UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

JORGE AUGUSTO COURA GOMES

Desenvolvimento de uma microscopia óptica não linear por rotação da
polarização elíptica

São Carlos
2016

JORGE AUGUSTO COURA GOMES

Desenvolvimento de uma microscopia óptica não linear por rotação da
polarização elíptica

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Física do Instituto de
Física de São Carlos da Universidade de
São Paulo, para a obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Lino Misoguti

VERSÃO CORRIGIDA

(Versão original disponível na unidade que aloja o programa)

São Carlos
2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica revisada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Gomes, Jorge Augusto Coura
Desenvolvimento de uma microscopia óptica não
linear por rotação da polarização elíptica / Jorge
Augusto Coura Gomes; orientador Lino Misoguti -
versão corrigida -- São Carlos, 2016.
66 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em
Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São
Carlos, Universidade de São Paulo, 2016.

1. Óptica não linear. 2. Rotação não linear da
polarização elíptica. 3. Laser. 4. Microscopia. I.
Misoguti, Lino, orient. II. Título.

À minha família, em especial,
a minha avó Maria Costa Coura – Cristina (in memoriam)
e Maria Josefa da Conceição – Dudu (in memoriam)
por terem me ensinado o que é o verdadeiro sentido do AMOR.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me proporcionou ser o que sou diante de todas as dificuldades e resignação para nunca desistir diante dos obstáculos e me fazer conhecedor de que não importa o tamanho da montanha, pois ela nunca poderá tampar o sol.

A minha mãe Glória Cele Coura Gomes, heroína que me deu apoio, incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço.

Meu pai Valdez Juval Rocha Gomes, que apesar de todas as dificuldades me fortaleceu e que para mim foi muito importante.

Aos meus irmãos Danilo José Coura Gomes, Valdez Juval Rocha Gomes Filho e ao meu querido sobrinho Danilo Manoel que sempre torceram pelo meu crescimento profissional e que sempre fizeram entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente.

Ao Prof. Dr. Lino Misoguti pela atenção e apoio durante o processo de definição e orientação, bem como pela oportunidade de realizar o mestrado contribuindo para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Instituto de Física de São Carlos, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

A todos (amigos e professores) do grupo Fotônica.

Agradeço a todos os professores por me proporcionarem o conhecimento no processo da formação profissional, não somente por terem me ensinado, mas por terem me feito aprender.

A CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa), pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio durante o curso de mestrado, contribuindo para a finalização de uma importante etapa da minha vida.

Meu muito obrigado a Maria Socorro Coura (tia Coca), Maria Helena Coura (tia Lena), tia Tânia Coura, Guiomar coura (in memoriam) e Antônio Carlos Coura (tio “Toim”) por fazerem parte de minha formação.

A D. Rejane pelo ajuda e conselhos.

D. Judite pelos conselhos de mãe, e também os seus filhos e meus amigos Antônio Júnior e Alisson Lutiele pela amizade verdadeira.

A “turma do Jafre” pelas brincadeiras.

Ao Samuel (chegado) pela amizade.

À minha namorada, Rafaela Moura, pelo incentivo, compreensão e encorajamento, durante todo este período.

Aos meus amigos da Química (UNESP) de Araraquara, Massao Ionachiro, bem como seus orientandos, André Carneiro, Flávio Caires (Boi), Francisco Campos (Chicão), José Augusto (Zezão), Tiago André Colman (Tiagão) e Wilhan.

Aos meus grandes amigos do Residencial Parque Atacama, Aline Cristina (Nina), Daniele Bonifácio (Dani), Flávio Novas, Leandro Augusto, Leandra Bonifácio (Lêlê), Sérgio Monteiro (Juca).

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

“Existem duas coisas infinitas: o Universo e a tolice dos homens, mas não estou certo sobre o Universo.”

