

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

Tese de Doutorado

**Aplicações de Microscopia CARS multiplexada em  
Nanotubos de Carbono e Tecido Cerebral \***

Alex Soares Duarte

Tese realizada sob a orientação dos Professores Dr. Marcos Antônio Zen Vasconcellos e Dr. Ricardo Rego Bordalo Correia apresentada ao Instituto de Física da UFRGS.

Porto Alegre

2014

---

\* Trabalho financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).



# Lista de Trabalhos

## Publicações

1. Duarte, A. S., Rehbinder, J., Correia, R. R. B., Buckup, T. and Motzkus, M. *Mapping impurity of single-walled carbon nanotubes in bulk samples with multiplex coherent anti-stokes Raman microscopy*. **Nano Letters** 13, 697-702 (2013). <http://dx.doi.org/10.1021/nl304371x>
2. Duarte, A. S., Reis, R., Correia, R. R. B., Buckup, T. and Motzkus, M. *Exploiting the Raman Vibrational Shift of Carbon Nanotubes for Information Storage*. [Em submissão, 17 de março de 2014]
3. Duarte, A. S., Buckup, T. & Motzkus, M. *Spectral features in a tumorous mouse brain tissue investigated by epi- and forward-detected Multiplex Coherent Anti-Stokes Microscopy*. [Em submissão, 17 de março de 2014]
4. Pohling, C., Brackmann, C., Duarte, A. S., Buckup, T., Enejder, A., and Motzkus, M. *Chemical imaging of lignocellulosic biomass by CARS microscopy*. **Journal of Biophotonics** 1-9 (2013). <http://dx.doi.org/10.1002/jbio.201300052>
5. Pohling, C., Bocklitz, T., Duarte, A. S., Buckup, T., Motzkus M. et al *MCARS-microspectroscopy of brain tissue with higher ranking data classification for biomedical imaging*. **Journal of Biophotonics**. [Submetido, 17 de março de 2014]

## Congressos

1. Duarte, A. S., Rehbinder, J., Correia, R. R. B., Buckup, T. \* and Motzkus, M. *Mapping impurity of single-walled carbon nanotubes in bulk samples with multiplex coherent anti-stokes Raman microscopy*. **Hannover 13**, 18-22 March 2013, Hannover, Germany. [Poster] <http://hannover13.dpg-tagungen.de/index.html>
2. Duarte, A. S., Rehbinder, J., Correia, R. R. B., Buckup, T. \* and Motzkus, M. *Mapping impurity of single-walled carbon nanotubes in bulk samples with multiplex coherent anti-stokes Raman microscopy*. **Focus on Microscopy 2013**, 24-27 March 2013, Maastricht, The Netherlands. [Oral] <http://www.focusonmicroscopy.org/2013/index.html>
3. Duarte, A. S., Rehbinder, J., Correia, R. R. B., Buckup, T. \* and Motzkus, M. *Mapping impurity of single-walled carbon nanotubes in bulk samples with multiplex coherent anti-stokes Raman microscopy*. **CLEO<sup>®</sup>/EUROPE - IQEC 2013**, 12-16 May 2013, Munich, Germany. [Oral] <http://www.cleoeurope.org/venue>
4. Duarte, A. S., Rehbinder, J., Correia, R. R. B. \*, Buckup, T. and Motzkus, M. *Mapping impurity of single-walled carbon nanotubes in bulk samples with multiplex coherent anti-stokes Raman microscopy*. **XXXVI ENFMC**, 13-17 de maio de 2013, Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil. [Oral] <http://www.sbfisica.org.br/~enfmc/xxxvi/>
5. Jorio, A. \*, Cançado, L. G., Cano-Márques, A. G., Soares, J. R., Schmidt, W. G., Rodrigues, Duarte, A. S., Correia, R. R. B., Schoffen, J. R., Vasconcellos, M. A. Z. et al *Looking for alternative nanoantennas for TERS*. **Light at the Nanotip: Scanning Near-field Optical Microscopy and Spectroscopy**, 4-8 August 2013, Bad Honnef, Germany. [Poster] <http://www.light-on-tip.uni-tuebingen.de>

\* apresentador

## Patente

1. *Dispositivo maciço com extremidade unidimensional para microscopia e espectroscopia óptica de campo próximo*, número do pedido: **BR 1020120333040**, data de depósito: 22.12.2012. [http://www.somos.ufmg.br/setores\\_academicos/view/56](http://www.somos.ufmg.br/setores_academicos/view/56) ou <http://www.google.com/patents/W02013097019A1?cl=pt&hl=pt-BR>

\* Uma cópia em cores desta tese encontra-se em:

<https://drive.google.com/folderview?id=0BzK3J2n5WtmVd3ZRVlctcHJYT2M&usp=sharing>



# Lista de Figuras

1.1	Diagrama de energia para o espalhamento Raman espontâneo: (a) Stokes e (b) anti-Stokes. $\omega_L$ e $\omega_{L'}$ são frequências do laser de bombeamento, $\omega_S$ e $\omega_a$ são as frequências das transições Stokes e anti-Stokes, respectivamente. As setas onduladas representam as transições espontâneas. . . . .	23
1.2	Diagrama de energia para o espalhamento Raman estimulado: (a) Stokes e (b) anti-Stokes. As setas retas representam o fóton emitido estimulado pela incidência de um fóton de excitação de mesma energia. $\omega_L$ e $\omega_{L'}$ são frequências do laser de bombeamento, $\omega_S$ e $\omega_a$ são as frequências das transições Stokes e anti-Stokes estimuladas, respectivamente. . . . .	25
1.3	Componentes real e imaginária da susceptibilidade Raman $\chi_R(\omega_s)$ . . . . .	28
1.4	(a) Diagrama de energia para o espalhamento Raman anti-Stokes estimulado ressonante; (b) Diagrama de energia para a emissão do sinal de fundo não ressonante; (c) Representação espectral dos pulsos de excitação, bombeamento (vermelho) e Stokes (laranja), e a frequência do espalhamento Raman anti-Stokes (azul). . . . .	31
1.5	Componentes real e imaginária da susceptibilidade Raman $\chi_R(\omega_a)$ . . . . .	32
1.6	Representação vetorial para o casamento de fase ( $\Delta k = 0$ ) entre as componentes envolvidas no processo Raman estimulado. . . . .	35
1.7	Diagrama de energia para espectroscopia CARS multiplexado. Um pulso Stokes largo excita uma multitude de estados vibracionais simultaneamente.	38
1.8	Montagem experimental microscopia CARS multiplexada. FI: isolador de Faraday, BS: divisor de feixe, F1: filtro de banda estreita, PCF: Fibra de cristal fotônico, F2: filtro passa-baixa, F3: filtro passa-alta. . . . .	39

- 
- 2.1 Interface do programa do MME para recuperação do sinal vibracional a partir de uma medida de CARS multiplexado. (a) painel frontal do programa em LabVIEW que apresenta o sinal CARS introduzido (gráfico superior) o ajuste da fase de correção (gráfico do meio) e o espectro Raman recuperado (gráfico inferior). (b) em detalhe, o ajuste da fase de correção  $-\varphi_{est}(\nu)$  a partir da fase do MME  $\psi(\nu)$ . . . . . 48
- 2.2 Comparação entre o Espectro Raman recuperado pelo MME (c) e um espectro Raman espontâneo medido em um equipamento comercial (b). O espectro CARS multiplexado é representado em (a). . . . . 49
- 2.3 Painel frontal do programa de implementação do MTKK. Gráfico superior, espectro CARS multiplexado do PET; e gráfico inferior: espectro Raman recuperado por MTKK usando o ajuste do SNR. . . . . 52
- 2.4 Representação do processo de PCA: (a) Matriz hiperspectral, (b) Recuperação do espectro Raman pelo MME, (c) determinação dos autovetores espectrais e (d) representação da imagem em função dos autovetores por associação de cores (RGB). (e) imagem que corresponde ao espectro Raman recuperado em  $1437\text{cm}^{-1}$  para uma amostra de tecido cerebral de rato com tumor e (f) o resultado do PCA. . . . . 54
- 3.1 (a) Espectro de absorção UV-Vis demonstrando diferentes picos de extinção devido a NCPU com diferentes estruturas. (b) Espectro de espalhamento Raman na região dos modos de vibração Radial (RBM). . . . . 58
- 3.2 Comparação entre a componente Raman espontânea (linha preta) e o espectro CARS multiplexado (linha vermelha) para uma distribuição de NCPU. 60



3.3	Microscopia CARS multiplexada de uma região de $25 \times 25 \mu m$ de uma amostra de NCPU. (a) e (b) representam as componentes ressonantes na banda D e G, respectivamente, e (c) representa a componente de SNR em $1050 \text{ cm}^{-1}$ . (d) o mapa da razão ( $I_D/I_G$ ) plotados em uma escala de cor apropriada para maior contraste. (e) e (f) apresentam razões entre diferentes posições no espectro CARS. As setas #1 e #2 nas imagens (a)-(f) assinalam dois feixes de nanotubos representativos. (g) Mostra a espectro CARS para os dois feixes destacados: #1 (linha vermelha) e #2 (linha preta). . . . .	63
3.4	Comparação entre o espectro MME Raman (linha preta) recuperado e o Raman espontâneo (linha vermelha). . . . .	64
3.5	Resultados de microscopia CARS multiplexada com espectro MME Raman recuperado. (a) distribuição de intensidade para a banda D e (b) banda G. (c) comparação entre os espectros MME Raman para os feixes de nanotubos assinaladas pelas setas #1 (linha vermelha) e #2 (linha preta). As regiões I e II estão identificadas como contendo maior e menor índice de impurezas, respectivamente. . . . .	65
3.6	(a) Mapa de impurezas através do parâmetro ( $I_D/I_G$ ) e (b) Associação em escala de cor: Banda D do espectro MME Raman recuperado (cor verde) e a banda G (cor vermelha). . . . .	66
4.1	Montagem adaptada de CARS multiplexado: FI, Isolador de Faraday; BS, divisor de feixe; F1, filtro estreito; PCF, Fibra de cristal fotônico; F2, filtro passa alta; F3, filtro passa baixa; BB, bloqueador. . . . .	68
4.2	Deslocamento Raman induzido a laser. (a) deslocamento para frequências menores que a inicial ( <i>downshift</i> ), com tempo de exposição constante e (b) deslocamento para frequências maiores que a inicial ( <i>upshift</i> ), com intensidade constante de 12,5 mW. . . . .	70
4.3	Espectroscopia eletrônica por perda de energia (EELS). O pico em 282 eV representa a presença de ligações do tipo $\pi$ , que ocorrem para carbonos $sp^2$ em NCPU. . . . .	71

- 4.4 Impressão de uma máscara, sobre uma amostra de NCPU, utilizando o deslocamento Raman induzido à laser. (Esquerda) Impressão do padrão que induz a modificação com laser de alta potência e (Direita) a leitura realizada por microscopia CARS multiplexada com laser de baixa potência. 72
- 4.5 Impressão do padrão "Uni HD" usando o deslocamento Raman induzido sobre um filme de NCPU. (a) mapa de deslocamento Raman e a (b) distribuição de intensidade da banda G, (c) espectros CARS multiplexado de uma região irradiada (linha vermelha) e não irradiada (linha preta), (d) variação do deslocamento Raman induzido ao longo de sucessivas leituras por CARS multiplexado. . . . . 74
- 4.6 Mapa de deslocamento para o (a) sinal CARS e (b) Raman espontâneo. . . 74
- 4.7 Informação binária armazenada em um filme de NCPU utilizando o deslocamento Raman induzido. A variação dos valores é determinada pelo controle do tempo de exposição. Pontos não irradiados representam o valor "0" (quadrados pretos, valor binário 00). O valor "1" foi irradiado por 100 ms (quadrados vermelhos, valor binário 10) e valor "2" foi irradiado por 200 ms (quadrados azuis, valor binário 01). . . . . 76
- 5.1 Image de microscopia óptica convencional de uma amostra marcada por Hematoxilina e Eosina. Fatia (#824) de cérebro de rato com tumor (10  $\mu m$  de espessura). . . . . 81
- 5.2 Resultados de microscopia CARS multiplexada. (a) espectro bruto de uma região de tecido normal (linha preta) e de uma região com tumor (linha vermelha), (b) superposição de uma imagem de microscopia óptica convencional com uma imagem obtida por CARS multiplexado sobre uma região de borda entre tecido normal e tumor, (c) imagem de microscopia CARS multiplexada tomando o espectro em  $2832\text{ cm}^{-1}$  e (d) imagem de contraste obtida por PCA usando dois autovetores. . . . . 83

- 5.3 Resultados do MME aplicado aos dados de microscopia CARS multiplexada. (a) espectros do MME Raman para uma região de tecido normal (linha preta) e para uma região de tumor (linha vermelha). Um conjunto de seis figuras recuperadas pelo MME mostrando diferentes características espectrais de uma mesma região escaneada (ver detalhes no texto): (b)-(e) quatro linhas Raman na região de *impressão digital*, (f) e (g) duas linhas Raman na região do CH. (h) microscopia óptica marcada por HE identificando a região de tecido normal (vermelho claro) e a região de tumor (vermelho escuro). (i) resultado da PCA utilizando o espectro MME Raman recuperado, três autovetores foram selecionados. . . . . 84
- 5.4 Resultado da comparação entre autovetores espectrais determinados pela PCA. (a) região de tecido normal, (b) borda entre os tecidos normal/tumor e (c) região dentro do tumor sólido. Os autovetores mais prováveis que caracterizam o tecido normal (em vermelho) e o tumor (em verde), também são reconhecidos na região de borda. . . . . 86
- 5.5 Comparação entre os resultados de microscopia CARS multiplexada em retrodetecção (coluna da esquerda) e em transmissão (coluna da direita), para uma região ( $200 \times 200 \mu m$ ) de borda entre os tecidos normal e tumor. (a)-(b) sinal bruto de CARS multiplexado tomado em  $2832 \text{ cm}^{-1}$ , (c)-(d) sinal MME Raman recuperado tomado em  $2882 \text{ cm}^{-1}$  e (e)-(f) resultados de PCA utilizando três autovetores. . . . . 88
- 6.1 (a) MEV de uma nanoponteira de Au construída por desbaste eletroquímico com 28 nm de diâmetro final e (b) Sistema de aproximação diapação+nanoponteira sobre um filme de NCPU. . . . . 92
- 6.2 (a) imagem de MEV de uma nanoponteira estruturada por desbaste de íons acelerados (FIB). (b)-(c) imagens por FIB de uma nanoponteira tipo fenda, em dois ângulos de visualização. . . . . 93
- 6.3 (a)-(b) resultados de AFM para nanotubos de carbono individuais e (c) para nanotubos de  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ . . . . . 94

---

6.4	Interface gráfica do programa, em ambiente LabVIEW, que converte a matriz hiperespectral CARS utilizando o MME. . . . .	95
-----	---	----

# Sumário

<b>1. Fundamentos de Espectroscopia vibracional</b> . . . . .	21
1.1 Espalhamento Raman espontâneo . . . . .	22
1.2 Espalhamento Raman Stokes estimulado . . . . .	24
1.2.1 Ganho de Amplitude Stokes . . . . .	25
1.3 Espalhamento Raman Anti-Stokes estimulado . . . . .	30
1.3.1 Ganho de amplitude anti-Stokes . . . . .	32
1.4 Microscopia Vibracional (Raman X CARS) . . . . .	36
1.5 Microscopia CARS multiplexada . . . . .	37
1.5.1 Montagem Experimental . . . . .	38
<b>2. Ferramentas para análise de dados em CARS multiplexado</b> . . . . .	42
2.1 Recuperação do sinal ressonante vibracional . . . . .	42
2.1.1 Método de Máxima Entropia (MME) . . . . .	43
2.1.2 Método de transformada Kramers-Kronig (MTKK) . . . . .	48
2.2 Análise por componentes principais (PCA) . . . . .	51
<b>3. Mapeamento de impurezas em Nanotubos de Carbono</b> . . . . .	56
3.1 Propriedades eletrônicas e estruturais em NCPU . . . . .	57
3.2 Distribuição de NCPU (Amostra) . . . . .	58
3.3 Parâmetro de Impureza . . . . .	59
3.4 Resultados . . . . .	61
<b>4. Armazenamento de dados via deslocamento Raman</b> . . . . .	67
4.1 Deslocamento Raman controlado em NCPU . . . . .	67
4.2 Resultados . . . . .	72

---

<b>5. Microscopia CARS multiplexada em tecido cerebral de rato . . . . .</b>	<b>79</b>
5.1 Microscopia vibracional em tecido cerebral de rato . . . . .	79
5.2 Resultados . . . . .	81
<b>6. Demais Trabalhos . . . . .</b>	<b>91</b>
<b>7. Conclusão . . . . .</b>	<b>97</b>

# Resumo

O tema geral desta tese é a utilização de técnicas ópticas de espectroscopia Raman não linear para análises de sistemas distintos. Especificamente, nos concentraremos na técnica de CARS multiplexado, introduzindo os princípios fundamentais e relatando a importância do tratamento de dados para a recuperação do espectro vibracional. Comprovamos que a técnica de CARS multiplexado é capaz de substituir a espectroscopia Raman convencional de maneira eficiente nas aplicações abordadas e apresentar diversas vantagens. Por fim, apresentamos outros trabalhos desenvolvidos durante o período de doutoramento relacionados à microscopia óptica em escala nanométrica.

**Palavras-Chave:** Raman, microscopia, espectroscopia, nanotubos de carbono, armazenamento de dados, cérebro, tecido, tumor, nanoponteira





# Multiplex CARS applied to Carbon Nanotubes and Brain Tissues

## Abstract

The general theme of this thesis is the use of the nonlinear Raman spectroscopy techniques to analyze different systems. Specifically we will concentrate in the Multiplex CARS technique, introducing the fundamentals and relating the important role of the data processing to retrieve the vibrational spectrum. We show that multiplex CARS can substitute the conventional Raman spectroscopy efficiently in the discussed subjects and provide several advantages. Finally, we present others developed works during the doctorate period related with microscopy in nanometric scale.



# Introdução

Espectroscopia vibracional designa um vasto conjunto de técnicas voltadas a investigar as propriedades da matéria pela determinação da energia vibracional das ligações moleculares. Em óptica, a técnica mais comum utiliza a emissão do espectro Raman para revelar os modos vibracionais contidos em uma determinada amostra. De maneira simplificada, um fóton de bombeamento excita a molécula até um estado virtual que em seguida decai para um estado vibracional real emitindo um fóton de menor energia, chamado Stokes. No entanto, a espectroscopia Raman sofre de algumas desvantagens, como a baixa intensidade do sinal gerado e a superposição do sinal Stokes com a emissão de fluorescência. Uma variação análoga, que tem origem em processos não lineares, é conhecida como espectroscopia Raman anti-Stokes coerente (CARS - *Coherent anti-Stokes Raman Spectroscopy*) e oferece um sinal mais intenso em comparação ao Raman convencional. O fato de a emissão CARS ocorrer para energias maiores que a de bombeamento garante a separação natural entre o sinal anti-Stokes e a fluorescência. Todas as técnicas de espectroscopia podem ser associadas à microscopia de varredura para, desta forma, fornecer informação sobre a especificidade química local de uma amostra. Este tipo associação foi largamente utilizada ao longo deste trabalho.

As técnicas convencionais de CARS exigem que um laser de bombeamento, de largura espectral estreita, na frequência da transição Stokes, seja sintonizado ao longo de uma determinada banda espectral para excitar individualmente cada modo vibracional. Por outro lado, a técnica explorada ao longo deste trabalho, nomeada CARS multiplexado, utiliza um único laser de bombeamento, largo espectralmente, para medir simultaneamente diversos modos vibracionais. Uma importante desvantagem da espectroscopia CARS, multiplexado ou não, diz respeito a estimulação de um processo não ressonante de origem puramente eletrônica. Devido à coerência entre os dois processos, o sinal não ressonante (SNR) in-

terfere com a emissão anti-Stokes distorcendo as linhas dos modos vibracionais. Sendo assim, o sinal que resulta de uma medida de CARS não representa diretamente o espectro vibracional Raman. Neste caso, a influência do SNR não pode ser removida por uma simples correção de fundo. Para isso, é necessário levar em conta a interferência entre as componentes ressonantes e não ressonantes. Uma parte relevante deste trabalho se destina a aplicar um método de análise de dados para a remoção da influência do SNR sobre uma medida de CARS multiplexado.

O primeiro capítulo desta tese discute os fundamentos básicos sobre a geração do sinal Raman, emitidos na frequência Stokes e anti-Stokes. Demonstramos a seguir que a propagação ao longo de um meio gera ganho sobre a emissão Raman. O segundo capítulo trata de discutir as técnicas de análise de dados empregadas ao longo deste trabalho, focando sobre o método de máxima entropia para a recuperação do sinal vibracional. São apresentados, nos três capítulos que seguem, os resultados de três trabalhos relacionados a aplicação da técnica de CARS multiplexado. O capítulo 3 propõe a utilização da microscopia CARS multiplexada para a construção de um mapa que revela a informação sobre impurezas presentes em uma distribuição de nanotubos de carbono. No capítulo 4, um novo conceito para armazenamento de dados, utilizando o deslocamento da frequência central de um modo Raman induzido à laser, é proposto. Em seguida, no capítulo 5, utilizamos a mesma técnica de microscopia para investigar tecido cerebral de rato com tumor. Em todos estes trabalhos, comprovamos a eficiência do método de máxima entropia para a recuperação do espectro vibracional, fundamental na interpretação dos dados adquiridos. Por último, no capítulo 6, apresentamos diversos outros trabalhos que foram desenvolvidos durante o período que compreende este doutorado. Relatamos os esforços para relacionar a técnica de CARS multiplexado com a microscopia de campo próximo, como a produção de nanoponteiras metálicas funcionalizadas, bem como reportamos o desenvolvimento do *software* que aplica o método de recuperação do sinal vibracional.

## Capítulo 1

# Fundamentos de Espectroscopia vibracional

A interação da luz com a matéria resulta em diversos processos geradores de frequências ópticas, que podem ser usados para recuperar informações sobre o meio interagente. Podemos classificar esses processos como lineares ou não lineares dependendo da resposta do meio em relação ao campo eletromagnético incidente. A polarização, ou momento de dipolo induzido por unidade de volume, é o termo presente nas equações de Maxwell que carrega informação sobre a resposta elétrica do meio material, sendo assim de fundamental importância na interpretação dos resultados de espectroscopias ópticas. De maneira geral, consideramos que a polarização  $\vec{P}(t)$  induzida por um campo eletromagnético  $\vec{E}(t)$ , de amplitude inferior àquela típica de campos atômicos dos elétrons, propagante em um meio material pode ser expressa por uma expansão em série de Taylor, tal que

$$\begin{aligned}\vec{P}(t) &= \epsilon_0 \left[ \chi^{(1)} \vec{E}(t) + \chi^{(2)} \vec{E}(t)^2 + \chi^{(3)} \vec{E}(t)^3 + \dots \right] \\ &\equiv \vec{P}^{(1)}(t) + \vec{P}^{(2)}(t) + \vec{P}^{(3)}(t) + \dots\end{aligned}\tag{1.1}$$

onde  $\epsilon_0$  é a permissividade do vácuo e  $\chi^{(1)}$ ,  $\chi^{(2)}$  e  $\chi^{(3)}$  são constantes conhecidas como susceptibilidade de primeira, segunda e terceira ordem do meio, respectivamente [5, 27]. A informação sobre o meio na eq. 1.1 está contida nestas constantes que aqui são consideradas como grandezas escalares por simplicidade, mas que, a rigor, são tensores devido o caráter vetorial do campo eletromagnético. A eq. 1.1 é válida sob algumas restrições, como a de que o material responde instantaneamente ao campo  $\vec{E}(t)$ . Além disso, para campos suficientemente intensos a série da eq. 1.1 não converge.

Na eq. 1.1 o primeiro termo  $\vec{P}^{(1)}(t)$  representa a polarização linear induzida, bem como  $\vec{P}^{(2)}(t)$  a polarização de segunda ordem,  $\vec{P}^{(3)}(t)$  a polarização de terceira ordem e assim sucessivamente. No entanto, o termo de correção de mais baixa ordem  $\vec{P}^{(2)}(t)$  somente é observado para materiais que não apresentam simetria de inversão. Considerando a polarização não linear de segunda ordem, temos que

$$\vec{P}^{(2)}(t) = \epsilon_0 \chi^{(2)} \vec{E}(t)^2 \quad (1.2)$$

e para um meio com inversão de simetria, assumindo a resposta instantânea da polarização em relação ao campo eletromagnético, a inversão do sinal de  $\vec{E}(t)$  deve refletir em  $\vec{P}^{(2)}(t)$ , tal que

$$-\vec{P}^{(2)}(t) = \epsilon_0 \chi^{(2)} [-\vec{E}(t)]^2 = \epsilon_0 \chi^{(2)} \vec{E}(t)^2. \quad (1.3)$$

A comparação das sentenças em 1.2 e 1.3 permite concluir que  $\vec{P}^{(2)}(t)$  deve ser igual a  $-\vec{P}^{(2)}(t)$  o que somente é satisfeito para meios com esta simetria se  $\chi^{(2)} = 0$ . Notamos que o mesmo vale para as demais susceptibilidades de ordem par. Materiais amorfos e 11 das 32 classes de cristais existentes apresentam simetria de inversão e, portanto, não permitem a observação de processos ópticos não lineares de segunda ordem tais como geração de segundo harmônico e geração em soma e diferença de frequências.

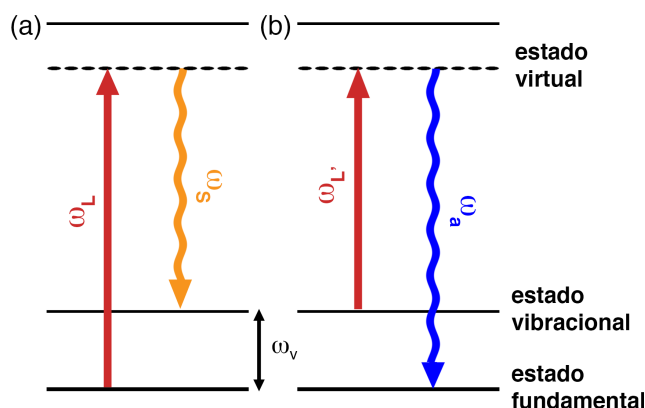
As técnicas de espectroscopia vibracional, que se baseiam-se em processos óticos de terceira ordem, por exemplo, Raman estimulado e CARS, onde a informação sobre o meio provém da constante  $\chi^{(3)}$ . A maior parte dos materiais de interesse como, gases, líquidos, sólidos amorfos e grande parte dos cristais apresentam simetria de inversão e por isso os processos ópticos que dependem de  $\vec{P}^{(3)}(t)$  são amplamente utilizados para o estudo de suas propriedades. Nas seções que seguem este capítulo descreveremos os processos de espectroscopia vibracional envolvidos neste trabalho.

## 1.1 Espalhamento Raman espontâneo

Espalhamento Raman espontâneo é um processo inelástico onde um fóton é aniquilado resultando na criação de um novo fóton com energia diferente [41]. Esta troca de energia entre o fóton incidente e o meio configura um processo não paramétrico, onde o estado

quântico inicial e final não coincidem. No caso em que o fóton espalhado tem menor energia do que o fóton de bombeamento (laser de excitação), o mesmo é denominado Stokes (Fig. 1.1a). Uma vez que medimos a frequência emitida do Stokes  $\omega_S$ , obtemos a energia relacionada ao estado vibracional  $\omega_v$  de um determinado sistema pela simples relação  $\omega_v = \omega_L - \omega_S$  sugerida pela Fig.1.1a, onde  $\omega_L$  é a frequência do laser de bombeamento.

