = 6\epsilon_0\chi^{(3)}E_1E_2^*E_3, \quad 2.14$$

$$P_2^{(3)}(2\omega_1 - \omega_2) = 3\epsilon_0\chi^{(3)}E_1^2E_2^*, \quad 2.15$$

$$P_3^{(3)}(2\omega_3 - \omega_2) = 3\epsilon_0\chi^{(3)}E_3^2E_2^*, \quad 2.16$$

Juntando 2.14, 2.15 e 2.16 com a condição de $\omega_1 = \omega_3$, nós podemos representar a polarização como uma polarizabilidade total $P_T^{(3)}$, generalizando para a mistura de frequências $(2\omega_1 - \omega_2)$.

$$P_T^{(3)}(2\omega_1 - \omega_2) = P_1^{(3)} + P_2^{(3)} + P_3^{(3)} = 12\epsilon_0\chi^{(3)}E_1^2E_2^*. \quad 2.17$$

Sabendo que a intensidade é proporcional a quadrado da polarização (Eq 2.18), temos para o caso da polarização total que:

$$I \propto |P|^2. \quad 2.18$$

Juntando a equação 2.19, e lembrando que o número 1 faz referência ao laser de bombeio e o número 2 o laser Stokes, temos:

$$I_{CARS} = I_{\omega_4} \propto \left| P_T^{(3)}(2\omega_P - \omega_S) \right|^2, \quad 2.19$$

$$I_{CARS} \propto \left| \chi^{(3)} \right|^2 |E_P^2| |E_S^*|^2, \quad 2.20$$

Nós observamos então como a intensidade da técnica CARS (I_{CARS}) é proporcional ao valor dos campos elétricos dos feixes de bombeio e Stokes, além da susceptibilidade de terceira ordem. Esta pode ser reescrita em termos das intensidades dos feixes de bombeio I_P e Stokes I_S .

$$I_{CARS}(\omega_{vib}) \propto \left| \chi^{(3)}(\omega_{vib}) \right|^2 I_P^2 I_S. \quad 2.21$$

Se mantemos fixos os valores destes campos elétricos, e só temos variação em $\chi^{(3)}$, a intensidade pode se resumir a uma expressão proporcional com a susceptibilidade de terceira ordem.

$$I_{CARS} \propto \left| \chi^{(3)} \right|^2. \quad 2.22$$

Porém, mesmo quando $\omega_P - \omega_S$ estejam longe das ressonâncias vibracionais, os campos produzidos pelo laser de bombeio e Stokes podem induzir uma polarização macroscópica de frequências anti-Stokes própria da resposta eletrônica do material, como foi explicado na figura 2.7. Este problema de não ressonância foi visto em nossas medidas experimentais que serão apresentadas no capítulo de resultados. Para entender tal fenômeno, pode-se descrever a susceptibilidade como uma parte ressonante e outra não ressonante como [14]:

$$I_{CARS} \propto \left| \chi_r^{(3)} + \chi_{nr}^{(3)} \right|^2, \quad 2.23$$

onde pode-se assumir $\chi_{nr}^{(3)}$ como uma constante já que não depende das escolhas de frequência de interesse, e $\chi_r^{(3)}$ como:

$$\chi_r^{(3)} = \frac{A}{(\Delta - i\gamma)}, \quad 2.24$$

onde A é uma amplitude arbitrária; e $\Delta = \omega_p - \omega_s - \omega_{vib}$ é descrito em função das frequências dos lasers ω_p, ω_s , e de ω_{vib} e com largura de banda ou tempo de vida do estado vibracional. Introduzindo estas considerações na equação 2.23, temos que a intensidade é:

$$I_{CARS} \propto |\chi_{nr}^{(3)}|^2 + |\chi_r^{(3)}|^2 + 2\chi_{nr}^{(3)} \text{Re}(\chi_r^{(3)}). \quad 2.25$$

O primeiro termo da expressão 2.25, é chamado de fundo não ressonante e é independente da frequência de interesse. O segundo termo é a contribuição da parte ressonante com o nível vibracional. E o terceiro termo é uma combinação da parte não ressonante $\chi_{nr}^{(3)}$, e da parte real ressonante $\text{Re}(\chi_r^{(3)})$ que contém uma resposta vibracional.

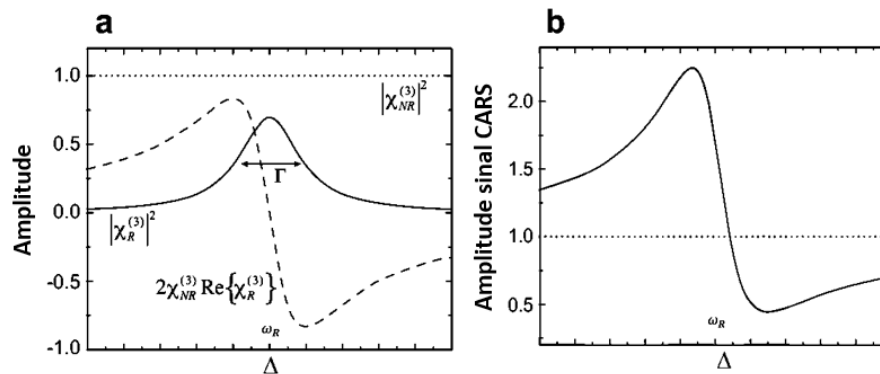


Figura 2.8. Gráficos da relação da amplitude do sinal em termos da variação Δ (a) Representação das três componentes da intensidade CARS, termos individuais; (b) Intensidade total CARS em relação ao termo não ressonante [14].

Todos os termos individuais são apresentados na parte (a) da figura 2.8. Dado que o terceiro termo $\left(2\chi_{nr}^{(3)} \text{Re}(\chi_r^{(3)})\right)$ tem forma dispersiva, a adição dos termos individuais ou intensidade CARS (I_{CARS}) sofre um desvio (figura 2.8 b), o que faz que a forma da linha CARS não se apresente como uma Lorentziana, mas sim como forma de linha assimétrica. Entretanto a sinal CARS aumenta quando está próximo às condições de ressonância com os estados vibracionais da molécula. Dessa forma, o CARS apesar de possuir características espectrais um pouco diferentes dos espectros Raman, possui uma intensidade de emissão ordens de grandeza superior.

No entanto, para caracterizar completamente o material é importante acessar as diferentes energias de vibração, para isso é necessário usar a técnica chamada de Multiplex CARS.

2.3 Multiplex CARS

Na configuração Multiplex CARS, o feixe de Stokes é espectralmente largo, geralmente no regime de femtosegundos. Por outro lado, a largura espectral do feixe de bombeio ω_p é estreita definindo a resolução espectral do espectro CARS. Dessa forma o processo CARS irá ocorrer numa ampla faixa de energias vibracionais de ligação.

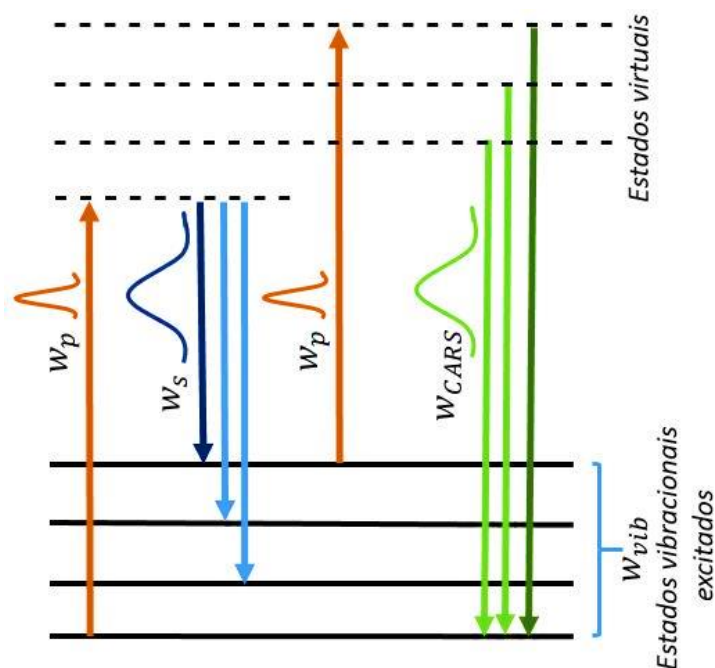


Figura 2.9. Diagrama do processo de Multiplex CARS.

A escolha dos lasers depende da aplicação específica, e em geral se deseja ter um feixe Stokes com espectro tão amplo quanto possível. Portanto, nós trabalhamos com dois tipos de laser de espectro largo, um laser pulsado de femtosegundos e um laser supercontínuo, dos quais falaremos no próximo capítulo.

A espectroscopia CARS teve várias melhorias desde sua invenção em 1999 quando o primeiro microscópio CARS exigiu quase 30 minutos na aquisição de uma única imagem. Hoje se geram imagens com taxas de aquisição de mais de 30 quadros por segundo [21, 22, 23]. Um dos maiores desafios da técnica é eliminar a contribuição não ressonante, que por muitas vezes pode mascarar o sinal vindo das ressonâncias vibracionais.

Capítulo 3

3. Montagem experimental

Neste trabalho instalamos dois sistemas diferentes para multiplex CARS com o fim de fazer a comparação e escolher o sistema que melhor se adapte aos nossos objetivos. Ambos sistemas têm uma linha laser com pulsos menores de 150 femto-segundos gerados pelo “MIRA”. A seguir apresentaremos uma pequena seção teórica dos principais aparelhos usados (lasers de femtosegundos e CPF), assim como os esquemas experimentais usados para a técnica de multiplex CARS.

3.1 Coherent mira optima 900-f e optical parametric oscillator (OPO)

Como foi mencionado anteriormente, para ter processos não lineares é preciso trabalhar com fontes de luz de altas potências, como são as provenientes dos lasers pulsados. Nosso primeiro esquema experimental utiliza dois tipos de lasers pulsados, o *MIRA*, e o *OPO*, ambos da empresa *Coherent*. Abaixo vamos explicar um pouco sobre sua teoria de operação.

3.1.1 Teoria e funcionamento dos lasers pulsados

Alguns tipos de laser podem emitir luz durante pequenos intervalos de tempo. Estes são chamados de lasers pulsados, e cada vez são mais importantes para o estudo de materiais e amostras biológicas. Normalmente, para o estudo da técnica CARS o uso de lasers ultracurtos (femtosegundos) não é muito conveniente já que reduz o contraste da imagem [14], perdendo informação dela. Mas, no caso de multiplex CARS ganha-se a vantagem do acesso a mais modos vibracionais das moléculas, devido ao fato que estes pulsos curtos apresentam espectros mais largos (em torno de alguns nanômetros). Outra vantagem deste tipo de laser é maiores potências de pico, já que esta é inversamente proporcional com o tempo de duração do pulso, como é mostrado na equação 3.1. Nesta equação, P_p é a potência

pico, $\langle P \rangle$ é a potência média do laser, τ_p a largura temporal do pulso e f_r a frequência de repetição dos pulsos [30, 31].

$$P_p = \frac{\langle P \rangle}{\tau_p f_r} . \quad 3.1$$

A largura temporal do pulso τ_p é dada pelo número de modos longitudinais da cavidade laser que estejam acoplados dentro da envolvente (Fig 3.1). Quanto mais curta a duração desse pulso, maior será a largura espectral do laser, indicando que maior será o número de frequências que saem simultaneamente do laser. A diferença do que acontece no funcionamento usual do laser de emissão de luz contínua é que os modos longitudinais evoluem independentes ou completamente desfasados. Mas, se o campo elétrico dos modos longitudinais oscila com fases bloqueadas (Técnica de geração de pulsos, Mode-locking), a soma destes quando estão em fase, originará um pico de intensidade ou pulso de luz. A duração deste pulso terá lugar até que as oscilações voltem a estar fora de fase.

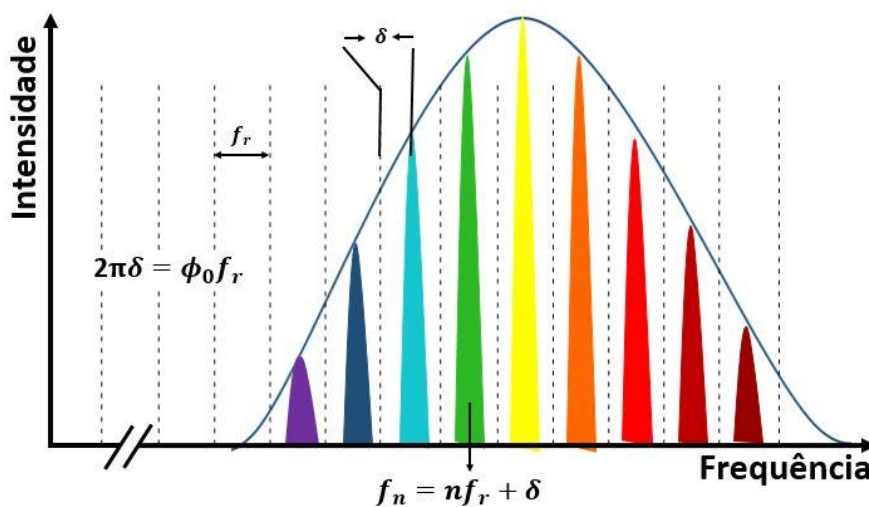


Figura 3.1. Diagrama de intensidade em função da frequência envolvente do laser pulsado. O espectro de saída do laser Mode-locking consiste em um pente de n frequências ópticas, separadas pela frequência de repetição f_r , que pode ou não ter um deslocamento δ .

Se aumentar o número modos longitudinais em fase, a superposição temporal vai dar lugar a pulsos mais curtos com espectros longitudinais mais largos.

3.1.2 Montagem experimental

Para a primeira configuração (Fig 3.2) usamos uma linha de laser Stokes (ω_s) de 800 nm, que resulta de um laser de titânio-safira (*MIRA*) com pulsos menores a 150 fs. Este laser é sintonizável de 700 nm a 980 nm, com uma frequência de repetição de pulso de 76 MHz, e é alimentado por um laser (*Verdi-V10*). A potência normal de saída do laser de alimentação é de 10 W com um comprimento de onda de 532 nm e modo gaussiano (TEM_{00}), o que permite que o laser de titânio-safira alcance potências de até 1,6 W em modo pulsado (dependente do alinhamento do laser).

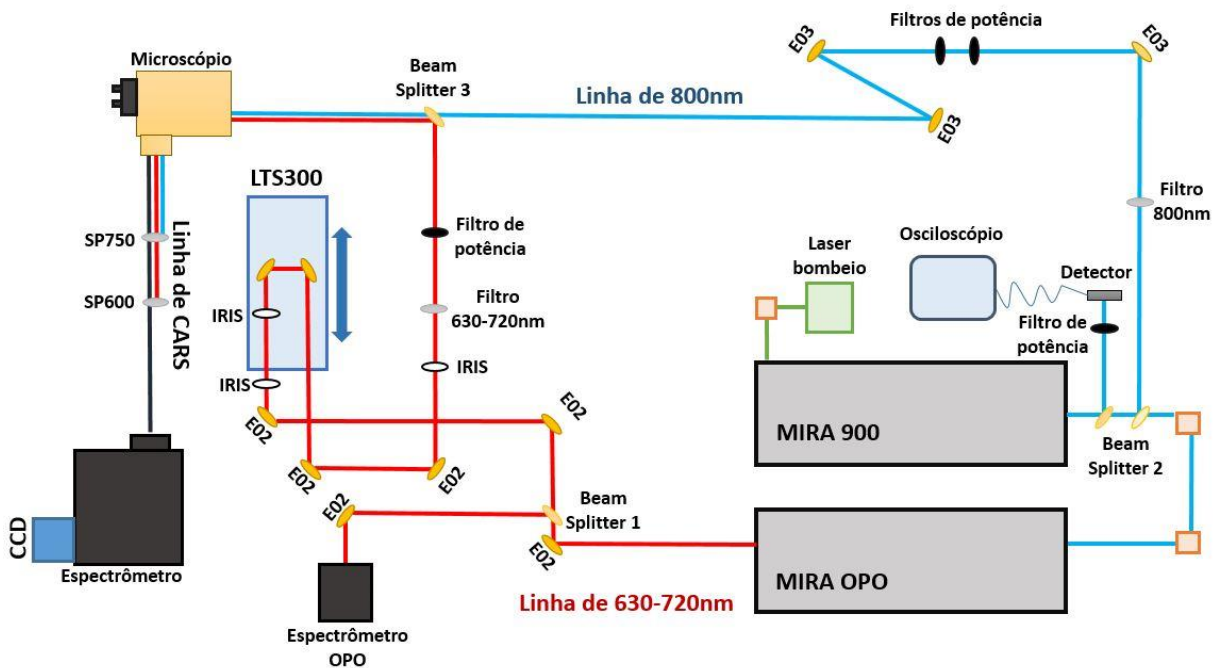


Figura 3.2. Diagrama experimental multiplex CARS com os lasers pulsados “Mira Optima 900-F” e o “optical parametric oscillator (OPO)”; Laser bombeio-laser (*Verdi-V10*) de $Nd:YVO_4$; E02-Espelho dielétrico banda larga de 400-750 nm (BB1-E02); E03-Espelho dielétrico banda larga de 750-1100 nm (BB1-E03); SP750-short pass filters 750 nm; SP600-short pass filters 600 nm; Filtro 800nm-Multiphoton filter 850/310; LTS300- estágio de translação linear “Thorlabs’LTS300(/M)”.

Ao sair do laser Stokes (Mira-900) o feixe com polarização horizontal é dirigido a dois divisores de feixe (do inglês *Beam splitters*) 10/90, chamados de *Beam Splitter 2* na figura 3.2. No primeiro o feixe é dividido em um 10% para o detector, que tem a tarefa de monitorar o pulso do laser com ajuda do osciloscópio, e em um 90% dirigido para o seguinte *beam splitter* 10/90. No segundo 90% do feixe é enviado à alimentação do laser OPO e 10% para nossa montagem experimental. No caminho óptico da linha de 800 nm temos alguns filtros e

espelhos (BB1-E03 da “Thorlabs”) que direcionam o laser para o próximo divisor de feixe (*beam splitter* 3), onde se juntará com a linha de bombeio.

A linha de laser de bombeio (ω_p) pode ser variada de 630 a 720 nm em passos de 1 nm. Nesse caso foi utilizado o laser do tipo “OPO” com pulsos de 150 fs e feixe em modo gaussiano de aproximadamente 2 mm. Em nossa configuração, o laser OPO é alimentado pelo laser “MIRA”. Esses comprimentos de onda têm uma sintonização totalmente independente um de outro.

O feixe que sai do OPO passa pelo *beam splitter* 1, que é um divisor de feixe 10/90, onde 10% da intensidade da luz é refletida para o espectrômetro OPO que monitora o comprimento de onda de saída do laser, e 90% é transmitida para nossa montagem experimental. Nele temos alguns espelhos (BB1-E02) e um estágio de translação linear “Thorlabs’LTS300(/M)” controlado por um motor de passo. O estágio de translação adquire muita importância no processo de multiplex CARS, posto que para obter uma frequência CARS (ω_{CARS}), que surge da combinação das frequências de bombeio (ω_p) e Stokes (ω_s), estas duas últimas tem que estar em perfeito alinhamento tanto espacial como temporal.