Albert Einstein

RESUMO

GOMES, J. A. C. *Desenvolvimento de uma microscopia óptica não linear por rotação da polarização elíptica*. 2016. 66 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

O uso de processos ópticos não lineares é um dos recursos utilizados na microscopia óptica para a obtenção de imagens tridimensionais (3D), sem destruição, de objetos transparentes. A obtenção de imagens em 3D é um recurso muito importante por permitir uma visualização de objetos com estruturas internas complexas. Existem vários processos ópticos não lineares que são usados em microscopia; por exemplo, geração de segundo harmônico, geração de terceiro harmônico, absorção de dois fótons, fluorescência induzida por absorção de dois fótons, etc. cada qual com suas características próprias, vantagens e desvantagens, etc. Um efeito não linear refrativo de grande importância é a rotação não linear da polarização elíptica (RNLPE), que é uma não linearidade tipo Kerr semelhante ao efeito de auto focalização. Através da RNLPE, é possível determinar a magnitude absoluta da não linearidade local, e com esta característica é possível o desenvolvimento de uma microscopia ainda nunca utilizada. O sinal da RNLPE não é regularmente utilizado para microscopia em parte devido à dificuldade de sua medida. No entanto, recentemente foi desenvolvida uma nova maneira, de determinação precisa e simples da RNLPE com o uso de um polarizador girante e um amplificador sensível à fase dupla. Dessa forma, neste trabalho propomos a prova de conceito de um microscópio simples utilizando o sinal de RNLPE. Implementamos um microscópio óptico baseado na medida da RNLPE utilizando um polarizador girante, um amplificador sensível à fase dupla, componentes de baixo custo e um sistema laser de femtossegundo. Obtivemos imagens de capilares de vidros, esferas de vidros, fibras ópticas e células de cebola com sucesso.

Palavras-chave: Óptica não linear. Rotação não linear da polarização elíptica. Laser. Microscopia.

ABSTRACT

GOMES, J. A. C. *Development of a nonlinear optical microscopy by elliptical polarization rotation*. 2016. 66 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

The use of nonlinear optical processes is one approach used in the optical microscopy, to obtain three-dimensional (3D) images, without destruction, of transparent objects. The acquisition of 3D images is an important resource to allow better visualization of those objects with internal complex structures. Various nonlinear optical processes are used in microscopy; for example, second-harmonic generation, third-harmonic generation, two-photon absorption, fluorescence induced by two-photon absorption, etc. which one with particular characteristics, advantage and disadvantage, etc. An interesting refractive nonlinearity, the nonlinear elliptical polarization rotation (NEPR) which is a Kerr nonlinearity similar to self focusing. Through NEPR, it is possible to determine the absolute magnitude of nonlinearity location, and this feature is possible to develop even never used microscopy. The NEPR signal is not regularly used for microscopy due to its difficult measurement. However, recently a new accurate and simple method of measurement NEPR was developed with use of rotating polarizer and a dual-phase lock-in amplifier. In this way, in this work we propose a proof of concept of one simple microscopy using the NEPR signal. We assembled a optical microscopy based on NEPR measurement using a rotating polarizer, a dual phase lock-in, low cost components, and a femtosecond laser system. We have successfully obtained image of glass capillaries, optical fibers, glass beds and onion cells.

Keywords: Optic nonlinear. Nonlinear rotation of the elliptical polarization. Laser. Microscopy.

Lista de Figuras

Figura 1 – Princípio de funcionamento da geometria confocal para a discriminação da profundidade. A1 e A2 são as aberturas conjugadas com as lentes L1 e L2, respectivamente. O plano do objeto fora do plano focal do sistema (tracejada) não é detectado.....	20
Figura 2 – Diagrama esquemático comparando uma fluorescência induzida por absorção linear e multifotônica.....	21
Figura 3 – Diagrama esquemático por FIA2F.....	22
Figura 4 – O laser de Ti:safira gera comprimentos de onda no IV (~700-1000 nm), possibilitando a excitação de dois fótons da região UV e região visível (~350-500nm).....	23
Figura 5 – (a) Diagrama de GSH; (b) diagrama de níveis de energia de GSH.....	24
Figura 6 – Diagrama de níveis de energia de GTH.....	26
Figura 7 – Sistema mecânico desenvolvido pelo grupo de Fotônica. A referência de “trigger” serve para que tenhamos uma referência para a medida do ângulo de rotação.....	29
Figura 8 – (a) Feixe incidente e transmito modulado pelo polarizador e (b) ângulo θ do eixo rotacionado.....	30
Figura 9 – Diagrama esquemático mostrando a rotação da polarização elíptica do feixe laser causada pela amostra não linear quando a mesma passa pela região focal.....	31
Figura 10 – Figura representando uma onda com polarização elíptica rotacionada de um ângulo (θ) após sua propagação em um meio não linear.....	38
Figura 11 – Diagrama esquemático do sistema experimental que é semelhante à montagem da técnica de varredura-z tradicional. Neste caso, a rotação da polarização elíptica do feixe é determinada pelo uso do <i>lock-in</i> e de um polarizador girante.....	45
Figura 12 – Típico sinal observado num osciloscópio mostrando os pulsos modulados pela rotação do analisador de um feixe com polarização elíptica. O <i>lock-in</i> só detecta a sinal modulado de baixa frequência.....	46