Pode ocorrer que o laser de bombeamento encontre o meio em um estado excitado (excitação térmica, por exemplo) e que a transição que segue ocorra entre o estado virtual e o estado fundamental. Neste caso o fóton emitido tem maior energia (ou frequência) que o laser de bombeamento e é denominado anti-Stokes (Fig. 1.1b). Também é possível obter a energia do estado vibracional através da detecção da frequência anti-Stokes  $\omega_a$ ; sendo a frequência do laser de bombeamento  $\omega_{L'}$  temos que,  $\omega_v = \omega_a - \omega_{L'}$ . Entretanto, a probabilidade de ocorrer uma transição anti-Stokes espontânea é menor que uma Stokes por um fator de Boltzmann  $\exp\left(\frac{-\hbar\omega_v}{k_B T}\right)$ , onde  $k_B$  é a constante de Boltzmann e  $T$  a temperatura. Para valores típicos  $\hbar\omega_v \gg k_B T$ , logo, o espalhamento Raman espontâneo ocorre predominantemente em frequências Stokes.



**Fig. 1.1:** Diagrama de energia para o espalhamento Raman espontâneo: (a) Stokes e (b) anti-Stokes.  $\omega_L$  e  $\omega_{L'}$  são frequências do laser de bombeamento,  $\omega_S$  e  $\omega_a$  são as frequências das transições Stokes e anti-Stokes, respectivamente. As setas onduladas representam as transições espontâneas.

## 1.2 Espalhamento Raman Stokes estimulado

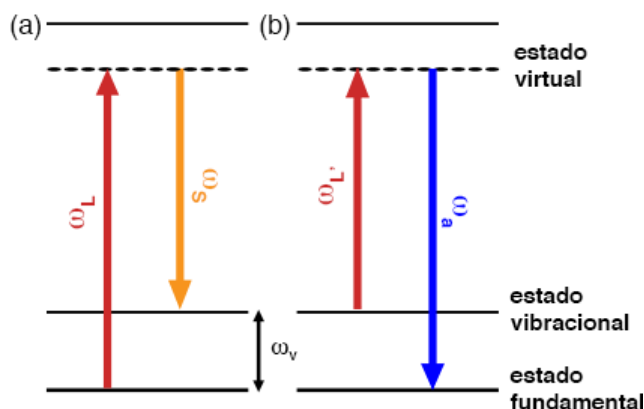
O espalhamento Raman estimulado é um processo não paramétrico, para o qual existe um casamento automático de vetor de onda (Fig. 1.2) [29]. A transição Raman na frequência Stokes, entre um estado virtual e um estado real vibracional, é estimulada pela incidência de um fóton com mesma frequência. Como resultado um fóton adicional Stokes é gerado pelo meio, coerente com o fóton incidente e de mesma energia. Em termos práticos, o feixe incidente na frequência Stokes sofre um ganho (ver cap. 1.2.1) ao propagar pelo meio. Este campo pode ter origem na própria emissão espontânea, realimentando o sistema, ou deliberadamente inserido por uma fonte externa coerente. Em termos de eficiência, o processo estimulado supera o processo espontâneo. A seção de choque para o processo Raman espontâneo por unidade de volume é de apenas  $10^{-6} \text{cm}^{-1}$ , o que representa uma conversão de aproximadamente uma parte em um milhão da energia do laser incidente na frequência Stokes. Para o processo de Raman estimulado, em condições otimizadas a conversão da energia de excitação em frequência Stokes chega a 10% ou mais [5]. A probabilidade da emissão de um fóton de energia Stokes é descrita pela relação:

$$P_S = D m_L (m_S + 1) \quad (1.4)$$

onde  $m_S$  é o número médio de fótons na frequência do laser,  $m_S$  é o número médio de fótons incidentes na frequência Stokes e  $D$  uma constante que depende das propriedades do meio Raman. Percebemos que a unidade na eq. 1.4 leva em conta a emissão Stokes Raman espontâneo.

Para fins de detecção, uma importante diferença entre o espalhamento Raman espontâneo e o estimulado é a direção em que o fóton gerado é emitido. No processo espontâneo as emissões, tanto na frequência Stokes quanto na anti-Stokes, ocorrem nas direções semelhantes à radiação de um dipolo. No entanto, para o processo estimulado a emissão da frequência Stokes ocorre em uma região cônica concêntrica com o feixe incidente, gerado tanto no sentido de propagação como também no sentido contra-propagante.





**Fig. 1.2:** Diagrama de energia para o espalhamento Raman estimulado: (a) Stokes e (b) anti-Stokes. As setas retas representam o fóton emitido estimulado pela incidência de um fóton de excitação de mesma energia.  $\omega_L$  e  $\omega_L'$  são frequências do laser de bombeamento,  $\omega_S$  e  $\omega_a$  são as frequências das transições Stokes e anti-Stokes estimuladas, respectivamente.

### 1.2.1 Ganho de Amplitude Stokes

Partindo de uma abordagem clássica, podemos descrever o comportamento de um modo molecular vibracional como um oscilador harmônico forçado [5]. Neste caso, o modo vibracional é excitado por uma força  $\vec{F}(t)$  onde a frequência de ressonância é  $\omega_v$ , a constante de amortecimento do oscilador é  $\gamma$ ,  $m$  é a massa reduzida e  $\vec{q}(t)$  é o desvio da distância interatômica a partir de um equilíbrio  $q_0$ . O movimento deste oscilador pode ser descrito pela equação

$$\frac{d^2\vec{q}}{dt^2} + 2\gamma\frac{d\vec{q}}{dt} + \omega_v^2\vec{q} = \frac{\vec{F}(t)}{m}. \quad (1.5)$$

Assumimos que a polarizabilidade da molécula não é constante no tempo e que varia com a distância interatômica  $\vec{q}(t)$  segundo a relação

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

onde  $\alpha_0$  é a polarizabilidade quando a distância interatômica é mantida no equilíbrio  $q_0$ . A partir destas relações vamos investigar como um campo eletromagnético pode excitar coerentemente um modo vibracional. Sendo assim, um campo óptico  $\vec{E}(z, t)$  induz um

momento de dipolo  $\vec{p}(z, t)$  em uma molécula localizada pela coordenada  $z$ , tal que

$$\vec{p}(z, t) = \epsilon_0 \alpha \vec{E}(z, t). \quad (1.7)$$

A energia depositada sobre um momento de dipolo é expressa por

$$W = \frac{1}{2} \left\langle \vec{p}(z, t) \cdot \vec{E}(z, t) \right\rangle = \frac{1}{2} \epsilon_0 \alpha \left\langle \vec{E}^2(z, t) \right\rangle, \quad (1.8)$$

onde os colchetes angulares representam a média temporal. Logo, a força exercida pelo campo incidente sobre o dipolo é dada por

$$\vec{F} = \frac{dW}{dq} = \left( \frac{d\alpha}{dq} \right)_0 \left\langle \vec{E}^2(z, t) \right\rangle. \quad (1.9)$$

O quadrado do campo na eq. 1.9 indica que se o campo incidente for composto por duas frequências teremos uma componente da força induzindo o dipolo na frequência de batimento. Desta forma, incidindo um campo como a frequência do laser de bombeamento  $\omega_L$  e a frequência Stokes  $\omega_S$  relativa, teremos a excitação ressonante de um modo vibracional de frequência  $\omega_v = \omega_L - \omega_S$ . De maneira mais quantitativa, supomos um campo incidente representado por

$$\vec{E}(z, t) = A_L e^{i(k_L z - \omega_L t)} + A_S e^{i(k_S z - \omega_S t)} + c.c. \quad (1.10)$$

Inserindo na eq. 1.9 a expressão da eq. 1.10 para o campo incidente, temos que a força produzida na frequência de batimento é:

$$\vec{F}(z, t) = \left( \frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 [A_L A_S^* e^{i(\kappa z - \Omega t)} + c.c.] \quad (1.11)$$

onde,

$$\kappa = k_L - k_S \quad \text{e} \quad \Omega = \omega_L - \omega_S. \quad (1.12)$$

Agora, podemos encontrar a solução para a eq. 1.5 do oscilador harmônico usando a expressão para a força dada pela eq. 1.11. Para tanto, vamos considerar uma solução tentativa (*Ansatz*) como

$$\vec{q} = q(\Omega) e^{i(\kappa z - \Omega t)} + c.c. \quad (1.13)$$

Assim, inserindo as eqs. 1.13 e 1.11 na eq. 1.5 do oscilador, temos

$$-\omega^2 q(\Omega) - 2i\omega\gamma q(\Omega) + \omega_v^2 q(\Omega) = \frac{\epsilon_0}{m} \left( \frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 A_L A_S^* \quad (1.14)$$

de onde facilmente obtemos a expressão para amplitude de oscilação

$$q(\Omega) = \frac{(\epsilon_0/m) (\partial \alpha / \partial q)_0 A_L A_S^*}{\omega_v^2 - \Omega^2 - 2i\Omega\gamma}. \quad (1.15)$$

Considerando a expressão para a polarizabilidade na eq. 1.6 e para o momento de dipolo na eq. 1.7, definimos a polarização induzida no meio como

$$\begin{aligned} \vec{P}(z, t) &= N \vec{p}(z, t) = \epsilon_0 N \vec{\alpha}(z, t) \vec{E}(z, t) \\ &= \epsilon_0 N \left[ \alpha_0 + \left( \frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 \vec{q}(z, t) \right] \vec{E}(z, t) \end{aligned} \quad (1.16)$$

onde  $N$  é o número de dipolos, ou moléculas, por volume que contribuem. Inserindo as eqs. 1.10 e 1.13, e tomando a parte que não depende de  $\alpha_0$  definimos a polarização não linear do meio como

$$\begin{aligned} \vec{P}^{NL}(z, t) &= \epsilon_0 N \left( \frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 [q(\Omega) e^{i(\kappa z - \Omega t)} + c.c.] \\ &\quad \times [A_L e^{i(k_L z - \omega_L t)} + A_S e^{i(k_S z - \omega_S t)} + c.c.]. \end{aligned} \quad (1.17)$$

A partir dessa expressão, percebemos que a interação não linear com o meio resulta em uma polarização não linear com componentes de diversas frequências diferentes. Se tomarmos, a partir da eq. 1.17, apenas a componente que oscila na frequência Stokes  $\omega_S$ , temos

$$\vec{P}_S^{NL}(z, t) = P(\omega_S) e^{-i\omega_S t} + c.c. \quad (1.18)$$

onde a amplitude complexa da polarização na frequência Stokes é dada por

$$P(\omega_S) = \frac{(\epsilon_0^2 N/m) (\partial \alpha / \partial q)_0^2 |A_L|^2 A_S}{\omega_v^2 - \Omega^2 - 2i\Omega\gamma} e^{ik_S z}. \quad (1.19)$$

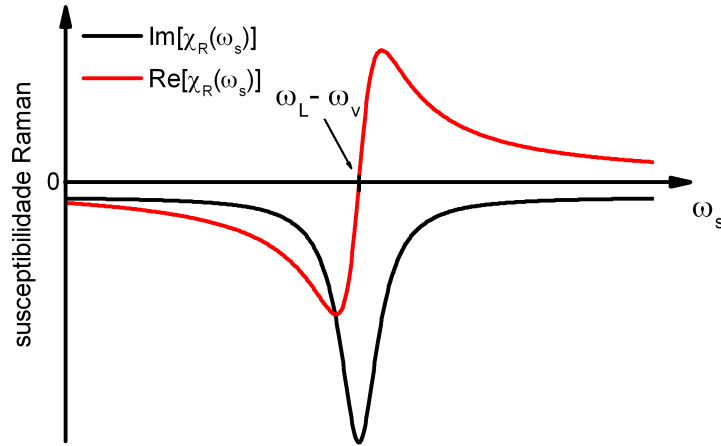
Podemos então definir susceptibilidade Raman  $\chi_R(\omega_S)$  relacionando com a susceptibilidade de terceira ordem  $\chi^{(3)}(\omega_S = \omega_S + \omega_L - \omega_L)$  [5], de maneira que

$$P(\omega_S) = 6\epsilon_0 \chi_R(\omega_S) |A_L|^2 A_S e^{ik_S z} \quad (1.20)$$

onde a susceptibilidade Raman é dada por

$$\chi_R(\omega_S) = \frac{\epsilon_0 (N/6m) (\partial \alpha / \partial q)_0^2}{\omega_v^2 - (\omega_L - \omega_S)^2 - 2i(\omega_L - \omega_S)\gamma}, \quad (1.21)$$

que está diretamente relacionada com a susceptibilidade de terceira ordem  $\chi^{(3)}$  como definida anteriormente na eq. 1.1. As componentes real e imaginária da susceptibilidade Raman estão representadas na Fig. 1.3 em função da frequência Stokes.



**Fig. 1.3:** Componentes real e imaginária da susceptibilidade Raman  $\chi_R(\omega_s)$ .

O vetor de deslocamento elétrico, presente nas equações de Maxwell, depende da polarização do meio ( $\vec{D} = \epsilon_0 \vec{E} + \vec{P}$ ) que por sua vez é composta por uma parte linear e outra não linear ( $\vec{P} = \vec{P}^{(1)} + \vec{P}^{NL}$ ), a exemplo da eq. 1.1. Podemos então escrever uma equação de onda considerando a resposta não linear  $\vec{P}^{NL}$  como termo fonte. Sendo assim, para um meio isotrópico e não dispersivo temos

$$-\nabla^2 \vec{E} + \frac{\epsilon^{(1)}}{c^2} \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} = -\frac{1}{\epsilon_0 c^2} \frac{\partial^2 \vec{P}^{NL}}{\partial t^2} \quad (1.22)$$

onde  $\epsilon^{(1)}$  é a permissividade relativa que é diferente para cada meio. Se considerarmos que o meio de propagação é dispersivo teremos uma permissividade relativa diferente para cada frequência de propagação e tanto o campo  $\vec{E}$  quanto a polarização não linear  $\vec{P}^{NL}$  na eq. 1.22 devem ser considerados como uma soma das componentes de frequência. Assim, considerando a polarização não linear da frequência Stokes  $\vec{P}_S^{NL}$  como termo fonte na eq. 1.22, temos

$$\nabla^2 \vec{E}_S(z, t) - \frac{\epsilon^{(1)}(\omega_S)}{c^2} \frac{\partial^2 \vec{E}_S(z, t)}{\partial t^2} = \frac{1}{\epsilon_0 c^2} \frac{\partial^2 \vec{P}_S^{NL}(z, t)}{\partial t^2}. \quad (1.23)$$

Considerando que a componente do campo na frequência Stokes é

$$\vec{E}_S(z, t) = A_S e^{i(k_S z - \omega_S t)} + c.c. \quad (1.24)$$

e substituindo as eqs. 1.18 e 1.20 na equação de onda 1.23, temos

$$\begin{aligned} \left[ \frac{d^2 A_S}{dz^2} + 2ik_S \frac{dA_S}{dz} - k_S^2 A_S + \frac{\epsilon^{(1)}(\omega_S) \omega_S^2}{c^2} A_S \right] e^{i(k_S z - \omega_S t)} + c.c. \\ = \frac{\omega_S^2}{c^2} 6 \chi_R(\omega_S) |A_L|^2 A_S e^{i(k_S z - \omega_S t)} + c.c. \end{aligned} \quad (1.25)$$

onde consideramos que o campo elétrico depende apenas da coordenada longitudinal  $z$ , logo  $\left( \nabla^2 \rightarrow \frac{d^2}{dz^2} \right)$ . Primeiro utilizamos a identidade  $k_S^2 = \epsilon^{(1)}(\omega_S) \omega_S^2 / c^2$  e percebemos que a terceira e quarta componentes da eq. 1.25 se anulam. Vamos também utilizar a aproximação de variação lenta da amplitude [5], que resulta em

$$\left| \frac{d^2 A_S}{dz^2} \right| \ll \left| k_S \frac{dA_S}{dz} \right| \quad (1.26)$$

que nos leva a desprezar o primeiro termo na eq. 1.25. Com isso obtemos a variação da amplitude do campo na frequência Stokes ao propagar pelo meio

$$\frac{dA_S}{dz} = -\alpha_S A_S \quad (1.27)$$

onde definimos

$$\alpha_S = -3i \frac{\omega_S}{n_S c} \chi_R(\omega_S) |A_L|^2 \quad (1.28)$$

e usamos a identidade  $k_S = n_S \omega_S / c$  para escrevermos em função do índice de refração para a frequência Stokes  $n_S$ . Neste ponto, retornamos para a análise da susceptibilidade Raman. Próximo a frequência de ressonância  $\omega_S = \omega_L - \omega_v$  (ver Fig. 1.3) a eq. 1.21 pode ser aproximada por

$$\chi_R(\omega_S) = \frac{(\epsilon_0 N / 12 m \omega_v) (\partial \alpha / \partial q)_0^2}{[\omega_S - (\omega_L - \omega_v)] + i\gamma} \quad (1.29)$$

Portanto, notamos que o sinal Raman Stokes estimulado tem dependência quadrática com a amplitude do laser de bombeamento  $A_L$  e linear com a amplitude do laser de estímulo  $A_S$  (eq. 1.20), diferente do processo espontâneo que escala linearmente com  $A_L$ . Na frequência de ressonância a susceptibilidade Raman é puramente imaginária e negativa, e que desta maneira  $\alpha_S$  (eq. 1.28) se torna real e negativo. Conseqüentemente, a eq. 1.27 garante que a amplitude do campo na frequência Stokes  $A_S$  sofre um ganho exponencial ao propagar pelo meio, devido à resposta não linear do mesmo. Além disso,  $\alpha_S$  depende apenas

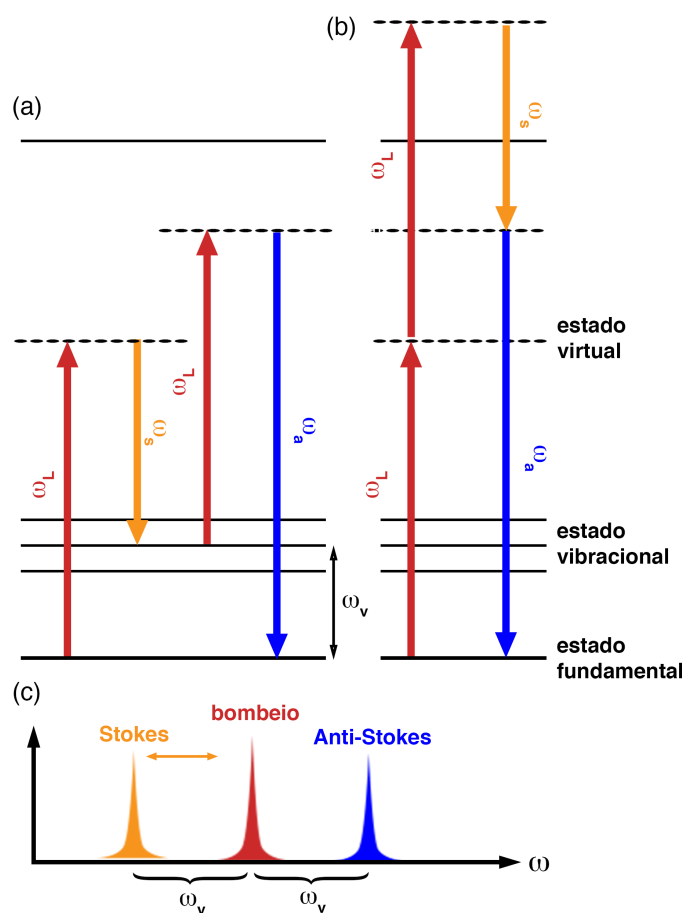
do módulo quadrado da amplitude do laser de bombeamento  $A_L$  (eq. 1.28), significando que a condição de casamento de fase entre as componentes de campo é automaticamente satisfeita para tal processo. Em outras palavras, dizemos que o espalhamento Raman Stokes é um processo puramente de ganho.

### 1.3 Espalhamento Raman Anti-Stokes estimulado

Ao estimularmos a transição Stokes beneficiamos também um segundo processo de mistura de quatro ondas que beneficia a frequência anti-Stokes. Após a transição Stokes estimulada, quando o sistema está no estado vibracional, um segundo fóton de energia maior - usualmente um fóton do próprio laser de bombeamento - promove a transição para um novo estado virtual que, em seguida, retorna ao estado fundamental emitindo um fóton anti-Stokes (Fig. 1.4). Basicamente, este processo difere do espalhamento Raman Stokes estimulado pela troca da terceira frequência envolvida no processo coerente, resultando na emissão de um fóton de energia maior (anti-Stokes) que a energia de bombeamento, resultando em processo paramétrico. Em termos de energia do estado quântico, a frequência anti-Stokes fica definida como  $\omega_a = 2\omega_L - \omega_S$  como sugere o diagrama na Fig. 1.4a. Na nomenclatura usual dizemos que a emissão Stokes está deslocada para o vermelho, por ter energia menor que o laser de bombeamento, e a emissão anti-Stokes deslocada para o azul, por ter maior energia que o laser de bombeamento. A medida da frequência anti-Stokes garante informação sobre o espectro vibracional pela relação direta  $\omega_v = \omega_a - \omega_L$ , uma vez que a frequência do laser de bombeamento é conhecida.

Ao considerarmos a incidência de apenas dois feixes de excitação, as frequências Stokes  $\omega_S$  e anti-Stokes  $\omega_a$  emitidas serão simétricas em relação a frequência de bombeamento  $\omega_L$  (Fig. 1.4c). Técnicas de espectroscopia vibracional que baseiam-se na detecção da frequência Raman Stokes, sofrem com a interferência da emissão de fluorescência que também ocorre com deslocamento para o vermelho. Sendo assim, um intenso sinal de fluorescência pode sobrepor o sinal Raman Stokes, escondendo a informação vibracional. O fato da frequência Raman anti-Stokes ocorrer deslocada para o azul torna essa emissão interessante para técnicas de espectroscopia, uma vez em que evita a sobreposição com o sinal de fluorescência, frequentemente presente em amostras de tecidos biológicos, por exemplo. No

entanto, a emissão de um sinal de fundo não ressonante na mesma frequência anti-Stokes representa um problema para a recuperação da informação vibracional. O sinal de fundo não ressonante tem origem puramente eletrônica que interfere com o sinal ressonante causando variação de frequência e amplitude[28]. A Fig. 1.4b representa uma contribuição não ressonante com a mesma frequência anti-Stokes onde uma transição eletrônica de dois fótons ocorre da transição Stokes. A interferência do sinal de fundo não ressonante será detalhadamente discutida no capítulo seguinte deste trabalho.



**Fig. 1.4:** (a) Diagrama de energia para o espalhamento Raman anti-Stokes estimulado ressonante; (b) Diagrama de energia para a emissão do sinal de fundo não ressonante; (c) Representação espectral dos pulsos de excitação, bombeamento (vermelho) e Stokes (laranja), e a frequência do espalhamento Raman anti-Stokes (azul).

### 1.3.1 Ganho de amplitude anti-Stokes

Podemos definir uma susceptibilidade Raman para a frequência anti-Stokes  $\chi_a$  baseado na eq. 1.21, através da identidade  $(\omega_L - \omega_S) = -(\omega_L - \omega_a)$  que relaciona as frequências Stokes e anti-Stokes geradas no processo estimulado, desta maneira

$$\chi_R(\omega_a) = \frac{\epsilon_0 (N/6m) (\partial\alpha/\partial q)_0^2}{\omega_v^2 - (\omega_L - \omega_a)^2 + 2i(\omega_L - \omega_a)\gamma}. \quad (1.30)$$

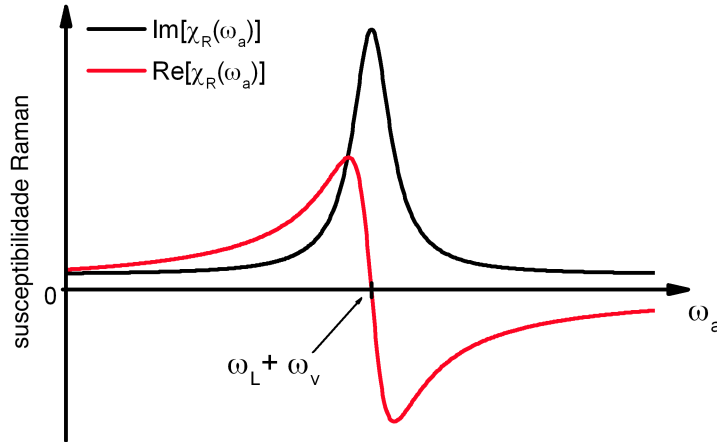
Assim, percebemos que

$$\chi_R(\omega_a) = \chi_R(\omega_S)^* \quad (1.31)$$

e seguindo o mesmo procedimento do cap. 1.2.1, teremos uma expressão aproximada para a susceptibilidade Raman  $\chi_R(\omega_a)$  na frequência de ressonância ( $\omega_a = \omega_L + \omega_v$ ) da seguinte forma

$$\chi_R(\omega_a) = \frac{-(\epsilon_0 N/12 m \omega_v) (\partial\alpha/\partial q)_0^2}{[\omega_a - (\omega_L + \omega_v)] + i\gamma}. \quad (1.32)$$

As componentes real e imaginária para a susceptibilidade Raman na frequência anti-Stokes



**Fig. 1.5:** Componentes real e imaginária da susceptibilidade Raman  $\chi_R(\omega_a)$ .

estão representadas na Fig. 1.5. De maneira análoga ao procedimento realizado para a frequência Stokes, podemos deduzir a seguinte relação de propagação para a amplitude do campo anti-Stokes

$$\frac{dA_a}{dz} = -\alpha_a A_a, \quad (1.33)$$



onde

$$\alpha_a = -3i \frac{\omega_a}{n_a c} \chi_R(\omega_a) |A_L|^2. \quad (1.34)$$

No entanto, a partir da eq. 1.32, notamos que  $\alpha_a$  será real e positivo, o que resulta em uma atenuação para a amplitude anti-Stokes  $A_a$ , segundo a eq. 1.33. Este resultado contradiz as observações experimentais onde a amplitude do sinal anti-Stokes demonstra um ganho considerável para determinadas direções de propagação. Devemos então considerar outros termos resultantes da eq. 1.17 que possam resultar em um ganho de amplitude maior do que a atenuação prevista pelo termo considerado anteriormente. De fato existe um termo resultante da polarização não linear (eq. 1.17) na frequência anti-Stokes  $\omega_a = 2\omega_L - \omega_S$ , tal que

$$\vec{P}_a^{NL}(z, t) = P(\omega_a) e^{-i\omega_a t} + c.c. \quad (1.35)$$

onde a amplitude complexa da polarização na frequência anti-Stokes é dada por

$$P(\omega_a) = \frac{(\epsilon_0^2 N/m) (\partial\alpha/\partial q)_0^2 A_L^2 A_S^*}{\omega_v^2 - \Omega^2 - 2i\Omega\gamma} e^{i(2k_L - k_S)z} \quad (1.36)$$

lembrando que  $\Omega = \omega_L - \omega_S = \omega_a - \omega_L$ . Aqui novamente, vamos expressar a polarização não linear em função de uma susceptibilidade relacionada com o termo correspondente da susceptibilidade de terceira ordem [5]. Neste caso, vamos definir a susceptibilidade de mistura de quatro ondas para a frequência anti-Stokes  $\chi_F(\omega_a)$  relacionada com a susceptibilidade de terceira ordem  $\chi^{(3)}(\omega_a = \omega_L + \omega_L - \omega_S)$ , tal que

$$P(\omega_a) = 3\epsilon_0 \chi_F(\omega_a) A_L^2 A_S^* e^{i(2k_L - k_S)z} \quad (1.37)$$

onde definimos

$$\chi_F(\omega_a) = \frac{\epsilon_0 (N/3m) (\partial\alpha/\partial q)_0^2}{\omega_v^2 - (\omega_L - \omega_a)^2 + 2i(\omega_L - \omega_a)\gamma}. \quad (1.38)$$

Comparando esta expressão com a eq. 1.30 temos que

$$\chi_F(\omega_a) = 2\chi_R(\omega_a). \quad (1.39)$$

Sendo assim, a polarização não linear total na frequência anti-Stokes é descrita pela soma dos termos que dependem de  $\chi_R(\omega_a)$  (eq.1.30) e  $\chi_F(\omega_a)$  (eq. 1.38), assim

$$P(\omega_a) = 6\epsilon_0 \chi_R(\omega_a) |A_L|^2 A_a e^{i2k_a z} + 3\epsilon_0 \chi_F(\omega_a) A_L^2 A_S^* e^{i(2k_L - k_S)z}. \quad (1.40)$$

Agora, podemos usar o mesmo argumento usado no início desta secção para definir uma susceptibilidade de mistura de quatro ondas na frequência Stokes,

$$\chi_F(\omega_S) = \frac{\epsilon_0 (N/3m) (\partial\alpha/\partial q)_0^2}{\omega_v^2 - (\omega_L - \omega_a)^2 + 2i(\omega_L - \omega_S)\gamma} \quad (1.41)$$

e então escrever também uma polarização para a frequência Stokes que depende de ambas susceptibilidades  $\chi_F(\omega_S)$  e  $\chi_R(\omega_S)$ , tal que

$$P(\omega_S) = 6\epsilon_0 \chi_R(\omega_S) |A_L|^2 A_S e^{i2k_S z} + 3\epsilon_0 \chi_F(\omega_S) A_L^2 A_a^* e^{i(2k_L - k_a)z}. \quad (1.42)$$

Comparamos as eqs. 1.21 e 1.41, notamos que de maneira análoga a frequência anti-Stokes

$$\chi_F(\omega_S) = 2\chi_R(\omega_S). \quad (1.43)$$

Se utilizarmos as expressões das eqs. 1.40 e 1.42 como termos fonte para a equação de onda 1.22, assumindo as mesmas aproximações do cap. 1.2.1, chegaremos a um conjunto de duas equações acopladas para a propagação da amplitude dos campos nas frequências Stokes e anti-Stokes. Assim, temos

$$\frac{dA_S}{dz} = -\alpha_S A_S + \kappa_S A_a^* e^{i\Delta k z} \quad (1.44a)$$

$$\frac{dA_a}{dz} = -\alpha_a A_a + \kappa_a A_S^* e^{i\Delta k z} \quad (1.44b)$$

onde os coeficientes não lineares de absorção e de acoplamento são dados por

$$\alpha_j = \frac{-3i\omega_j}{n_j c} \chi_R(\omega_j) |A_L|^2 \quad j = S, a \quad (1.45a)$$

$$\kappa_j = \frac{3i\omega_j}{2n_j c} \chi_F(\omega_j) A_L^2 \quad j = S, a \quad (1.45b)$$

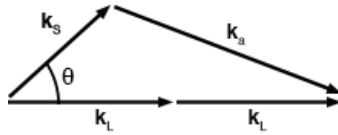
e definimos o casamento de fase entre os vetores de onda (Fig. 1.6) como

$$\Delta k = \Delta \mathbf{k} \cdot \hat{\mathbf{z}} = (2\mathbf{k}_L - \mathbf{k}_S - \mathbf{k}_a) \cdot \hat{\mathbf{z}}. \quad (1.46)$$

Com isso, reconhecemos nas eqs. 1.44 um termo Raman de ganho ou perda (primeiro a direita da igualdade) e um segundo de acoplamento (segundo a direita da igualdade). O termo de acoplamento será relevante somente para valores de  $\Delta z$  muito pequenos. Em outras palavras, se  $\Delta z \gg 0$  as equações desacoplam e a frequência Stokes sofrerá ganho enquanto a anti-Stokes sofrerá perda ao propagar pelo meio Raman. No caso em que

$\Delta z \approx 0$ , as duas equações acoplam e ambas frequências serão amplificadas ao propagar pelo meio Raman.