O primordial para obter este alinhamento é que o caminho óptico das duas linhas de lasers tenham a mesma distância, (o que equivale a dizer que os pulsos chegarão na amostra simultaneamente), tomando como referência o ponto no qual os lasers se dividem até onde esses mesmos se encontram, em nosso caso o *beam splitter* 3 (T760lpxr). Para confirmar o alinhamento espacial e temporal se utilizou o princípio da mistura de quatro ondas (FWM). Assim, quando os dois feixes estão em sincronia temporal e espacial se produz um pico intenso de FWM. É importante destacar que a largura espectral deste depende da largura dos lasers de bombeio e Stokes.

Os dois feixes foram sobrepostos em um microscópio confocal “Nikon eclipse Ti” (figura 3.3) composto por objetivas microscópicas. Na parte superior, utilizada para focalizar os feixes na amostra está uma objetiva “Plan Fluor ELWD” com ampliação 40X e abertura numérica (NA) de 0.6. Na parte inferior, a objetiva “TU Plan Fluor EPI P” com ampliação e

abertura numérica maior 100x/0.9, para coletar o máximo de informação proveniente da amostra.

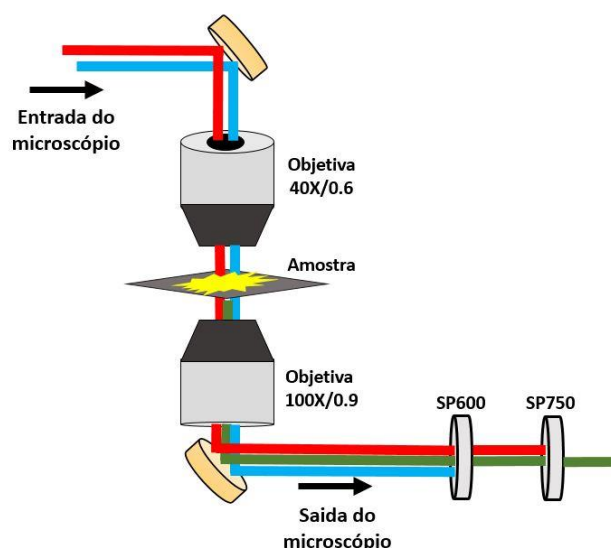


Figura 3.3. Diagrama da montagem experimental do microscópio *Nikon eclipse Ti* e a amostra.

Os sinais dos lasers transmitidos da amostra passam pelos filtros passa baixa SP750 e SP600, nos quais se eliminam as linhas do laser de bombeio e Stokes. Desta forma permitindo a passagem só da linha CARS que leva a informação que precisamos e que é direcionada para o espectrômetro (Andor) e detectado pela CCD (iDus Andor). A potência máxima que atinge na amostra é de $\pm 40 \text{ mW}$, sendo está uma soma das potencias semelhantes provenientes da linha do laser de bombeio e da linha do laser Stokes.

3.2 Coherent Mira optima 900-f e photonic crystal fibers (PCF)

Na segunda montagem experimental, nós desenvolvemos micro espectroscopia Multiplex CARS de banda ultra larga, usando comprimentos de onda de infravermelho (IR), obtidos a partir de uma luz super contínua que é gerado por uma fibra de cristal fotônica (PCF).

3.2.1 Teoria e funcionamento da fibra de cristal fotônica (PCF)

Como já foi mencionado, a aplicação dos pulsos do laser de bombeio e Stokes excitam múltiplas transições Raman. Para isso, é preciso que o espectro do laser Stokes seja largo suficiente para obter as respostas vibracionais das moléculas em diferentes

comprimentos de onda. Um método alternativo para obter um espectro largo, é usar uma fonte de luz super contínua (SC), as quais requerem só algumas dezenas de mW de potência para funcionar [32].



Figura 3.4. Fibra de cristal fotônica (PCF), FemtoWHITE CARS da NKT photonics [33].

Esta fonte de luz super contínua é produto da focalização de um intenso pulso de laser em um meio não-linear [33]. As propriedades do feixe de saída do PCF (do inglês Photonic Crystal Fibers) são altamente sensíveis à largura de pulso, comprimento de onda e potência do laser de bombeio o qual para nós é o laser *Coherent Mira Optima 900-F*. Em nosso caso o super contínuo é dado pela fibra de cristal fotônica (figura 3.4), que consiste em uma região de revestimento micro estruturado com um arranjo hexagonal de furos de ar que dirige a luz para um núcleo de sílica pura de 1-2 μm de diâmetro (Figura 3.5).

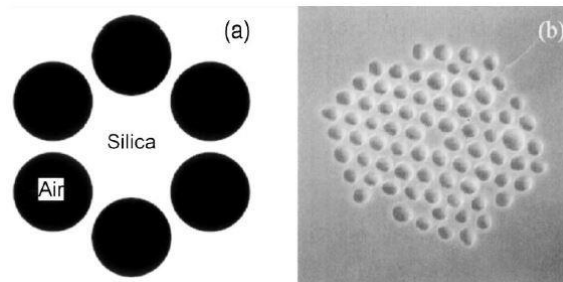


Figura 3.5. a) Simulação de uma fibra multimodo micro estruturada, construída por um núcleo de Sílica e envolvido por um anel de furos de ar. b) Imagem de micrografia electrónica do revestimento interno e do núcleo da fibra de ar-sílica [34].

O confinamento da luz é devido a uma banda proibida criada em estruturas com variação periódica no índice de refração total interna no núcleo da sílica e na interface do revestimento do ar. Os tamanhos destes vazios de ar permitem diferentes graus de liberdade, ocasionando mudanças nas propriedades de propagação da luz dentro da fibra. Foi demonstrado que estas fibras exibem comportamentos únicos dependendo da mudança na estrutura [34], como dispersão anômala de velocidade de grupo (GVD) em comprimentos de onda curtos.

Ao injetar pulsos ultracurtos e com baixa potência na fibra, pode se gerar uma luz super contínua e também com pulsos ultracurtos e de luz coerente. Estas fibras PCF podem então ser usadas para a espectroscopia multiplex CARS.

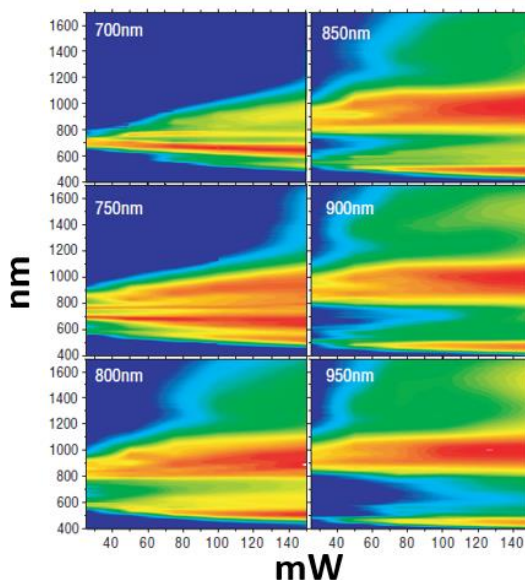


Figura 3.6. Mapa de intensidade da luz de um super contínuo, dependente dos comprimentos de onda do laser de bombeio [33].

Utilizamos a fibra de cristal fotônica *FemtoWHITE CARS* da *NKT photonics* projetada para ter dispersão zero em 800 nm, e gerar um super contínuo com uma faixa de 400nm-2000nm. As formas do espectro (Figura 3.6) emitido variam com respeito ao comprimento de onda do laser de bombeio e à potência acoplada (potência do super contínuo medida após o objetivo de colimação). Estes mapas são importantes para obter os perfis espectrais desejados.

Na figura 3.6, temos os principais espectros da luz branca, para diferentes comprimentos de onda procedentes do laser de bombeio (700nm-950nm). As figuras mostram a intensidade da luz obtida para o super contínuo de 400nm a 1600nm que depende da potência acoplada na fibra PCF medida de 40 a 140mW. Estas figuras também podem ser apresentadas como gráficos de densidade espectral com respeito ao comprimento de onda, que também têm dependência da potência de acoplamento.

Os espectros da figura 3.7 têm largura espectral conveniente para nosso experimento de 785nm-1100nm, foram obtidos com a fibra de cristal fotônica (*FemtoWHITE*

CARS) bombeada com um comprimento de onda de 785 nm proveniente do laser *Coherent Mira Optima 900-F*.

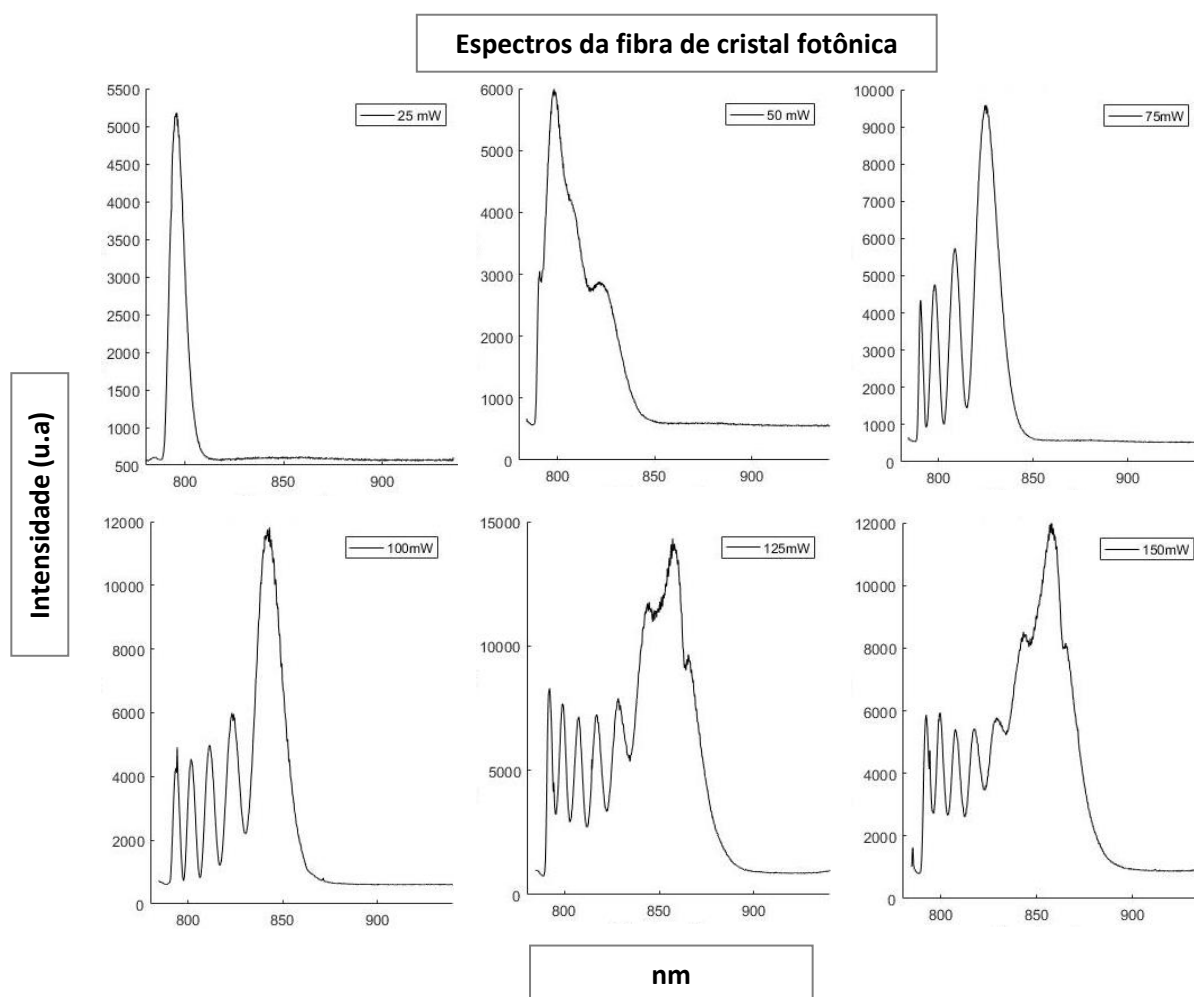


Figura 3.7. Dependência da potência acoplada com respeito ao comprimento de onda do laser de bombeio 785 nm. Os espectros produzidos pelo laser “*Coherent Mira Optima 900-F*”.

A forte dependência do espectro de luz branca com a potência acoplada mostra que é importante manter uma potência constante e alta o suficiente para termos um espectro largo para que seja aplicado para espectroscopia multiplex CARS.

3.2.2 Montagem experimental

Nesta configuração de multiplex CARS com banda ultra larga usamos duas linhas laser, uma delas proveniente do laser *Mira Optima 900-F* descrito na montagem anterior. Neste caso o laser de titânio safira representará a linha de bombeio ω_p , lembrando que

$\omega_{CARS} < \omega_p < \omega_s$. A linha do laser Stokes será o espectro contínuo gerado pela fibra na região 750 - 1100 nm.

Os diagramas experimentais sofreram leves modificações como pode ser notado nas figuras 3.8 e 3.10. A linha de bombeio é trocada de 800 nm, que foi o comprimento de onda originalmente usado na primeira configuração, para 785 nm. Estas mudanças só ocorreram com o fim de um melhor aproveitamento dos elementos ópticos presentes no laboratório. Serão apresentadas as duas configurações, porque foram obtidos resultados interessantes com ambos comprimentos de onda.

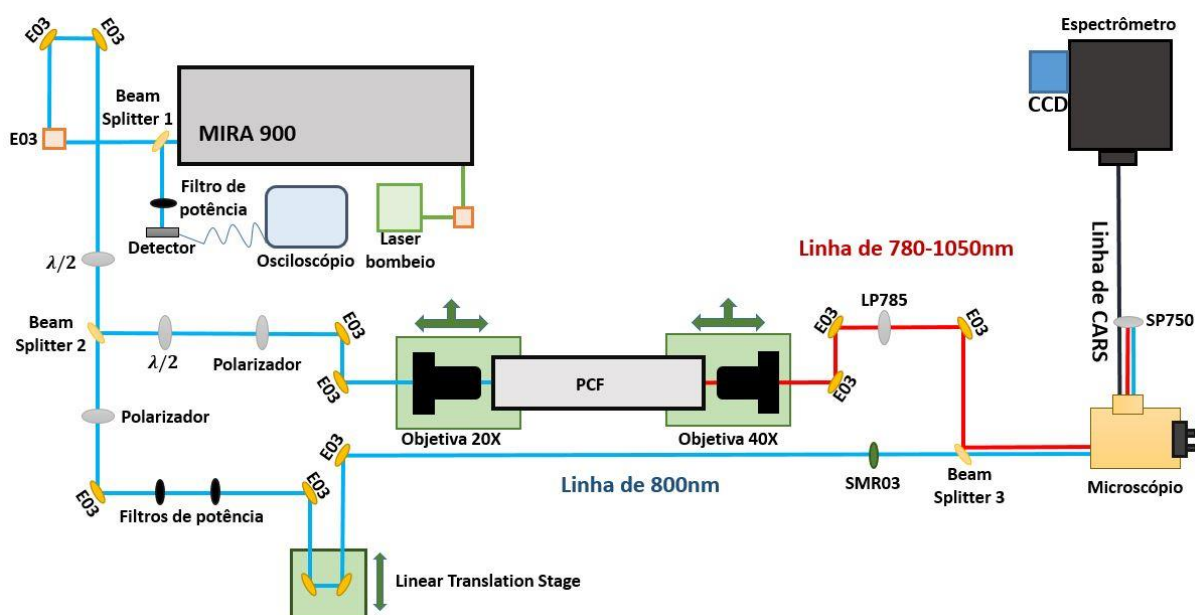


Figura 3.8. Diagrama experimental multiplex CARS com o laser pulsado "Mira Optima 900-F" e a fibra de cristal fotônico (PCF); Laser bombeio-laser (Verdi-V10) de Nd:YVO₄; E03-Espelho dielétrico banda larga de 750-1100 nm (BB1-E03); SP750-short pass filters 750 nm; Beam Splitter 3- T760lpxr da chroma; SMR03-Lente; LP785- Filtro long pass LP02-785RU-25 da Semrock.

Vemos na figura 3.8 como a linha de bombeio ω_p sai do laser Mira-900 passando pelo divisor de feixe (*Beam Splitter 1*), que da mesma forma que na configuração anterior divide 10% da potência para um detector que está ligado ao osciloscópio, e cuja função é monitorar os pulsos provenientes do laser, tarefa importante já que a fibra fotônica funcionará corretamente só se o laser de alimentação é pulsado. O 90% restante vai dirigido por uma série de espelhos de prata (BB1-E03) até uma placa de $\lambda/2$, que cumpre duas funções pertinentes. A primeira consiste em dispor a polarização do laser e da fibra na mesma direção, com a intenção de melhorar o processo de multiplex CARS. A segunda é modificar a direção

da polarização que chega no *beam splitter* 2, procurando com isso distribuir convenientemente as potências da linha laser que vão atingir na fibra fotônica (menor a 300 mW) e a linha que continua o caminho do feixe de bombeio.

Ao sair do divisor de feixe 2, a linha de 800 nm continua até um polarizador que diminui ainda mais a potência do laser para logo ser levado a um estágio de translação (estágio da “Thorlabs” com ajuste manual de 50 mm). Este estágio vai ter a mesmo objetivo que na primeira configuração, onde é utilizado para conseguir um alinhamento temporal dos feixes de bombeio e Stokes.

Do outro lado, a linha do laser Stokes (gerada na fibra de cristal fotônica) inicia no *beam splitter* 2, onde temos uma combinação da placa $\lambda/2$ e do polarizador que servem como atenuador variável da potência do laser de bombeio. Para evitar danos na fibra é relevante o controle do nível da potência do laser, a recomendação do fabricante é não exceder os 300 mW.

O suporte para a fibra (figura 3.9) é uma parte essencial da configuração, já que a estabilidade e alinhamento do laser pode modificar o espectro da fibra que possui diâmetro de núcleo só de 1.8 μm . Em nosso caso, usamos como suporte dois estágios “NanoMax 300” da “Thorlabs”, os quais permitem ajustes em X,Y e Z, e servem para alinhar as objetivas microscópicas à fibra óptica.