Figura 13 – Varredura de uma lamínula na direção z, para calibração do feixe incidente em uma amostra.....	50
Figura 14 – (a) Cubeta preenchida com acetona e um capilar imerso; (b) como a varredura foi feita em xz a figura é como se estivesse vendo por cima.....	52
Figura 15 – Imagem obtida por RNLPE de um capilar dentro de uma cubeta preenchida com acetona. (a) Plano xz de 2x4 mm de tamanho. (b) Sinal de RNLPE (ângulo) em função da direção z para uma determinada posição x (perto da parte central do capilar).....	53
Figura 16 – (a) Fibra entre duas lamínulas junto com um gel casador de índice de refração; (b) figura em perfil.....	54
Figura 17 – Imagem de uma fibra óptica em um sistema de eixos xyz a partir do sinal da RNLPE, os três planos xy estão distanciados de 50 μm ao longo do eixo z.....	54
Figura 18 – Esferas de vidros em 4 planos xy diferentes espaçados de 50 μm	55
Figura 19 – Não linearidade do gel utilizando a técnica da RNLPE.....	56
Figura 20 – Escala em cores da não linearidade do gel.....	56
Figura 21 – Imagens de células de uma cebola. (a) representa a imagem de células de cebola utilizando a técnica de RNLPE e em (b) temos uma imagem da região correspondente obtida a partir de um microscópio óptico.....	57

SUMÁRIO

1 Introdução.....	17
2 Microscopia óptica.....	19
2.1 Considerações iniciais.....	19
2.2 Microscopia por FIA2F.....	22
2.3 Microscopia por GSH.....	24
2.4 Microscopia por GTH.....	25
3 Microscopia por rotação não linear da polarização elíptica.....	27
3.1 Considerações iniciais.....	27
3.2 Implementação e aperfeiçoamento de um método preciso para a medida da RNLPE.....	28
3.3 Rotação não linear da polarização elíptica.....	31
3.3.1 Equação de ondas.....	31
3.3.2 Determinação do ângulo da RNLPE e mecanismos físicos gerados pela não linearidade de um meio.....	34
3.3.3 Equação da rotação não linear da polarização elíptica (RNLPE).....	40
3.4 RNLPE em amostras grossas.....	44
3.5 Configuração esquemática para microscopia por RNLPE.....	44
4 Resultados de microscopia por RNLPE.....	49
4.1 Calibração do feixe de laser para sua utilização em microscopia.....	49
4.1.1 Varredura em lamínula como método de calibração.....	49
4.1.2 Determinação do z_0 , w_0 e potência.....	50
4.2 Imagens obtidas por RNLPE.....	51
5 Conclusão e perspectivas.....	59
Referências.....	61

Apêndice A.....65

1 Introdução

O microscópio pode ser compreendido como sendo um instrumento para visualizar objetos invisíveis a olho nu. Em grande parte, os avanços tecnológicos nessa área foram motivados pelo desenvolvimento das áreas da biologia e da medicina. A necessidade de entender melhor o micromundo, fez com que microscópios avançados baseados no fenômeno óptico tradicional da refração (reflexão em alguns casos) se desenvolvessem. Além disso, na busca constante de mais aumentos, melhor fidelidade e contraste de imagens e, eventualmente, permitir visualizações tridimensionais, motivaram o desenvolvimento de técnicas alternativas de microscopia baseadas em fluorescência, imagem confocal e em processos multifotônicos (1-5), por exemplo.