Em materiais com dispersão normal o índice de refração para a frequência do laser de bombeamento não é o mesmo que o índice médio para as frequência Stokes e anti-Stokes. Sendo assim, a condição de acoplamento ideal ( $\Delta k = 0$ ) somente é atingida para um pequeno ângulo inicial entre as componentes  $\mathbf{k}_L$  e  $\mathbf{k}_S$  (Fig. 1.6) para que a dispersão entre as diferentes componentes seja compensada. Contudo, atualmente em microscopia vibracional, a condição de casamento de fase é satisfeita utilizando lentes objetivas com alta abertura numérica, que garantem um alta focalização de ambos feixes em um volume de interação muito pequeno. Desta maneira, mesmo para incidência de feixes paralelos e colimados sobre a objetiva, teremos uma larga distribuição direcional dos vetores de onda ( $\mathbf{k}_L$  e  $\mathbf{k}_S$ ) dentro de um pequeno volume de interação (tipicamente poucos microns cúbicos), preenchendo automaticamente a condição de casamento de fase ideal ( $\Delta k = 0$ ) [8, 28].



**Fig. 1.6:** Representação vetorial para o casamento de fase ( $\Delta k = 0$ ) entre as componentes envolvidas no processo Raman estimulado.

Se o casamento de fase  $\Delta k \approx 0$ , tal que o termo de acoplamento seja dominante na eq. 1.44b, podemos desprezar o termo de perda, assim

$$\frac{dA_a}{dz} = \kappa_a A_S^* e^{i\Delta k z}, \quad (1.47)$$

e ao considerarmos a propagação do campo em um meio Raman por uma distância  $L$ , temos

$$A_a(z) = \kappa_a A_S^* \int_0^L e^{i\Delta k z} dz = \kappa_a A_S^* \left( \frac{e^{i\Delta k L} - 1}{i\Delta k} \right). \quad (1.48)$$

Da maneira que definimos a amplitude a intensidade do campo é dada por

$$I_j = 2 n_j \epsilon_0 c |A_j|^2, \quad j = L, S, a. \quad (1.49)$$

Assim, usando as eqs. 1.49 e 1.48, a intensidade do campo na frequência anti-Stokes pode ser escrita da seguinte forma,

$$I_a = \frac{9 \omega_a^2 |\chi_F(\omega_a)|^2}{16 \epsilon_0^2 n_L^2 n_S n_a c^4} I_L^2 I_S L^2 \frac{\sin^2(\Delta k L/2)}{(\Delta k L/2)^2} \quad (1.50)$$

$$I_a = I_a^{(max)} \operatorname{sinc}^2\left(\frac{\Delta k L}{2}\right), \quad (1.51)$$

onde  $I_a^{(max)}$  é a intensidade máxima do campo gerado.

Concluindo, a situação otimizada para a geração do campo através do processo Raman anti-Stokes considera o casamento de fase entre os vetores de onda envolvidos ( $\Delta k \rightarrow 0$ ) e a distância de interação ( $L$ ). Ao utilizarmos uma lente objetiva de grande abertura numérica, otimizamos as duas condições: disponibilizando uma ampla distribuição de vetores de onda na região do foco e reduzindo o volume de interação.

## 1.4 Microscopia Vibracional (Raman X CARS)

Microscopia vibracional óptica é um termo amplo, que designa a combinação de técnicas de espectroscopia vibracional (diferentes processos Raman) com técnicas de microscopia de varredura. Este tipo de microscopia obtém especificidade molecular resolvendo espacialmente emissões ópticas relativas à energia vibracional de uma determinada ligação molecular. Em geral, uma fonte laser é utilizada para gerar o(s) feixe(s) de iluminação que são focalizados sobre a amostras através de um microscópio óptico que se encarrega de fazer a varredura da amostra sob a região do foco. O sinal Raman emitido pela amostra é então coletado e enviado para um sistema de detecção capaz de resolver uma larga região espectral, ou somente uma linha de interesse.

Ao considerarmos a microscopia Raman convencional a informação vibracional está contida no espectro da emissão Stokes que necessariamente ocorre para energias menores que a do laser de bombeamento (deslocamento para o vermelho). Dado a baixa eficiência do processo espontâneo, usualmente a microscopia Raman faz uso da emissão Stokes estimulada, onde um feixe de estímulo incide juntamente com o de bombeamento. Porém algumas amostras, tecido cerebral de rato, por exemplo, apresentam um forte sinal de fluorescência que se sobrepõe ao espectro Raman (Stokes) impedindo a resolução do mesmo.

Esta desvantagem, muitas vezes é contornada pelo aumento da intensidade do laser (fluência) juntamente com um maior tempo de integração do sinal detectado. Contudo, esse tipo de solução aumenta o risco de fotodegradação de amostras mais sensíveis à intensidade do laser, como ocorre para os tecidos biológicos.

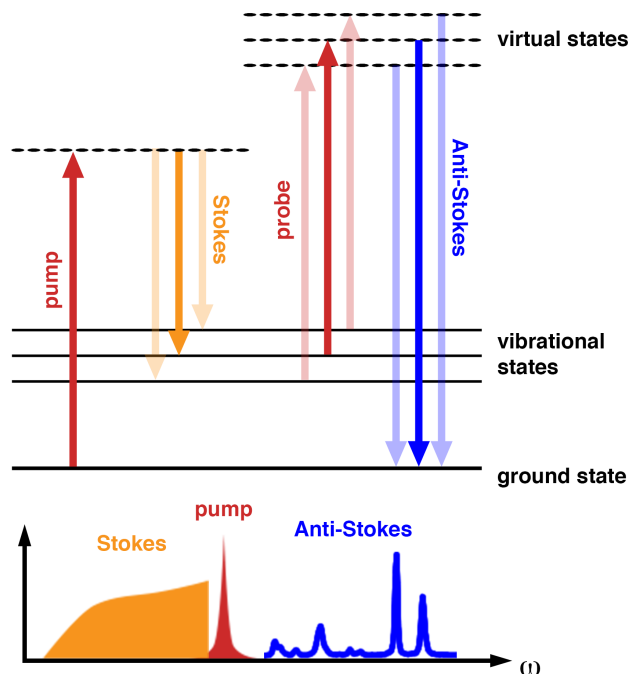
A técnica de espectroscopia óptica que utiliza a detecção da emissão Raman anti-Stokes estimulada é conhecida pelo acrônimo CARS (do inglês, *Coherent anti-Stokes Raman Spectroscopy*). Na espectroscopia CARS a informação vibracional é obtida através do espectro anti-Stokes que ocorre para energias maiores que o laser de bombeamento (deslocamento para o azul) evitando, desta maneira, a sobreposição com o espectro de fluorescência da amostra. No entanto, ocorre para esse tipo de processo de mistura de quatro ondas contribuições ópticas não ressonantes (ver Fig. 1.4) que interferem com o sinal anti-Stokes vibracional. Em geral, o efeito da contribuição não ressonante não esconde completamente o espectro anti-Stokes, mas interfere e distorce as linhas do mesmo. A interferência entre o sinal vibracional e o não ressonante, e os procedimentos para separá-los serão discutidos detalhadamente no capítulo seguinte.

Por fim, as duas técnicas discutidas nesta seção requerem a varredura espectral do feixe de estímulo Stokes para que se obtenha o espectro vibracional completo da uma molécula. Como nestes dois casos, os pulsos de bombeamento e Stokes são espectralmente estreitos (tipicamente alguns nanômetros), o processo estimulado (Stokes ou anti-Stokes) não abrange (prova) mais do que um estado vibracional simultaneamente (ver Fig. 1.4). Essa necessidade de varredura espectral do feixe de estímulo para se obter a informação vibracional completa consome tempo, expondo a amostra a um longo tempo de iluminação. Desta maneira, uma técnica de espectroscopia que fosse capaz de acessar simultaneamente diversos estados vibracionais, reduzindo o tempo de exposição e evitando a foto-degradação da amostra, seria ideal para investigar qualquer tipo de amostra.

## 1.5 Microscopia CARS multiplexada

CARS multiplexado é uma variação simples do processo CARS convencional, onde um pulso espectralmente largo é utilizado como feixe de estímulo Stokes para excitar simultaneamente um conjunto grande de estados vibracionais (fig. 1.7). A ideia é simples, porém

experimentalmente requer um pulso largo (conhecido como super-contínuo) gerado coerentemente como o pulso de bombeamento. Tal pulso se torna possível através da tecnologia de cristais fotônicos aplicado à fibras ópticas, que tornaram-se peça fundamental para esse tipo de espectroscopia. A microscopia CARS multiplexada é a técnica tema deste trabalho. Uma descrição fundamental da montagem utilizada será apresentada a seguir.



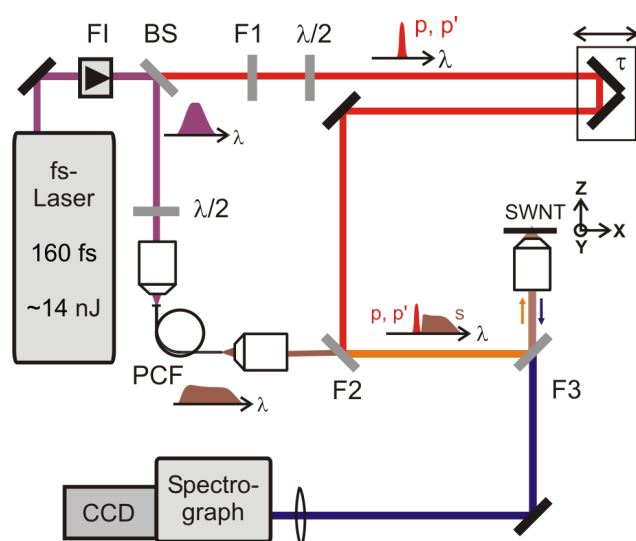
**Fig. 1.7:** Diagrama de energia para espectroscopia CARS multiplexado. Um pulso Stokes largo excita uma multitude de estados vibracionais simultaneamente.

### 1.5.1 Montagem Experimental

No presente experimento de CARS multiplexado (ver esquema figura 1.8) um oscilador de pulsos de fentossegundos Ti:Safira (Coherent Mira 900) bombeado por um laser de diodo de estado sólido (Lighthouse Photonics Sprout-G) foi utilizado como fonte. Este sistema emite pulsos com duração temporal de aproximadamente  $160 \text{ fs}$ , e com energia por pulso de até  $14 \text{ nJ}$ .

O feixe, que sai da cavidade do laser é inicialmente repartido em uma razão de  $1/3$  por um divisor de feixe (BS). A parte transmitida pelo divisor passa por um filtro de banda estreita (F1) ( $1 \text{ nm}$  de largura espectral) centrado em  $783 \text{ nm}$  que resulta no feixe

de bombeamento para o processo CARS. Aproximadamente 30% da energia incidente no divisor de feixe é refletida e enviada através de uma fibra de cristal fotônico (PCF - *Photonic Crystal Fiber*, type NL-PM-750, crystal fiber A/S) onde um feixe super-contínuo é gerado. O feixe de banda espectral larga, de 500 até 1100 nm com até 45 mW de potência média, será utilizado como o feixe de estímulo Stokes no processo CARS. O laser de Ti:Safira gera o pulso curto pelo travamento de fase entre os campos que propagam dentro de sua cavidade. No entanto, qualquer perturbação dentro da cavidade pode romper o estado de travamento. Para isso, um isolador de Faraday é utilizado na saída da cavidade do oscilador, evitando que qualquer reflexão retro espalhada retorne à cavidade.



**Fig. 1.8:** Montagem experimental microscopia CARS multiplexada. FI: isolador de Faraday, BS: divisor de feixe, F1: filtro de banda estreita, PCF: Fibra de cristal fotônico, F2: filtro passa-baixa, F3: filtro passa-alta.

Uma vez gerados os dois pulsos (bombeamento e Stokes) é necessário garantir que ambos estejam sobrepostos temporal e espacialmente.

A caracterização temporal dos pulsos de bombeamento e Stokes foi realizada em outros trabalhos anteriormente publicados pelo grupo alemão [45, 46]. De fato o pulso de bombeamento, após passar de filtro de banda estreita (Fig.1.8, F1), sofre um alargamento e passa a ter aproximadamente 1.4 ps de largura temporal. O pulso Stokes (super-contínuo) apresenta uma largura temporal que se estende por pouco mais que 400 fs e apresenta uma dispersão em torno da frequência central [45]. Desta maneira, a condição de superposi-

ção temporal dos dois pulsos, sobre a amostra, é facilmente satisfeita para as frequências diversas do pulso super-contínuo.

Uma linha de retardo  $\tau$  (figura 1.8) é adicionada ao longo do trajeto do feixe de bombeamento permitindo a sintonia da superposição temporal. O alinhamento colinear dos dois feixes é realizado com o auxílio de um filtro de banda passa baixa (F2), que bloqueia parte do espectro do feixe super-contínuo (estímulo Stokes) para comprimento de onda abaixo de  $785 \text{ nm}$ . Fótons com energia maior que a do laser de bombeamento não contribuem para o processo CARS e poderiam atrapalhar a detecção do sinal anti-Stokes. O feixe de bombeamento é totalmente refletido pelo filtro (F2) permitindo o alinhamento colinear com o feixe transmitido.

O feixe recombinado (bombeamento + Stokes) é então refletido por um terceiro filtro de banda passa alta (F3) e então enviado para um microscópio invertido. Uma objetiva de alta abertura numérica (Olympus UPLSAPO 60xW, NA 1.2) focaliza o feixe composto sobre a amostra gerando o sinal de CARS. O sinal retroespalhado é coletado pela mesma objetiva, colimado e enviado de volta alinhado sobre o mesmo trajeto. Ao retornar sobre o filtro (F3) o sinal na frequência anti-Stokes (deslocado para o Azul) é totalmente transmitido e enviado ao sistema de detecção. O sinal CARS detectado é então focalizado na entrada de um espectrômetro (Princeton Instruments Acton SP2300) acoplado a uma câmera CCD (Andor Newton) refrigerada à  $-50^\circ\text{C}$  para suprimir ruído eletrônico. Este sistema permite a aquisição sensível e simultânea de uma banda espectral larga ( $3500 \text{ cm}^{-1}$ ) simultaneamente.

Um transladador piezoelétrico 3D (Physik Instrumente P-545) é utilizado para realizar a varredura da amostra sob a região do foco. A amostra deve estar fixa a uma lâmina de microscópio convencional. O controle do piezo 3D e do sistema de detecção é realizado e sincronizado via *software* (National Instruments - LabView). Como resultado montamos uma matriz onde um espectro vibracional é associado a cada pixel escaneado sobre uma determina região da amostras, dando origem a uma matriz hiperespectral 3D [34]. Esta matriz é formada de maneira que cada plano retorne uma imagem que correspondente a uma determinada posição no espectro, ou seja, a uma determinada linha vibracional. Utilizando um software de análise, podemos então extrair da matriz hiperespectral uma a imagem que corresponde a um pico do espectro vibracional, recuperando informação sobre



a especificidade molecular local.

## Capítulo 2

# Ferramentas para análise de dados em CARS multiplexado

Neste capítulo vamos discutir os métodos empregados na análise dos dados coletados pelo experimento de CARS multiplexado e suas variações. As duas primeiras seções serão dedicadas aos dois métodos aplicados para a recuperação do espectro vibracional Raman separando-o da contribuição de fundo não ressonante. Por último, vamos discutir a análise de componentes espectrais que permite identificar regiões com características espectrais comuns.

### 2.1 Recuperação do sinal ressonante vibracional

Tipicamente dois feixes de estímulo são utilizados em espectroscopia CARS: o bombeamento ( $\omega_b$ ) e o Stokes ( $\omega_S$ ). Entretanto, a incidência desses feixes sobre um meio Raman não estimula somente o processo CARS, mas também resulta na emissão de um sinal não ressonante (SNR) coerente com o sinal vibracional ressonante (ver fig. 1.4). Este sinal tem origem puramente eletrônica e depende somente de processos paramétricos não ressonantes, resultando em uma resposta mais rápida comparada àquela do sinal ressonante [28].

Como vimos no capítulo anterior, em regime estacionário, as propriedades ópticas de um meio não linear podem ser descritas pela susceptibilidade de terceira ordem  $\chi^{(3)}$ . De maneira geral, podemos descrever essa susceptibilidade como a soma da contribuição res-

sonante ( $\chi_R^{(3)}$ ) com a não ressonante ( $\chi_{NR}^{(3)}$ ), assim

$$\chi^{(3)} = \chi_R^{(3)} + \chi_{NR}^{(3)}. \quad (2.1)$$

Sendo o processo CARS coerente, as componentes ressonante e não ressonante propagam colinearmente e interferem sobre a região do detector. A intensidade do sinal emitido será proporcional à soma das duas susceptibilidades, tal que

$$\begin{aligned} I_{CARS} &\propto |\chi^{(3)}|^2 = |\chi_R^{(3)} + \chi_{NR}^{(3)}|^2 \\ &= |\chi_R^{(3)}|^2 + 2\chi_{NR}^{(3)} \operatorname{Re}[\chi_R^{(3)}] + |\chi_{NR}^{(3)}|^2. \end{aligned} \quad (2.2)$$

Notamos que a contribuição ressonante não pode ser recuperada a partir do sinal CARS através de uma simples correção de sinal de fundo. Infelizmente, a magnitude da  $\chi_{NR}^{(3)}$  não é constante ao longo de uma amostra heterogênea, de maneira que intensidade direta do sinal CARS não representa fidedignamente a distribuição vibracional (Raman) de uma amostra.

Para que técnicas de espectroscopia CARS sejam utilizadas como fonte de informação espectral vibracional quantitativa se faz necessário a recuperação da componente ressonante ( $\chi_R^{(3)}$ ), a partir da intensidade  $I_{CARS}$ . Com esse objetivo, vamos discutir dois processos de pós-análise utilizados para recuperar a informação vibracional a partir dos dados obtidos por microscopia CARS multiplexada.

### 2.1.1 Método de Máxima Entropia (MME)

A teoria de análise espectral de máxima entropia foi desenvolvida por John Parker Burg em 1975 [7], onde ele desenvolve um procedimento para estimar o espectro de potências de uma série temporal estacionária a partir do conhecimento parcial da função de auto-correlação. O método de análise espectral de Burg sugere escolher a série temporal mais aleatória e imprevisível com a qual a função de auto-correlação concorda com os valores conhecidos [43]. Este procedimento corresponde a maximização da entropia, tal como utilizado em mecânica estatística e em teoria de informação. Baseado na teoria de análise espectral desenvolvida por Burg, em 1992, o finlandês Erik Vartiainen propôs a aplicação do Método de Máxima Entropia (MME) para a recuperação das partes real e imaginária

da susceptibilidade de terceira ordem  $\chi^{(3)}$ , quando somente o módulo quadrado  $|\chi^{(3)}|^2$  é conhecido [42–44]. Este método foi desenvolvido especificamente para recuperar a informação vibracional (espectro Raman) a partir de um espectro medido por CARS.

Considerando um sistema que não apresenta ressonância de um fóton, a parte não ressonante ( $\chi_{NR}^{(3)}$ ) é puramente real e independente de frequência, assim

$$\chi^{(3)}(\omega_{as}) = \chi_R^{(3)}(\omega_{as}) + \chi_{NR}^{(3)}. \quad (2.3)$$

A parte ressonante da susceptibilidade de terceira ordem pode ser representada da seguinte forma,

$$\chi_R^{(3)}(\omega_{as}) = \sum_j \frac{A_j}{\Omega_j - (\omega_b - \omega_S) - i\Gamma_j} \quad (2.4)$$

onde  $A_j$ ,  $\Omega_j$  e  $\Gamma_j$  são a amplitude, a frequência e a largura de linha do  $j$ -ésimo modo Raman que compõe o espectro, respectivamente. Vimos no cap. 1.3.1 (Fig. 1.5) que a componente real  $\text{Re}[\chi_R^{(3)}]$  apresenta uma linha com forma dispersiva e que a informação que corresponde ao modo Raman está contida na parte imaginária  $\text{Im}[\chi_R^{(3)}]$  da susceptibilidade de terceira ordem. Aqui vamos considerar que o sinal de CARS medido é normalizado pelo sinal de uma região da amostra onde não temos componentes ressonantes, assim o sinal CARS medido é diretamente proporcional ao módulo quadrado da susceptibilidade, ou seja:

$$\begin{aligned} S(\omega_{as}) &= |\chi_R^{(3)}(\omega_{as}) + \chi_{NR}^{(3)}|^2 \\ &= |\chi_R^{(3)}(\omega_{as})|^2 + 2\chi_{NR}^{(3)} \text{Re}[\chi_R^{(3)}(\omega_{as})] + |\chi_{NR}^{(3)}|^2. \end{aligned} \quad (2.5)$$

Sabemos que o espectro Raman espontâneo é proporcional à parte imaginária da susceptibilidade de primeira ordem [44], ou seja:

$$I_{Raman}(\omega) \propto -\text{Im}[\chi_R^{(1)}(\omega)] = \sum_j \frac{A_j \Gamma_j}{(\Omega_j - \omega)^2 + \Gamma_j^2} \quad (2.6)$$

onde, novamente, o índice na soma representa o  $j$ -ésimo modo Raman. Logo, fica óbvio, dado as eqs. 2.6 e 2.4, que a parte imaginária da susceptibilidade CARS,  $\text{Im}[\chi_R^{(3)}(\omega_{as})]$ , corresponde a mesma informação vibracional contida no sinal Raman espontâneo e, portanto, são diretamente comparáveis.

Podemos então reconstruir o espectro CARS  $S(\omega_{as})$  através da teoria de máxima entropia [7],

$$S(\nu) = \left| \frac{\beta}{1 + \sum_{k=1}^M a_k \exp(-2\pi i k \nu)} \right|^2 = \left| \frac{\beta}{A_M(\nu)} \right|^2 \quad (2.7)$$

onde definimos a frequência normalizada  $\nu$  em função dos extremos do espectro,

$$\nu = \frac{\omega_{as} - \omega_{min}}{\omega_{max} - \omega_{min}}. \quad (2.8)$$

Os coeficientes do MME,  $a_k$  e  $|\beta|$ , são determinados resolvendo um sistema de equações lineares de *Toeplitz* [42],

$$\begin{bmatrix} C_0 & C_1^* & \cdots & C_M^* \\ C_1 & C_0 & \cdots & C_{M-1}^* \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ C_M & C_{M-1} & \cdots & C_0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 \\ a_1 \\ \vdots \\ a_M \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} |\beta|^2 \\ 0 \\ \vdots \\ 0 \end{bmatrix} \quad (2.9)$$

onde  $C_m$  são calculados por uma transformada de Fourier discreta do sinal CARS por um espaço discreto de frequências  $\nu_j = j/L$  ( $j = 0, 1, \dots, L$ )

$$C_m = L^{-1} \sum_{j=0}^{L-1} S(\nu_j) \exp(2\pi i m \nu_j). \quad (2.10)$$

Sendo  $\beta$  independente da frequência  $\nu$ , podemos definir a fase do MME através da eq. 2.7 como  $\psi(\nu) = \arg \{A_M(\nu)\}$ . A dimensão de componentes necessárias (parâmetro  $M$ ) varia com a complexidade do espectro a ser reproduzido. Um valor típico utilizado seria  $M=100$ . Em seguida, podemos expressar o sinal CARS em termos de uma fase real  $\theta(\nu) = \arg \left\{ \chi_R^{(3)} + \chi_{NR}^{(3)} \right\}$ , e utilizando a eq. 2.4, temos que

$$\begin{aligned} \chi_R^{(3)}(\nu) + \chi_{NR}^{(3)} &= \sqrt{S(\nu)} \exp[i\theta(\nu)] \\ &\simeq \frac{|\beta| \exp[i\theta(\nu)]}{|A_M(\nu)|} = \frac{|\beta| \exp[i\theta(\nu) - i\psi(\nu)]}{A_M(\nu) \exp[-i\psi(\nu)]} = \frac{|\beta| \exp[i\varphi(\nu)]}{A_M^*(\nu)} \end{aligned} \quad (2.11)$$

onde introduzimos uma fase erro  $\varphi(\nu) = \theta(\nu) - \psi(\nu)$  que é a diferença entre a fase real do espectro CARS e a fase estimada pelo MME. A ideia em usar o MME para recuperar a fase real do sinal CARS, é de que tanto  $\theta(\nu)$  como  $\psi(\nu)$  possuem as mesmas características espectrais, e, portanto, a diferença entre elas  $\varphi(\nu)$  é apenas um fundo de variação suave. Sendo assim, podemos definir diferença de fase estimada  $\varphi_{est}(\nu)$  apenas ajustando uma

linha de base suave na fase do MME  $\psi(\nu)$ , e então aproximar a fase real do espectro CARS por

$$\theta(\nu) \approx \theta_{est}(\nu) = \varphi_{est}(\nu) + \psi(\nu). \quad (2.12)$$

Assim, o sinal Raman recuperado de um espectro CARS pode ser definido por

$$I_{Raman}(\nu) = \text{Im} \left[ \chi_R^{(3)} \right] \simeq \sqrt{S(\nu)} \sin \theta_{est}(\nu). \quad (2.13)$$

### Aplicação do MME

Para aplicar o MME, desenvolvemos um software em ambiente LabVIEW (National Instruments<sup>TM</sup>). O painel frontal do programa está representado na Fig. 2.1. O algoritmo para o tratamento do espectro medido por um experimento de CARS multiplexado foi desenvolvido de acordo com o procedimento descrito acima e detalhado a seguir.