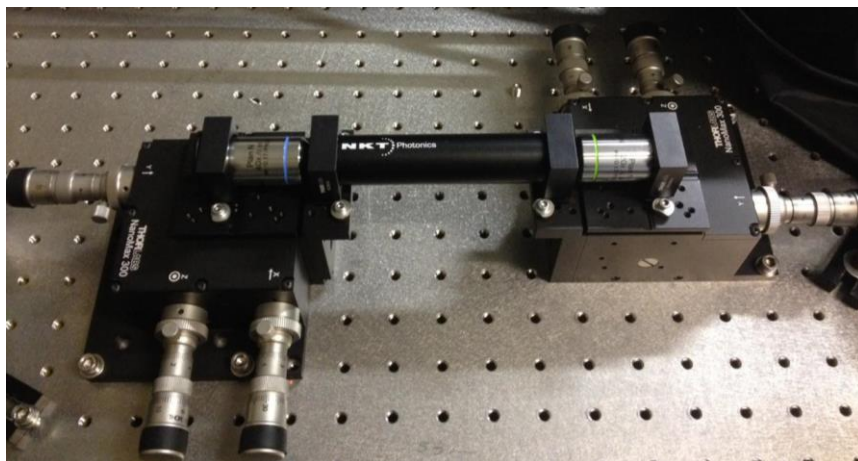


Figura 3.9. Imagem da montagem experimental da fibra de cristal fotônica.

Para focar o feixe de alimentação na PCF é usada uma objetiva “*Plan N*” da “*Olympus*” com abertura numérica 0.40 e ampliação 20X. Após a fibra PCF (*FemtoWHITE CARS*) é usada uma objetiva *Plan N 40X/0.65* também da *Olympus* com o fim de colimar o feixe de saída. A eficiência do acoplamento é uma relação da potência medida após a objetiva de colimação (*Plan N 40X/0.65*) e a potência do laser medida antes da objetiva de foco (*Plan N 20X/0.40*). Esta eficiência depende da óptica usada para atingir com precisão o diâmetro do núcleo da fibra.

Na configuração mostrada na figura 3.9, obtivemos 50% de acoplamento após a objetiva de colimação. Em um experimento posterior (não apresentado neste trabalho) onde se trocou a ordem das objetivas, deixando como objetiva de acoplamento a *Plan N 40X/0.65* e como objetiva de colimação a *Plan N 20X/0.40*, a eficiência de acoplamento aumentou para 60%. No entanto, nesta última configuração a geração do super contínuo ficou mais instável, então decidiu-se voltar na configuração inicial. Nestes dois casos a potência de entrada na fibra *FemtoWHITE CARS* gerou espectros como foi apresentado na figura 3.7.

A largura espectral da fibra óptica vai de 400 nm até aproximadamente 1200 nm. Nós limitamos esta largura espectral com um filtro passa alta 785 nm da “*Semrock*” (LPO2-785RU-25), para cumprir a condição da técnica CARS onde o comprimento de onda de bombeio tem que ser menor que o comprimento de onda Stokes ($\omega_p < \omega_s$). Uma vez limitado o comprimento de onda, os feixes de Stoke e de bombeio se juntam no *beam splitter* 3 (T760lpxr da chroma) e logo enviados para o microscópio (fig 3.3).

No segundo esquema (figura 3.10), se implementaram algumas modificações principalmente pela troca de comprimento de onda do laser de bombeio “*MIRA*”, de 800 nm para 785 nm. O comportamento da fibra *PCF* não se vê afetado pela mudança. Mas, por complicações apresentadas no esquema prévio por causa da instabilidade do laser Mira-900, se adicionou um isolador de Faraday da “*Newport*” (*Broadband Faraday Optical Isolators*), com faixa espectral de 720-950 nm.

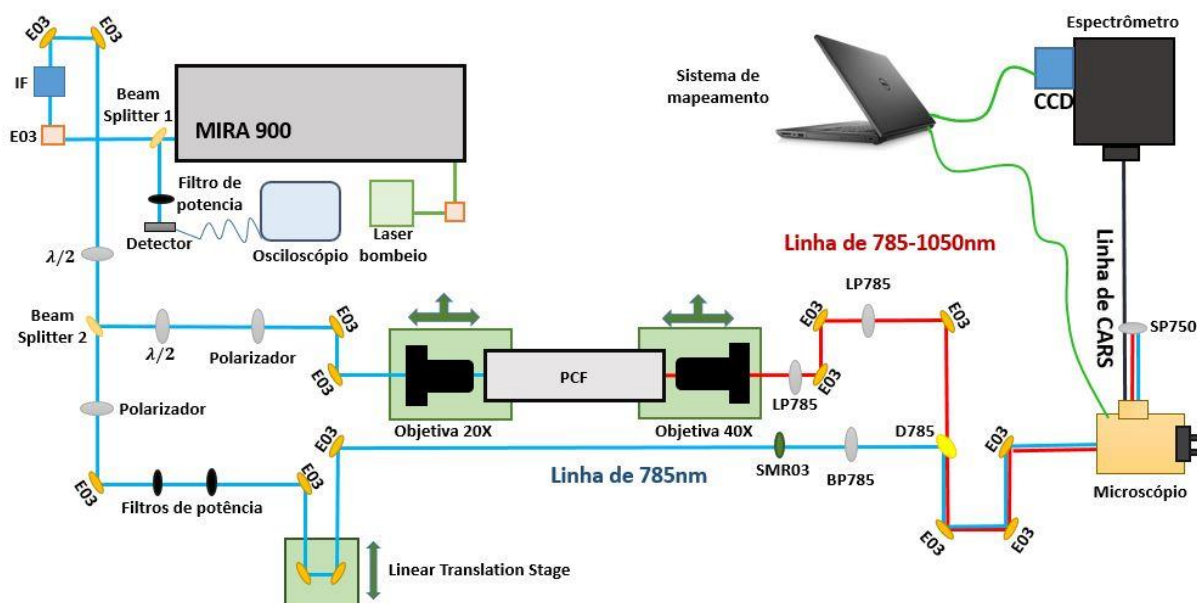


Figura 3.10. Diagrama experimental multiplex CARS com o laser pulsado “Mira Optima 900-F” e a fibra de cristal fotônico (PCF); Laser bombeio-laser (Verdi-V10) de Nd:YVO₄; E03-Espelho dielétrico banda larga de 750-1100 nm (BB1-E03); SP750-short pass filters 750 nm; Beam Splitter 3- T760lpxr da Chroma; SMR03-Lente; LP785- Filtro long pass LP02-785RU-25 da Semrock; BP785- Filtro Band pass LL01-785; D785- Dicroico Di03-R785 da Semrock; IF-Isolador de Faraday da Newport (Broadband Faraday Optical Isolators), com faixa espectral de 720-950 nm.

Agora, o feixe de saída do laser de bombeio passa pelo isolador de Faraday o qual elimina a luz que é refletida da fibra óptica. Esta reflexão acontece porque a objetiva de acoplamento focaliza o feixe próximo da fibra a qual não possui revestimento antirreflexo e como resultado o feixe é refletido de volta para o laser, gerando instabilidade no estado pulsado. Para alcançar uma alta eficiência de acoplamento se recomenda o uso do isolador de Faraday, e potências semelhantes nas linhas lasers de bombeio e Stokes quando estas se juntam no dicroico (D785).

No capítulo de resultados argumentamos que esta configuração experimental foi a que mais se adaptou as nossas necessidades. Portanto, se desenhou um sistema de mapeamento (Fig. 3.11.), constituído por uma USB-6009 (placa conversora digital-analógica: DAQ) da “National Instruments” que gera os sinais de voltagem para controlar um estágio piezoelétrico XY que, junto com sua controladora (Nano-drive) ambas da “Mad City Labs” deslocam a amostra com resolução de dezenas de nanômetros e com comprimento máximo de varredura de 25 μm .

Os instrumentos foram ligados em três equipamentos da montagem experimental por meio de um programa desenvolvido em *LabVIEW* (Apêndice 2) que gera três sinais elétricos. Dois sinais analógicos para mover a amostra no estágio piezoelétrico XY, e um sinal digital TTL para o espectrômetro realizar a aquisição de um espectro. Os sinais são sincronizados de tal maneira que é adquirido um espectro a cada posição da amostra. A DAQ usada gera sinais analógicos apenas de 0 a 5 volts, por conseguinte a varredura é limitada a um comprimento de 25 μm .

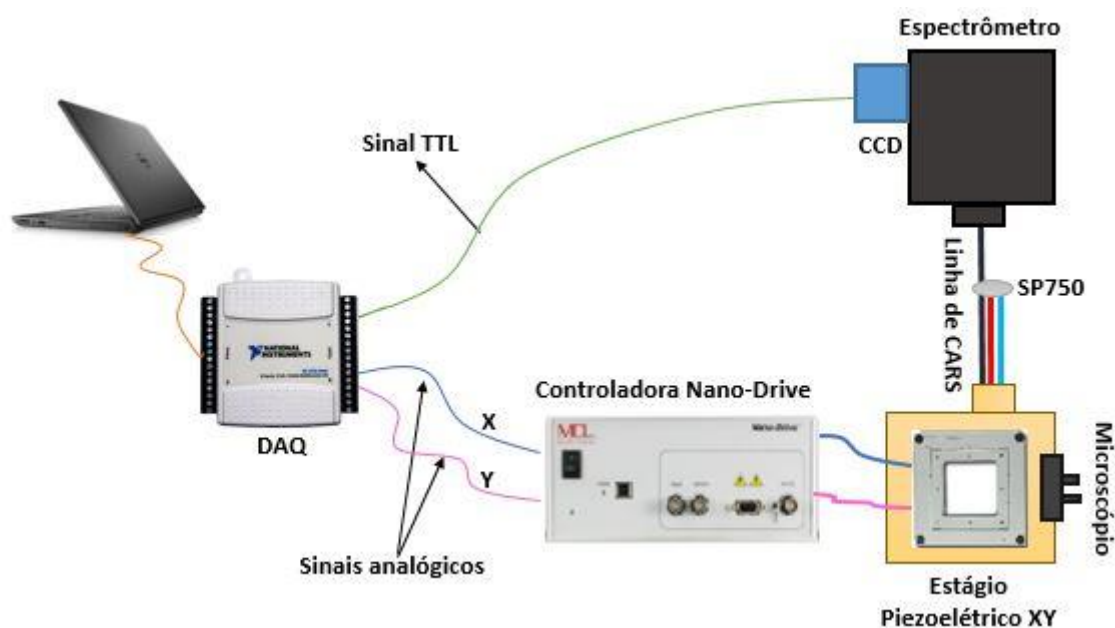


Figura 3.11. Sistema de mapeamento.

No seguinte capítulo, analisamos os resultados obtidos pelas diferentes montagens experimentais, e comparamos com os espectros Raman das amostras de referência. A partir desta análise se argumentara qual montagem experimental é a mais indicada para a caracterização das amostras para nossos objetivos.

Capítulo 4

4. Resultados e discussão

Este capítulo vai ser dividido em cinco seções. A primeira (4.1), apresenta os resultados obtidos pela espectroscopia Raman convencional das amostras de referência (acetonitrila, metanol e acetona). É importante salientar que utilizamos essas amostras a fim de comparar os espectros Raman destas amostras com os espectros feitos pela espectroscopia CARS e multiplex CARS, a fim de validar o funcionamento destas técnicas. Não é intenção desta dissertação identificar e descrever os modos normais de vibração destas moléculas, os quais dão origem a seu espectro Raman.

Na segunda (4.2), mostramos os resultados obtidos na montagem experimental “MIRA” com “OPO”, (montagem experimental da figura 3.2), com uma linha Stokes (ω_S) de 800 nm e a linha de bombeio (ω_P) variada de 630 a 720 nm.

Na terceira seção (4.3), “MIRA” com “PCF”, vamos mostrar somente os resultados para a configuração mostrada na figura 3.10, com o comprimento de onda do laser de bombeio em 785 nm. Os resultados referentes a montagem experimental da figura 3.8, serão mostrados no apêndice 1.

Nestas três primeiras partes se usaram as mesmas amostras de referência (acetonitrila, metanol e acetona) a fim de comparar os resultados experimentais da espectroscopia Raman convencional com os resultados da técnica CARS.

A seção 4.4, vamos exibir os resultados do mapeamento de duas amostras específicas, microesferas de poliestireno de 3 μm de diâmetro e tecido biológico (corte de tecido cerebral de camundongo).

Na última seção (4.5), vão se discutir os resultados apresentados, quais são as possíveis melhorias nas montagens experimentais, e qual destes é mais conveniente para cumprir os objetivos propostos nesta dissertação.

4.1 RESULTADOS DE ESPECTROSCOPIA RAMAN

Para este estudo foi necessário obter os espectros Raman das amostras de referência. Se escolheram estas amostras pelo fato de ter propriedades de transparência, condição ótima para uma primeira análise, já que nosso sistema de multiplex CARS funciona por transmissão e não por retro espalhamento. Além desta condição de transparência, as amostras de referência (acetone, metanol e acetona) não tem especial interesse em nosso trabalho, portanto, não falamos muito das características dos espectros Raman.

Para obter estes espectros Raman foi utilizada uma montagem experimental constituída por um laser semiconductor contínuo verde de 561 nm; espelhos de prata; um microscópio invertido Nikon Eclipse com objetivas variáveis de 10x, 40x e 60x; um espelho dicróico de 45 graus, ubicado dentro do microscopio, que reflete comprimentos de onda abaixo de 561 nm e transmite acima deste valor; lente focalizadora; um espectrômetro Andor com câmera CCD acoplada, e um filtro passa alta (long pass) em 561 nm para evitar a saturação do espectrômetro devido a alta intensidade do laser.

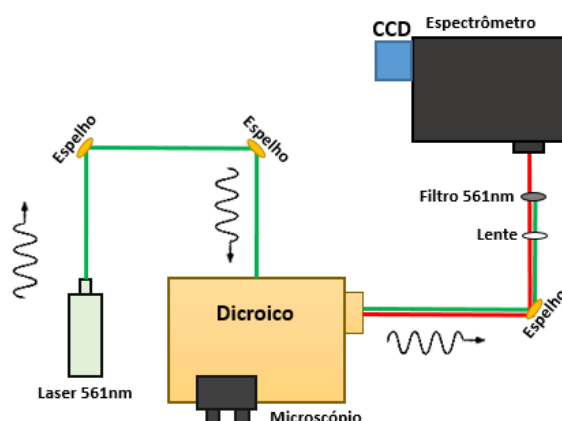


Figura 4.1. Esquema da montagem experimental para microscopia Raman.

A montagem experimental funciona por retro espalhamento da luz. Esta luz proviene de um laser semiconductor monocromático com comprimento de onda de 561 nm

que entra no microscópio pela parte traseira, batendo no espelho dicróico que esta em um ângulo de 45 graus, este espelho dicróico dirige a luz até a objetiva microscopica a qual a enfoca na amostra. Agora, da amostra sain três conjuntos de frequencias geradas pelo processo Raman, estas frequencias são transmitidas pelo dicróico e dirigidas para fora do microscopio. Fora do microscopio a luz é levada para a lente focalizadora e ao filtro passa alta de 561 nm, que cortar a frequência do laser e deixar passar apenas a parte relativa ao espectro raman Stokes que é encaminhado para o espectrômetro e detectado pela CCD (Fig 2.3). O procedimento é o mesmo para todas as amostras.

4.1.1 Acetona

A acetona ou propanona (CH_3COCH_3), líquido incolor com odor característico, usado como solvente e antisséptico, é volátil e inflamável [35,36]. Quando se realiza a medida de espectroscopia Raman a temperatura ambiente se percebeu que este material tem a particularidade de evaporar-se rapidamente quando é submetida a potências do laser acima de 30 mW. O espectro Raman obtido está representado na figura 4.2, onde se notam os picos perto da região de 2919 cm^{-1} que corresponde aos modos normais da vibração do radical CH_3 ou grupo metilo, e perto de 1699 cm^{-1} um pico de assinatura das vibrações do estiramento $C = O$ que pode ser encontrado nos compostos carbonilicos [37,40,41].

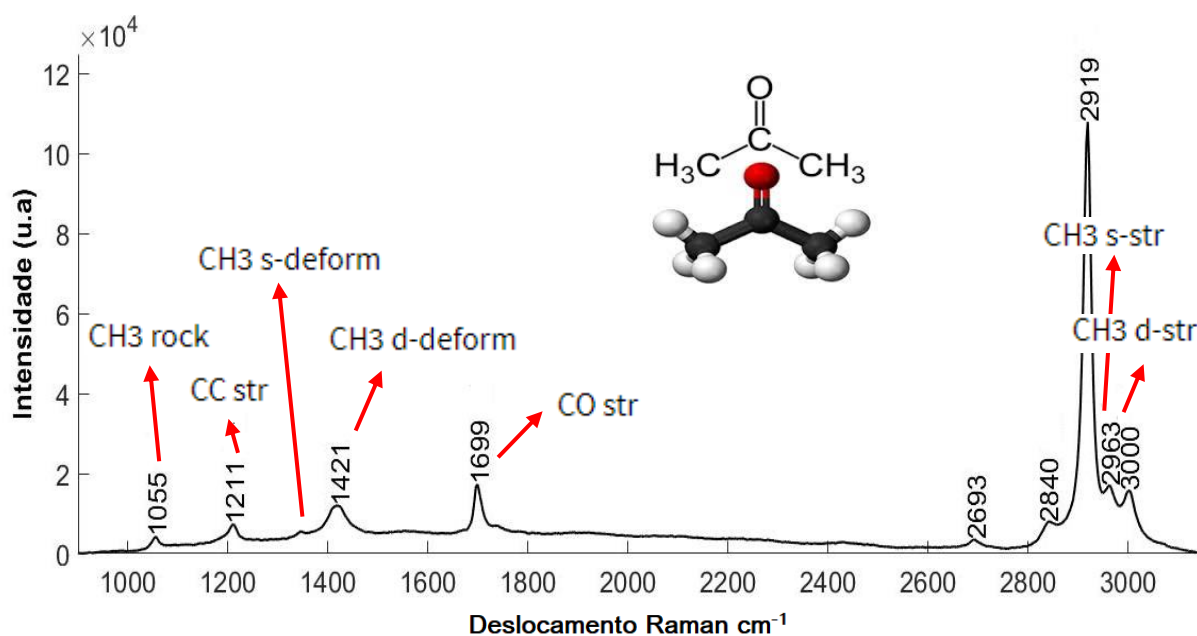


Figura 4.2. Espectro Raman da acetona apresentando os modos normais de vibração molecular. Str (vibração por alongamento), s-str (vibração por alongamento simétrico), d-str (vibração por alongamento assimétrico), rock (vibração assimétrica por balanço), s-deform (vibração de deformação simétrico), d-deform (vibração de deformação assimétrico).

4.1.2 Acetonitrila

A acetonitrila (CH_3CN), é um líquido límpido e incolor com odor aromático, tóxico por absorção cutânea [35,36]. Foi medido a temperatura ambiente e apresento os picos Raman mostrados na figura 2.5. Neste caso temos os modos normais de vibração do radical $C \equiv N$ na região de 2245 cm^{-1} conforme a fórmula química acima, além dos modos de vibração simétricos (2937 cm^{-1}) e antissimétricos (2998 cm^{-1}) do grupo metilo $C - H$ [37,41,42,43].