A visualização tridimensional é sem dúvida um avanço fantástico para estudar sistemas complexos e multi estruturados, como são os casos de espécies/organismos biológicos. Neste sentido o desenvolvimento da microscopia confocal se tornou um passo muito importante (6), que se baseia na capacidade de resolução de profundidade da técnica confocal. No entanto, um plano de imagem não pode ser visualizado instantaneamente, ou seja, um plano de imagem é obtido ponto a ponto por meio de uma varredura da amostra ou do feixe de luz de visualização.

A visualização de diferentes planos de imagens em diferentes profundidades e posterior reconstrução tridimensional por computador permite a visualização das três dimensões (3D) de um objeto estruturado. Com os avanços tecnológicos, atualmente é possível fazer uma rápida varredura do feixe, por exemplo, com o uso de galvo motores controlados por computadores modernos a fim de obter uma imagem tridimensional complexa com relativa velocidade.

Uma evolução significativa para melhorar a resolução das imagens obtidas por um microscópio confocal tradicional, pode ser obtida com o uso de processos ópticos não lineares. Estes processos ópticos, em que a maioria, são naturalmente processos confocais, ainda estão em fase de expansão e desenvolvimento por se tratar de uma metodologia relativamente nova e exigir o uso de lasers pulsados modernos. Técnicas experimentais de estudo com este tipo de fenômeno estão sempre surgindo, como por exemplo, recentemente foi desenvolvida uma nova

metodologia de determinação precisa e simples da RNLPE com o uso de um polarizador girante e um amplificador sensível à fase (*dual phase lock-in*). (7-8)

Tradicionalmente processos ópticos não lineares como fluorescência induzida por absorção de dois fótons, a geração de segundo e terceiro harmônicos, absorção de dois fótons, etc. são utilizados em microscopia não linear (9-18), no entanto, a medida da RNLPE nunca foi utilizada para este fim. Neste trabalho propomos explorar essa medida e desenvolver essa estratégia em microscopia, uma vez que observamos um bom avanço e uma grande simplificação da medida precisa de RNLPE.

Como veremos nessa dissertação, o uso dessa nova técnica mostraram que a medida da RNLPE, que é um efeito não linear de terceira ordem (19), pode ser um bom sinal de contraste para a microscopia não linear. Foi observado um bom sinal ruído, e uma grande sensibilidade, o que permite em princípio ser explorada para uso em microscopia para obtenção de imagens de estruturas complexas. Como prova de conceito foram obtidas algumas imagens de estruturas interessantes. Foram obtidas imagens de um capilar mergulhado dentro de um líquido, uma fibra óptica, esferas de vidro e de células de cebola, por exemplo.

Esta dissertação está dividida em cinco principais capítulos. O primeiro capítulo é uma introdução que contém sucintos comentários sobre microscopia. O segundo capítulo refere-se à microscopia óptica. Neste tópico foi feita uma breve explicação a respeito da microscopia linear, citando suas principais características e fazendo uma rápida comparação com a microscopia não linear situando as grandes vantagens que esse tipo de microscopia pode fornecer. Em seguida foram citadas e explicadas, de forma sucinta uma vez que não objetivo deste trabalho, os tipos de microscopias não lineares existentes e já trabalhadas por outros autores.

O terceiro capítulo ficou dedicado aos fundamentos teóricos da RNLPE. Foram feitas algumas considerações a respeito deste fenômeno, bem como a explicação de um novo método de medida da rotação da polarização elíptica e o comportamento da RNLPE no regime de amostras grossas e finas.

O capítulo seguinte ficou reservado para apresentação dos resultados experimentais em que algumas imagens utilizando a RNLPE são mostradas.

O último capítulo está reservado para discussões, conclusões e propostas futuras.