Primeiro, o espectro CARS é reconstruído através da análise de máxima entropia proposta por Burg [7]. Com isso obtemos os coeficientes  $\beta$  e  $A_M(\nu)$  que nos remetem à fase do MME  $\psi(\nu)$ . Dois parâmetros devem ser fornecidos nesta parte: L, o número de frequências que determina a discretização do espectro (eq. 2.10) e o M o número de componentes espectrais independentes que define a dimensão da matriz de Toeplitz (eq. 2.9). O parâmetro L é definido de acordo com o número de pontos que compõem o espectro medido; por vezes, uma interpolação para aumentar o números de pontos resulta em uma melhor reconstrução do espectro. A variação do parâmetro M resulta em uma maior influência na definição da fase do MME. Em geral, quanto maior o valor de M mais fiel é a definição da fase, contudo, o tempo de processamento também cresce consideravelmente. Utilizamos um espectro medido por CARS multiplexado de uma amostra de Politereftalato de etileno (PET) para alimentar o algoritmo do MME, representado no gráfico superior da Fig. 2.1a. A esquerda do painel frontal do programa, na Fig. 2.1a, reconhecemos os controles de entrada dos parâmetros que definem L, pelo valor de interpolação de pontos para espectro inserido, e o valor direto do M.

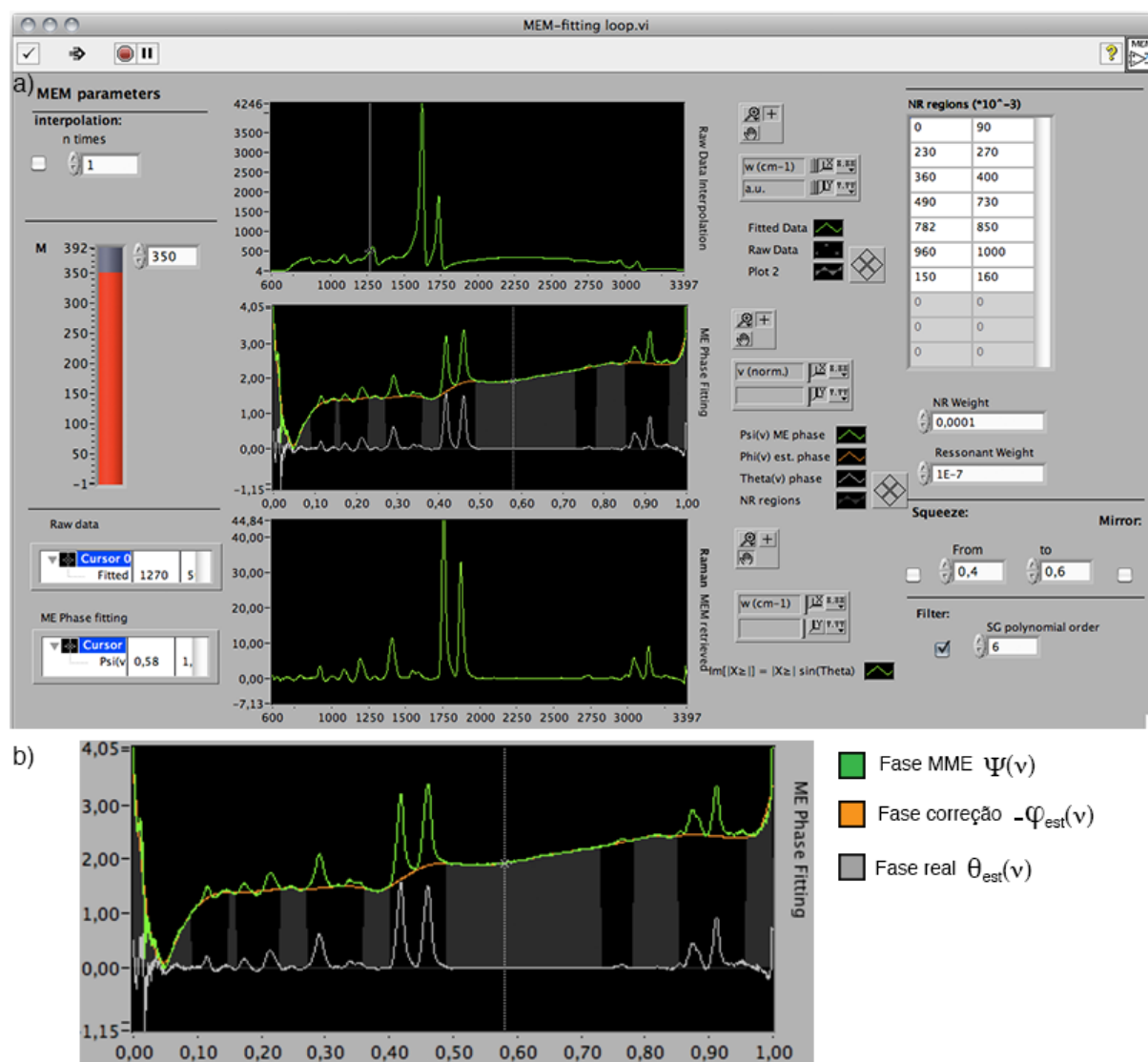
Na segunda etapa do algoritmo realizamos o ajuste da fase de correção  $-\varphi_{est}(\nu)$ , representado em detalhe na Fig. 2.1b. A linha em verde, representa a fase definida através do MME  $\psi(\nu) = \arg [A_M(\nu)]$ . A fase de correção  $\varphi_{est}(\nu)$ , representada pela linha laranja, é definida através de um ajuste polinomial suave de uma linha de base na fase  $\psi(\nu)$ . De

fato, está é a parte mais importante do processo, e requer uma certa supervisão para que tenhamos uma boa aproximação da fase real. Para que o ajuste da fase de correção não considere as regiões ressonantes (modos Raman), o programa prevê a definição das regiões onde nenhum pico ressonante é esperado (direita do painel frontal, Fig. 2.1a). Desta maneira, o ajuste polinomial da fase de correção considera apenas as regiões não ressonantes e resulta em uma linha de base suave ideal. As regiões em cinza escuro da Fig.2.1b indicam as regiões do espectro do PET definidas como não ressonantes.

Em seguida, utilizamos a fase de correção estimada  $\varphi_{est}(\nu)$  para definir a fase real estimada  $\theta_{est}(\nu)$ , representada pela linha cinza claro na Fig. 2.1b. Percebemos que nos extremos do espectro a fase estimada não é confiável. Esse problema ocorre por conta da transformada de Fourier de um espectro finito no cálculo dos coeficientes  $C_m$  da matriz de Toeplitz (eq. 2.10). Existem métodos para contornar a distorção das bordas do espectro, como o método de estiramento do espectro inserido [42], no entanto, na maioria das vezes basta desconsiderar uma pequena parte dos extremos, restringindo-se a uma porção menor do espectro.

Na Fig. 2.2 apresentamos a comparação entre o resultado do MME (c) e um espectro Raman estimulado (b). O espectro Raman estimulado foi obtido através de um espectrômetro comercial Witec (@532 nm). Notamos que o CARS multiplexado apresenta menor resolução espectral do que o Raman espontâneo, como esperado. Parte da discordância na posição dos picos deve-se a um erro de calibração do sistema de detecção da montagem de CARS multiplexado, que foi corrigido posteriormente.

Por fim, devemos considerar que o intuito deste procedimento é a sua aplicação em resultados medidos por microscopia CARS multiplexada. Como discutido anteriormente (cap. 1.5.1), a matriz hiperspectral resultante da medida de uma região da amostra é composta por uma grande quantidade de espectros. Se considerarmos que a medida de varredura é realizada com resolução de 100 X 100 pixels, teremos 10.000 espectros, aos quais devemos aplicar o MME. Sendo assim, o procedimento para cada região adquirida pode consumir um tempo de processamento considerável. Em média, uma medida de 100 X 100 pixels, dependendo do valor de M e do tamanho do espectro considerado, pode levar até 5h para converter a hipermatriz espectral inteiramente.

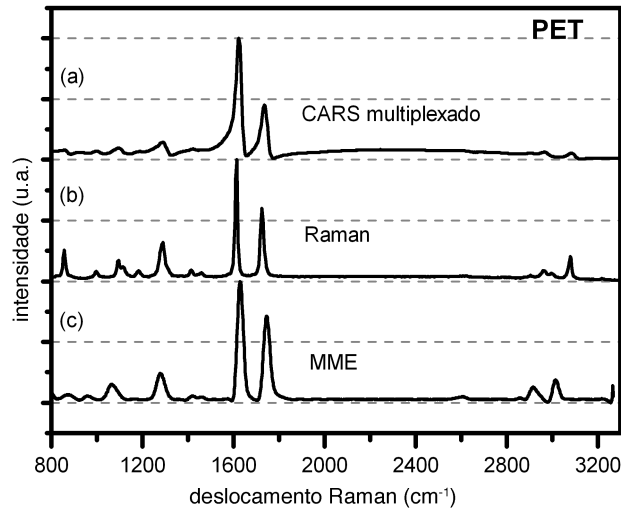


**Fig. 2.1:** Interface do programa do MME para recuperação do sinal vibracional a partir de uma medida de CARS multiplexado. (a) painel frontal do programa em LabVIEW que apresenta o sinal CARS introduzido (gráfico superior) o ajuste da fase de correção (gráfico do meio) e o espectro Raman recuperado (gráfico inferior). (b) em detalhe, o ajuste da fase de correção  $-\varphi_{est}(\nu)$  a partir da fase do MME  $\psi(\nu)$ .

### 2.1.2 Método de transformada Kramers-Kronig (MTKK)

Existem poucos métodos alternativos para a recuperação do espectro vibracional a partir de uma medida de CARS, e o mais bem sucedido é o Método de Transformada Kramers-Kronig (MTKK) [23, 25]. A ideia aplicada neste método, consiste em aplicar uma trans-





**Fig. 2.2:** Comparação entre o Espectro Raman recuperado pelo MME (c) e um espectro Raman espontâneo medido em um equipamento comercial (b). O espectro CARS multiplexado é representado em (a).

formada de Fourier para operar o espectro CARS no domínio de tempo, e, em seguida, usar a operação inversa para retornar ao domínio de frequência. Apesar de o MME e o MTKK se desenvolverem de maneira distintas, um trabalho recente comprova que os dois métodos são funcionalmente equivalentes [9].

Teoricamente o MTKK é bem simples e pode ser implementado com baixo consumo de processamento. A relação comumente utilizada usada, para recuperar a fase a partir do módulo de uma grandeza complexa, deriva de uma relação de Kremers-Kronig linear e pode ser escrita como [25]

$$\varphi(\omega) = -\frac{P}{\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{\ln |\chi(\omega'')|}{\omega'' - \omega} d\omega'' \quad (2.14)$$

onde  $\chi(\omega) = |\chi(\omega)| \exp[i\varphi(\omega)]$ , e  $P$  é o valor principal da integral de Cauchy. De maneira conveniente, vamos definir o seguinte operador

$$\psi(f(\omega)) = \mathcal{T} [u(t) \mathcal{T}^{-1} [f(\omega)]] \quad (2.15)$$

onde  $\mathcal{T}$  é o operador transformada de Fourier,  $u(t)$  a função de Heaviside e  $f(\omega)$  é o sinal CARS medido. Se utilizarmos o teorema da convolução, o mesmo operador pode ser escrito

da seguinte forma

$$\psi(f(\omega)) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \mathcal{T}[u(t)] * \mathcal{T}[\mathcal{T}^{-1}[f(\omega)]]. \quad (2.16)$$

A transformada de Fourier da função de Heaviside pode ser expressa por  $\mathcal{T}[u(t)] = 1/i\sqrt{2\pi}\omega + \sqrt{\pi/2}\delta(\omega)$ . Se substituirmos na eq. 2.16 e escrevermos a integral de convolução explicitamente, obtemos

$$\psi(f(\omega)) = \frac{1}{2} \left[ \frac{-i}{\pi} P \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{\ln|\chi(\omega')|}{\omega' - \omega} d\omega' + f(\omega) \right]. \quad (2.17)$$

Assim, se combinarmos as eqs. 2.17 e 2.14 podemos expressar a fase  $\varphi(\omega)$  dependendo apenas do operador  $\psi$ , ou seja, apenas da operação de transformada de Fourier,

$$\varphi(\omega) = 2 \operatorname{Im} \left\{ \psi(\ln|\chi(\omega)|) - \frac{\ln|\chi(\omega)|}{2} \right\}. \quad (2.18)$$

Sendo assim, podemos usar a eq. 2.18 para determinar a fase do sinal de CARS ( $\chi(\omega) \equiv \chi^{(3)}(\omega)$ ), e, conseqüentemente, a parte imaginária que representa o sinal Raman. No entanto, a teoria descrita acima somente é válida se o SNR for constante ao longo do espectro CARS, ou seja, não depender da frequência. Na prática, isso somente seria verdade se considerássemos um região espectral muito pequena. Contudo o trabalho de Liu [25] propõe a substituição do produto  $u(t) \mathcal{T}^{-1}[f(\omega)]$  na eq. 2.15 por

$$\eta(t : f(\omega)) = \begin{cases} \mathcal{T}^{-1}[f(\omega)], & t \geq 0 \\ \mathcal{T}^{-1}[f_{NR}(\omega)], & t < 0 \end{cases} \quad (2.19)$$

onde  $f_{NR}(\omega)$  é a componente do SNR na medida de CARS. Este procedimento considera que o sinal CARS no domínio de tempo é simétrico em torno de  $t = 0$ , e ao usarmos a função  $\eta(t : f(\omega))$  forçamos que a componente em tempo negativo seja representada somente pela resposta do SNR. Desta forma ao retornarmos para o domínio de frequência a influência do SNR é descontada, mesmo se o SNR não for constante.

### Aplicação do MTKK

O MTKK também foi implementado durante este doutorado, a título de comparação com o MME previamente desenvolvido, motivado por uma possível economia no tempo de processamento dos dados. A Fig. 2.3 apresenta o painel frontal do programa que implementa o MTKK para recuperação do sinal vibracional, partindo de um espectro CARS

multiplexado do PET. No entanto, a necessidade de inserir um espectro que corresponde ao SNR (eq. 2.19), limitou consideravelmente a aplicação do método. No momento em que programamos o MTKK haviam dados consistentes já medidos sem a medida do SNR relativo. Ainda assim, a medida de um espectro que represente o SNR em microscopia é um desafio experimental nada trivial. Testamos a possibilidade de realizar um ajuste do SNR (linha amarela, Fig. 2.3), o que resultou pouco eficiente. Além disso, pequenas variações no ajuste do SNR resultam em grandes mudanças no espectro Raman recuperado. Ao contrário do que ocorre para o MME onde pequenas variações no ajuste da fase de correção não influenciam o espectro Raman recuperado de maneira relevante.

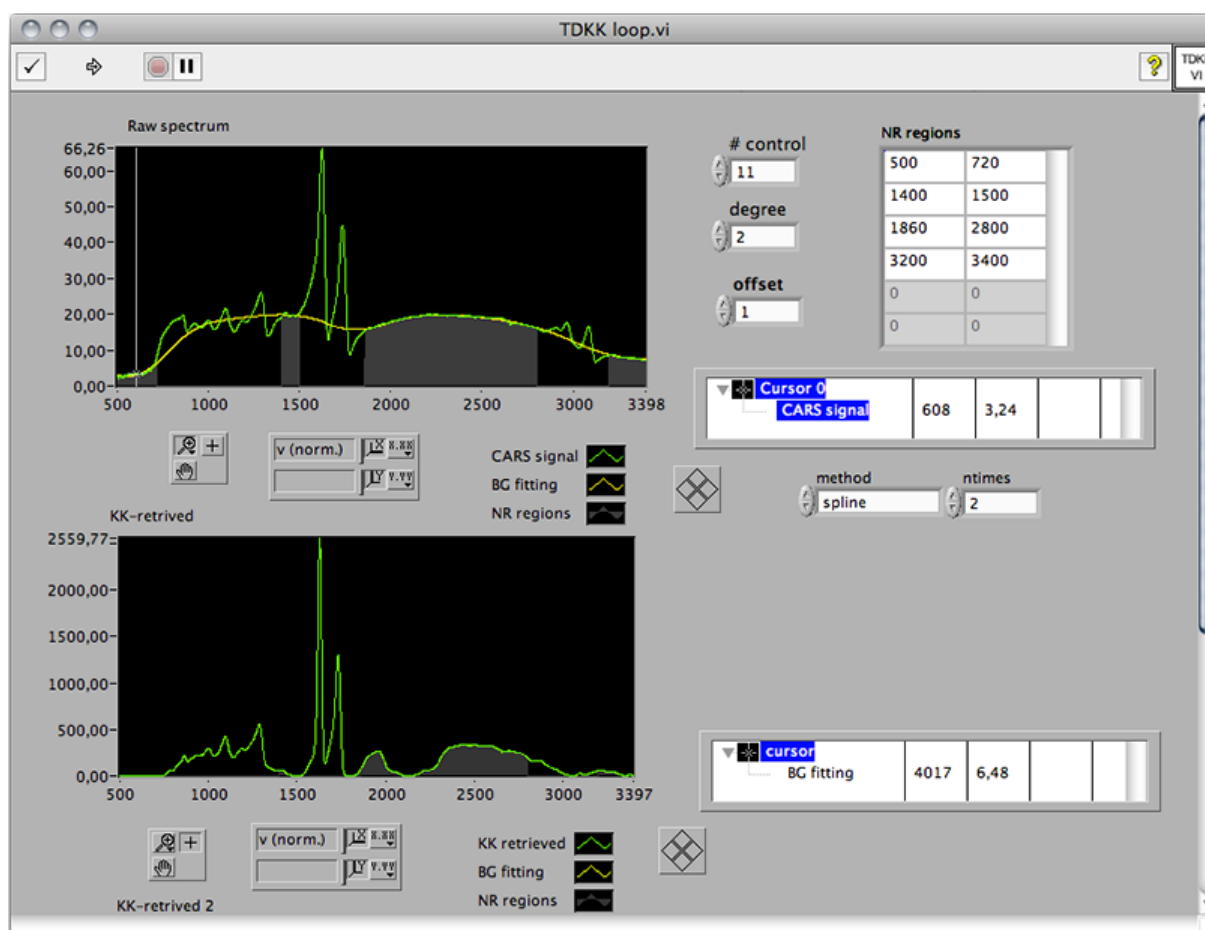
De fato, procuramos um método que opere de maneira não supervisionada para todos os espectros que compõem uma medida de microscopia CARS multiplexada. Por isso, o MTKK foi deixado de lado, por ora, a favor do MME. Ainda assim, a inserção de uma medida que represente o SNR pode levar a melhores resultados, e essa é uma das perspectivas de trabalho futuro.

## 2.2 Análise por componentes principais (PCA)

O método de análise espectral por componentes principais (PCA - *Principal Components Analysis*) é um procedimento largamente utilizado em microscopia para reconhecer características espectrais comuns ao longo de uma região [2, 24, 34].

Em princípio, os espectros da matriz hiperespectral são dispostos em uma matriz bidimensional onde as colunas representam os diferentes espectros. Em seguida, a matriz de covariância entre os diferentes índices espectrais é calculada. Através da matriz de covariância uma base de autovetores espectrais e seus respectivos autovalores são determinados. Os autovetores espectrais são classificados segundo seus autovalores em ordem decrescente. A ideia é desprezar os autovetores de menor autovalores, uma vez que os maiores representam características espectrais comuns a um maior número de espectros medidos, ou seja, são estatisticamente mais prováveis [34].

Ainda assim, ocorre que algumas características espectrais recorrentes não sejam interessantes, tal como um sinal de fundo remanescente que não representa um modo vibracional. Sendo assim, se faz necessário o reconhecimento, entre os autovetores mais prováveis,

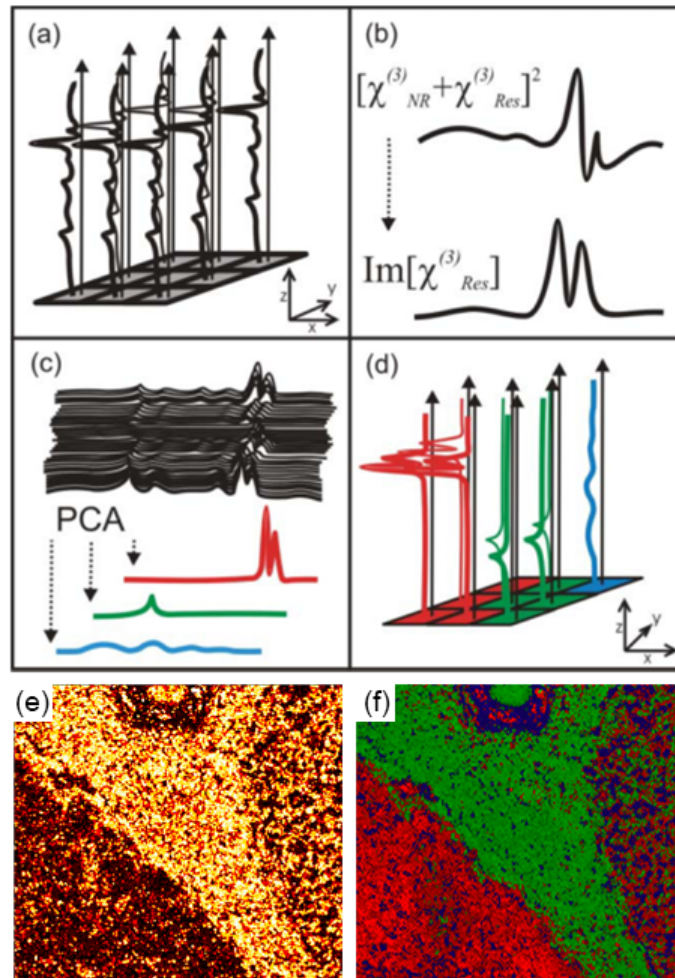


**Fig. 2.3:** Painel frontal do programa de implementação do MTKK. Gráfico superior, espectro CARS multiplexado do PET; e gráfico inferior: espectro Raman recuperado por MTKK usando o ajuste do SNR.

de alguma característica química (vibracional) observada na amostra. A fim de representar tais características, três dos autovetores espectrais de interesse são associados com os índices vermelho, verde e azul em uma escala de cor (RGB - *Red, Green, Blue*). Com isso, uma imagem da região escaneada é reconstruída, onde uma região de cor predominantemente vermelha, por exemplo, é melhor representada pelas características espectrais do autovetor associado com o índice vermelho. Na Fig. 2.4 o processo de análise esta representado desde a matriz hiperespectral CARS (a), passando pela recuperação do sinal Raman como o MME (b), seguido pela determinação e classificação do autovetores espectrais (c) e finalizando com a representação dos autovetores relevantes em escala de cores (d).

Como exemplo, apresentamos um resultado do PCA aplicado a uma medida realizada por microscopia CARS multiplexada sobre uma amostra de tecido cerebral de rato com tumor. A Fig. 2.4e mostra o resultado da microscopia em uma região de borda entre tecido normal e tumor (no  $\lambda = 1437\text{ cm}^{-1}$ ) onde o espectro Raman já foi recuperado pelo MME. Em comparação, a Fig.2.4f mostra o resultado da mesma região pelo PCA, onde a cor verde é reconhecida como a região de tumor. Este e outros resultados serão discutidos detalhadamente nos capítulos seguintes. Por ora, percebemos que o PCA é capaz de identificar uma clara mistura de características espectrais, região da direita Fig. 2.4f, que não é possível identificar através da análise do resultado bruto de microscopia Raman recuperado (Fig. 2.4e).

Na prática, foi utilizado aqui um algoritmo para o PCA já desenvolvido em ambiente LabVIEW, disponível no grupo de Heidelberg [34]. Contudo, eu realizei uma pequena modificação na representação dos autovetores espectrais. O programa de PCA antigo, ao construir a imagem por associação RGB, associava um valor de índice para cada uma das componentes de cor, por pixel. O programa modificado, considera apenas a componente de maior índice por pixel. Em outras palavras, o programa antigo mostrava a soma das três componentes RGB, enquanto o novo mostra apenas o índice da componente mais relevante ressaltando a principal característica química local. Essa modificação nos permite obter imagens de PCA com maior contraste entre regiões próximas. No entanto, devemos considerar que o fato de uma região apresentar uma determinada componente (cor) não garante que essa característica espectral (vibracional) é única presente, mas sim a mais relevante.



**Fig. 2.4:** Representação do processo de PCA: (a) Matriz hiperspectral, (b) Recuperação do espectro Raman pelo MME, (c) determinação dos autovetores espectrais e (d) representação da imagem em função dos autovetores por associação de cores (RGB). (e) imagem que corresponde ao espectro Raman recuperado em  $1437\text{cm}^{-1}$  para uma amostra de tecido cerebral de rato com tumor e (f) o resultado do PCA.



## Capítulo 3

# Mapeamento de impurezas em Nanotubos de Carbono

As pesquisas desenvolvidas em nanotubos de carbono desempenham um papel importante no avanço da nanotecnologia, tanto no ambiente acadêmico quanto na indústria. O desenvolvimento de biossensores e transistores miniaturizados, bem como pesquisas em estabilização molecular e armazenamento eficiente de energia estão relacionadas com a exploração das propriedades eletrônicas e estruturais dos nanotubos de carbono [4, 47, 49]. Em alguns aspectos, os nanotubos de carbono apresentam uma estrutura quase unidimensional permitindo uma boa relação entre resultados experimentais e teóricos. Através da espectroscopia Raman ressonante podemos identificar os diversos modos vibracionais de um nanotubo de carbono [39]. A partir da informação vibracional podemos: extrair o diâmetro preciso dos nanotubos de carbono, reconhecer propriedades eletrônicas (metálicos ou semicondutores) e também classificar a quantidade de defeitos e impurezas presentes em uma amostra. Sendo assim, os diferentes métodos de espectroscopia e microscopia vibracional são ferramentas fundamentais para a exploração das propriedades dos nanotubos de carbono.

Este capítulo descreve a aplicação da técnica de microscopia CARS multiplexada para investigar os modos vibracionais em Nanotubos de Carbono de Parede Única (NCPU). A relação entre dois modos característicos é utilizada para construir um mapa de distribuição de impurezas sobre uma amostra em feixes de NCPU. O conhecimento sobre a quantidade de impurezas ou defeitos em uma amostra de nanotubos de carbono é extremamente relevante para a sua aplicação, uma vez que as propriedades eletrônicas dependem da qualidade



da estrutura. Além disso, sítios de defeitos são utilizados para funcionalizar quimicamente os NCPU. Ainda, utilizamos o MME para recuperar o sinal Raman vibracional de uma medida CARS multiplexado, evidenciando a importância do método.

Os resultados apresentados neste capítulo foram publicados [13].

### 3.1 Propriedades eletrônicas e estruturais em NCPU

A maioria dos métodos de síntese de NCPU, em larga escala, resultam uma certa quantidade de impurezas que, em geral, são resíduos de catalizadores metálicos utilizados no processo de síntese ou carbono amorfo. Diferentes métodos de síntese resultam em NCPU com diferentes propriedades eletrônicas e estruturais. Os processos mais eficientes na produção de NCPU utilizam catalizadores gasosos como o HIPCo (processo com óxido de Carbono em alta pressão) [6] e o processo de deposição química à vácuo que utiliza um suporte metálico de Cobalto e Molibdênio conhecido como CoMoCAT [21]. O CoMoCAT é o processo que apresenta melhor eficiência considerando quantidade vs tempo, resultando em uma distribuição de diâmetro com 90% dos nanotubos entre 0,72 e 0,92 nm.