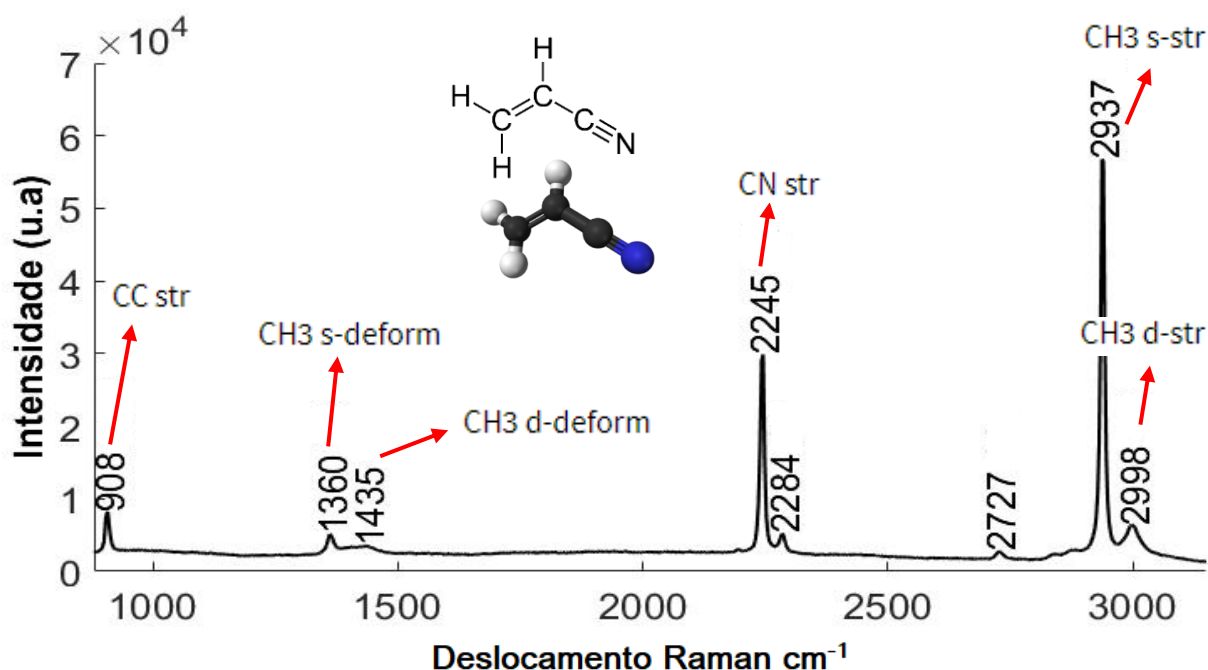


Figura 4.3. Espectro Raman da acetonitrila apresentando os modos normais de vibração molecular. Str (vibração por alongamento), s-str (vibração por alongamento simétrico), d-str (vibração por alongamento assimétrico), s-deform (vibração de deformação simétrica), d-deform (vibração de deformação assimétrica).

4.1.3 Metanol

A Metanol (CH_3OH), ou álcool metílico é um líquido volátil, incolor e inflamável [35,36]. Medido a temperatura ambiente, produzindo o espectro Raman apresentado na Figura 4.4. Os picos mais proeminentes na região de 2700 cm^{-1} - 3100 cm^{-1} são contribuições do radical $C - H$, não entanto, o espectro Raman nesta região é bastante complicado devido à existência de vários modos vibracionais, incluindo estiramento simétrico, alongamento antissimétrico e modos de combinação. A ligação $O - H$ resulta em um longo sinal de Raman com frequência de vibração entre 3200 a 3500 cm^{-1} . Esta vibração alongada acontece só em metanol líquido, em fase de vapor se apresenta um pico mais fino em 3683 cm^{-1} [38,41,44].

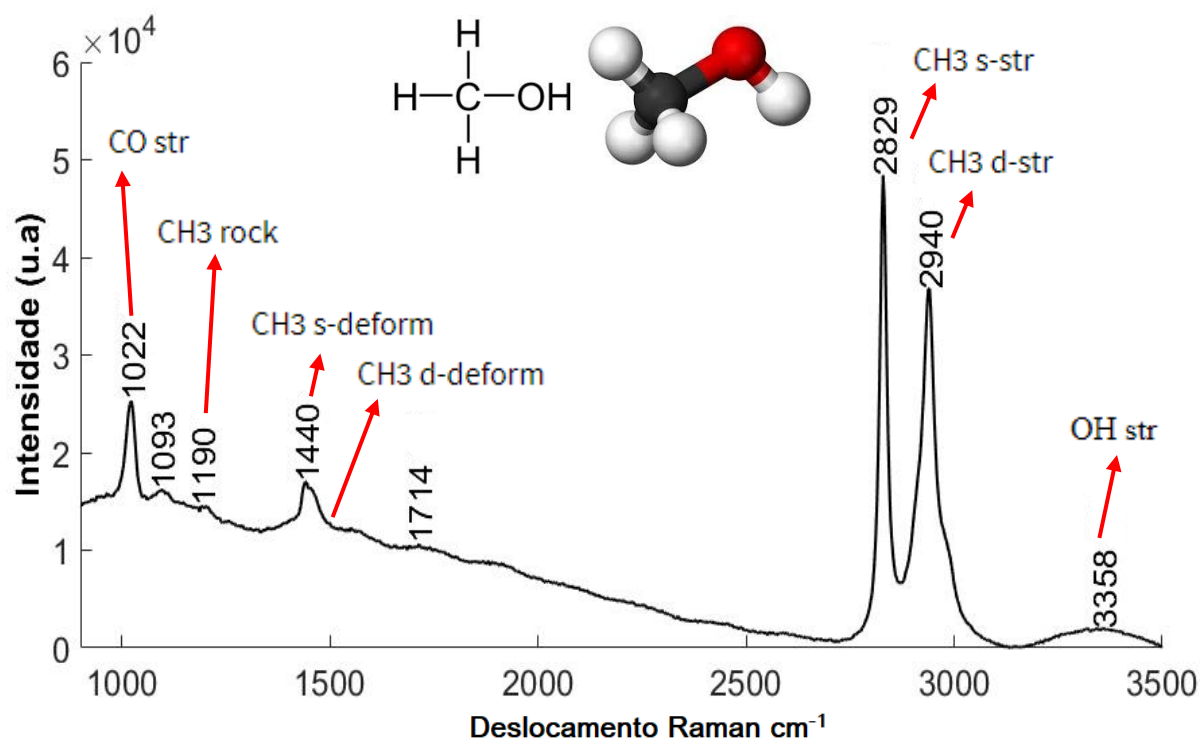


Figura 4.4. Espectro Raman do metanol apresentando os modos normais de vibração molecular. Str (vibração por alongamento), s-str (vibração por alongamento simétrico), d-str (vibração por alongamento assimétrico), rock (vibração assimétrica por balanço), s-deform (vibração de deformação simétrico), d-deform (vibração de deformação assimétrico).

4.2 “Coherent Mira Optima 900-F” com “optical parametric oscillator”

Esta montagem experimental está baseada em dois lasers pulsados de femto-segundos, com comprimentos de onda diferentes. Por isso, foi necessário sincronizar espacial e temporalmente os dois feixes de luz conforme descrito no capítulo anterior. Para cada amostra de referência, iremos mostrar duas figuras com as medidas experimentais. Uma delas são mostrados vários espectros CARS para diferentes comprimentos de onda de bombeio e a outra selecionamos dois espectros CARS e comparamos com espectro Raman convencional.

A primeira figura (4.5 (a), 4.6 (a) e 4.7 (a)) representa os espectros CARS, cada um deles gerados quando a linha Stokes (ω_S) de 800 nm se junta com a linha de bombeio (ω_P), esta última variada 630 a 720 nm. Observa-se nestas figuras, um sinal máximo em 640-645 nm correspondente a ressonância de vibração próxima a 2950 cm^{-1} para a acetonitrila (figura 4.5 (a)), para o metanol (figura 4.6 (a)) dos picos 2850 e 2950 cm^{-1} , e da acetona (figura 4.7

(a)) no pico próximo de 2950 cm^{-1} . Os picos apresentados nesta zona são próprios do radical CH_3 destas amostras de referência.

Na figura (4.5 (b), 4.6 (b) e 4.7 (b)), comparamos o deslocamento dos picos dos espectros CARS com os espectros Raman das amostras de referência. Os espectros foram normalizados pelo valor máximo, já que os parâmetros iniciais dos espectros Raman e os espectros CARS não foram os mesmos, impedindo uma comparação direta das intensidades. Nesta figura é mostrada o espectro CARS com maior intensidade (vermelho), que em teoria é o pico CARS mais ressonante com a amostra. Identifica-se também outro espectro CARS (preto) para comparação, além do espectro Raman (azul) obtido experimentalmente no laboratório.

Notamos nestas figuras, que o espectro CARS é muito mais largo que o espectro Raman, de forma que não podem ser observados com clareza a presença de picos menores como 2998 cm^{-1} na acetonitrila, nem os picos 2840 , 2963 e 3000 cm^{-1} na acetona. Além disto, os picos mais intensos nas amostras de referência apresentam deslocamentos em relação ao espectro Raman convencional. Estes desvios foram calculados nas tabelas 4.1, 4.2 e 4.3, sendo que o módulo de desvio foi calculado a partir da diferença em cm^{-1} dos picos do espectro Raman (azul) e dos espectros CARS (vermelho e preto).

Estes erros mostrados nas tabelas 4.1, 4.2 e 4.3 podem ser entendidos devido à instabilidade do comprimento do laser de bombeio e Stokes que variam por diferentes fatores, como alinhamento, temperatura e vibrações da mesa óptica.

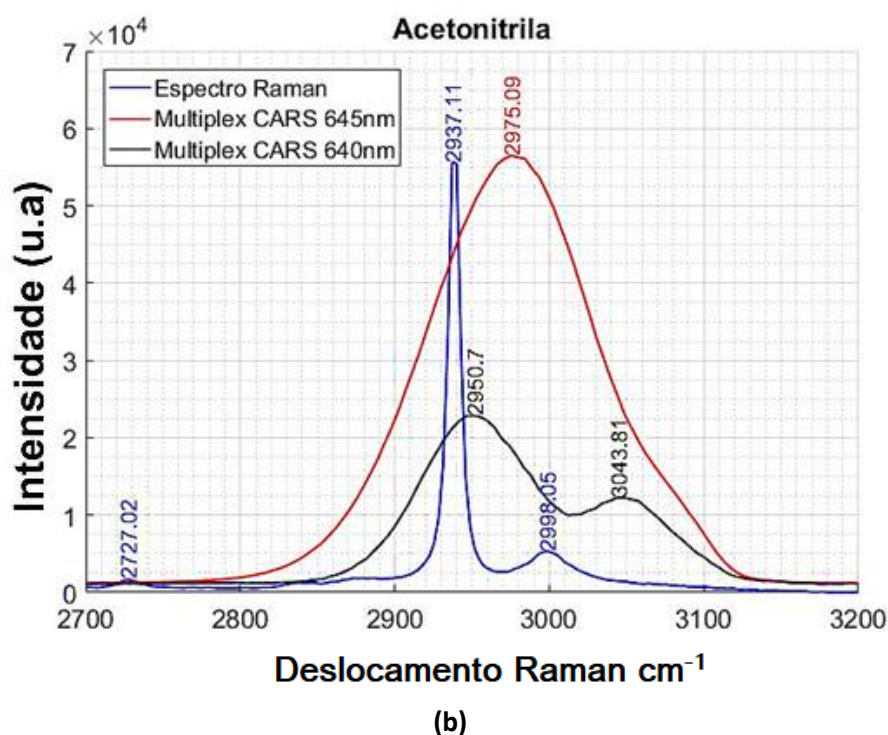
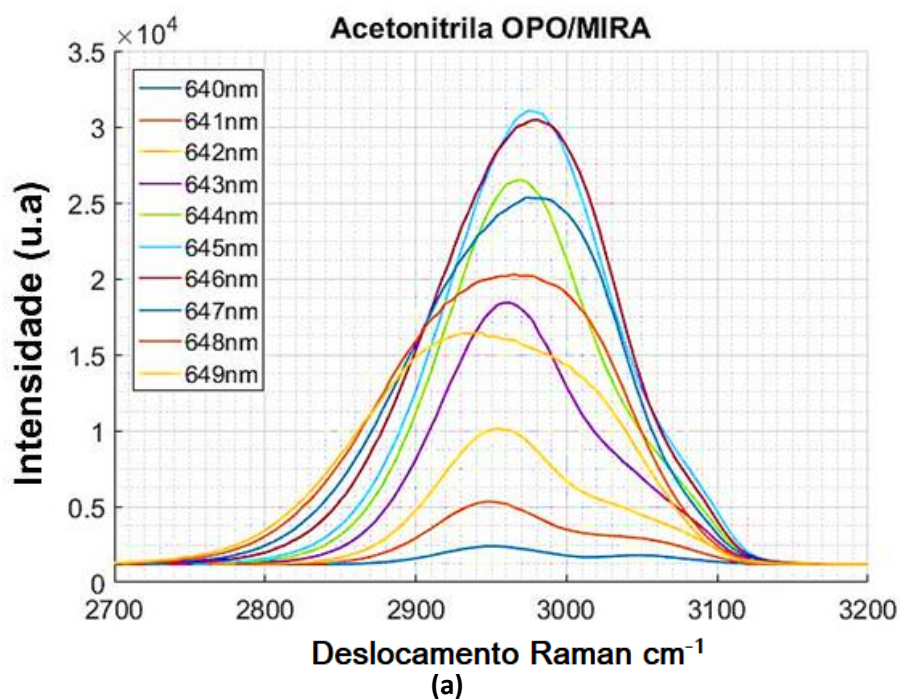
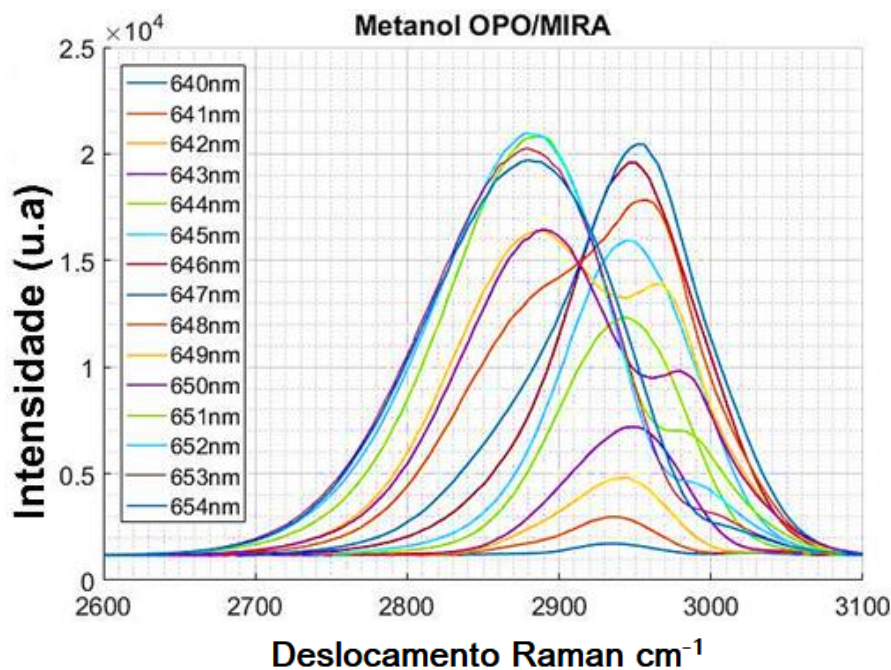


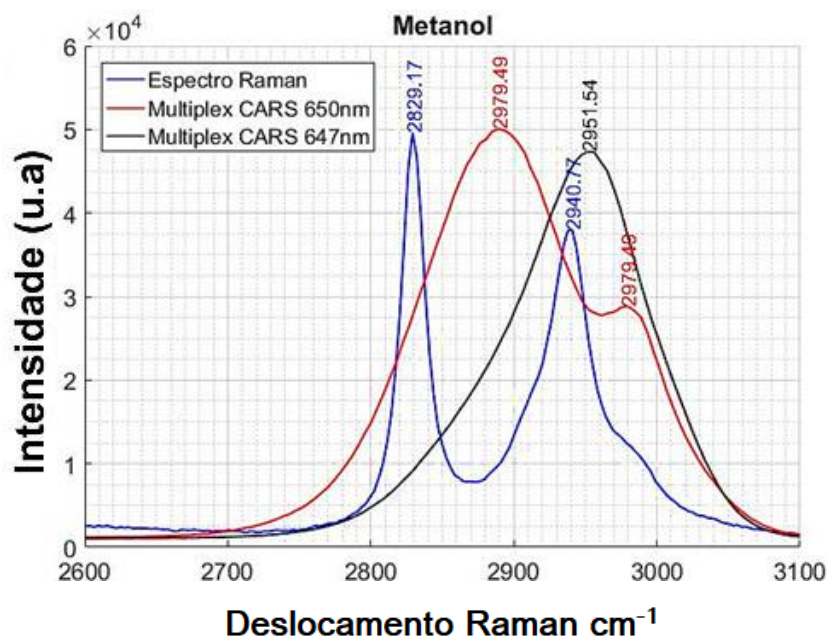
Figura 4.5. Espectros CARS para amostra de Acetonitrila, (a) Espectros CARS gerados por a mistura do laser Stokes fixo em 800 nm (*MIRA*) e a variação do laser de bombeio (*OPO*), (b) Comparação de espectros CARS (vermelho e preto) com o espectro Raman (azul).

Módulo do desvio (cm^{-1})			
	Azul = 2937.11		Azul = 2998.05
Vermelha = 2975.09	37.98	Vermelha = ----	-----
Preta = 2950.7	13.59	Preta = 3043.81	45.76

Tabela 4.1. Módulo de desvio dos picos no espectro Raman (Azul) e os picos dos espectros CARS (vermelho e preto) para a amostra de acetonitrila.