2 Microscopia óptica

2.1 Considerações iniciais

Para entender o princípio de funcionamento de um microscópio não linear, devido à semelhança, é interessante fazer uma breve explanação do princípio de obtenção de uma imagem tridimensional pela configuração confocal usando a fluorescência (20), mesmo este sendo um processo óptico linear. Neste caso, é possível obter imagens tridimensionais pela varredura da amostra e construção da imagem ponto a ponto.

Os microscópios confocais tradicionais usam, principalmente, o fenômeno óptico linear da fluorescência induzida por absorção de um fóton. A configuração óptica confocal permite uma visualização localizada e pontual de objetos “transparentes” (ou translúcidos fluorescendo apenas no comprimento de onda utilizado) devido a uma resolução lateral, e também possui uma boa discriminação de profundidade, ou seja, apesar da fluorescência ocorrer num grande volume, ela é coletada em um pequeno ponto específico da amostra, devido uma configuração confocal, e a partir da varredura da amostra ou do feixe de luz, e posterior captura da intensidade da fluorescência, é possível construir a resposta da fluorescência de um objeto na forma tridimensional (Figura 1). Neste caso, a visualização estrutural do objeto está vinculada às diferentes respostas locais (intensidade) de fluorescência do objeto. (6)

Figura 1 - Princípio de funcionamento da geometria confocal para a discriminação da profundidade. A1 e A2 são as aberturas conjugadas com as lentes L1 e L2, respectivamente. O plano do objeto fora do plano focal do sistema (tracejada) não é detectado.

Fonte: Adaptada de Masters (6).

A obtenção de um plano de imagem não pode ser obtida instantaneamente, pois é necessário realizar uma varredura completa na amostra naquele plano focal. Ademais, para se construir tridimensionalmente um objeto, é necessário varrer vários planos em diferentes profundidades onde um programa computacional é necessário para compor a imagem 3D. O inconveniente da não visualização instantânea do objeto é compensado pela riqueza de detalhes que uma visualização em 3D possibilita.

Em grande parte, a evolução do microscópio confocal está atrelada ao desenvolvimento de sistemas de varredura do feixe e de computadores rápidos para a reconstrução de uma imagem. Atualmente os sistemas de varredura do feixe baseado em galvo motores e estágios de translação xyz que são extremamente precisos e rápidos e os computadores portáteis atuais permitem a obtenção de imagens muito rapidamente.

A fluorescência pode ser induzida por luz comum ou por laser. O uso de laser traz muitas vantagens, como por exemplo, a maior intensidade de fluorescência, maior penetração em amostras difusas, melhor colimação do feixe, etc. (6) É importante observar que para o microscópio de fluorescência funcionar é preciso que a amostra possua uma fluorescência própria (autofluorescência), que essa seja dependente da estrutura e posição da amostra, ou senão, é necessário introduzir um cromóforo externo adequado.

Já a microscopia multifotônica tem funcionamento similar à confocal tradicional no que diz respeito à obtenção de imagens, como por exemplo, o sinal é obtido pontualmente, portanto, há a necessidade de varredura da amostra ou do feixe para construção da imagem tridimensional. Dentre as principais vantagens da microscopia multifotônica pode-se citar: melhor resolução devido à melhor discriminação lateral e de profundidade (melhor que o limite de difração); menor possibilidade de dano à amostra, no caso de microscopia por absorção e fluorescência; pode-se obter maior profundidade de medida devido à menor absorção óptica do feixe de bombeio na amostra, uma vez que se trabalha em comprimentos de onda maiores, etc. A excitação multifotônica é naturalmente confocal, a região analisada é no foco do feixe, e localizada devido ao processo ser não linear (Figura 2).

Figura 2 - Diagrama esquemático comparando uma fluorescência induzida por absorção linear e multifotônica.

Fonte: Adaptada de Masters (6).