Podemos entender um NCPU como uma folha de grafeno enrolada. Dependendo da forma com que os nanotubos são formados eles podem ser de três tipos quanto à simetria: *Armchair*, *Zigzag* ou *Chiral*. Essas estruturas estão relacionadas com a orientação dos hexágonos em relação ao eixo do tubo. Dois números inteiros  $(n, m)$  definem o vetor quiral que define a célula unitária de um NCPU. Quanto ao comportamento eletrônico, os NCPU podem ser caracterizados como metálicos ou semicondutores. Como regra geral, temos que todos os nanotubos que satisfazem a condição:  $(n - m) = 3k$  onde  $k = 1, 2, 3, \dots$  são metálicos e os demais são semicondutores [4]. Essa regra somente é válida para nanotubos com diâmetro maior que 0,7 nm.

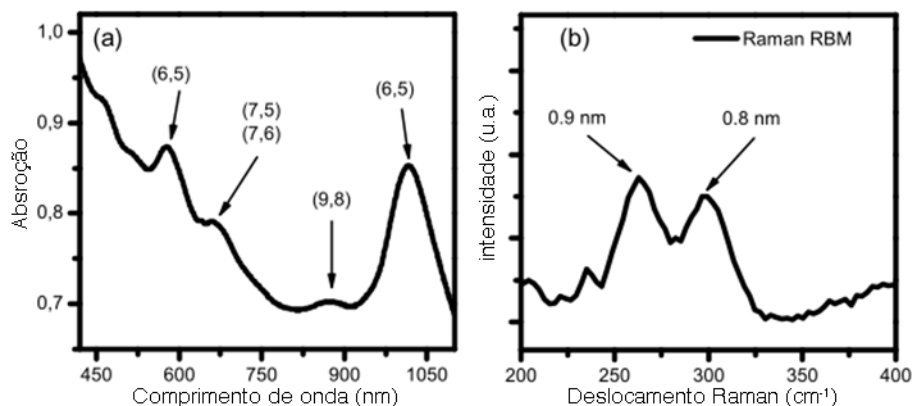
NCPU que apresentam diferentes estruturas possuem distintos espectros de absorção. Esta assinatura fica evidente quando realizamos uma medida de absorção UV-Vis em uma distribuição densa de NCPU sobre um substrato de vidro como demonstra a Fig. 3.1a. A associação dos picos de absorção com os respectivos nanotubos  $(n, m)$  foi feita com base nos dados fornecidos pelo fabricante (Sigma-Aldrich) [21].

O espectro Raman de uma amostra de NCPU fornece uma informação estrutural im-

portante, que é o diâmetro dos nanotubos contidos em uma amostra. Através da frequência central do modo de vibração Radial (RBM - *Radial Breathing Modes*) podemos determinar precisamente o diâmetro de um NCPU. O RBM ocorre em uma região Raman de baixa frequência na faixa de  $100 - 500 \text{ cm}^{-1}$  [21, 39]. Para determinar o diâmetro  $d$  a seguinte relação é válida,

$$\nu_{RBM} = \left( \frac{227}{d} \right) \sqrt{1 + C_e d^2} \quad (3.1)$$

onde  $\nu_{RBM}$  é a frequência do modo vibracional RBM em  $\text{cm}^{-1}$  e  $C_e$  é um parâmetro que considera a influência do meio [3]. Desta maneira, ao medirmos o espectro Raman de uma amostra densa de NCPU identificamos dois picos principais na região RBM. De acordo com a equação 3.1 podemos associar os dois picos medidos aos nanotubos de carbono com diâmetros de 0,8 e 0,9 nm (Fig. 3.1b), o que concorda exatamente com os dados fornecidos pelo fabricante (diâmetro 0,7-0,9 nm).



**Fig. 3.1:** (a) Espectro de absorção UV-Vis demonstrando diferentes picos de extinção devido a NCPU com diferentes estruturas. (b) Espectro de espalhamento Raman na região dos modos de vibração Radial (RBM).

## 3.2 Distribuição de NCPU (Amostra)

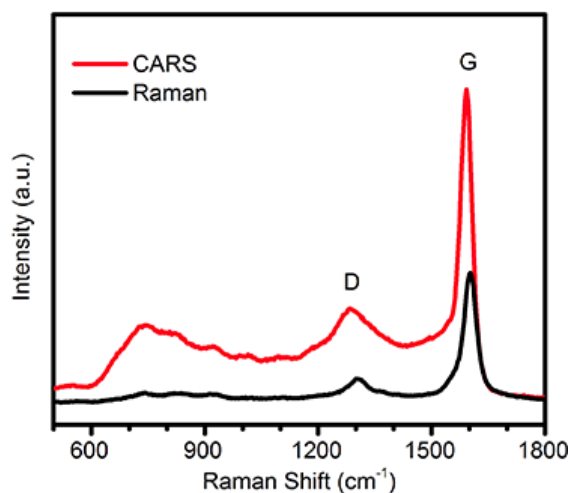
NCPU comerciais (Sigma-Aldrich (6,5) chirality, >77% as NCPU) sintetizados pelo método CoMoCAT [21] foram dispersos em solução de 1,2-Dicloroetano em concentração de

1mg de nanotubos para 2,5 ml de solvente. Inicialmente, a dispersão foi mantida em banho de ultrassom por aproximadamente 4 horas. Em seguida, a dispersão foi centrifugada para decantar os grandes aglomerados que persistiam. Por fim, uma gota do sobrenadante foi depositada sobre um slide de microscópio óptico que, então, foi rotacionado por um equipamento de *spin-coating* a uma frequência de rotação de 1000 rpm. No entanto, este procedimento de dispersão não é usualmente eficiente, pois os NCPU voltam a se agregar devido às forças de Wan-der-Waals. Como resultado, obtivemos grandes aglomerados de nanotubos compostos de feixes menores.

A Fig. 3.2 apresenta o espectro CARS (linha vermelha) e o anti-Stokes Raman (linha preta) de uma distribuição de NCPU medida com o experimento de CARS multiplexado descrito no capítulo 1.5.1. O sinal de anti-Stokes Raman espontâneo foi medido incidindo apenas o feixe de bombeamento sobre a amostra. A este sinal vamos denominar apenas Raman ao longo deste capítulo. Sendo o sinal Raman para os NCPU comparável ao sinal CARS, uma medida realizada pelo experimento de CARS multiplexado resulta em um sinal total composto por uma componente coerente CARS somada a uma componente espontânea Raman. Sendo assim, todo espectro denominado CARS, aqui apresentado, considera a subtração da componente Raman. Notamos que o espectro CARS (Fig. 3.2 - linha vermelha) dos NCPU apresenta uma contribuição larga de SNR. A extração desta componente de SNR é de suma importância para a recuperação do sinal vibracional Raman a partir de uma medida de CARS multiplexado. Nos resultados que seguem, o MME foi utilizado para a recuperação do sinal Raman [11, 42–44].

### 3.3 Parâmetro de Impureza

Na literatura, o uso da razão entre a intensidade da banda D ( $\sim 1350 \text{ cm}^{-1}$ ) e a intensidade da banda G ( $\sim 1580 \text{ cm}^{-1}$ ) ( $I_D/I_G$ ) no espectro Raman é utilizada como parâmetro qualitativo para determinar a existência de alguns defeitos ou impurezas em materiais de carbono  $sp^2$ , como é o caso dos NCPU [12, 40]. Para esses materiais, a presença da banda D é um indicador de desordem na rede cristalina. Os principais modos Raman observados para os NCPU originam-se de elétrons excitados que interagem com os fônons da rede. Para um processo de espalhamento Raman de ressonância única, o elétron excitado inte-



**Fig. 3.2:** Comparação entre a componente Raman espontânea (linha preta) e o espectro CARS multiplexado (linha vermelha) para uma distribuição de NCPU.

rage com um único fônon da rede, que pode ser criado (Stokes) ou aniquilado (anti-Stokes). Em um processo de espalhamento Raman de dupla ressonância, o elétron excitado interage duplamente com a rede, não necessariamente emitindo, ou absorvendo, dois fônons. No caso da banda D em NCPU, o fônon excitado é refletido elasticamente por alguma imperfeição da rede (ligação com átomos externos, defeitos estruturais, ligações híbridas  $sp^3$  ou a própria extremidade do nanotubo) sendo considerado uma dupla interação ou um espalhamento de dupla ressonância. Desta maneira a razão entre as intensidades das bandas D (dupla ressonância) e G (ressonância única) relacionam dois processos de naturezas distintas. Como somente um dos processos relacionados depende da existência de defeitos na rede de grafeno, a razão entre as duas bandas revela a informação sobre a concentração local de defeitos, desconsiderando a densidade de NCPU [39].

Contudo, a razão ( $I_D/I_G$ ) têm gerado controvérsia ao caracterizar uma amostra de nanotubos de carbono. No trabalho de Resasco et al. [20] é apresentada uma comparação, para medidas do parâmetro ( $I_D/I_G$ ), entre NCPU dispersos em solução e em distribuição sólida. Como resultado, os autores afirmam que para uma distribuição sólida é necessário pelo menos uma média entre 50 pontos diferentes na amostra para que ocorra uma concordância com os resultados medidos em solução. Este resultado sugere que existe uma variação local do parâmetro impureza ( $I_D/I_G$ ) em amostras sólidas de NCPU. Sendo assim, uma técnica de microscopia vibracional suficientemente sensível, poderia ser empre-

gada para caracterizar esta inomogeneidade e construir um mapa local de impurezas sobre uma amostra sólida de NCPU. Na sequência deste capítulo, vamos demonstrar os resultados de como a técnica de CARS multiplexado foi empregada para construir este mapa de impurezas, utilizando o parâmetro ( $I_D/I_G$ ). A técnica de CARS multiplexado, assim como as técnicas convencionais de espectroscopia Raman, pode ser utilizada neste tipo de caracterização de nanotubos de carbono pois fornece simultaneamente (ponto a ponto) as intensidades das bandas D e G necessárias para determinar o parâmetro de impureza.

### 3.4 Resultados

Um aglomerado do NCPU foi selecionado em uma amostra preparada conforme a descrição da secção 3.2. Uma região de  $25 \times 25 \mu m$  foi escaneada duas vezes, dentro das mesmas condições experimentais, a fim de obter o sinal de CARS multiplexado (feixe de bombeamento e Stokes incidentes) e o sinal de Raman (somente o feixe de bombeamento).

As Figs. 3.3a e b apresentam os resultados da microscopia CARS multiplexada relacionados à variação de intensidade das bandas D ( $I_D$ ) e G ( $I_G$ ), respectivamente. Podemos notar aspectos distintos nas variações de intensidades  $I_D$  e  $I_G$ , observando as setas #1 e #2 que assinalam diferentes feixes de nanotubos sobre a região escaneada. A Fig. 3.3g apresenta o espectro CARS multiplexado para os dois feixes representativos: #1 (linha vermelha) e #2 (linha preta).

A Fig. 3.3c apresenta a variação de intensidade do sinal CARS multiplexado quando uma componente não ressonante do espectro é selecionada (no caso  $1050 \text{ cm}^{-1}$ ). Notamos que a componente de SNR varia espacialmente sobre a distribuição de NCPU de maneira semelhante à variação apresentada para a banda D (Fig. 3.3a). Essa semelhança sugere que o resultado apresentado para a variação da intensidade da banda D é fortemente influenciado pela interferência com o SNR. Esta constatação evidencia a necessidade da separação entre o sinal vibracional e o SNR. Contudo o SNR fornece informação topográfica sobre a ressonância eletrônica, que pode ser relevante para outros fins [22].

As Figs. 3.3d-f apresentam mapas construídos com as razões entre as bandas D e G, entre a banda D e o SNR e entre o SNR e a banda G, respectivamente. Estes resultados corroboram para a necessidade de recuperação do sinal Raman para obtenção da informa-

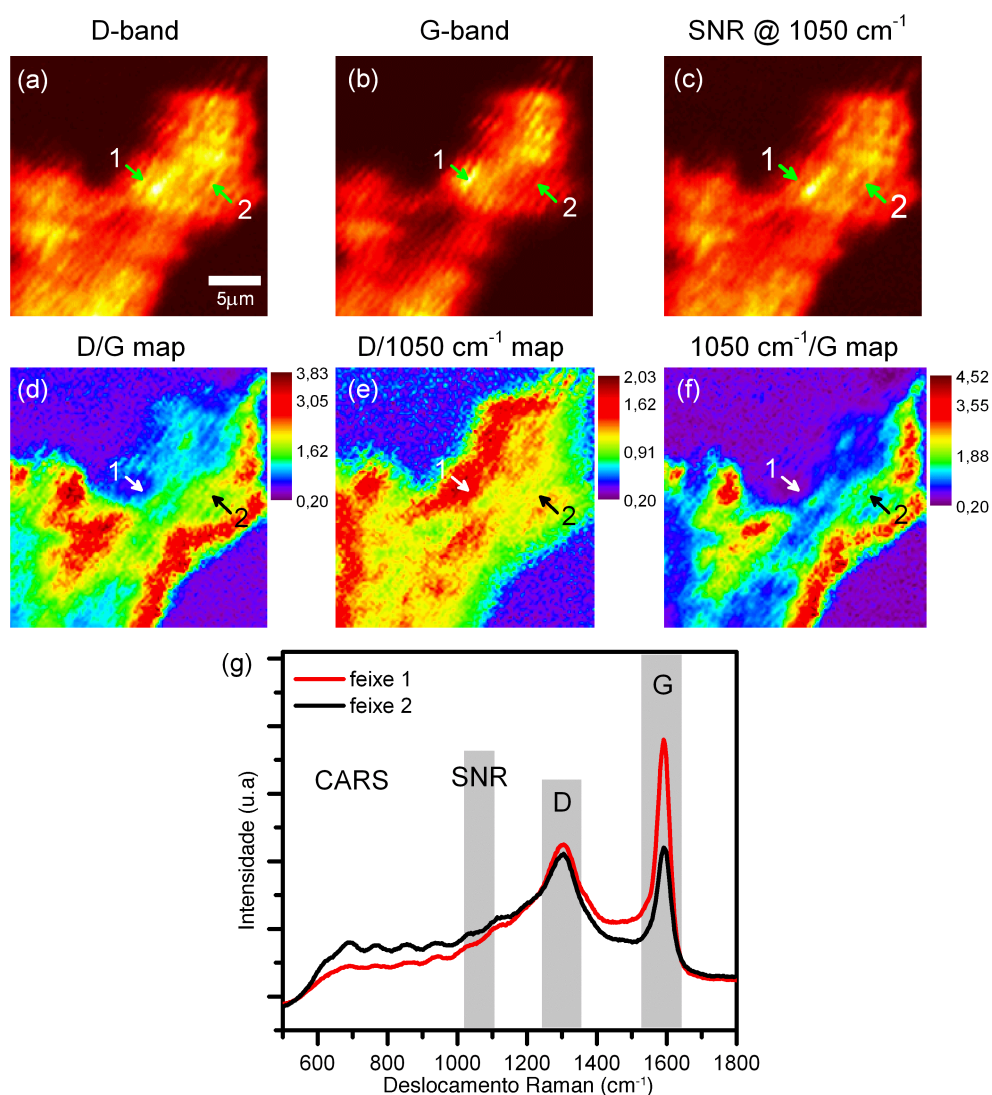
ção sobre impurezas. A Fig. 3.3f, por exemplo, não deveria apresentar qualquer informação sobre defeitos na amostra, contudo, apresenta uma distribuição muito semelhante a da Fig. 3.3d que mostra o mapa ( $I_D/I_G$ ). Sendo assim, nenhum dos mapas apresentados na Fig. 3.3 pode ser considerado um mapa de impurezas devido à influência do SNR.

O espectro Raman recuperado pelo MME e o espectro Raman espontâneo de um ponto representativo da amostra de NCPU estão representados na Fig. 3.4. Existe ainda uma discordância em relação a forma dos picos recuperados pelo MME devido ao processo de ajuste da fase de correção não otimizado, contudo, as amplitudes concordam de maneira satisfatória.

A fig. 3.5 apresenta os dados medidos por CARS multiplexado processados pelo MME. Na Fig. 3.5a temos a distribuição de intensidade para a banda D do espectro MME Raman recuperado, enquanto, na Fig. 3.5b, distribuição para a banda G. Os espectros para os dois feixes de nanotubos assinalados, #1 (linha vermelha) e #2 (linha preta), nas figuras anteriores estão representados na Fig. 3.5c. Percebemos que os espectros MME Raman não apresentam a distorção observada nos resultados de CARS multiplexado bruto (Fig. 3.3g), devido ao SNR, e se aproximam do resultado esperado para o espectro vibracional.

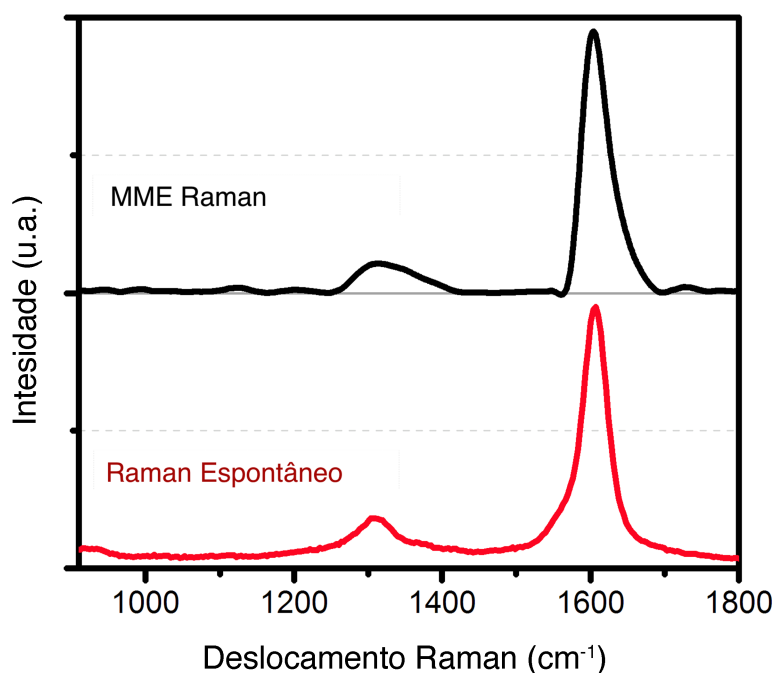
De posse dos resultados de MME Raman recuperado, podemos então construir um mapa de impurezas da região escaneada utilizando o parâmetro ( $I_D/I_G$ ). Para construir este mapa dividimos as matrizes normalizadas que representam as distribuições de intensidade das bandas D (Fig. 3.5a) e G (3.5b). A Fig. 3.6a apresenta o mapa de impurezas para a mesma distribuição de NCPU apresentada nas Figs. 3.3 e 3.5. Podemos identificar a variação do índice impurezas ( $I_D/I_G$ ) ao longo da distribuição de NCPU, onde as regiões vermelhas representam uma maior concentração de defeitos. No entanto, como o parâmetro de impureza depende de uma razão entre intensidades o mapa da Fig. 3.6a não contém informação sobre a concentração de NCPU. Para recuperar essa informação a Fig. 3.6b mostra a associação em cores da variação de intensidade da banda D (cor verde) e da banda G (cor vermelha).

Nos resultados apresentados na Fig. 3.6a destacamos duas regiões: região I com maior e região II com menor índice de impureza. Ao analisarmos as mesmas regiões na Fig. 3.5b percebemos que a região de maior impureza coincide com a região de menor concentração de NCPU. Isso significa que o maior parâmetro ( $I_D/I_G$ ) é encontrado para regiões onde



**Fig. 3.3:** *Microscopia CARS multiplexada de uma região de 25 × 25 μm de uma amostra de NCPU. (a) e (b) representam as componentes ressonantes na banda D e G, respectivamente, e (c) representa a componente de SNR em 1050 cm<sup>-1</sup>. (d) o mapa da razão ( $I_D/I_G$ ) plotados em uma escala de cor apropriada para maior contraste. (e) e (f) apresentam razões entre diferentes posições no espectro CARS. As setas #1 e #2 nas imagens (a)-(f) assinalam dois feixes de nanotubos representativos. (g) Mostra a espectro CARS para os dois feixes destacados: #1 (linha vermelha) e #2 (linha preta).*

os nanotubos estão mais dispersos. Trabalhos recentes na literatura, demonstram um aumento na intensidade da banda D para amostras de NCPU submetidas a uma uma

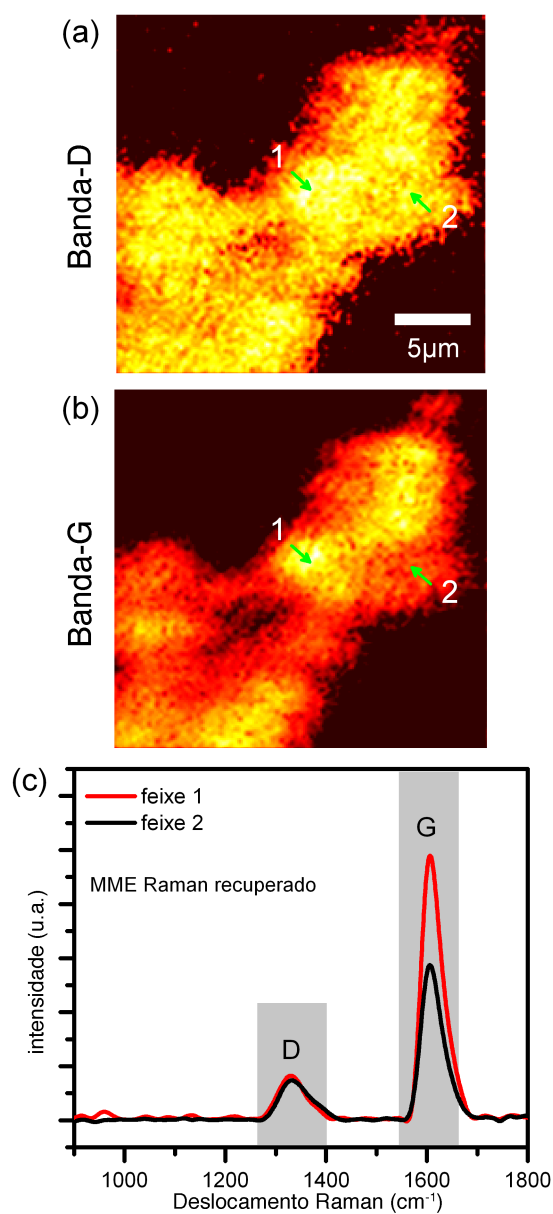


**Fig. 3.4:** Comparação entre o espectro MME Raman (linha preta) recuperado e o Raman espontâneo (linha vermelha).

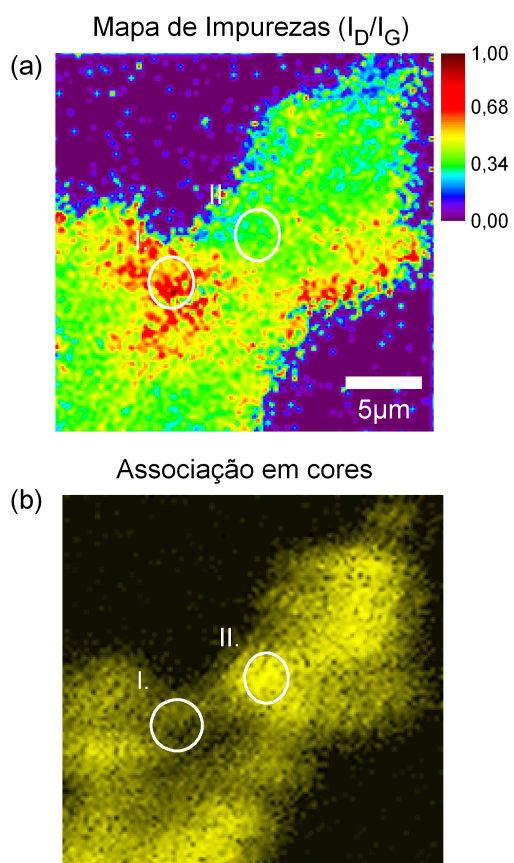
oxidação induzida [12, 40]. O crescimento do parâmetro de desordem (banda D) está associado a um aumento de ligações híbridas  $sp^3$  entre os carbonos pela oxidação dos nanotubos.

Portanto, a sutil variação do parâmetro de impureza ao longo do aglomerado de NCPU estudado pode ser entendida como uma maior oxidação dos nanotubos mais dispersos. Regiões com maior concentração apresentam um espectro Raman que contém contribuições de nanotubos internos, que estão protegidos (blindados) por nanotubos mais externos. Estes nanotubos internos estão submetidos a uma interação com o meio externo menor em comparação aos nanotubos mais dispersos. Em outras palavras, os nanotubos mais dispersos estão sujeitos a uma oxidação espontânea maior do que os nanotubos internos em regiões mais densas. Sendo assim, regiões com maior concentração apresentam um índice de impureza ( $I_D/I_G$ ) menor do que o índice de regiões dispersas. Essa interpretação corrobora com os resultados apresentados neste trabalho (ver Fig. 3.6).





**Fig. 3.5:** Resultados de microscopia CARS multiplexada com espectro MME Raman recuperado. (a) distribuição de intensidade para a banda D e (b) banda G. (c) comparação entre os espectros MME Raman para os feixes de nanotubos assinaladas pelas setas #1 (linha vermelha) e #2 (linha preta). As regiões I e II estão identificadas como contendo maior e menor índice de impurezas, respectivamente.



**Fig. 3.6:** (a) Mapa de impurezas através do parâmetro ( $I_D/I_G$ ) e (b) Associação em escala de cor: Banda D do espectro MME Raman recuperado (cor verde) e a banda G (cor vermelha).

## Capítulo 4

# Armazenamento de dados via deslocamento Raman

Aplicativos e dispositivos digitais modernos exigem novos métodos mais eficientes de armazenamento de dados [30–32]. Dispositivos convencionais de armazenamento de memória são baseados na mudança da refletividade da luz sobre uma camada de moléculas de corante [26]. No decorrer deste capítulo vamos propor uma nova forma de armazenar informação baseada no deslocamento da frequência de um modo Raman induzido a laser. Para tanto, utilizamos um filme de NCPU, onde a frequência central do pico relativo à banda G foi modificada. Acreditamos que essa proposta pode levar a dispositivos de alta capacidade de armazenamento de dados, uma vez que a informação pode ser confinada em regiões sub micrométricas.

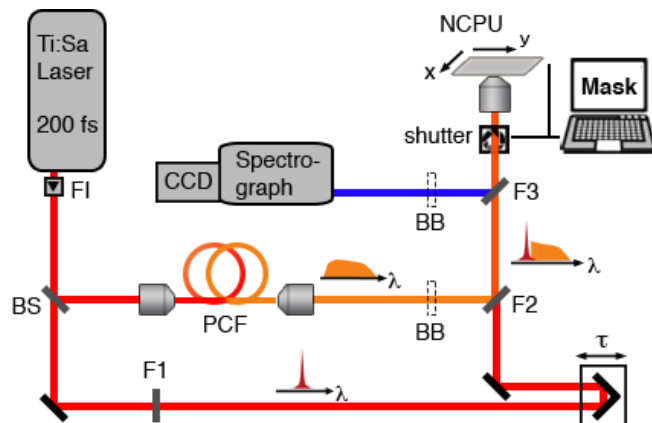
Os resultados apresentados neste capítulo estão em processo de submissão.