(a)

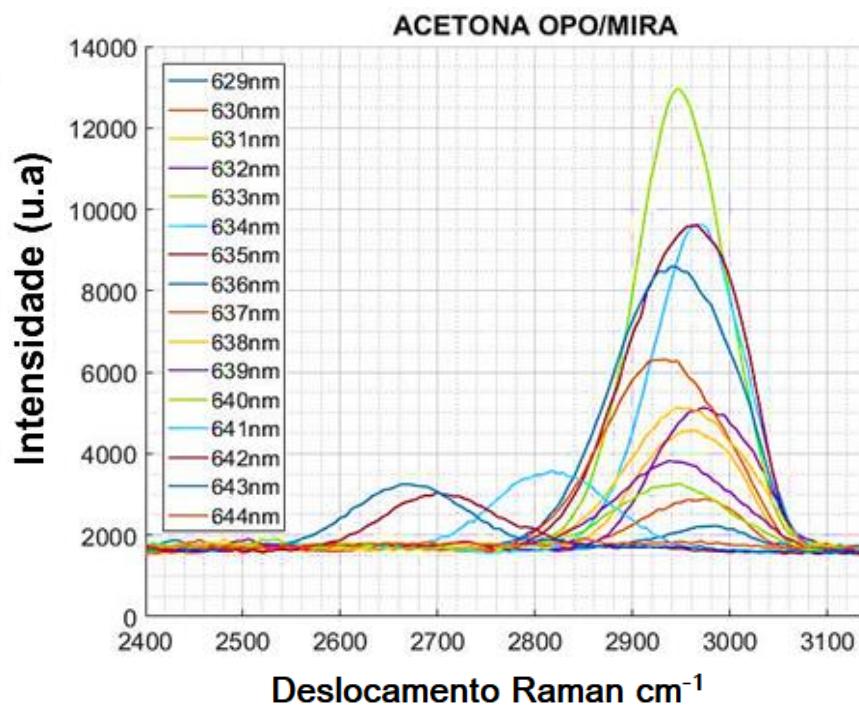


(b)

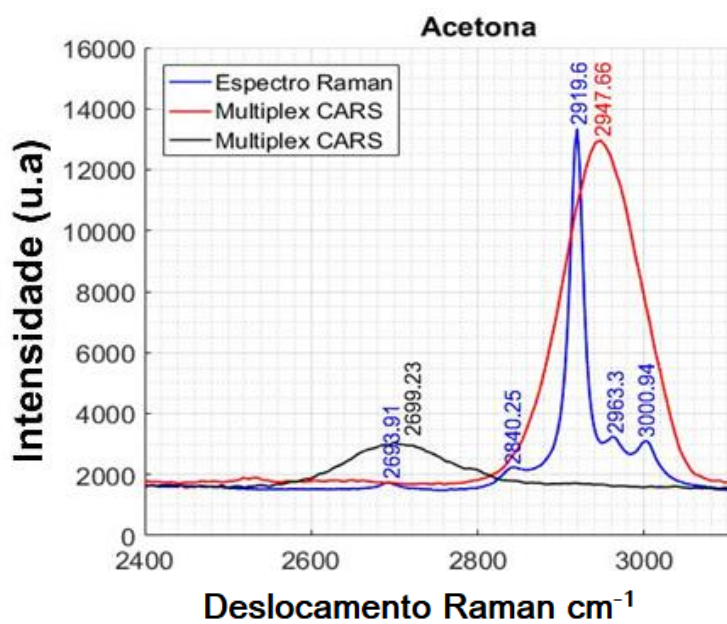
Figura 4.6. Espectros CARS para amostra de Metanol, (a) Espectros CARS gerados por a mistura do laser Stokes fixo em 800nm (*MIRA*) e a variação do laser de bombeio (*OPO*), (b) Comparação de espectros CARS (vermelho e preto) com o espectro Raman (azul).

Módulo do desvio (cm^{-1})			
	Azul = 2829.17		Azul = 2940.77
Vermelha = 2979.49	150.32	Vermelha = 2979.49	38.72
Preta = ----	----	Preta = 2951.54	10.77

Tabela 4.2. Módulo de desvio dos picos no espectro Raman (Azul) e os picos dos espectros CARS (vermelho e preto) para a amostra de metanol.



(a)



(b)

Figura 4.7. Espectros CARS para amostra de Acetona, (a) Espectros CARS gerados por a mistura do laser Stokes fixo em 800nm (MIRA) e a variação do laser de bombeio (OPO), (b) Comparação de espectros CARS (vermelho e preto) com o espectro Raman (azul).

Módulo do desvio (cm ⁻¹)			
	Azul = 2693.91		Azul = 2919.6
Vermelha = ----	----	Vermelha = 2947.66	28.06
Preta = 2699.23	5.32	Preta = ----	----

Tabela 4.3. Módulo de desvio dos picos no espectro Raman (Azul) e os picos dos espectros CARS (vermelho e preto) para a amostra de acetona.

4.3 “Coherent Mira Optima 900-F” com “Photonic Crystal Fiber”

Nesta configuração experimental temos a presença de um laser pulsado de femto-segundos (MIRA) e uma fibra de cristal fotônica (PCF), com características descritas no capítulo anterior. Aqui, também foi necessária a sincronização dos feixes de luz, espacial e temporalmente, além de ajustes de potência e foco da amostra no microscópio. Nesta seção mostramos três figuras baseadas nos resultados experimentais para cada amostra de referência.

As figuras (4.8, 4.11 e 4.14), é mostrada o espectro CARS para diferentes atrasos temporais entre os pulsos de bombeio e Stokes. Esse atraso temporal se faz necessário pois cada região espectral possui uma velocidade de propagação diferente em meios dispersivos. Desta forma, para ter um espectro CARS mais amplo possível devemos variar o atraso temporal. As larguras espectrais destas figuras são maiores em comparação com as figuras (4.5 (a), 4.6 (a) e 4.7 (a)), observando se além dos picos pronunciados na região de 2950 cm^{-1} a presença de picos na região de 1000 a 2300 cm^{-1} . Esta região no espectro é atribuída à largura espectral da fibra de cristal fotônica (linha do laser Stokes de 785 nm até 1100 nm), e abre a possibilidade ao estudo de novos materiais, especialmente materiais biológicos que tem importante ressonância de 1000 a 2000 cm^{-1} .

A figura (4.9, 4.12 e 4.15), mostra a comparação de espectros CARS com o espectro Raman convencional em uma região espectral específica, estas figuras foram normalizadas pelo máximo, já que não se usaram os mesmos parâmetros iniciais dos espectros Raman e os espectros de multiplex CARS. Assim como na configuração anterior evidenciamos que os espectros CARS (vermelho e preto) são mais largos que os espectros Raman (azul), o que impede achar picos de menor intensidade em nossas amostras de referência. Porém, neste caso o deslocamento dos picos dos espectros CARS em comparação com o espectro Raman é muito menor. Estes erros de deslocamento são mostrados nas tabelas 4.4, 4.5 e 4.6, e podem ser atribuídos à variação no comprimento de onda do laser de bombeio ($785 \pm 5\text{ nm}$), ou a variação espectral apresentada pela fibra de cristal fotônica ao longo do tempo.

A terceira figura (4.10, 4.13 e 4.16) foi feita para observar a coincidência ou não, dos espectros CARS com o espectro Raman das amostras. No programa MATLAB R2016a se fez um tratamento dos dados de cada amostra, pegando os pontos máximos locais de cada curva CARS (pontos vermelhos), a presença destes máximos deve indicar a existência de um pico Raman. As figuras então, são construídas ao obter os valores de intensidade máxima para os diferentes espectros CARS obtinhas em cada atraso temporal os quais são comparados com o espectro Raman das amostras. Nas figuras se evidenciam erros nas medidas na faixa de 1600 a 2400 cm^{-1} , os picos expostos nesta região não concordam com os espectros Raman das amostras de referência. Estes picos podem ser atribuídos ao fundo não ressonante das amostras ou o espectro instável da fibra de cristal fotônica.

Módulo do desvio (cm^{-1})			
	Azul = 2245.59		Azul = 2937.11
Vermelha = 2242.47	3.12	Vermelha = 2946.18	9.07
Preta = 2250.06	4.47	Preta = 2946.18	9.07

Tabela 4.4. Módulo de desvio dos picos no espectro Raman (Azul) e os picos dos espectros CARS (vermelho e preto) para a amostra de acetonitrila.

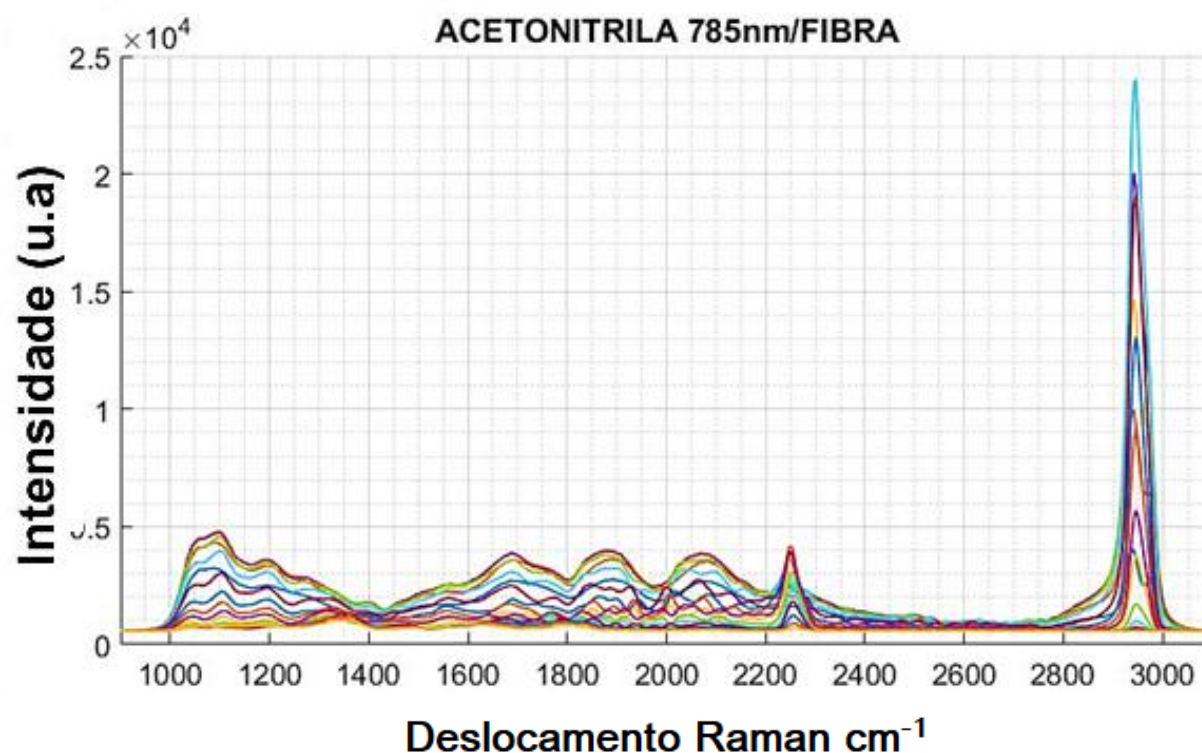


Figura 4.8. Espectro CARS para a amostra de acetonitrila, gerados pela mistura do laser de bombeio (fixo em 785 nm) e a fibra de cristal fotônica (contínua de 785 nm até 1100 nm). As múltiplas curvas representam os espectros CARS para diferentes valores de atraso de tempo.

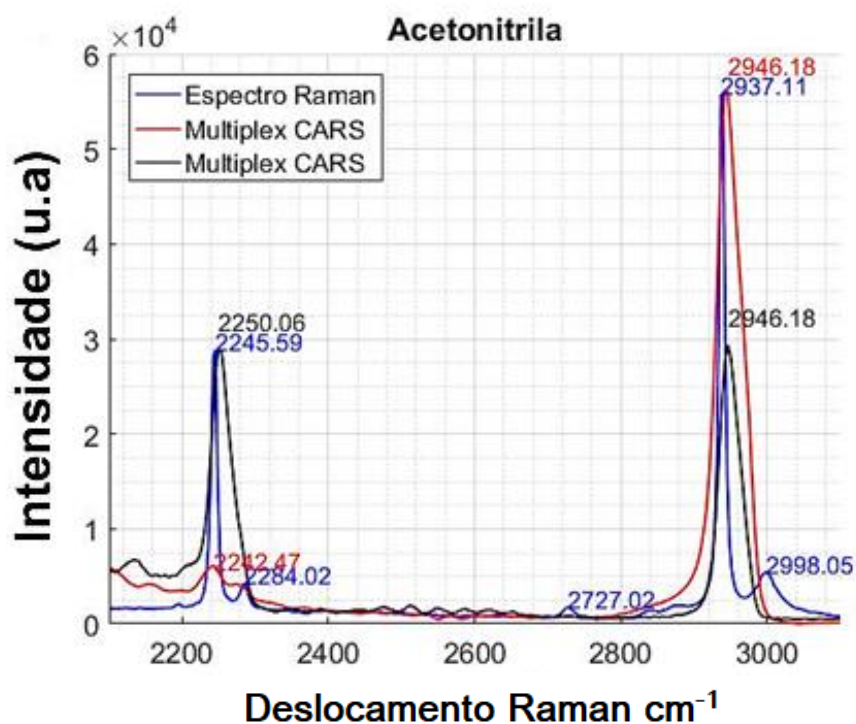


Figura 4.9. Comparação de espectros CARS (vermelho e preto) com o espectro Raman (azul), para a amostra de acetonitrila.

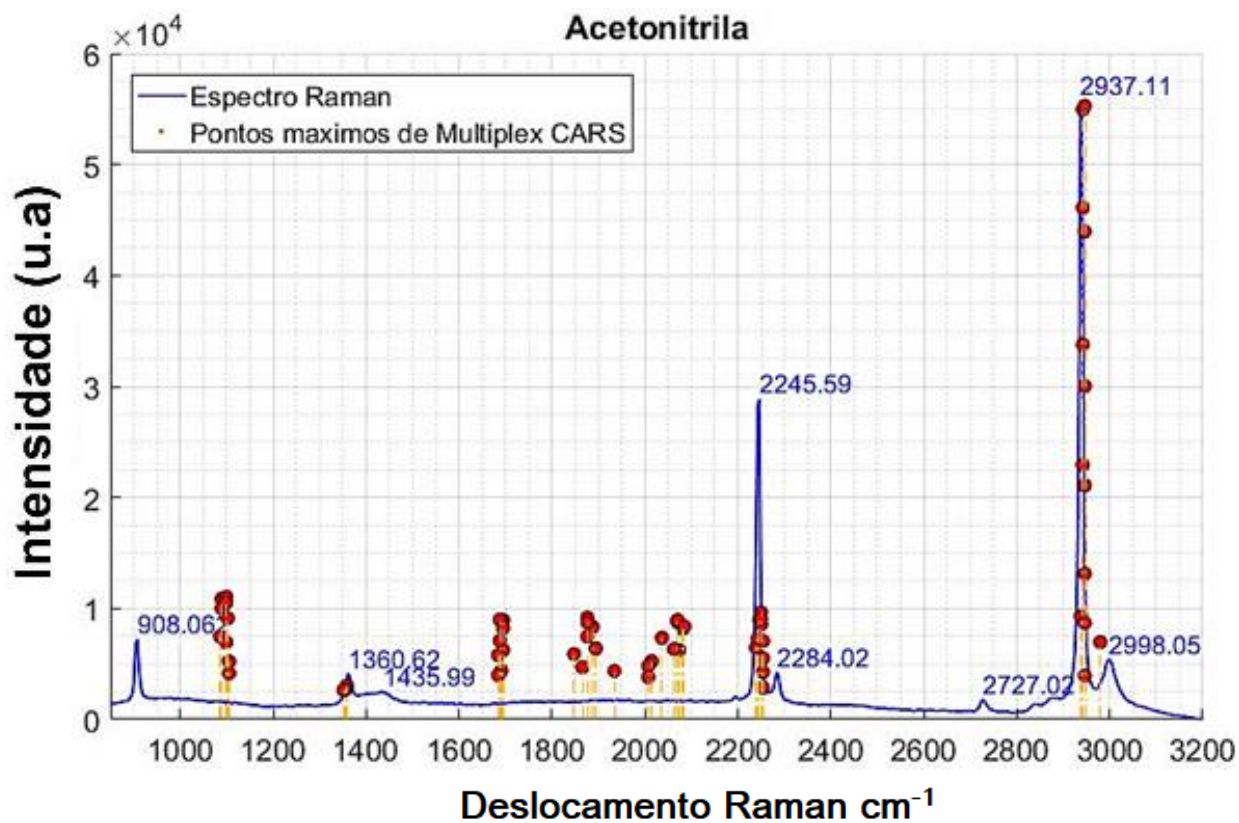


Figura 4.10. Espectro Raman (linha azul) comparada com os pontos de intensidade máxima (vermelhos) do espectro CARS a cada atraso de tempo, para a amostra de acetonitrila.

Módulo do desvio (cm^{-1})			
	Azul = 2829.17		Azul = 2940.77
Vermelha = 2838.61	9.44	Vermelha = 2954.51	13.74
Preta = ----	----	Preta = ----	----

Tabela 4.5. Módulo de desvio dos picos no espectro Raman (Azul) e os picos dos espectros CARS (vermelho e preto) para a amostra de metanol.

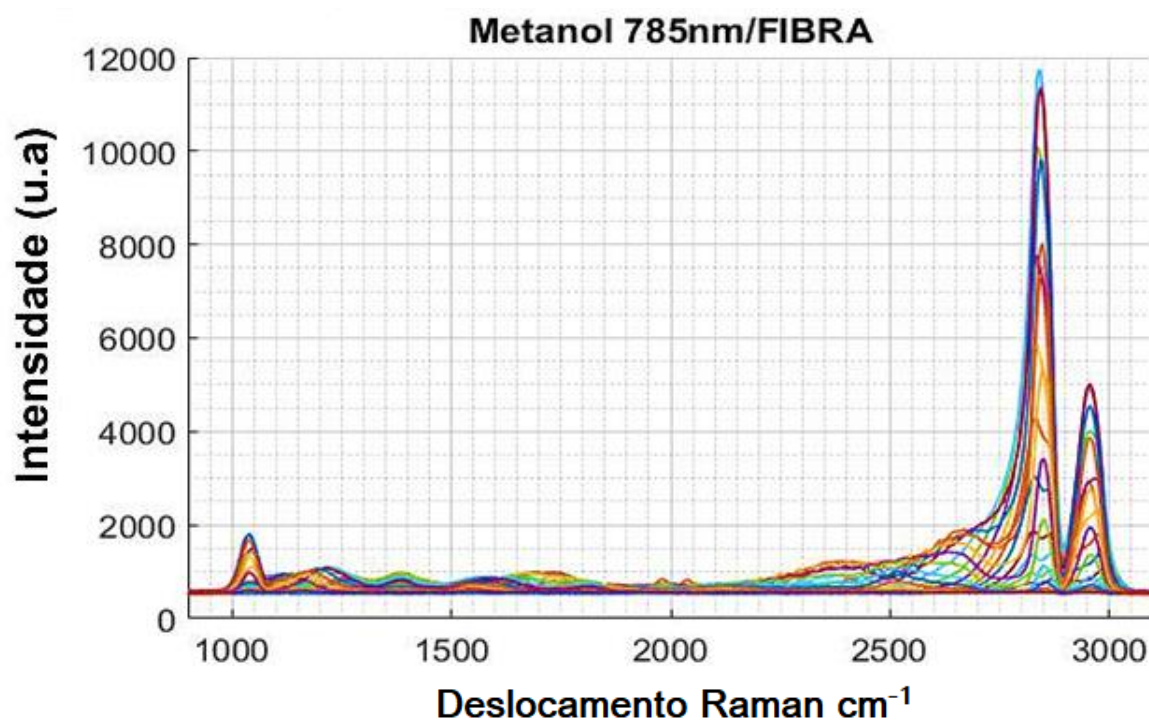


Figura 4.11. Espectro CARS para a amostra de metanol, gerados pela mistura do laser de bombeio (fixo em 785 nm) e a fibra de cristal fotônica (contínua de 785 nm até 1100 nm). As múltiplas curvas representam os espectros CARS para diferentes valores de atraso de tempo.

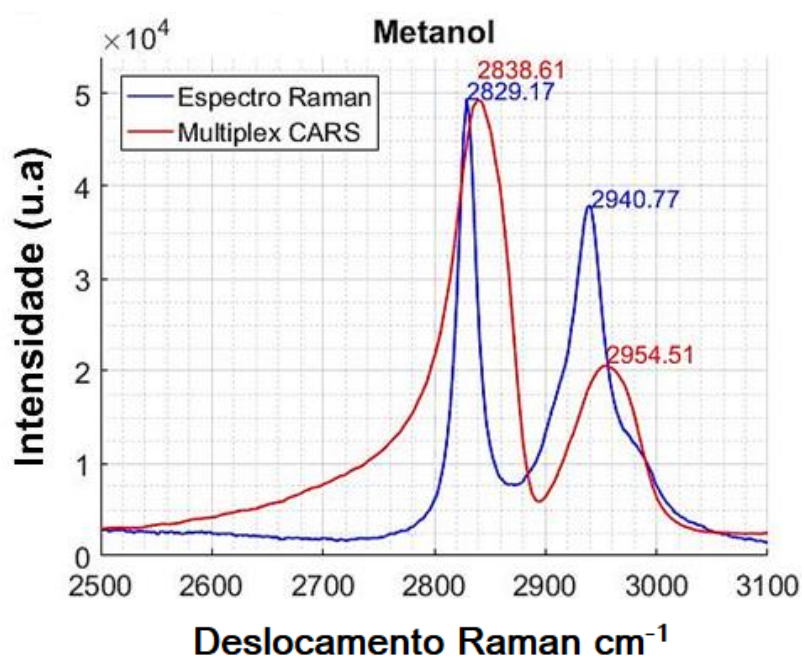


Figura 4.12. Comparação de espectros CARS (vermelho) com o espectro Raman (azul), para a amostra de metanol.

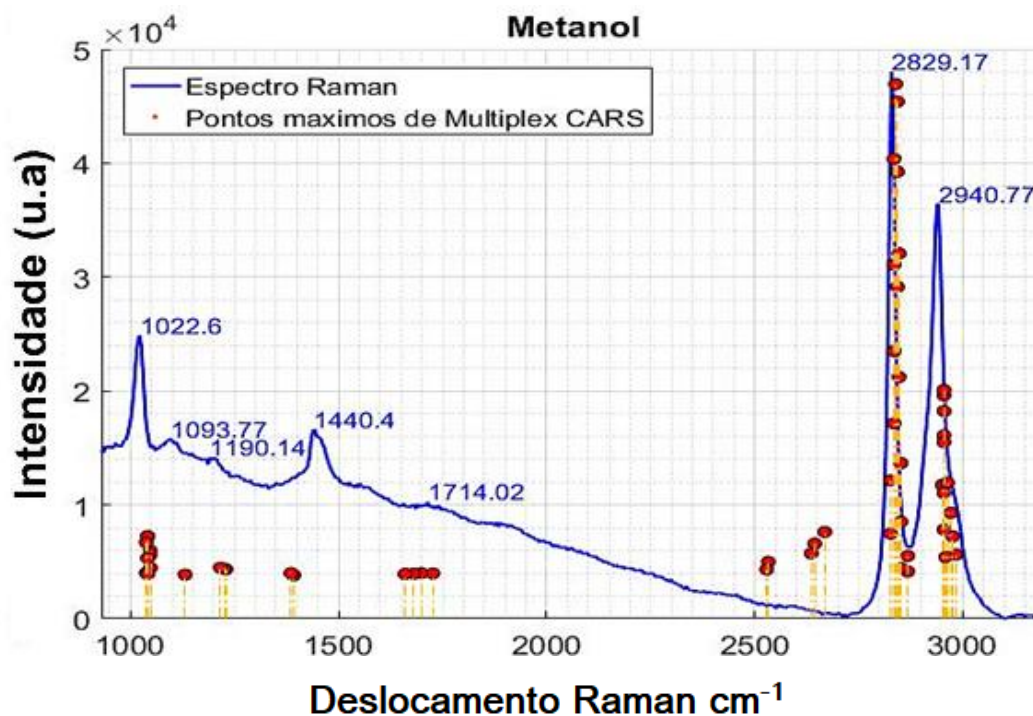


Figura 4.13. Espectro Raman (linha azul) comparada com os pontos de intensidade máxima (vermelhos) do espectro CARS a cada atraso de tempo, para a amostra de metanol.

Módulo do desvio (cm^{-1})	
	Azul = 2919.6
Vermelha = 2937.85	18.25
Preta = ----	----

Tabela 4.6. Módulo de desvio dos picos no espectro Raman (Azul) e os picos dos espectros CARS (vermelho e preto) para a amostra de acetona.

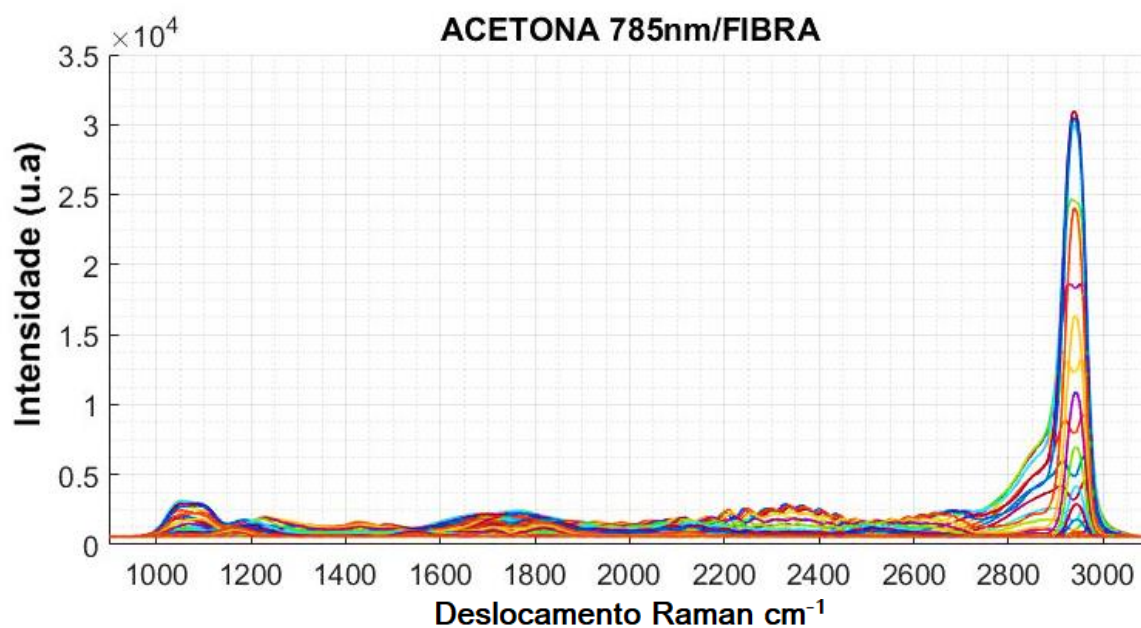


Figura 4.14. Espectro CARS para a amostra de acetona, gerados pela mistura do laser de bombeio (fixo em 785 nm) e a fibra de cristal fotônica (contínua de 785 nm até 1100 nm). As múltiplas curvas representam os espectros CARS para diferentes valores de atraso de tempo.

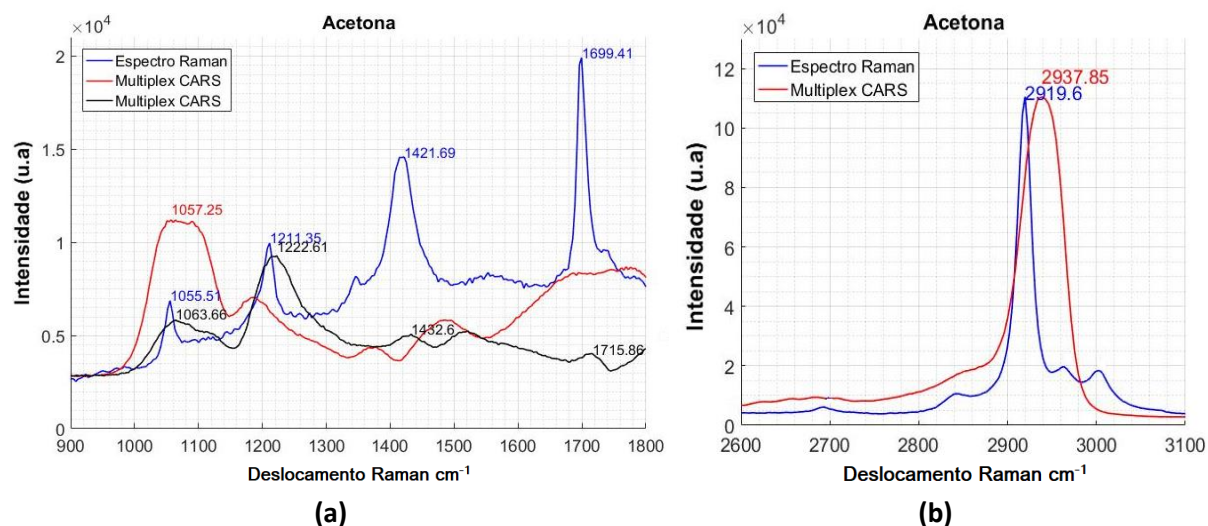


Figura 4.15. Comparação de espectros CARS com o espectro Raman (azul), (a) na região de 900 a 1800 cm^{-1} , (b) na região de 2600 a 3000 cm^{-1} , para a amostra de acetona.

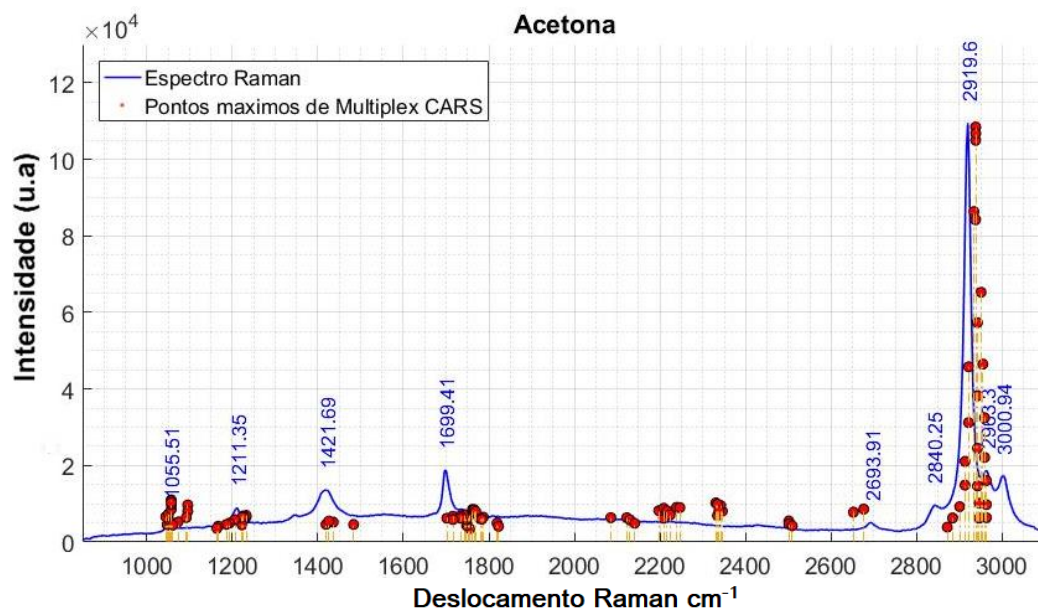


Figura 4.16. Espectro Raman (linha azul) comparada com os pontos de intensidade máxima (vermelhos) do espectro CARS a cada atraso de tempo, para a amostra de acetona.

4.4 MAPEAMENTO

O sistema de mapeamento descrito no capítulo 3, é então utilizado junto da montagem experimental “MIRA” com “PCF”, como foi mostrado na figura 3.11. Em cada ponto desta matriz de mapeamento se coleta o espectro CARS da amostra, e os dados são analisados no programa HSPE feito no laboratório de Nano-espectroscopia da UFMG. Neste programa uma imagem é gerada, os eixos X e Y são as coordenadas espaciais e a coordenada Z (mapa de cor) é a intensidade de uma determinada região do espectro CARS.

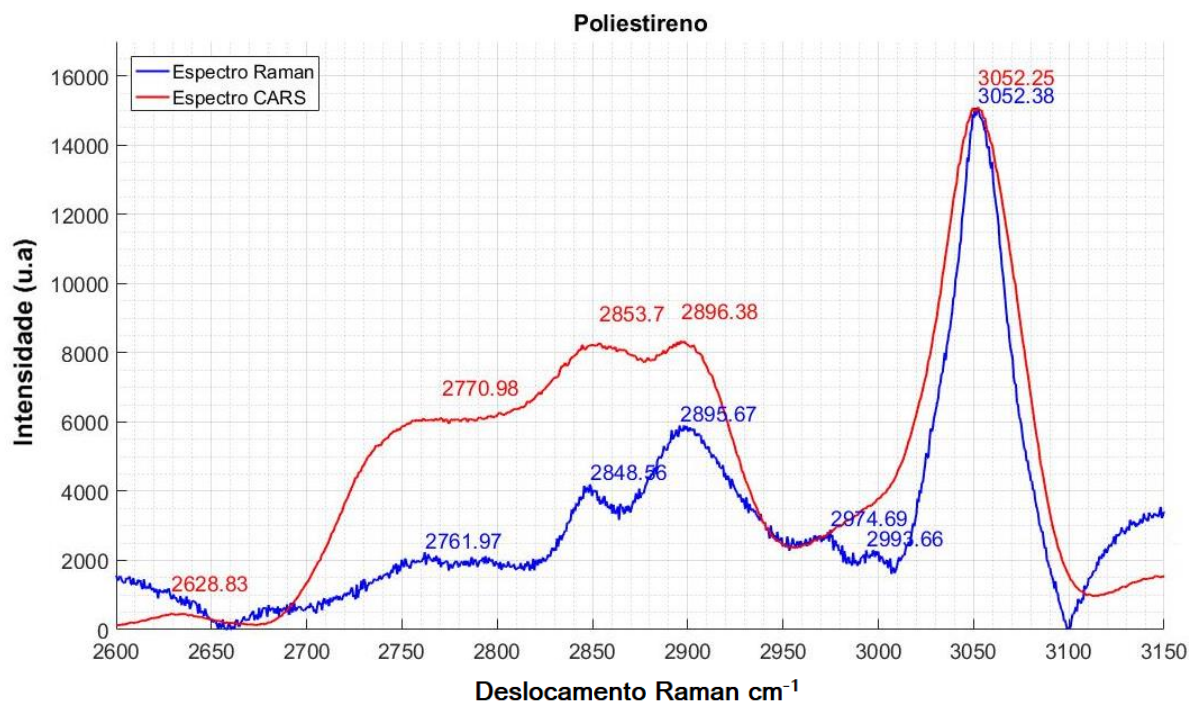


Figura 4.17. Espectro CARS para amostra de poliestireno (vermelho), gerados pela mistura do laser de bombeio (fixo em 785 nm) e a fibra de cristal fotônica (contínua de 785 nm até 1100 nm), comprado com o espectro Raman (azul) da mesma amostra.

Um primeiro teste do processo foi feito em amostras de microesferas de poliestireno de 3 μm de diâmetro. O espectro CARS do poliestireno é comparado com o espectro Raman convencional, mostrados na figura 4.17. Na figura 4.18 (a) mostra a imagem óptica da amostra de microesferas e na parte (b) mostra-se a imagem CARS referente a banda do poliestireno centrada em 3052 cm^{-1} . O tempo de aquisição em cada ponto da amostra foi de 2 segundos e foram feitos uma matriz de 51 x 51 pontos cobrindo uma área total de 25 μm x 25 μm . Aprecia-se a concordância de tamanho e localização espacial das microesferas de poliestireno ao comparar as imagens apresentadas nas figuras 4.18 (a) e 4.18 (b), comprovando com isso que o sistema de mapeamento funciona corretamente.

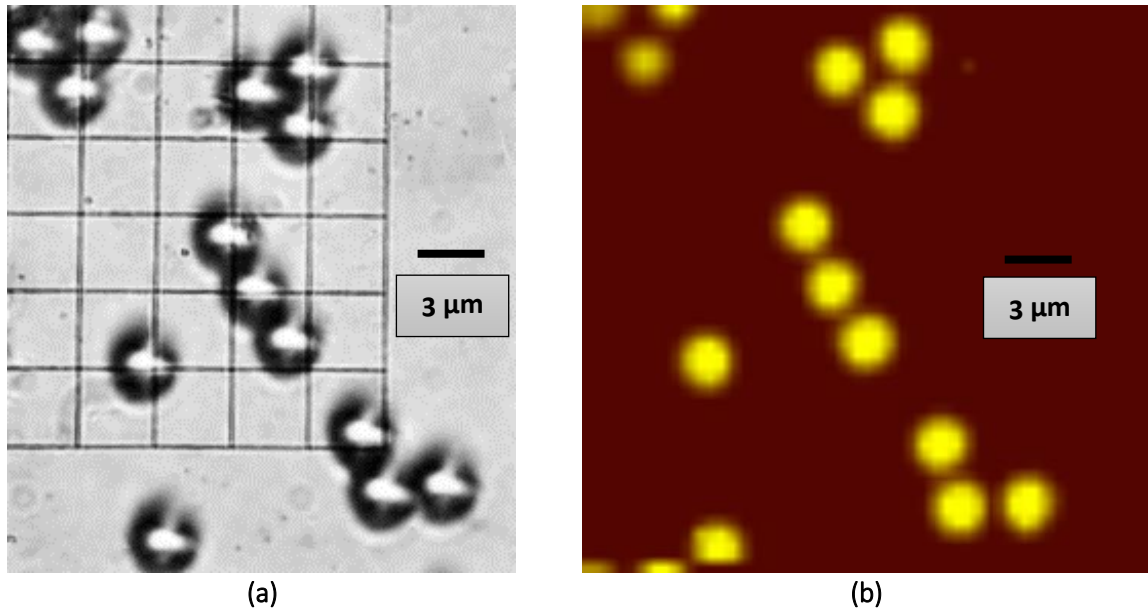


Figura 4.18. Processo de mapeamento das amostras (a) Imagem óptica de uma amostra de poliestireno de 3 μm de diâmetro (b) Matriz de Espectro 51x51, para a banda selecionada no pico de 3052 cm^{-1} .