### 4.1 Deslocamento Raman controlado em NCPU

O deslocamento da frequência central de um modo vibracional pode ser induzido pela exposição controlada de uma determinada molécula à radiação de um laser de alta potência. Esta constatação resulta das observações feitas sobre as amostras de NCPU estudadas ao longo deste trabalho. NCPU são utilizados em diversas áreas da ciência e tecnologia, como na produção de dispositivos eletrônicos em escala reduzida, sensores químicos e armazenamento eficiente de energia, entre outros. Os defeitos que ocorrem ao longo da rede de grafeno, que forma o nanotubo (ver cap. 2), não são sempre indesejados, podendo

desempenhar um papel importante na aplicação dos NCPU [14, 37, 49]. Um trabalho de 2008 de C. Zavaleta et al. [48] utiliza NCPU funcionalizados, através de defeitos induzidos, como marcadores para o reconhecimento não invasivo de regiões tumorais em tecido vivo. Este artigo relaciona os dois tipos de amostras pesquisadas nesta tese.

Inicialmente vamos considerar duas pequenas adaptações que foram realizadas sobre o experimento de CARS multiplexado descrito no cap. 1.5.1. A primeira consiste em inserir um obturador atuado por software que controla o bloqueio do laser de bombeamento que incide sobre a amostra. Esse controle foi implementado com o objetivo de imprimir um padrão sobre a amostra, utilizando a modificação causada pelo laser de bombeamento e este procedimento será discutido de forma detalhada a seguir. A segunda adaptação insere dois bloqueadores de feixe: um cancela o feixe Stokes e outro impede que a luz espalhada pela amostra seja enviada ao detector quando o feixe de bombeamento, com alta potência, é utilizado para induzir o deslocamento do modo Raman. O esquema da montagem utilizada neste trabalho está representado na Fig. 4.1.



**Fig. 4.1:** Montagem adaptada de CARS multiplexado: FI, Isolador de Faraday; BS, divisor de feixe; F1, filtro estreito; PCF, Fibra de cristal fotônico; F2, filtro passa alta; F3, filtro passa baixa; BB, bloqueador.

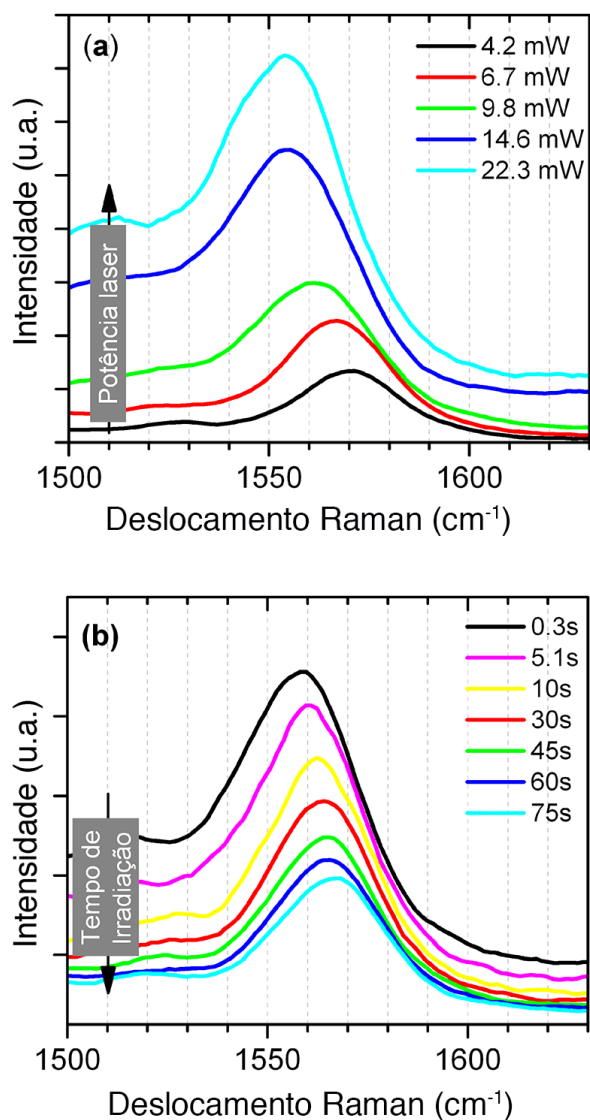
A amostra empregada neste estudo foi preparada de forma semelhante a descrita no cap. 3.2. NCPU comerciais (Sigma-Aldrich (6,5) chirality, >77% como NCPU) em pó (3 mg) foram diluídos em água (50 ml). Um surfactante (Pluronic F127, 50 mg) foi utilizado para evitar a agregação dos nanotubos após a dispersão. A solução foi submetida a um banho de ultrassom por 10 min., e após 30 min. decantando, parte do sobrenadante foi novamente

submetido ao ultrassom por mais 10 min. A dispersão final foi gotejada sobre uma lâmina de microscópio convencional onde o solvente foi evaporado à temperatura ambiente. Na preparação desta amostra não utilizamos as técnicas de centrifugação e *spin-coating* com a intenção de obtermos uma distribuição próxima a de um filme de nanotubos homogêneo. De fato, para regiões pequenas da ordem de  $100 \times 100 \mu m$  a amostra apresenta em uma homogeneidade satisfatória.

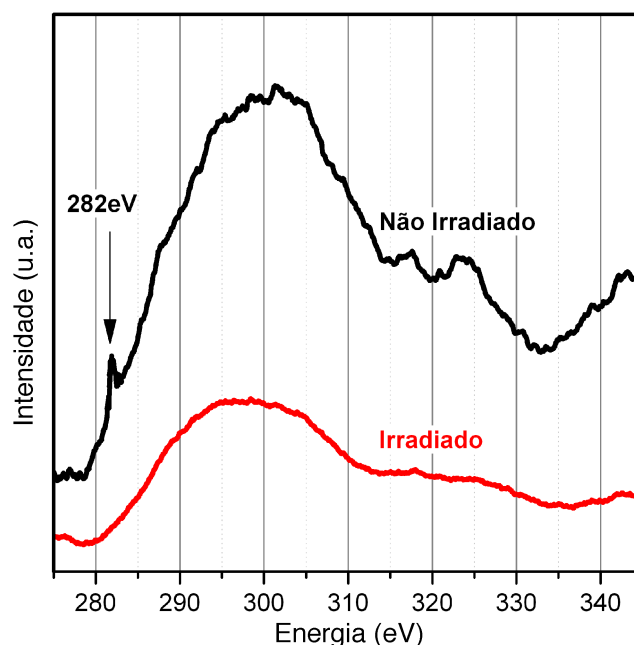
A interação do laser com a amostra de NCPU resulta em um deslocamento da frequência central do pico relativo a banda G no espectro CARS. Este deslocamento foi observado tanto para frequências mais baixas (*downshift*), em relação a frequência dos NCPU inalterados, quanto para frequências mais altas (*upshift*). O deslocamento para frequências mais baixas ocorre quando mantemos um tempo de exposição curto ( $\sim 30 ms$ ) e aumentamos a intensidade do laser. A variação do *downshift* está representada na Fig. 4.2a, onde observamos um deslocamento máximo de  $15 cm^{-1}$ . Essa interação por um período curto aquece o nanotubo e resulta em um aumento da anarmonicidade das ligações entre os carbonos, sendo reversível. O sistema retorna ao mesmo estado após atingir a temperatura inicial. [10, 36].

Ao mantermos a intensidade do laser constante, acima de um valor mínimo, e variarmos o tempo de exposição da amostra, observamos um deslocamento da frequência central da banda G para valores maiores que o inicial (Fig. 4.2b). Ao contrário do deslocamento para frequências menores, o *upshift* não é reversível, ou seja, o deslocamento permanece após a irradiação. Os valores de deslocamento máximo observado para uma potência média de 12,5 mW foi de  $9 cm^{-1}$ , conforme os dados da Fig. 4.2b. Esse tipo de deslocamento permanente, desde que controlado, pode ser utilizado como mecanismo de armazenamento de informação não volátil.

A irradiação contínua de um filme de NCPU, resulta no deslocamento controlado da frequência central da banda G de até  $12 cm^{-1}$  através do tempo de exposição da amostra. Este deslocamento é resultado de uma modificação estrutural relacionada com a destruição de carbonos  $sp^2$  e a amorfização do filme de NCPU localmente [15]. Esse efeito de amorfização é corroborado pela redução da intensidade da banda G, como visto na Fig. 4.2b. A modificação dos NCPU ( $sp^2 \rightarrow sp^3$ ) muda a ressonância eletrônica do processo Raman. Além disso, a susceptibilidade de terceira ordem para carbonos  $sp^3$  é ordens de magnitude



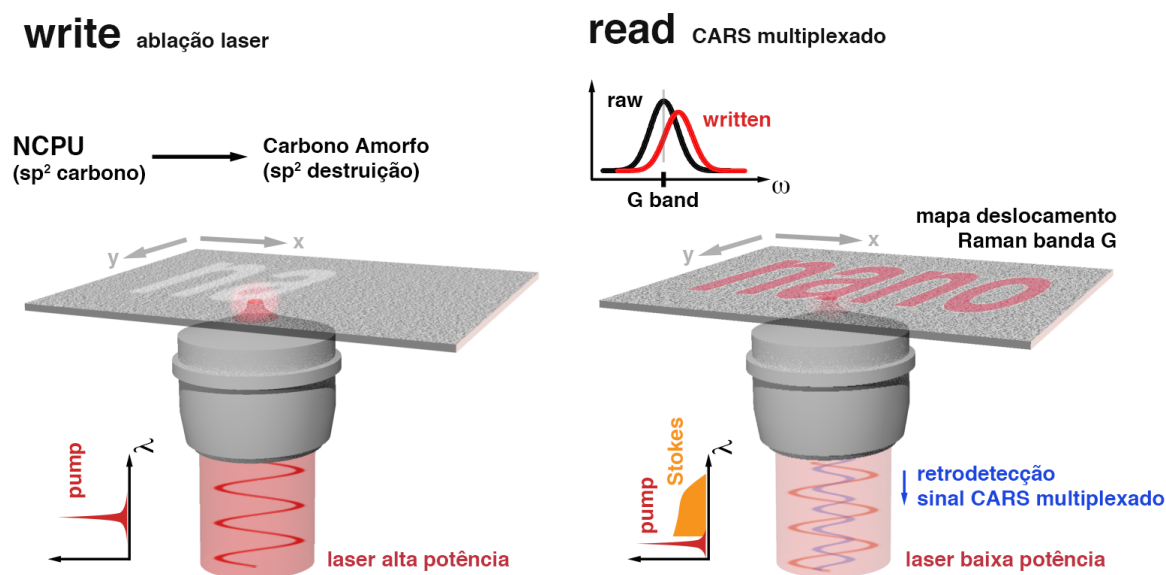
**Fig. 4.2:** Deslocamento Raman induzido a laser. (a) deslocamento para frequências menores que a inicial (*downshift*), com tempo de exposição constante e (b) deslocamento para frequências maiores que a inicial (*upshift*), com intensidade constante de 12,5 mW.



**Fig. 4.3:** Espectroscopia eletrônica por perda de energia (EELS). O pico em 282 eV representa a presença de ligações do tipo  $\pi$ , que ocorrem para carbonos  $sp^2$  em NCPU.

menor do que para carbonos  $sp^2$ .

Com a finalidade de confirmar a modificação estrutural dos NCPU induzida a laser, realizamos medidas (por Dr. Roberto Reis CNANO) de espectroscopia eletrônica por perda de energia (EELS - *Electron Energy Loss Spectroscopy*) em um microscópio de transmissão Zeiss Libra<sup>®</sup>, operando a 80 kV. A Fig. 4.3 mostra dois espectros de EELS: um para uma região da amostra de NCPU que foi irradiada a laser (linha vermelha) e outro para uma região não irradiada (linha preta). O pico observado em 282 eV representa transições do tipo  $1s \rightarrow \pi^*$  enquanto a banda mais larga 210-310 eV representa as transições do tipo  $1s \rightarrow \sigma^*$ . O grafeno é formado por carbonos  $sp^2$ , que contém ligações do tipo  $\sigma$  e  $\pi$ , enquanto carbonos  $sp^3$  são formados somente por ligações covalentes  $\sigma$ . Sendo assim, os resultados apresentados na Fig. 4.3 concordam com a amorfização induzida dos NCPU e a redução das ligações do tipo  $\pi$ .



**Fig. 4.4:** Impressão de uma máscara, sobre uma amostra de NCPU, utilizando o deslocamento Raman induzido à laser. (Esquerda) Impressão do padrão que induz a modificação com laser de alta potência e (Direita) a leitura realizada por microscopia CARS multiplexada com laser de baixa potência.

## 4.2 Resultados

O experimento de CARS multiplexado adaptado, representado na Fig. 4.1, foi utilizado para imprimir um padrão sobre um filme de NCPU. Uma máscara, construída em código binário, define o padrão que será impresso sobre a amostra, bem como a área escaneada. Para os pontos definidos com o valor "0" na máscara o feixe de laser permanece bloqueado pelo obturador (Fig. 4.1), enquanto que para os pontos de valor "1" o obturador libera o feixe sobre a amostra durante um determinado intervalo de tempo. Durante o processo de impressão, somente o laser de bombeamento com alta potência é utilizado, além disso, a detecção do sinal retro espalhado é bloqueada para evitar a saturação da câmera CCD (bloqueadores, Fig. 4.1).

Em seguida, uma medida de microscopia CARS multiplexada, da mesma região impressa, revela o espectro que representa a banda G ponto a ponto. Os procedimentos de impressão e leitura do padrão estão representados esquematicamente na Fig.4.4. É importante notar que a intensidade do laser utilizada para a varredura CARS deve ser menor que

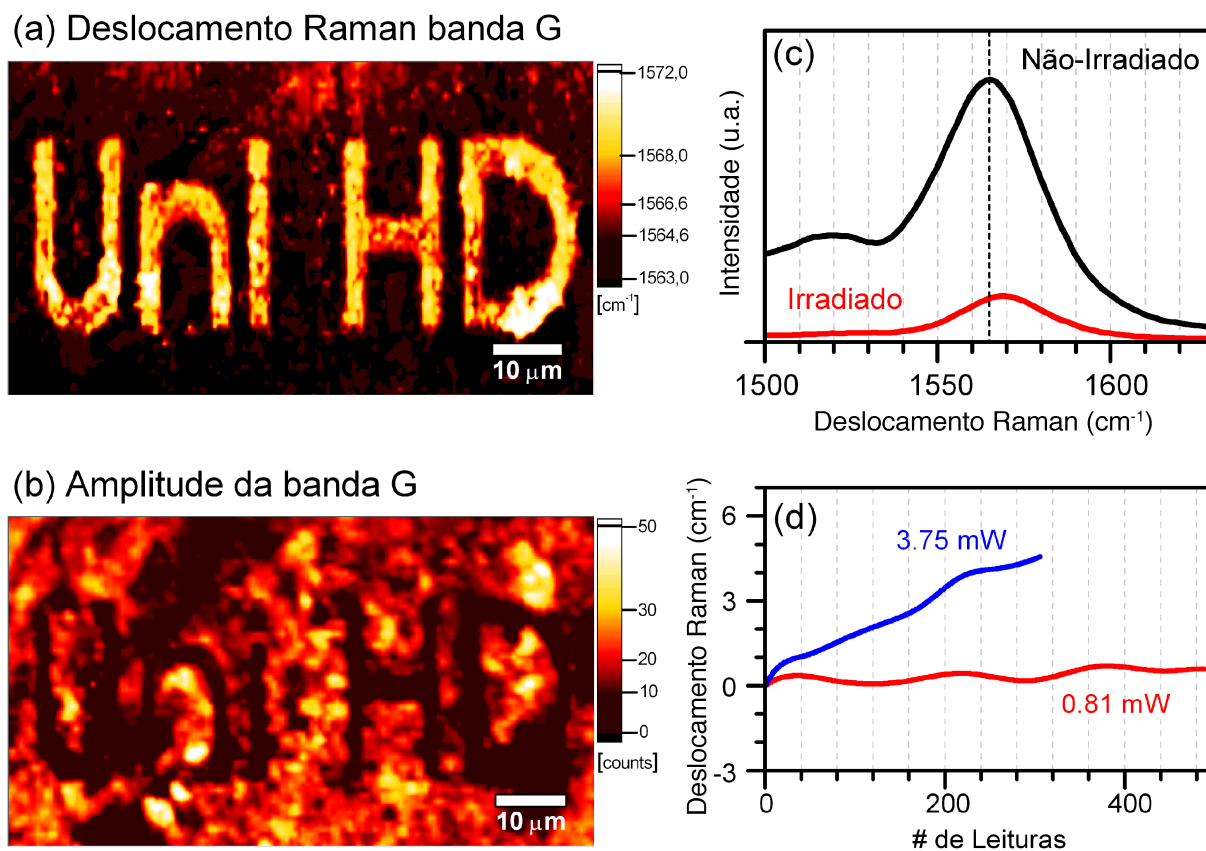


a intensidade de impressão do padrão, para que não seja induzido um novo deslocamento durante a varredura. Um algoritmo simples determina ponto a ponto a posição central da banda G através de um ajuste gaussiano, e constrói um mapa de deslocamento que releva precisamente as regiões que foram modificadas pelo laser.

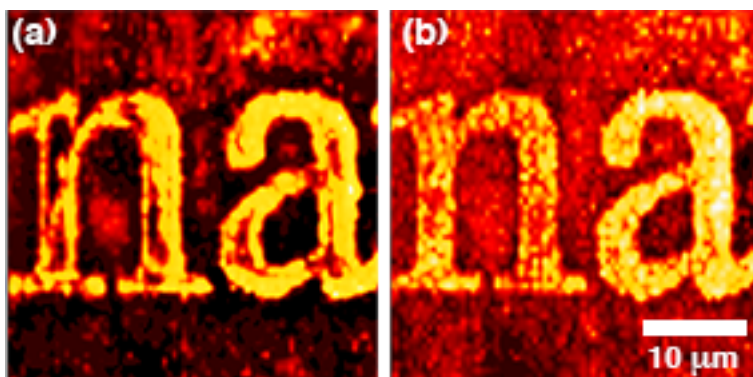
Na Fig. 4.5 apresentamos os resultados que comprovam que o deslocamento Raman pode ser utilizado como um mecanismo de armazenamento de dados não volátil. O padrão com a palavra "Uni HD" foi impresso sobre um filme de NCPU preparado conforme a descrição anterior. Este padrão foi impresso com um laser de 12,5 mW de potência média com um tempo de exposição de 100 ms por ponto. O laser de varredura CARS (bombeamento e Stokes), utilizado para realizar a leitura da região modificada, tinha uma potência de 2,75 mW e o tempo de exposição usado foi de 50 ms por ponto. O deslocamento médio induzido foi de aproximadamente  $5 \text{ cm}^{-1}$ , como indica o mapa de deslocamento representado na Fig. 4.5a. A Fig. 4.5b traz a distribuição de intensidade para a banda G ao longo da mesma região. Apesar de a modificação a laser também resultar em uma redução da amplitude da banda G, a informação de intensidade (Fig. 4.5b) não é suficientemente precisa para reproduzir o padrão induzido.

O espectro médio dentro de uma região irradiada (linha vermelha) e o espectro de uma região não irradiada (linha preta) estão representados na Fig. 4.5c. Um aspecto importante para comprovar a não volatilidade do mecanismo de armazenamento proposto é considerar o número de leituras que podem ser realizadas sobre o mesmo ponto sem que a informação seja alterada. Para isso, realizamos uma série de medidas sucessivas sobre um mesmo ponto, onde cada medida corresponde a uma exposição da amostra ao feixe de leitura por 50 ms. Para um feixe com potência de 3,75 mW o deslocamento acumulado ao longo de pouco menos que 300 leituras já compromete a informação armazenada (Fig. 4.5d, linha azul). No entanto, para uma potência média de 0,81 mW (Fig. 4.5d, linha vermelha) o deslocamento induzido não ultrapassa  $1 \text{ cm}^{-1}$  permanecendo dentro da imprecisão da medida, não representando um deslocamento real da frequência central.

Contudo, os dados apresentados até aqui não comprovam que a modificação induzida tem origem vibracional. Como o sinal de CARS multiplexado é acompanhado por uma componente não ressonante, poderíamos sugerir que a interação do laser com os NCPU alterasse as propriedades ópticas alterando o sinal não ressonante. Como o SNR interfere



**Fig. 4.5:** Impressão do padrão "Uni HD" usando o deslocamento Raman induzido sobre um filme de NCPU. (a) mapa de deslocamento Raman e a (b) distribuição de intensidade da banda G, (c) espectros CARS multiplexado de uma região irradiada (linha vermelha) e não irradiada (linha preta), (d) variação do deslocamento Raman induzido ao longo de sucessivas leituras por CARS multiplexado.

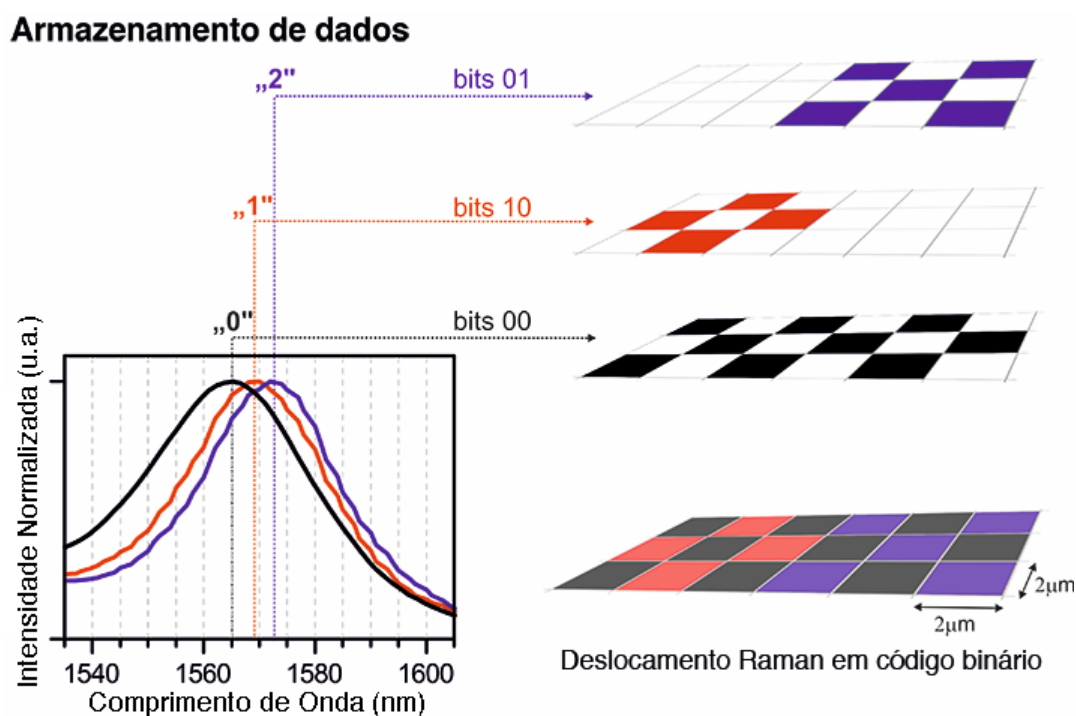


**Fig. 4.6:** Mapa de deslocamento para o (a) sinal CARS e (b) Raman espontâneo.

com o vibracional, a alteração do mesmo poderia causar o deslocamento da Banda G sem modificar o modo vibracional. Para comprovar que o deslocamento induzido tem origem vibracional, realizamos também uma medida detectando o sinal de Raman espontâneo, que não apresenta contribuição não ressonante. A Fig. 4.6 traz a comparação entre os mapas de deslocamento, de uma mesma região induzida, para o sinal CARS multiplexado (a) e para o sinal Raman espontâneo (b). Notamos que mesmo para o sinal puramente vibracional o deslocamento induzido também é observado.

Por último, demonstramos que é possível controlar a magnitude do deslocamento variando o tempo de irradiação e/ou a intensidade do laser de indução. Desta maneira, podemos armazenar mais do que um único bit por ponto. Naturalmente que o tamanho da área modificada está próximo ao limite de difração do próprio feixe, que ao reposicionar sobre o mesmo ponto, para recuperar a informação armazenada, não coletará o sinal exatamente da mesma região. Esta imprecisão na posição corresponde a uma determinada imprecisão na leitura do deslocamento Raman induzido, uma vez o sinal medido é uma soma de contribuições na região do foco. Sendo assim, a variação do deslocamento que define a distância entre os bits armazenados no mesmo ponto deve ser menor que a imprecisão da medida. Uma região contendo 18 pontos,  $2 \mu\text{m}$  de distância entre eles, foi atuada e três valores foram definidos (Fig. 4.7). O valor "0" não foi irradiado e os valores "1" e "2" foram irradiados com uma potência de 12,5 mW durante 100 e 200 ms, respectivamente. Uma medida de CARS multiplexado com potência de 2,75 mW e tempo de exposição de 50 ms revela o padrão apresentado na Fig. 4.7. Os três valores determinados foram associados com valores binários, e estão descritos na legenda da Fig. 4.7.

Concluindo, demonstramos o princípio que permite utilizar o deslocamento da frequência central de um modo Raman, induzido à laser, como um mecanismo de armazenamento de dados. De fato o deslocamento de frequência ocorre pelo aquecimento local da amostra de NCPU, devido à focalização e a alta densidade de energia fornecida pelo feixe de bombeamento em modo de escrita. Além disso, apontamos a técnica de CARS multiplexado com ideal para a recuperação da informação armazenada. Isto porque, apesar de a informação estar contida no espectro vibracional, técnicas de Raman convencionais demandam um maior tempo de exposição da amostra à radiação, podendo induzir o deslocamento durante a leitura dos dados armazenados. Existem muitos desafios tecnológicos que se-



**Fig. 4.7:** Informação binária armazenada em um filme de NCPU utilizando o deslocamento Raman induzido. A variação dos valores é determinada pelo controle do tempo de exposição. Pontos não irradiados representam o valor "0" (quadrados pretos, valor binário 00). O valor "1" foi irradiado por 100 ms (quadrados vermelhos, valor binário 10) e valor "2" foi irradiado por 200 ms (quadrados azuis, valor binário 01).

param a técnica proposta de uma real aplicação. Em princípio, a natureza molecular do espectro vibracional permite que os pontos de armazenamento sejam levados a dimensões nanométricas, como por exemplo, a utilização de técnicas de amplificação de campo por sondas nanométricas para a leitura e indução do deslocamento [18, 38]. Naturalmente, deve existir outras moléculas que apresentam igual ou melhor capacidade de armazenar informação no deslocamento de modos Raman que os NCPU, que podem ser exploradas para o mesmo fim. Por fim, a possibilidade de aumentar a densidade de dados e de armazenar diversos bits em um único ponto pode levar a dispositivos de armazenamento de dados com capacidades extraordinárias.



## Capítulo 5

# Microscopia CARS multiplexada em tecido cerebral de rato

Utilizamos a técnica de microscopia CARS multiplexada para investigar características espectrais em amostras de tecido cerebral de rato com tumor tipo melanoma. Novamente, o MME para a recuperação do espectro vibracional, a partir do espectro CARS multiplexado, foi empregado. Demonstramos que a utilização do MME se faz necessária para recuperar a informação vibracional pouco intensa na região conhecida como *impressão digital* (1000-1800  $cm^{-1}$ ). Além disso, utilizamos o método de análise por componentes principais (PCA) para identificar características espectrais próprias do tecido normal (saudável) e tumor. Por fim, os resultados de microscopia CARS multiplexada obtidos nos modos de transmissão e retroespalhamento foram comparados. Os resultados revelam uma região tumoral mais estruturada indicando a presença de espalhadores nanométricos, que geram sinal CARS na direção retroespalhada.

Os resultados apresentados neste capítulo estão em processo de submissão.