Uma vez que o sistema está funcionando corretamente, se fez um segundo teste em tecido biológico. Este tecido é um corte de cérebro de camundongo com espessura de $\pm 8\mu\text{m}$. Este tecido cerebral apresenta acúmulos de proteína β -amilóide que pretende-se estudar nos trabalhos futuros. Neste tipo de tecidos a imagem do CARS é especialmente útil, já que a técnica permite investigações in vivo e sem uso de marcadores fluorescentes. [14]

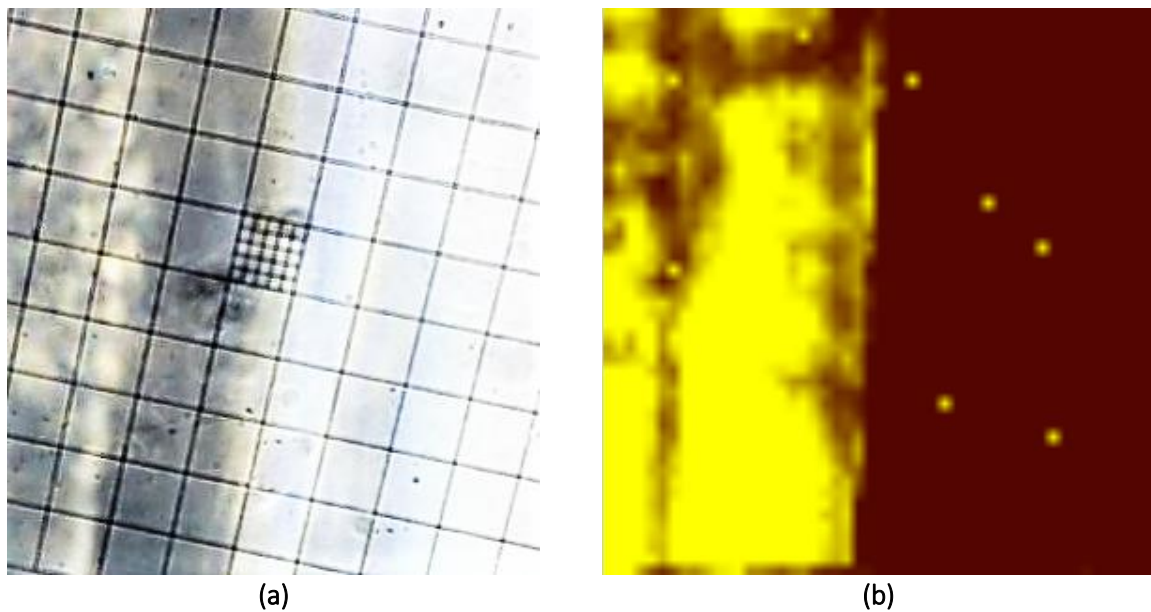


Figura 4.19. Processo de mapeamento das amostras (a) Imagem óptica de uma amostra de tecido biológico (b) Matriz de Espectro 51 x 51 com tempo de exposição dos lasers de 3 segundos.

A figura 4.19 (a) é uma imagem óptica do tecido cerebral em tonalidade escura à esquerda da imagem. A figura 4.19 (b) foi feita computacionalmente com a matriz de mapeamento. Nesta matriz se observa que dentro do tecido os espectros CARS tem a forma apresentada pela linha vermelha da figura 4.20, fora dele o espectro CARS desaparece (linha azul da figura 4.20). O tempo de exposição dos lasers na amostra para este caso foi de 3 segundos em cada ponto da matriz. Neste tempo o espectrômetro pode captar finos raios cósmicos como se mostra na linha preta da figura 4.20, que na imagem hiper espectral de CARS (fig. 4.19 (b)) se representam como pontos circulares intensos.

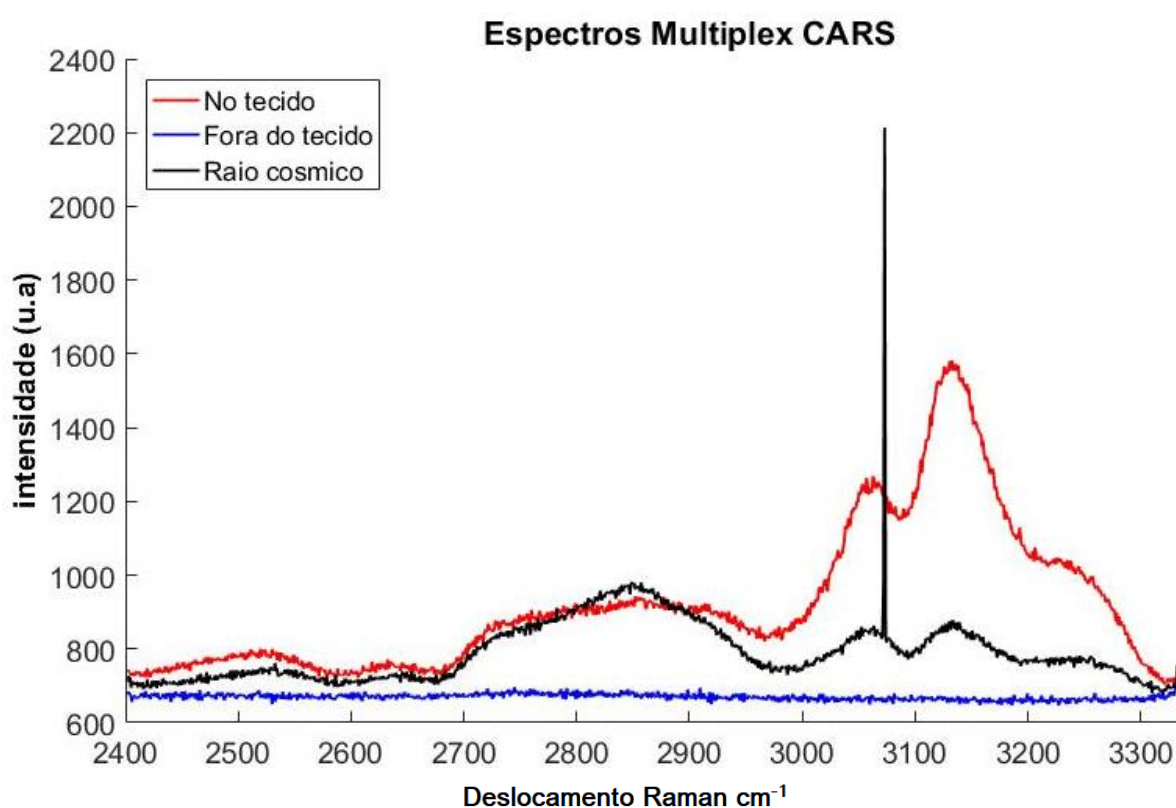


Figura 4.20. Espectros CARS em diferentes pontos da matriz de mapeamento 26 x 26. Em vermelho o espectro CARS sobre o tecido cerebral do camundongo. Em preto, raio cósmico sobressaindo do espectro CARS. Em azul, espectro CARS fora do tecido.

4.5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Os resultados mostrados dos espectros das amostras de referência (acetona, metanol e acetona) nas seções 4.2 e 4.3 apresentam uma boa concordância com os espectros Raman convencionais da seção 4.1, especialmente na região espectral próxima a 2950 cm^{-1} como mostrado na seção 4.3. Futuramente iremos trabalhar para corrigir problemas

experimentais (estabilidade da fibra fotônica) para que toda região espectral possa ser usada para o CARS. Devido à maior largura na espectral e maior similaridade entre o espectro CARS e espectro Raman, se decidiu usar a segunda montagem experimental. Isso se deve ao fato que futuramente iremos analisar tecidos biológicos que possuem importantes ressonâncias vibracionais entre 1000 e 2000 cm^{-1} , faixa que não é alcançada na primeira montagem experimental.

Não foram analisados os parâmetros de intensidade dos espectros Raman convencional e os espectros de multiplex CARS, dado que os experimentos de espectroscopia Raman convencional e os de multiplex CARS não foram feitos com as mesmas condições iniciais. Por isso, a comparação dos espectros foi normalizada pelo máximo de intensidade dos gráficos.

Utilizando a configuração “*Coherent Mira Optima 900-F*” com “*Photonic Crystal Fiber*” (figura 3.10), foi possível realizar o mapeamento de amostras de microesferas poliestireno, onde cada ponto do mapeamento foi representa a intensidade CARS do modo de vibração em 3052,25 cm^{-1} . Observamos que a imagem óptica e imagem CARS possuem ótima correlação, reafirmando a eficácia da técnica.

Realizamos também os primeiros testes do mapeamento aplicado em corte de cérebro de camundongo de $\pm 8 \mu\text{m}$ de espessura. Trabalhamos com esse tecido em nosso laboratório, pois estamos estudando a deposição de placas de proteína β -amilóide. O objetivo deste teste é ratificar que nossa técnica funciona em qualquer tipo de superfície, além de abrir o caminho para futuras investigações para se identificar e quantificar a quantidade destas placas. Observamos que foi possível obter um sinal CARS vindo do tecido biológico e com o mapeamento foi possível distinguir o tecido do substrato de vidro. Porém, ainda serão necessários mais teste e otimizações no sistema para termos uma boa imagem destes tipos de tecido.

Capítulo 5

5. Conclusões e próximos passos

Nesta dissertação apresentamos o estudo, desenvolvimento e aplicação da técnica multiplex CARS, fenômeno óptico não linear de terceiro ordem que fornecem informações das propriedades dos materiais. Fizemos uma revisão bibliográfica que permitiu a construção de uma montagem experimental para a aplicação da técnica multiplex CARS. A eficiência das montagens experimentais foi validada por meio de uma comparação com os espectros Raman obtidos de amostras de referência (acetonitrila, metanol e acetona). Através do processo CARS tivemos como resultado um sinal muito mais intenso que o obtido pela microscopia Raman convencional, o que permite ter imagens em tempo curto. Demonstramos o funcionamento da microscopia multiplex CARS mapeando amostras de poliestireno e tecido biológico, sem precisar de uso de marcadores que danifiquem o material.

Concluimos também que a montagem experimental que melhor se adequa aos nossos propósitos é a montagem “*Coherent Mira Optima 900-F*” com “*Photonic Crystal Fiber*”, devido ao seu amplo faixa espectral e melhor coincidência com os picos Raman das amostras de referência. Desta forma através desta dissertação foi possível consolidar o aparato experimental para trabalhos futuros em amostras biológicas.

5.1 PRÓXIMOS PASSOS

Como perspectivas para este trabalho, se pretende estudar os acúmulos de proteína β -amilóide presentes em tecidos biológicos, identificando-os a partir de imagens e de espectros CARS característicos desta. É importante lembrar que os grandes acúmulos de β -amilóide em tecidos é indicador da doença de Alzheimer, e a detecção precoce desta enfermidade é um de nossos objetivos principais.

Para obter boa resolução das imagens e eliminar o fundo não ressonante (descrito na parte teórica) da amostra queremos modificar a montagem experimental “*Coherent mira optima 900-f*” com “*photonic crystal fiber*”. Algumas mudanças na técnica que propomos são:

- Detecção sensível à polarização [24], que pode suprimir completamente a contribuição não ressonante com ajuda do controle de polarização, mas atenua significativamente o sinal ressonante.
- Microscopia do Epi-CARS [25], elimina o fundo não-ressonante do material em grandes proporções, mas não a contribuição não-ressonante espalhada. Essa técnica consiste em mudar a geometria para coletarmos os sinais CARS retro espalhados e não o transmitido.

Também deveremos estabilizar a fibra de cristal fotônica de uma melhor maneira, evitando as oscilações de potência que podem ser causadas pela margem de erro do laser “*Coherent mira optima 900-f*”. Estima-se que essas modificações podem melhorar a profundidade de penetração e a sensibilidade da detecção de CARS no tecido.

6. Referências

- [1] M. Prince, A. (2015). Las consecuencias de la demencia análisis de prevalencia, incidencia, coste y tendencias. *Alzheimer's Disease International*.
- [2] Tuchin, V. (2006). Optical clearing of tissues and blood. *SPIE*.
- [3] Ado Jório Mildred S. Dresselhaus, R. (2011). *Raman spectroscopy in graphene related systems*. Wiley-VCH.
- [4] Fox, M. (2010). *Optical Properties of Solids*. Oxford University Press.
- [5] Boyd, R. (2008). *Nonlinear Optics*. Academic Press.
- [6] Xie, J. (2004). Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy: instrumentation, theory, and applications. *ACS Publications*.
- [7] Newport, C. Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microspectrometer. *Technology and Applications Center Newport Corporation*.
- [8] Raman, K. (1928). *Nature*, 121:501.
- [9] Raman, C. (1928). A new radiation. *Indian Journal of physics*, 2387–398.
- [10] Malard, L. (2009). *Raman spectroscopy of graphene: probing phonons, electrons and electron-phonons interactions*. Universidade Federal de Minas Gerais: Tese de doutorado.
- [11] Quintero, G. (2005). Polarização eletrotérmica de vidros e fibras ópticas. *PUC- Rio*.
- [12] Ariano De Giovanni Rodrigues, J. (2012). Espectroscopias de infravermelho, Raman e de fotoluminescência: potencialidades e complementaridades. *Revista Brasileira de Ensino de Física*.
- [13] Lafetá Prates da Fonseca, L. (2017). *Propriedades ópticas não-lineares de terceira ordem em materiais bidimensionais*. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais.
- [14] Conor L, E. (2008). Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy: Chemical Imaging for Biology and Medicine. *The Annual Review of Analytical Chemistry*.
- [15] Evans CL, P. (2005). Chemical imaging of tissue in vivo with video-rate coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:16807–12.
- [16] Evans CL, X. (2007). Chemically selective imaging of brain structures with CARS microscopy. *Opt. Expr.* 15:12076–87.

- [17] Cheng, J. (2002). Laser scanning coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy and applications to cell biology. *Biophys. J.* 83:502–9.
- [18] Dufresne, C. (2003). Flow and fracture in drying nanoparticle suspensions. *Phys. Rev. Lett.* 91:224501.
- [19] Nan X, Y. (2004). CARS microscopy: lights up lipids in living cells. *Biophotonics Int.* 11:44.
- [20] Nan X, P. (2006). Nonperturbative chemical imaging of organelle transport in living cells with coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Biophys. J.* 91:728–35.
- [21] Zumbusch A, H. (1999). Three-dimensional vibrational imaging by coherent anti-Stokes Raman scattering. *Phys. Rev. Lett.* 82:4142–45.
- [22] Oudar, Smith, Shen. *Appl. Phys. Lett.* 1979, 34, 758-760.
- [23] Brakel, Schneider. (1988). In *Advances in Nonlinear Spectroscopy*. New York.
- [24] Cheng, B. (2001). Polarization coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Opt. Lett.* 26:1341–43.
- [25] Volkmer A, C. (2001). Vibrational imaging with high sensitivity via epi-detected coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Phys. Rev. Lett.* 87:23901.
- [26] Volkmer A, B. (2002). Time-resolved coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy: imaging based on Raman free induction decay. *Appl. Phys. Lett.* 80:1505–7.
- [27] Evans CL, P. (2004). Coherent anti-Stokes Raman scattering spectral interferometry: determination of the real and imaginary components of nonlinear susceptibility $\chi(3)$ for vibrational microscopy. *Opt. Lett.* 29:2923–25.
- [28] Potma, E. (2006). Heterodyne coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) imaging. *Opt. Lett.* 31:241–43.
- [29] Andresen, K. (2006). Picosecond anti-Stokes generation in a photonic-crystal fiber for interferometric CARS microscopy. *Opt. Expr.* 14:7246–51.
- [30] Héctor A, C. M (2010). Laser de pulsos ultracortos para aplicación en metrología. *Simposio de Metrología*.
- [31] Pérez, E. *Caracterización de Pulsos de Luz Láser Ultracortos*. Universitat Politècnica de Catalunya.
- [32] Hideaki Kano. (2005). Ultrabroadband multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering microspectroscopy using a supercontinuum generated from a photonic crystal fiber. *American Institute of Physics, Appl. Phys. Lett.* 86, 121113.

- [33] Technology and Applications Center, N. C. (s.f.). *Supercontinuum Generation in SCG-800 Photonic Crystal Fiber*.
- [34] Jinendra K Ranka, R. S. (2000). Optical properties of high-delta air-silica microstructure optical fibers. *Optical Society of America / OPTICS LETTERS / Vol. 25, No. 11*.
- [35] National library of medicine, national center for biotechnology information. (s.f.). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>.
- [36] Instituto Nacional de Segurança e Saúde Ocupacional (NIOSH). (s.f.). <https://www.cdc.gov/niosh/npg/npgd0006.html>.
- [37] Gerhard Herzberg, F. (1988). *Molecular spectral and molecular structure*.
- [38] Bernd Mewes, G. (1999). Fuel vapor measurements by linear Raman spectroscopy using spectral discrimination from droplet interferences. *Appl. Opt.* 38, 1040-1045.
- [39] Tara E. Tracy, Peter Dongmin Sohn. (2016). Acetylated Tau Obstructs KIBRA-Mediated Signaling in Synaptic Plasticity and Promotes Tauopathy-Related Memory Loss.
- [40] Robert T. Dillon and Roscofi G. Dicrinson. (1929). Raman spectra from acetone.
- [41] NIST Standard Reference Database 69: NIST Chemistry WebBook.
- [42] P. Neelakantan. (1964). Raman spectrum of acetonitrile.
- [43] Olivier Q, Benoît C. (2006). Experimental and theoretical investigation of the Raman and hyper-Raman spectra of acetonitrile and its derivatives. *The journal of chemical physics* 124, 244312.
- [44] Yuanqin Yu, Yuxi Wang. (2013). Complete Raman Spectral Assignment of Methanol in the C-H Stretching Region.

Apêndice A.

Configuração “coherent mira optima 900-f” com “photonic crystal fiber”

A primeira configuração realizada com a fibra de cristal fotônica foi feita utilizando-se um laser de bombeio de 806 nm no divisor de feixe 2 como se mostra na figura 3.11, deixando passar uma potência menor de 300 mW para a fibra de cristal fotônica e o restante para a linha de bombeio do esquema Multiplex CARS. Deixamos de usar essa configuração e passamos a usar a configuração mostrada na dissertação pois não possuímos alguns itens como espelhos dicróico para 806 nm. Dessa forma havia muita perda de potência ao longo do caminho óptico até o microscópio. De qualquer forma anexamos aqui os resultados obtidos para essa configuração. As figuras foram feitas seguindo-se o mesmo procedimento descrito na seção de resultados.