## 5.1 Microscopia vibracional em tecido cerebral de rato

Diversas técnicas de espectroscopia ópticas vêm sendo utilizadas para investigar amostras de tecido cerebral e identificar patologias [1, 2, 17, 24, 35]. Espectroscopia Raman, por exemplo, pode substituir a técnica padrão de microscopia com marcação por Hematoxilina e Eosina (HE) em estudos histopatológicos. A microscopia vibracional é uma técnica não invasiva que não requer nenhum tipo de marcador, o que permite a sua aplicação em

tecidos biológicos, até mesmo, para diagnóstico *in vivo* [17]. No entanto, técnicas de espectroscopia vibracional que utilizam o sinal Raman espontâneo exigem um longo período de exposição da amostra a uma intensa irradiação por laser o que compromete a integridade do tecido, podendo gerar a fotodegradação do mesmo. Por outro lado, técnicas de microscopia Raman estimulado exigem um menor tempo de integração do sinal detectado, resultando em uma rápida aquisição que pode chegar até a taxa de repetição de vídeo [16]. A emissão Raman Stokes, comumente utilizada em espectroscopia vibracional, ocorre para fótons de menor energia que os do laser de estímulo (deslocamento para o vermelho). Especialmente para amostras de tecido biológico, a energia do fóton Stokes coincide com a banda de fluorescência da amostra, para frequências ópticas do laser de bombeamento. Neste caso, o sinal intenso de fluorescência sobrepõe-se ao sinal vibracional, impedindo a investigação do mesmo. Como a emissão Raman anti-Stokes ocorre para energias maiores que o laser de estímulo (deslocamento para o azul), a microscopia CARS multiplexada figura como um excelente candidato para investigar amostras de tecido biológico. Além disso, o sinal de CARS multiplexado é mais intenso que o de Raman estimulado e o espectro vibracional, de uma larga janela espectral, é detectado simultaneamente [16, 24, 35].

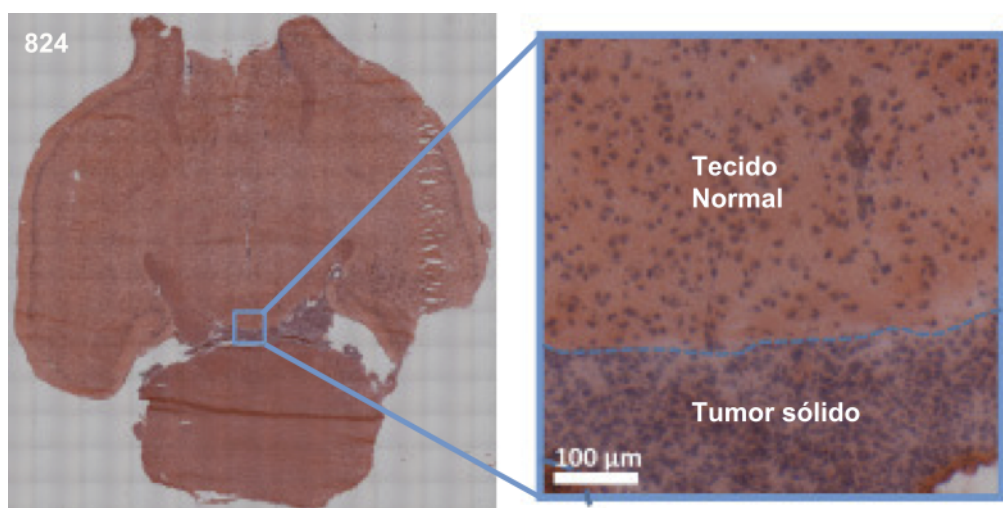
## Montagem Experimental

A montagem experimental utilizada neste trabalho é a mesma descrita no Cap. 1.5.1, com exceção para as medidas comparativas entre o sinal transmitido e o retroespalhado. Neste caso, uma segunda lente objetiva foi acrescentada, após a amostra, colinearmente alinhada à objetiva de iluminação para coletar o sinal CARS transmitido através da amostra. O sinal colimado por esta objetiva é enviado ao mesmo sistema de detecção descrito para a montagem no modo de retroespalhamento.

## A amostra

A amostra consiste em uma fatia, com 10  $\mu\text{m}$  de espessura, de uma secção transversal do cérebro de um rato (*Murinae*) com tumor. A Fig. 5.1 traz uma imagem por microscopia óptica de uma fatia marcada por HE imediatamente vizinha à fatia analisada por CARS multiplexado. Esta secção contém tecido cerebral normal (região vermelho claro) e tumor





**Fig. 5.1:** *Image de microscopia óptica convencional de uma amostra marcada por Hematoxilina e Eosina. Fatia (#824) de cérebro de rato com tumor (10  $\mu\text{m}$  de espessura).*

sólido (Melanoma, linha celular K1735) (região vermelho escuro), como indicado no detalhe da Fig. 5.1. As amostras foram cedidas por Dr. Karin Geiger e por Dr. Matthias Kirsch do Centro Clínico da Universidade de Dresden (Alemanha). As medidas apresentadas neste trabalho foram realizadas com amostras criopreservadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

## 5.2 Resultados

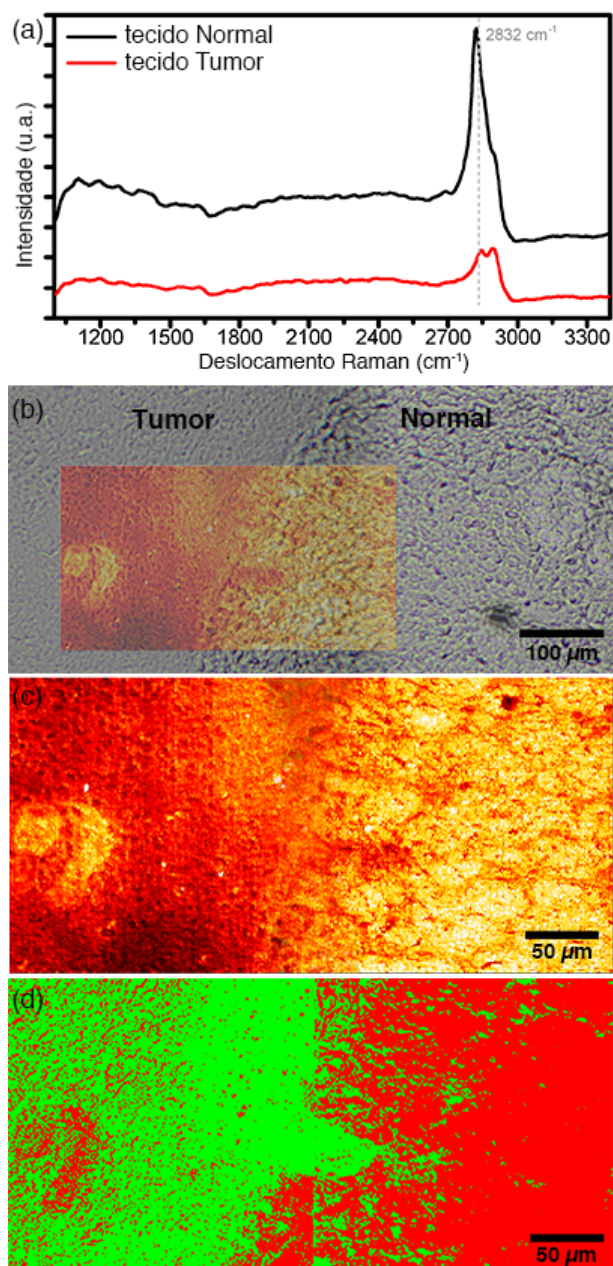
Apesar de o sinal de CARS não representar diretamente o espectro vibracional, ele também pode ser utilizado para mapear diferenças na composição química de uma amostra. A Fig. 5.2 traz resultados de microscopia CARS multiplexada sobre uma região da amostra de tecido cerebral de rato. As imagens de microscopia apresentadas são compostas por um mosaico de duas medidas realizadas em região de  $200 \times 200 \mu\text{m}$ , com resolução de  $1\text{px}/\mu\text{m}$ .

Primeiro, apresentamos uma média de 25 espectros CARS (pixels na imagem) sobre uma região de tecido normal (linha preta) e sobre uma região de tumor (linha vermelha), na Fig. 5.2a. Notamos que na região de CH ( $2700\text{-}3500 \text{ cm}^{-1}$ ) existem dois picos intensos em  $2832$  e  $2895 \text{ cm}^{-1}$ . A Fig. 5.2b apresenta uma imagem de microscopia óptica convencional, em um região de borda entre os dois tecidos, superposta por uma imagem de microscopia CARS multiplexado tomada em  $2832 \text{ cm}^{-1}$ . Esta mesma imagem de microscopia esta

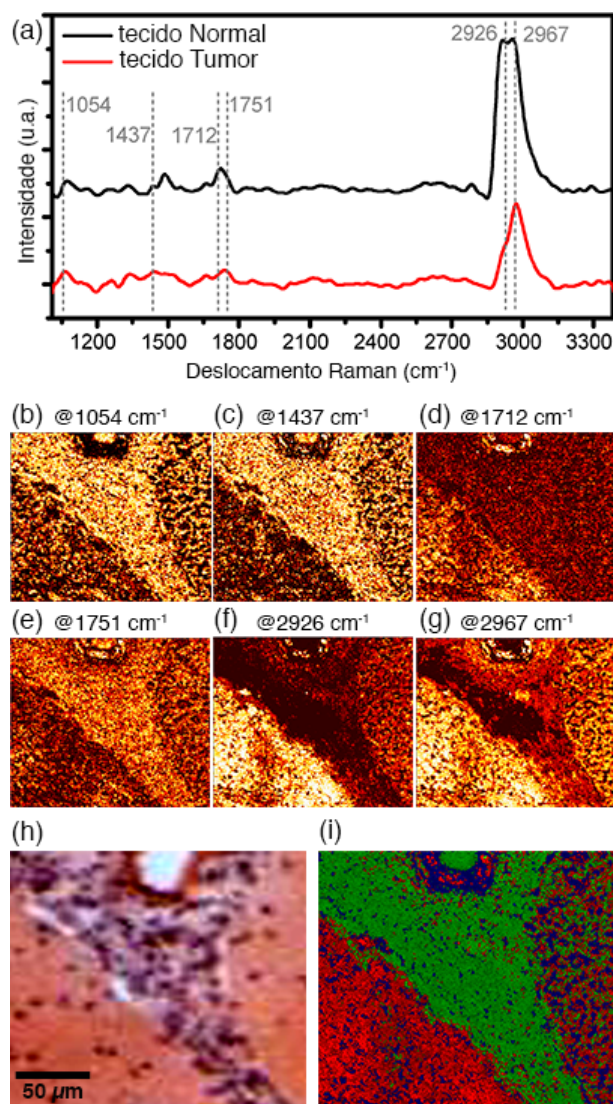
representada em detalhe na Fig. 5.2c. A identificação das regiões, de tecido normal e tumor, foi realizada com o auxílio de uma imagem de microscopia marcada com HE, semelhante a apresentada na Fig. 5.1. Verificamos que a região do tecido normal apresenta uma contribuição mais intensa para o pico em  $2832\text{ cm}^{-1}$ . Apesar dessa análise prover uma boa distinção entre as regiões, a fronteira entre os dois tecidos ainda não está bem definida. Para tanto utilizamos a PCA selecionando dois autovetores que serão associados aos tecidos normal e ao tumor. A Fig. 5.2d apresenta o resultado da PCA, onde o autovetor associado à cor verde representa o tumor e o autovetor vermelho representa o tecido normal. A descontinuidade presente na Fig. 5.2d deve-se ao fato de a PCA ser realizada separadamente para cada uma das regiões escaneadas que compõem o mosaico.

Apesar de os dados brutos do espectro de CARS multiplexado apresentar informação relevante sobre a amostra, somente dois picos na região de CH são distinguíveis. A informação contida na região de *impressão digital* não pode ser diferenciada do comportamento observado para o sinal não ressonante. Para recuperar a informação vibracional e resolver picos ressonantes pouco intensos na região de *impressão digital* aplicamos o MME. Uma nova região ( $200 \times 200\ \mu\text{m}$ ) da amostra contendo tecido normal e tumor foi escaneada e os resultados apresentados na Fig. 5.3. A média entre 25 espectros MME Raman recuperados, para uma região de tecido normal (linha preta) e tumor (linha vermelha), estão representados na Fig. 5.3a. A comparação com os espectro brutos de CARS multiplexado (Fig. 5.2a) evidencia a forte influência do SNR. Os espectros MME Raman recuperados revelam diversos picos ressonantes na região de *impressão digital*, e as imagens de microscopia corresponde aos picos em  $1066$ ,  $1440$ ,  $1658$  e  $1668\text{ cm}^{-1}$  estão representadas nas Figs. 5.3b-e, respectivamente. O picos mais intensos na região dos estiramentos C-H ( $2882$  e  $2922\text{ cm}^{-1}$ ) estão representados nas Figs. 5.3f-g. Notamos que diferentes picos caracterizam regiões distintas, comprovando o caráter ressonante dos modos Raman e reconhecendo diferentes contribuições químicas sobre a amostra. Estes picos podem ser associados a grupos vibracionais que representam compostos como lipídeos, proteínas, colesterol, etc [19]. Por exemplo, os picos mais intensos em  $2882$  e  $2922\text{ cm}^{-1}$  referem-se as vibrações  $\text{CH}_3$  e  $\text{CH}_2$ , presentes em lipídeos, enquanto a pico em  $1658\text{ cm}^{-1}$  reconhece a presença de amido I presente em proteínas.

A Fig. 5.3h apresenta o resultado de microscopia óptica para uma fatia marcada por



**Fig. 5.2:** Resultados de microscopia CARS multiplexada. (a) espectro bruto de uma região de tecido normal (linha preta) e de uma região com tumor (linha vermelha), (b) superposição de uma imagem de microscopia óptica convencional com uma imagem obtida por CARS multiplexado sobre uma região de borda entre tecido normal e tumor, (c) imagem de microscopia CARS multiplexada tomando o espectro em  $2832\text{ cm}^{-1}$  e (d) imagem de contraste obtida por PCA usando dois autovetores.

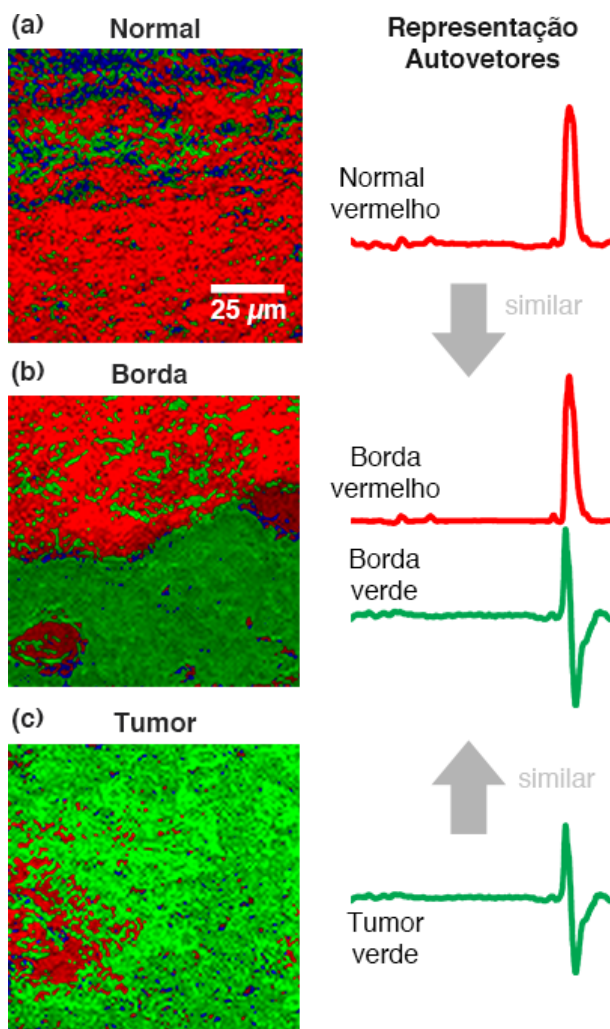


**Fig. 5.3:** Resultados do MME aplicado aos dados de microscopia CARS multiplexada. (a) espectros do MME Raman para uma região de tecido normal (linha preta) e para uma região de tumor (linha vermelha). Um conjunto de seis figuras recuperadas pelo MME mostrando diferentes características espectrais de uma mesma região escaneada (ver detalhes no texto): (b)-(e) quatro linhas Raman na região de impressão digital, (f) e (g) duas linhas Raman na região do CH. (h) microscopia óptica marcada por HE identificando a região de tecido normal (vermelho claro) e a região de tumor (vermelho escuro). (i) resultado da PCA utilizando o espectro MME Raman recuperado, três autovetores foram selecionados.

HE correlacionada com a amostra analisada. Nesta figura, a região de tumor é identificada pela cor vermelha escura e o tecido normal pela cor vermelha claro. O resultado de PCA utilizando 3 autovetores espectrais, está representado na Fig. 5.3i para a mesma região analisada neste conjunto. Por comparação com a Fig. 5.3h, identificamos a região de tumor representada principalmente pelo autovetor associado com a cor verde na Fig. 5.3i. Apesar de a análise dos resultados de microscopia marcada por HE não permitir distinção entre os dois tipos de tecidos saudáveis (direita e esquerda da região de tumor, Fig.5.3h), a análise por decomposição vetorial permite claramente diferenciá-los. De fato, uma imagem ampliada da Fig.5.3h (não mostrada), comparada com um atlas de anatomia cerebral de rato, permite identificar que as regiões à esquerda e à direita do tumor não pertencem a mesma estrutura cerebral, i.e., pertencem ao córtex e ao hipocampo. Notamos que o tecido normal à direita da região tumoral (Fig. 5.3i) não é representado por um único autovetor espectral, como ocorre para o tecido à esquerda. Isso permite afirmar que o tecido à direita apresenta uma composição química mais equilibrada, quando comparado ao outro tecido normal.

No entanto, para que técnicas de microscopia vibracional sejam utilizadas para delimitar regiões de tumor em uma amostra, é necessário um conhecimento prévio sobre as regiões afetadas. Se realizarmos uma varredura sobre uma região de tumor sólido e uma outra sobre o tecido normal, a borda que delimita a região afetada pode ser determinada por comparação entre os autovetores espectrais mais prováveis. A Fig. 5.4 apresenta os resultados que comparam os autovetores mais prováveis medidos em uma região de tecido normal (a) e dentro do tumor sólido (c) (representados na coluna da direita) com os autovetores identificados em uma região de borda (b) entre os dois tipos de tecidos. As regiões escaneadas tem dimensões de  $100 \times 100 \mu m$  e as técnicas de análise por MME e PCA foram aplicadas. Percebemos que, tanto o autovetor que caracteriza o tecido normal (representado em vermelho), como o autovetor que nomeia o tumor (representado em verde) estão presentes na região de borda (Fig. 5.4b) e definem com precisão o limite entre os dois tecidos. Um estudo aprofundado poderia determinar autovetores espectrais característicos para diferentes tipos de tecidos saudáveis e patológicos.

Por último, comparamos o sinal de CARS multiplexado retrodetectado com o sinal transmitido através da amostra. Foi realizada a microscopia com ambos sinais (retrode-

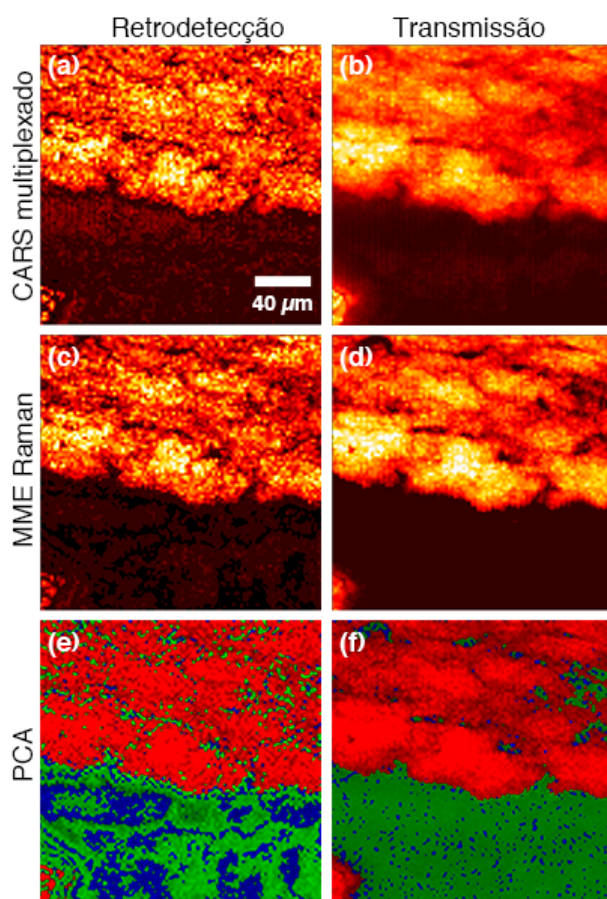


**Fig. 5.4:** Resultado da comparação entre autovetores espectrais determinados pela PCA. (a) região de tecido normal, (b) borda entre os tecidos normal/tumor e (c) região dentro do tumor sólido. Os autovetores mais prováveis que caracterizam o tecido normal (em vermelho) e o tumor (em verde), também são reconhecidos na região de borda.

tectado e transmitido) sobre uma mesma região de  $200 \times 200 \mu m$  contendo a margem entre os tecidos normal e tumor. A Fig. 5.5 apresenta os resultados desta comparação (coluna da esquerda, sinal retrodetectado e coluna da direita, sinal transmitido); onde (a)-(b) representam o sinal bruto de CARS multiplexado em  $2832 \text{ cm}^{-1}$ , (c)-(d) o espectro MME Raman recuperado em  $2882 \text{ cm}^{-1}$  e (e)-(f) o resultado da PCA (a partir do MME Raman) utilizando 3 autovetores espectrais. Notamos que a figura que representa o sinal retrodetectado, evidente nos resultados de MME Raman e PCA, apresenta uma maior estruturação principalmente na região de tumor (parte inferior nas imagens). Ao compararmos os resultados de PCA reconhecemos a região predominantemente verde como sendo a região de tumor, no entanto, para o sinal retrodetectado (Fig. 5.5e) existem estruturas representadas pela cor (autovetor) azul que não ocorrem para o sinal transmitido.

Em um processo de mistura de quatro ondas, a condição de casamento de fase pode ser satisfeita ao longo da direção de propagação em ambos os sentidos. Sendo assim, o sinal CARS pode ser *gerado* também em retroespalhamento. Teoricamente, o sinal CARS retroespalhado ( $I_{retro}$ ), excitado por um feixe altamente focalizado, depende do tamanho da partícula espalhadora e somente ocorre para partículas menores que o comprimento de onda do laser de bombeamento ( $\lambda_b$ ) [8]. Quanto menor a partícula espalhadora maior o  $I_{retro}$ , atingindo o máximo para o tamanho de  $0,3 \lambda_b$  quando o nível do sinal é igual ao sinal CARS gerado no sentido progressivo ( $I_{prop}$ ). Admitindo que o tecido tumoral contém regiões com partículas menores que  $\lambda_b$ , mas ainda maiores que  $0,3 \lambda_b$ , temos que  $I_{retro} \ll I_{prop}$ . O sinal transmitido pela amostra é composto pelo  $I_{prop}$  somado ao  $I_{retro}$  refletido pela interface da amostra com o substrato. De maneira análoga, o sinal retrodetectado é composto pelo  $I_{retro}$  somado ao  $I_{prop}$  que é refletido pela interface correspondente. Como  $I_{retro} \ll I_{prop}$ , o sinal  $I_{retro}$  refletido é desprezível frente ao  $I_{prop}$  na detecção transmitida. Contudo, para o sinal retrodetectado, o sinal  $I_{retro}$  é comparável ao  $I_{prop}$  refletido. Na prática, o sinal detectado em transmissão é pelo menos 4 vezes mais intenso que o retrodetectado. Estes argumentos nos permitem inferir que a diferença entre as regiões de tumor para o sinal retrodetectado (Fig. 5.5e) e para o sinal transmitido (Fig. 5.5f) deve-se a presença de partículas nanométricas, menores que  $\lambda_b$ .

Concluindo, comprovamos a aplicabilidade da técnica de CARS multiplexado para investigação de propriedades espectrais em tecido cerebral de rato. Identificamos precisa-



**Fig. 5.5:** Comparação entre os resultados de microscopia CARS multiplexada em retro-detecção (coluna da esquerda) e em transmissão (coluna da direita), para uma região ( $200 \times 200 \mu\text{m}$ ) de borda entre os tecidos normal e tumor. (a)-(b) sinal bruto de CARS multiplexado tomado em  $2832 \text{ cm}^{-1}$ , (c)-(d) sinal MME Raman recuperado tomado em  $2882 \text{ cm}^{-1}$  e (e)-(f) resultados de PCA utilizando três autovetores.



mente a fronteira entre tecido normal e tumor, o que pode levar a um diagnóstico mais preciso sobre a evolução da patologia. Além disso, comprovamos a eficiência do MME para a recuperação do espectro vibracional Raman que nos permite obter especificidade química sobre o tecido analisado. Detectamos picos na região de *impressão digital* utilizando o sinal coerente, o que não tem precedentes na literatura, segundo o nosso conhecimento. Por fim, a comparação do sinal retrodetectado com o transmitido nos permite afirmar a presença de partículas nanométricas no tecido doente, o que não ocorrem para o tecido normal.

CARS multiplexado é uma técnica rápida, não invasiva, que dispensa iluminação com alta energia prevenindo a fotodegradação de amostras biológicas, podendo ser aplicada sem a necessidade de marcadores químicos. Por todas essas vantagens a aplicação em diagnóstico *in vivo* se torna uma possibilidade viável e interessante.

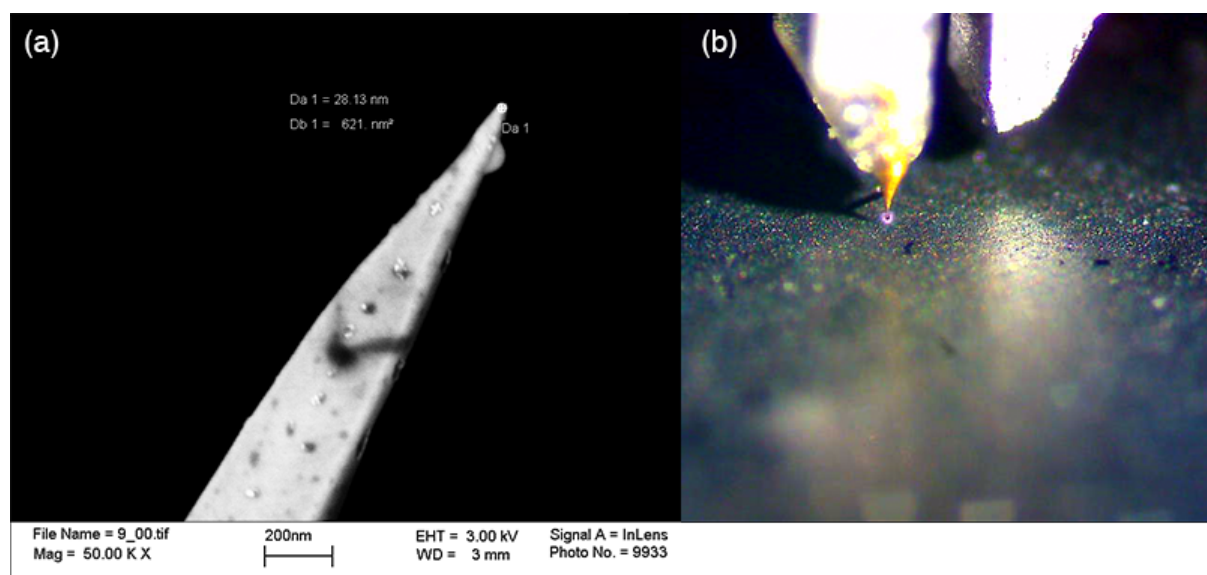


## Capítulo 6

# Demais Trabalhos

## CARS amplificado por Campo-próximo

Inicialmente, o meu plano de doutoramento previa a construção de um sistema de controle da aproximação entre uma nanoponteira e a superfície de uma amostra, utilizando um diapasão de quartzo. A intenção era montar um sistema que observasse o sinal de CARS multiplexado amplificado pelo campo-próximo excitado na extremidade da nanoponteira. No entanto, após um período (aproximadamente 1 ano e meio) de diversas tentativas em obter um sistema estável de aproximação, concluímos que o sucesso desta abordagem dependia de um esforço de desenvolvimento incompatível com o tempo disponível de trabalho em Heidelberg. Além disso, em Nov/2011 Kawata et al [18] publicaram um trabalho que relata a amplificação do sinal CARS por campo-próximo. Durante este período eu adaptei os parâmetros para a produção de nanoponteiras de Au por desbaste eletroquímico (tema da minha dissertação) de maneira otimizada. A Fig. 6.1a mostra uma imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de uma ponteira representativa. Realizamos um ensaio de 30 nanoponteiras das quais 80% apresentaram diâmetro da extremidade abaixo de 50 nm. A Fig. 6.1b apresenta uma destas ponteiras colada em um diapasão de quartzo, próxima a superfície de um filme de NCPU e irradiada por laser na interface.

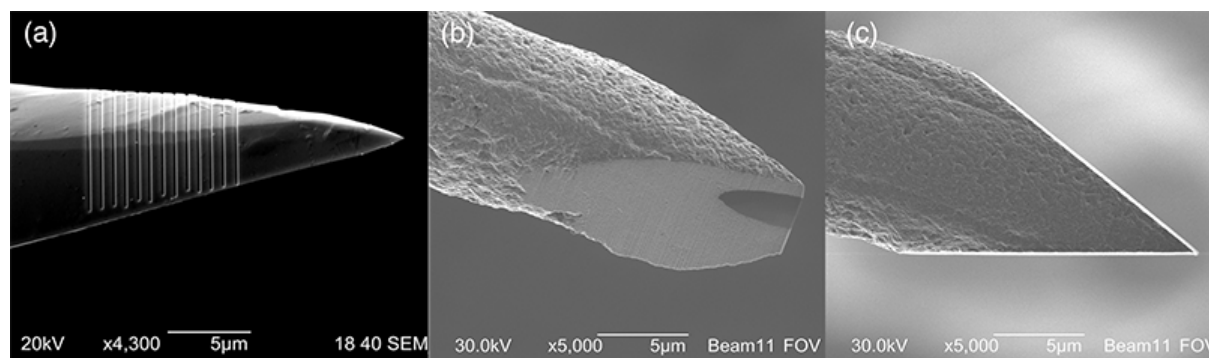


**Fig. 6.1:** (a) MEV de uma nanoponteira de Au construída por desbaste eletroquímico com 28 nm de diâmetro final e (b) Sistema de aproximação diapasão+nanoponteira sobre um filme de NCPU.

## Conformação de Nanoponteiras de Au

Utilizamos um equipamento de feixe de íons acelerados (FIB - *Focused Ion Beam*) para conformar e estruturar nanoponteiras de Au produzidas por desbaste eletroquímico. A intenção era reproduzir uma nanoponteira que utiliza a propagação do plasmon de superfície para excitar de maneira não local o campo-próximo na extremidade [38]. A Fig. 6.2a apresenta a imagem de MEV de uma nanoponteira estruturada com ranhuras (grade) de periodicidade de 750 nm. Esta estrutura permite o acoplamento de uma componente do campo elétrico do laser incidente, sobre a região das ranhuras, com o plasmon de superfície que leva a energia até a extremidade da nanoponteira. Apesar de obtermos sucesso na produção deste tipo de estrutura, a mesma nunca foi testada pela indisponibilidade de um sistema de aproximação.

Em colaboração com a Rede Brasileira de Pesquisa e Instrumentação em NanoEspectroscopia Óptica, que procura novas formas de excitar o campo-próximo através da construção de nanoantenas, propomos um procedimento rápido para conformar uma nanoponteira metálica tipo fenda. A Fig. 6.1b-c apresenta imagens feitas pelo próprio FIB de uma nanoponteira de Au tipo fenda, conformada no Laboratório de Nano Conformação

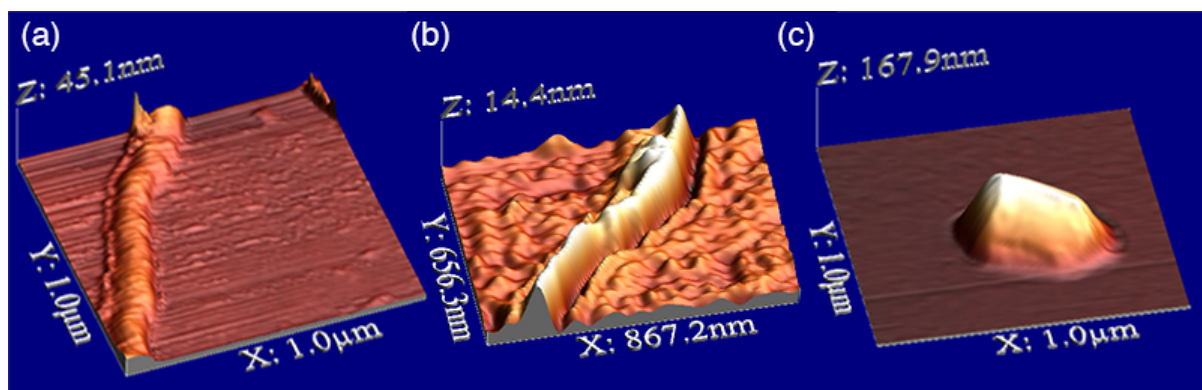


**Fig. 6.2:** (a) imagem de MEV de uma nanoponteira estruturada por desbaste de íons acelerados (FIB). (b)-(c) imagens por FIB de uma nanoponteira tipo fenda, em dois ângulos de visualização.

(LNC) da UFRGS. O procedimento consiste em partir de uma nanoponteira previamente desbastada pelo método eletroquímico. Como queremos um estrutura (fenda) muito pequena em relação à espessura do fio que origina a ponteira, o desbaste diretamente por FIB consome muitas horas de operação para remover uma grande quantidade do metal. Contudo, se partimos de uma nanoponteira já desbastada pelo método eletroquímico necessitamos remover pouco material com o FIB. Desta maneira, um procedimento simples em duas etapas (aproximadamente 3 horas) resulta em uma boa nanoponteira tipo fenda (Fig. 6.1b-c). Este procedimento nos rendeu o registro de uma patente sobre o nome de "*Dispositivo maciço com extremidade unidimensional para microscopia e espectroscopia óptica de campo próximo*" (número do pedido: BR 1020120333040), em participação junto à Rede Brasileira de Pesquisa e Instrumentação em NanoEspectroscopia Óptica.

## Equipamento comercial de NSOM

Em Setembro/2013 (instalação) o LNC da UFRGS adquiriu um equipamento comercial (Nanonics Imaging Ltd.) de microscopia óptica de campo-próximo (NSOM - *Near-field Scanning Optical Microscopy*). Antes desta instalação, em Março/2013, eu estive em visita ao laboratório OPTMA (Universidade Federal de Alagoas) para receber treinamento em um sistema semelhante em operação nesta instituição. Junto ao treinamento, realizamos a microscopia por força atômica (AFM - *Atomic Force Microscopy*) em amostras de

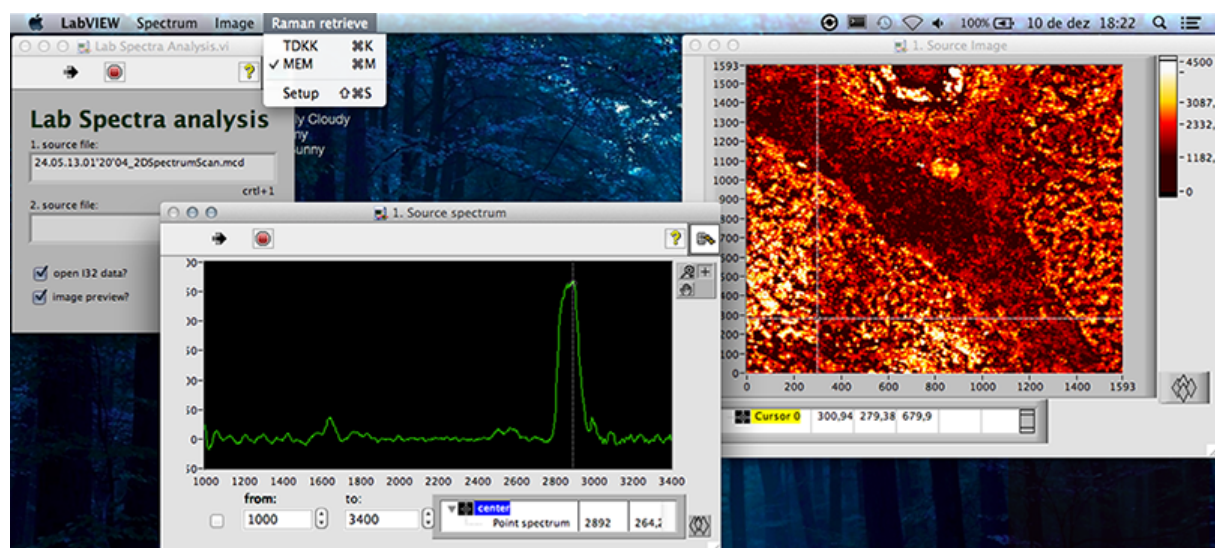


**Fig. 6.3:** (a)-(b) resultados de AFM para nanotubos de carbono individuais e (c) para nanotubos de  $Ta_2O_5$ .

nanotubos de carbono (Figs. 6.3a-b) e de  $Ta_2O_5$  (Fig. 6.3c). As amostras de nanotubos de  $Ta_2O_5$  foram cedidas pelo Prof. Sérgio Ribeiro Teixeira (UFRGS), que tem interesse em investigar a fotocatalise induzida em meio aquoso. Contudo as medidas nesse tipo de amostra não foram bem sucedidas porque os nanotubos foram arrastados pela nanoponteira durante a varredura devido a baixa aderência ao substrato. Desta maneira, o que vemos na Fig. 6.3c representa uma parte de um nanotubos medido antes de o mesmo ser arrastado.

## Software para aplicação do MME

Durante a minha participação junto ao laboratório alemão da Universidade de Heidelberg, trabalhei no melhoramento de um programa para a aplicação do MME em medidas de CARS multiplexado. Até então, o software que executava o MME baseava-se em um procedimento proposto pelo Finlandês Erik M. Vartiainen em 1992 [42]. Contudo, o mesmo autor propôs uma alteração conceitual no procedimento em 2006, que leva a resultados consideravelmente melhores [44]. Sendo assim, eu reconstruí o software que aplicava o MME (ambiente LabVIEW) considerando as alteração propostas no trabalho de 2006, além de adicionar algumas ferramentas de análise como filtros e médias. Uma visualização da interface gráfica do programa desenvolvido está representada na Fig. 6.4. Os três painéis nesta figura (da esquerda para a direita) têm como função: 1) carregar os dados medidos por Microscopia CARS multiplexado (matriz hiperespectral), 2) selecionar o comprimento



**Fig. 6.4:** Interface gráfica do programa, em ambiente LabVIEW, que converte a matriz hiperespectral CARS utilizando o MME.

de onda no espectro e 3) exibir a imagem relativa ao comprimento de onda selecionado. As configurações do MME são definidas através de um quarto painel, como o que está representado na Fig. 2.1.

## Participação em outros Trabalhos

Por fim, colaborei junto a outros pesquisadores em dois trabalhos que não estão diretamente relacionados ao tema desta tese. O primeiro trabalho (já publicado) se intitula "*Chemical imaging of lignocellulosic biomass by CARS microscopy*"[33]. Neste trabalho eu colaborei na investigação, por microscopia CARS multiplexado, de amostras de celulose frente à variação da polarização do feixe de excitação. Além disso, eu realizei a análise de todos os dados medidos utilizando o MME atualizado. O segundo trabalho que participei como coautor, trata-se da investigação de amostras de tecido cerebral de rato, intitulado "*MCARS-microspectroscopy of brain tissue with higher ranking data classification for biomedical imaging*"(em submissão), que diferencia-se pela aplicação de uma técnica de classificação de vetores espectrais diferente da PCA. Neste trabalho, realizei parte da análise dos dados medidos além de aplicar o MME atualizado através do novo software desenvolvido.





## Capítulo 7

# Conclusão

Acreditamos que os resultados apresentados neste trabalho contribuem para a consolidação da microscopia CARS multiplexada como um técnica de espectroscopia vibracional para o estudo de sistemas diversos. Apresentamos suas vantagens sobre as técnicas convencionais e também como contornar a sua maior desvantagem relacionada à contribuição não ressonante.

Os estudos realizados com nanotubos de carbono revelaram um procedimento capaz de caracterizar a pureza de uma distribuição. Essa abordagem pode ser utilizada para identificar a presença de defeitos sobre a rede de grafeno e auxiliar em diversas aplicações, como na funcionalização de nanotubos de carbono e a utilização deles como marcador biológico. Se considerarmos que o mesmo procedimento pode ser realizado utilizando a microscopia em escala nanométrica, através da espectroscopia de campo próximo, podemos realizar a caracterização de impurezas sobre um nanotubo de carbono isolado. Esta abordagem revelaria informação importante sobre o comportamento eletrônico, auxiliando na construção de dispositivos em escala nanométrica.

O trabalho sobre o armazenamento de dados utilizando o deslocamento do modo Raman apresenta uma prova de conceito de um procedimento que requer muita investigação antes de se tornar uma aplicação real. Assim como no trabalho anterior, a extensão da técnica de CARS multiplexado para a escala nanométrica promete resultados interessantes, como o aumento considerável da densidade de armazenamento de dados. Além disso, a busca por outros materiais, com propriedades ideais para de deslocamento Raman induzido a laser, pode aumentar as chances de uma real aplicação do princípio estabelecido nesta tese.

A aplicação da microscopia CARS multiplexada para determinação de regiões de tumor

em tecido cerebral de rato se mostrou bem sucedida. A técnica pode ser utilizada para um diagnóstico mais preciso ao determinar as bordas entre o tecido normal e o tumor. Comprovamos que a avaliação espectral completa deste tipo de tecido, através do sinal CARS, depende da recuperação do espectro vibracional utilizando ferramentas de análise pós medida. Os resultados deste trabalho sugerem que a técnica seja aplicada em outros sistemas biológicos.

CARS multiplexado não figura como uma técnica indispensável e sua aplicabilidade está condicionada ao tipo de amostra a ser investigada. A sua maior vantagem reside no tempo de aquisição reduzido, devido a excitação simultânea de diversos modos Raman, e a capacidade de evitar a superposição do sinal vibracional com o sinal de fluorescência. Porém, amostras como os nanotubos de carbono, que apresentam um sinal intenso de Raman espontâneo, não exigem uma técnica coerente como CARS. De fato, os trabalhos apresentados nesta tese sobre investigação de NCPU poderiam também ter sido realizado com um experimento de Raman convencional. No entanto, a análise de tecido cerebral de rato e a detecção de modos na região de impressão digital não poderiam ser observados por microscopia Raman convencional, devido à baixa intensidade do sinal e a superposição com a fluorescência da amostra.

Ainda existem algumas melhorias que podem ser propostas ao experimento de CARS multiplexado. Um balanço mais equilibrado da potência do feixe de Stokes (super contínuo) em relação ao feixe de bombeamento pode aumentar a intensidade do sinal CARS gerado, sem o aumento da potência média incidente. Com isso, poderíamos reduzir o tempo de integração ponto a ponto aumentando o tempo total de varredura. Os demais trabalhos, ainda em fase de desenvolvimento, seguem no sentido de unir a espectroscopia vibracional com a amplificação de campo próximo excitado por laser na extremidade de uma nanoponteira metálica. Apesar dessa união não ser inédita, a nano-ótica representa um campo de pesquisa recente, promissor e ainda pouco explorado.

# Agradecimentos

Agradeço a todos os que tomaram parte deste trabalho direta ou indiretamente. Em especial aos meus orientadores Ricardo Rego Bordalo Correia e Tiago Buckup que conduziram este trabalho de maneira brilhante e instrutiva. A todos os meus amigos, em especial aos membros do "*poleiro*". Aos amigos/colaboradores Roberto Moreno Souza dos Reis e Júlio Ricardo Schoffen que contribuíram com seus resultados. Aos meu pais, Marli C. Soares Duarte e Paulo Roberto M. Duarte, pelo apoio eterno. E, especialmente, à minha amada esposa Maria Mercedes Salgueiro P. Duarte pelo suporte incondicional.



# Referências Bibliográficas

- [1] S. Akkas, M. Severcan, O. Yilmaz, and F. Severcan. Effects of lipoic acid supplementation on rat brain tissue: An FTIR spectroscopic and neural network study. *Food Chemistry*, 105(3):1281–1288, 2007.
- [2] N. Amharref, A. Beljebbar, S. Dukic, L. Venteo, L. Schneider, M. Pluot, and M. Manfait. Discriminating healthy from tumor and necrosis tissue in rat brain tissue samples by Raman spectral imaging. *Biochimica et biophysica acta*, 1768(10):2605–15, Oct. 2007.
- [3] P. Araujo, A. Jorio, M. Dresselhaus, K. Sato, and R. Saito. Diameter Dependence of the Dielectric Constant for the Excitonic Transition Energy of Single-Wall Carbon Nanotubes. *Physical Review Letters*, 103(14):146802, Sept. 2009.
- [4] R. H. Baughman, A. Zakhidov, and W. Heer. Carbon nanotubes—the route toward applications. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5582):787–92, Aug. 2002.
- [5] R. W. Boyd. *Nonlinear optics*. Elsevier Science, second edition, 1992.
- [6] M. J. Bronikowski, P. a. Willis, D. T. Colbert, K. a. Smith, and R. E. Smalley. Gas-phase production of carbon single-walled nanotubes from carbon monoxide via the HiPco process: A parametric study. *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, 19(4):1800, 2001.
- [7] J. P. Burg. *Maximum Entropy Spectral Analysis*. PhD thesis, Stanford University, 1975.
- [8] J.-X. Cheng, A. Volkmer, and X. S. Xie. Theoretical and experimental characterization

- of coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Journal of the Optical Society of America B*, 19:1363, 2002.
- [9] M. T. Cicerone, K. a. Aamer, Y. J. Lee, and E. Vartiainen. Maximum entropy and time-domain Kramers-Kronig phase retrieval approaches are functionally equivalent for CARS microspectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, 43(5):637–643, May 2012.
- [10] P. Corio, P. S. Santos, M. A. Pimenta, and M. S. Dresselhaus. Evolution of the molecular structure of metallic and semiconducting carbon nanotubes under laser irradiation. *Chemical Physics Letters*, 360(5-6):557–564, 2002.
- [11] J. P. R. Day, K. F. Domke, G. Rago, H. Kano, H.-o. Hamaguchi, E. M. Vartiainen, and M. Bonn. Quantitative coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy. *The journal of physical chemistry. B*, 115(24):7713–25, June 2011.
- [12] R. a. DiLeo, B. J. Landi, and R. P. Raffaele. Purity assessment of multiwalled carbon nanotubes by Raman spectroscopy. *Journal of Applied Physics*, 101(6):064307, 2007.
- [13] A. S. Duarte, J. Rehbinder, R. R. B. Correia, T. Buckup, and M. Motzkus. Mapping impurity of single-walled carbon nanotubes in bulk samples with multiplex coherent anti-stokes Raman microscopy. *Nano letters*, 13(2):697–702, Feb. 2013.
- [14] X. Feng, S. Irle, H. Witek, K. Morokuma, R. Vidic, and E. Borguet. Sensitivity of ammonia interaction with single-walled carbon nanotube bundles to the presence of defect sites and functionalities. *Journal of the American Chemical Society*, 127(30):10533–10538, 2005.
- [15] A. C. Ferrari and J. Robertson. Raman spectroscopy of amorphous, nanostructured, diamond-like carbon, and nanodiamond. *Philosophical Transactions of the Royal Society a-Mathematical Physical and Engineering Sciences*, 362(1824):2477–2512, 2004.
- [16] C. W. Freudiger, W. Min, B. G. Saar, S. Lu, G. R. Holtom, C. He, J. C. Tsai, J. X. Kang, and X. S. Xie. Label-free biomedical imaging with high sensitivity by stimulated Raman scattering microscopy. *Science (New York, N.Y.)*, 322(5909):1857–61, Dec. 2008.

- [17] C. W. Freudiger, R. Pfannl, D. a. Orringer, B. G. Saar, M. Ji, Q. Zeng, L. Ottoboni, W. Ying, C. Waeber, J. R. Sims, P. L. De Jager, O. Sagher, M. a. Philbert, X. Xu, S. Kesari, X. S. Xie, and G. S. Young. Multicolored stain-free histopathology with coherent Raman imaging. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 92(10):1492–502, Oct. 2012.
- [18] K. Furusawa, N. Hayazawa, F. C. Catalan, T. Okamoto, and S. Kawata. Tip-enhanced broadband CARS spectroscopy and imaging using a photonic crystal fiber based broadband light source. *Journal of Raman Spectroscopy*, (November 2011):n/a–n/a, Mar. 2012.
- [19] R. Galli, O. Uckermann, M. J. Winterhalder, K. H. Sitoci-Ficici, K. D. Geiger, E. Koch, G. Schackert, A. Zumbusch, G. Steiner, and M. Kirsch. Vibrational spectroscopic imaging and multiphoton microscopy of spinal cord injury. *Analytical chemistry*, 84(20):8707–14, Oct. 2012.
- [20] V. M. Irurzun, M. P. Ruiz, and D. E. Resasco. Raman intensity measurements of single-walled carbon nanotube suspensions as a quantitative technique to assess purity. *Carbon*, 48(10):2873–2881, Aug. 2010.
- [21] R. Jansen and P. Wallis. Manufacturing , Characterization and Use of Single Walled Carbon Nanotubes Structure of Carbon Nanotubes Unique Properties of Single Walled Carbon Nanotubes Mechanical The Challenges of Single Walled Carbon Nanotubes ( SWNTs ). *Material Matters*, 4.1:23, 1991.
- [22] H. Kim, T. Sheps, P. G. Collins, and E. O. Potma. Nonlinear optical imaging of individual carbon nanotubes with four-wave-mixing microscopy. *Nano letters*, 9(8):2991–5, Aug. 2009.
- [23] Y. Lee, D. Moon, K. Migler, and M. Cicerone. Quantitative Image Analysis of Broadband CARS Hyperspectral Images of Polymer Blends. *Analytical chemistry*, pages 2733–2739, 2011.
- [24] R. S. Lim, J. L. Suhaim, S. Miyazaki-Anzai, M. Miyazaki, M. Levi, E. O. Potma, and B. J. Tromberg. Identification of cholesterol crystals in plaques of atherosclerotic

- mice using hyperspectral CARS imaging. *Journal of lipid research*, 52(12):2177–86, Dec. 2011.
- [25] Y. Liu, Y. J. Lee, and M. T. Cicerone. Broadband CARS spectral phase retrieval using a time-domain Kramers–Kronig transform. *Optics letters*, 34(9):1363–1365, 2009.
- [26] E. R. Meinders. *Optical data storage : phase-change media and recording*. Number 4. Springer, Dordrecht, 2006.
- [27] S. Mukamel. *Principles of nonlinear optical spectroscopy*. Oxford University Press, first edition, 1995.
- [28] M. Müller and A. Zumbusch. Coherent anti-Stokes Raman Scattering Microscopy. *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry*, 8(15):2156–70, Oct. 2007.
- [29] P. Nandakumar, a. Kovalev, and a. Volkmer. Vibrational imaging based on stimulated Raman scattering microscopy. *New Journal of Physics*, 11(3):033026, Mar. 2009.
- [30] K. Nozaki, A. Shinya, S. Matsuo, Y. Suzaki, T. Segawa, T. Sato, Y. Kawaguchi, R. Takahashi, and M. Notomi. Ultralow-power all-optical RAM based on nanocavities. *Nature Photonics*, 6(4):248–252, 2012.
- [31] C. E. Olson, M. J. R. Previte, and J. T. Fourkas. Efficient and robust multiphoton data storage in molecular glasses and highly crosslinked polymers. *Nature Materials*, 1(4):225–228, 2002.
- [32] S. S. P. Parkin, M. Hayashi, and L. Thomas. Magnetic domain-wall racetrack memory. *Science*, 320(5873):190–194, 2008.
- [33] C. Pohling, C. Brackmann, A. Duarte, T. Buckup, A. Enejder, and M. Motzkus. Chemical imaging of lignocellulosic biomass by CARS microscopy. *Journal of biophotonics*, 7(1-2):126–34, Jan. 2014.



- [34] C. Pohling, T. Buckup, and M. Motzkus. Hyperspectral data processing for chemoselective multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy of unknown samples. *Journal of biomedical optics*, 16:21105, 2011.
- [35] C. Pohling, T. Buckup, A. Pagenstecher, and M. Motzkus. Chemoselective imaging of mouse brain tissue via multiplex CARS microscopy. *Biomedical optics express*, 2(8):2110–6, Aug. 2011.
- [36] N. R. Raravikar, P. Keblinski, A. M. Rao, M. S. Dresselhaus, L. S. Schadler, and P. M. Ajayan. Temperature dependence of radial breathing mode Raman frequency of single-walled carbon nanotubes. *Physical Review B*, 66(23):235424, 2002.
- [37] J. A. Robinson, E. S. Snow, S. C. Badescu, T. L. Reinecke, and F. K. Perkins. Role of defects in single-walled carbon nanotube chemical sensors. *Nano Letters*, 6(8):1747–1751, 2006.
- [38] C. Ropers, D. Solli, C. Schulz, C. Lienau, and T. Elsaesser. Localized multiphoton emission of femtosecond electron pulses from metal nanotips. *Physical review letters*, 98(4):43907, 2007.
- [39] R. Saito, M. Hofmann, G. Dresselhaus, A. Jorio, and M. S. Dresselhaus. Raman spectroscopy of graphene and carbon nanotubes. *Advances in Physics*, 60(3):413–550, June 2011.
- [40] L. Stobinski, B. Lesiak, L. Kövér, J. Tóth, S. Biniak, G. Trykowski, and J. Judek. Multiwall carbon nanotubes purification and oxidation by nitric acid studied by the FTIR and electron spectroscopy methods. *Journal of Alloys and Compounds*, 501(1):77–84, 2010.
- [41] R. Sutherland, D. McLean, and S. Kirkpatrick. *Handbook of nonlinear optics*. Marcel Dekker, Inc., New York - Basel, second edition, 2003.
- [42] E. M. Vartiainen. Phase retrieval approach for coherent anti-Stokes Raman scattering spectrum analysis. *Journal of the Optical Society of America B*, 9(8):1209, Aug. 1992.

- [43] E. M. Vartiainen, H. Kishida, and T. Koda. Phase retrieval in nonlinear optical spectroscopy by the maximum-entropy method : an application to the  $|X(3)|^2$  spectra of polysilane. 13(10):2106–2114, 1996.
- [44] E. M. Vartiainen, H. a. Rinia, M. Müller, and M. Bonn. Direct extraction of Raman line-shapes from congested CARS spectra. *Optics express*, 14(8):3622–30, Apr. 2006.
- [45] B. von Vacano, T. Buckup, and M. Motzkus. In situ broadband pulse compression for multiphoton microscopy using a shaper-assisted collinear SPIDER. *Optics Letters*, 31(8):1154, 2006.
- [46] B. von Vacano, T. Buckup, and M. Motzkus. Shaper-assisted collinear SPIDER: fast and simple broadband pulse compression in nonlinear microscopy. *Journal of the Optical Society of America B*, 24(5):1091, 2007.
- [47] K. Yanagi, Y. Miyata, and H. Kataura. Highly Stabilized  $\beta$ -Carotene in Carbon Nanotubes. *Advanced Materials*, 18(4):437–441, Feb. 2006.
- [48] C. Zavaleta, A. de la Zerda, Z. Liu, S. Keren, Z. Cheng, M. Schipper, X. Chen, H. Dai, and S. S. Gambhir. Noninvasive Raman spectroscopy in living mice for evaluation of tumor targeting with carbon nanotubes. *Nano letters*, 8(9):2800–5, Sept. 2008.
- [49] Y.-B. Zhang, M. Kanungo, A. J. Ho, P. Freimuth, D. van der Lelie, M. Chen, S. M. Khamis, S. S. Datta, a. T. C. Johnson, J. a. Misewich, and S. S. Wong. Functionalized carbon nanotubes for detecting viral proteins. *Nano letters*, 7(10):3086–91, Oct. 2007.