A.1. Metanol

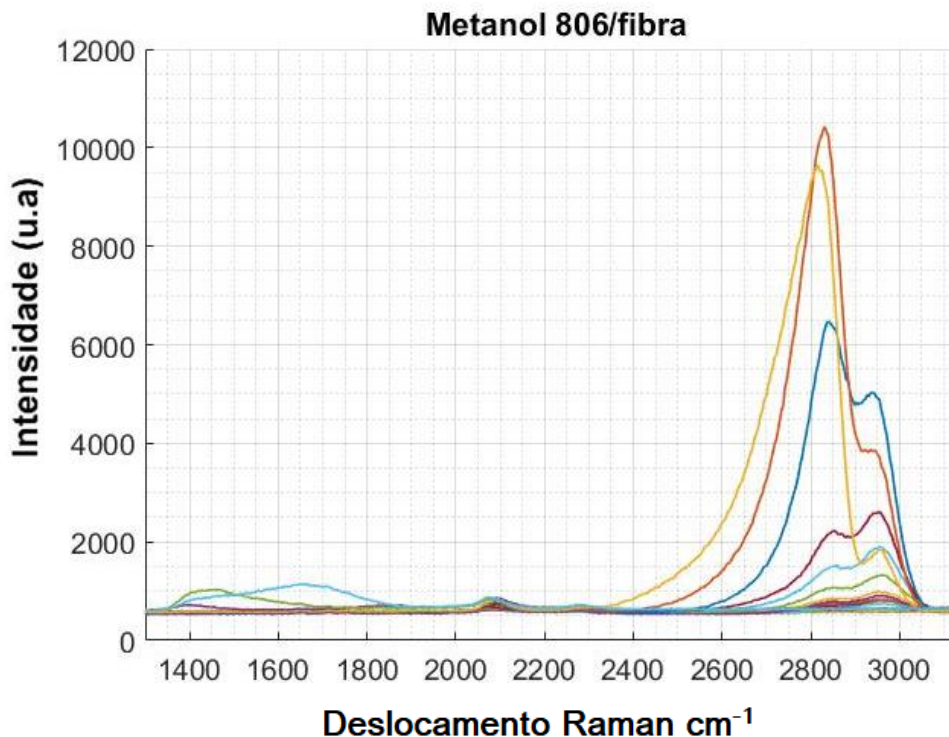


Figura. A. 1. Espectro CARS para a amostra de metanol, gerados pela mistura do laser de bombeio (fixo em 806 nm) e a fibra de cristal fotônica (contínua de 785 nm até 1100 nm). As múltiplas curvas representam os espectros CARS para diferentes valores de atraso de tempo.

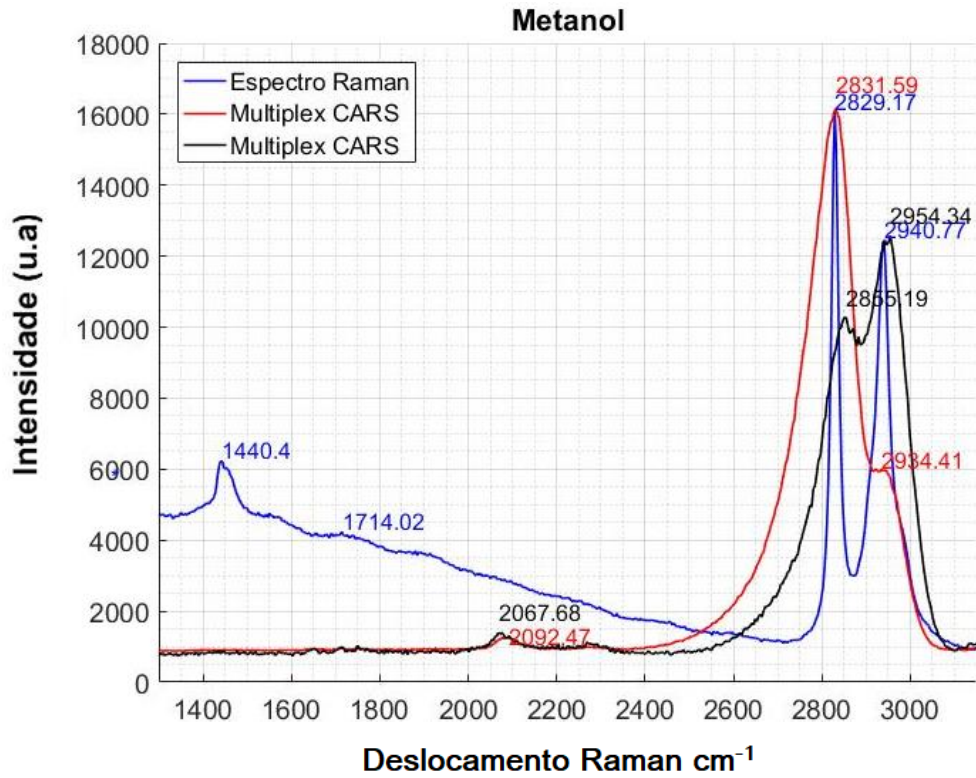


Figura. A. 2. Comparação de espectros CARS (vermelho e preto) com o espectro Raman (azul), para a amostra de metanol.

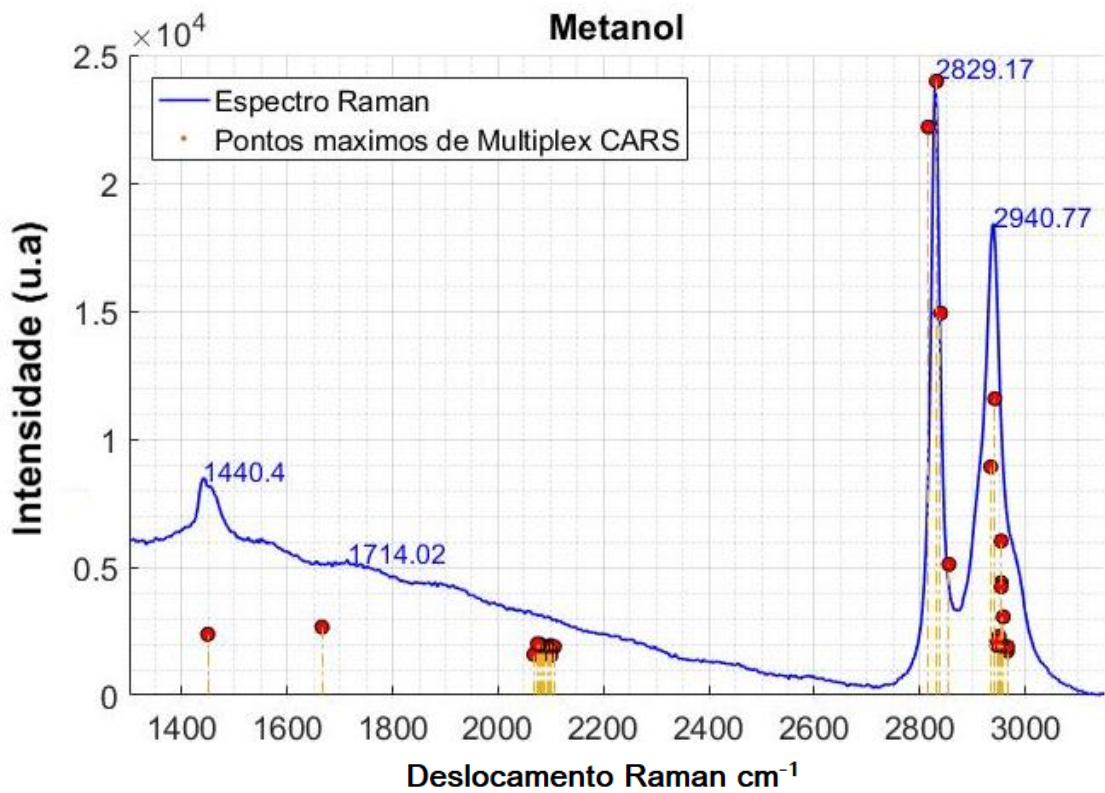


Figura. A. 3. Espectro Raman (linha azul) comparada com os pontos de intensidade máxima (vermelhos) do espectro CARS a cada atraso de tempo, para a amostra de metanol.

A.2. Acetona

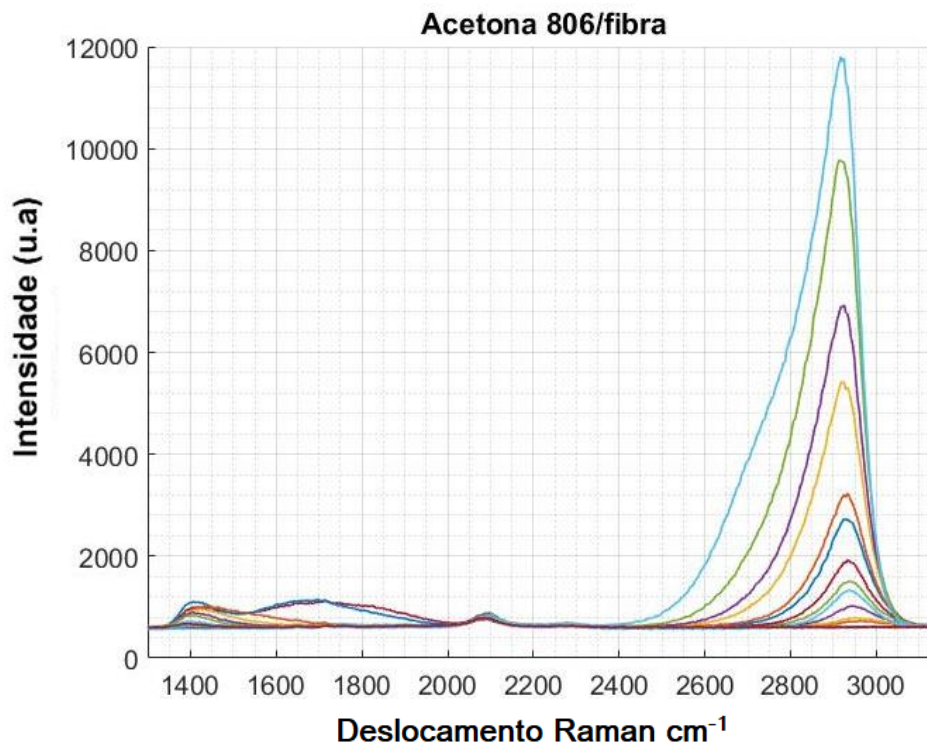


Figura. A. 4. Espectro CARS para a amostra de acetona, gerados pela mistura do laser de bombeio (fixo em 806 nm) e a fibra de cristal fotônica (contínua de 785 nm até 1100 nm). As múltiplas curvas representam os espectros CARS para diferentes valores de atraso de tempo.

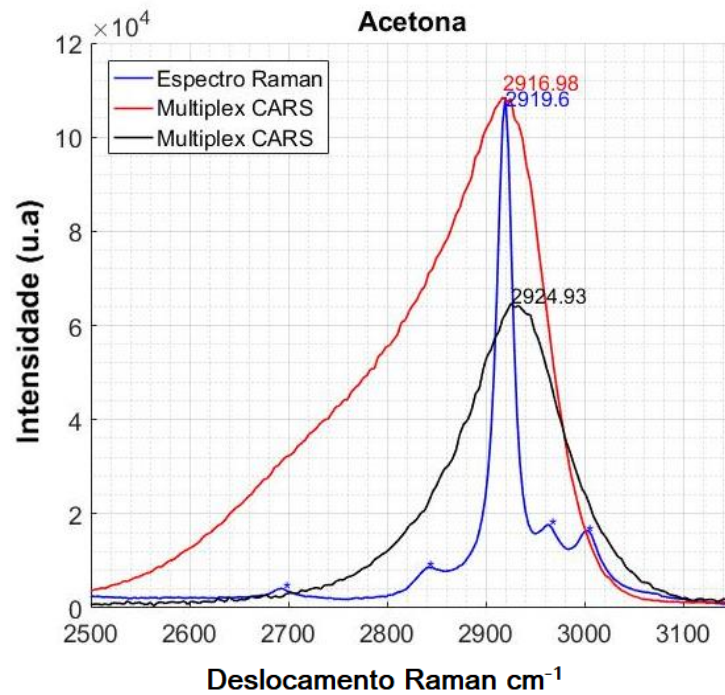


Figura. A. 5. Comparação de espectros CARS (vermelho e preto) com o espectro Raman (azul), para a amostra de acetona.

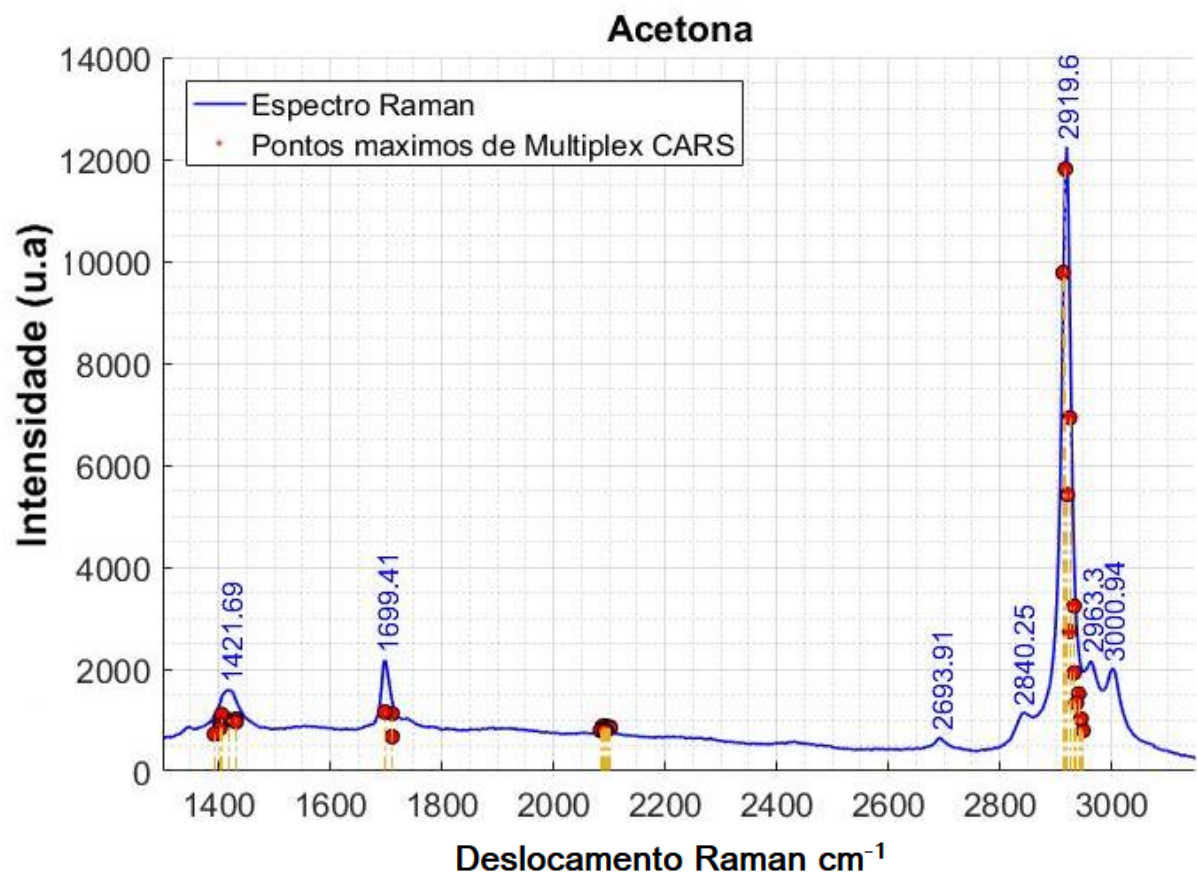


Figura. A. 6. Espectro Raman (linha azul) comparada com os pontos de intensidade máxima (vermelhos) do espectro CARS a cada atraso de tempo, para a amostra de acetona.

Apêndice B. Programa de mapeamento

O programa de mapeamento utilizado nesta dissertação foi feito com o software LabVIEW. O programa se baseia em variar a posição do estágio piezoelétrico XY e realizar uma medida do espectro CARS em cada ponto da amostra. Para isso, se gera através da DAQ dois sinais analógicos para a controladora e um sinal TTL para o espectrômetro, o qual possui uma opção “trigger” que inicia a aquisição dos espectros CARS. O movimento do estágio é sincronizado com o espectrômetro de forma que seja possível mapear uma região.

Como a DAQ usada gera sinais analógicos no rango de 0 a 5 volts, a varredura fica limitada a um comprimento de 25 μm . Iniciamos a varredura sempre em 0 voltios nas saídas X e Y da controladora e de acordo com a quantidade e comprimento de passos que se quer dar, o programa calcula quanto se deve aumentar a tensão em cada passo. Sempre que é dado um passo em qualquer direção se inicia um pulso TTL.

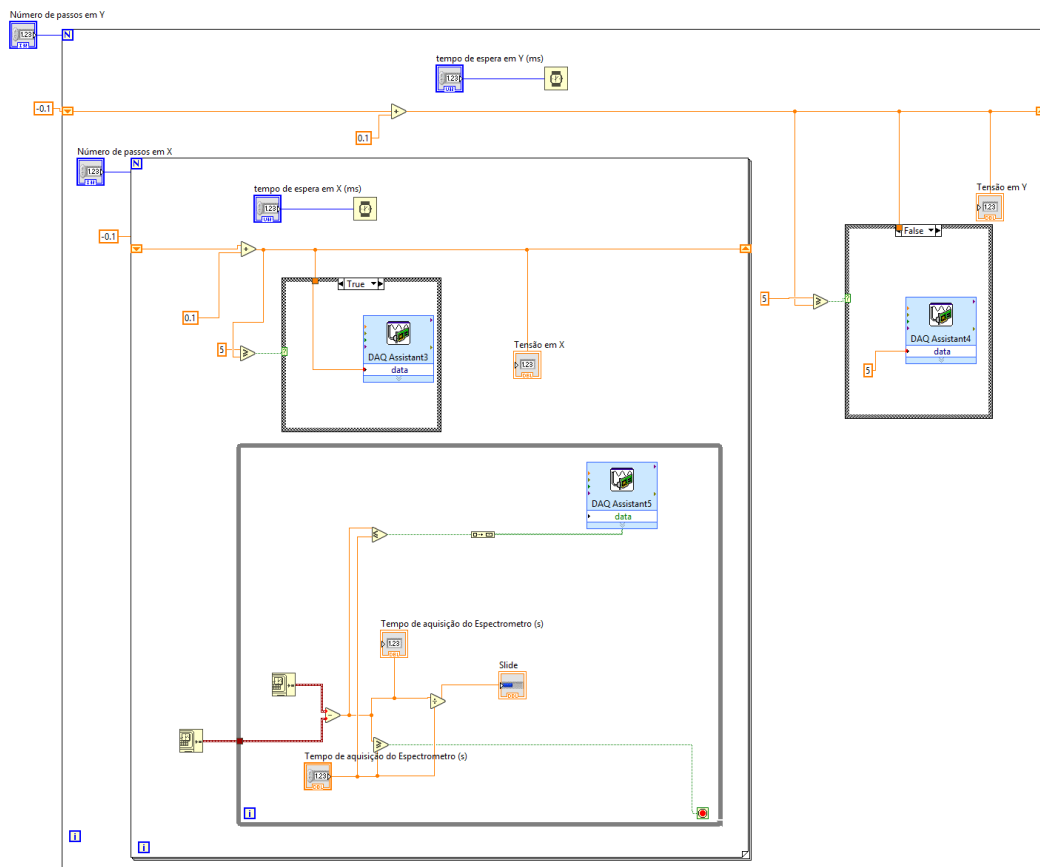


Figura. B. 1. Programa de mapeamento (diagrama de blocos), software LabVIEW.