Como podemos observar na Figura 2, a microscopia multifotônica pode ser obtida a partir da configuração básica de um microscópio confocal. Neste caso, a fonte de excitação deve ser substituída por lasers pulsados especiais que podem induzir uma excitação multifotônica. Como veremos em seguida, vários processos ópticos multifotônicos (ou não lineares) são métodos adequados para ser utilizado em microscopia, por exemplo, pode-se usar a fluorescência induzida por absorção de dois fótons (FIA2F) (9-11), a geração de segundo harmônico (GSH) (9-12), a

geração de terceiro harmônico (GTH) (13-18), a absorção de dois fótons (A2F) (11), etc.

Cada processo óptico não linear traz vantagens e desvantagens e diferentes tipos de informação com relação às estruturas estudadas. Por exemplo, a FIA2F depende muito da distribuição dos cromóforos na estrutura (9), a GTH traz informações com relação às propriedades das interfaces (21), a A2F com relação ao volume. (11) Ademais, há problemas intrínsecos de cada técnica como na GSH e de GTH que depende muito do tipo de amostra quanto à transparência, pois necessita que o meio seja transparente tanto para o feixe fundamental quanto para o seu harmônico.

2.2 Microscopia por FIA2F

O princípio físico da FIA2F consiste na excitação do fluoróforo via absorção de dois fótons. O fluoróforo, no seu estado fundamental, é excitado para um estado “virtual” enquanto a absorção de outro fóton, quase que instantânea, o excita para um estado de maior energia, quando este mesmo fluoróforo decai, para o seu estado fundamental, o mesmo emite uma luz gerando a fluorescência (Figura 3). (10) Os dois fótons absorvidos têm metade da energia e, conseqüentemente, o quase o dobro do comprimento de onda do fóton emitido.

Figura 3 – Diagrama esquemático por FIA2F.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Como o processo por excitação de dois fótons precisa de dois fótons para excitação para cada fóton emitido, a intensidade do sinal gerado será proporcional ao quadrado da intensidade da excitação. (11) Devido a esta dependência quadrática a fluorescência origina-se apenas na região do volume focal, pois é nesta região onde se concentra uma maior quantidade de fótons para interagir com o fluoróforo e induzir a excitação de dois fótons.

O tipo de laser utilizado que induz mais facilmente a absorção de dois fótons é o de Ti:safira (laser pulsado de femtossegundo muito comum) o qual permite controlar o comprimento de onda de ~700-1000 nm proporcionando a excitação de dois fótons do fluoróforo da região UV até a verde do espectro de luz (~350-500 nm) (Figura 4). (9)

Figura 4 – O laser de Ti:safira gera comprimentos de onda no IV (~700-1000 nm), possibilitando a excitação de dois fótons da região UV e região visível (~350-500 nm).

Fonte: Adaptada de Mulligan (9).

A microscopia por FIA2F consiste em produzir imagens pela emissão de fótons ao sair de um estado excitado para outro estado de menor energia (fluorescência). A amostra absorve a luz de uma fonte luminosa (laser), e através da absorção de dois fótons da fonte geradora de luz, o fluoróforo passa para um estado mais excitado, e quando este fluoróforo retorna para um estado de menor energia há uma emissão de luz, e a microscopia por FIA2F utiliza esta luz para produção de imagens. (22-24)

2.3 Microscopia por GSH

A GSH ocorre como resposta do meio devido a um intenso feixe de luz que se propaga em um meio anisotrópico (apresenta susceptibilidade não linear de segunda ordem ($\chi^{(2)}$)). Uma vez que a polarizabilidade de segunda ordem depende do quadrado do campo elétrico, invertendo o sentido do campo elétrico o sentido da polarizabilidade não inverterá, portanto, o tensor desaparece em meios isotrópicos (sendo assim a única forma para seu desaparecimento é que o tensor de segunda ordem seja zero em meios isotrópicos).

Considerando um campo elétrico de frequência fundamental ω incidindo sobre um material anisotrópico, que apresenta não linearidade de segunda ordem, este campo elétrico fundamental induz uma resposta de polarização não linear $P^{(2)}$ na frequência 2ω (segundo harmônico) no material.

Figura 5 – (a) Diagrama de GSH; (b) diagrama de níveis de energia de GSH.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Microscopia por GSH vem ganhando popularidade por ser, biologicamente compatível. Em materiais biológicos onde emissores de GSH são bem organizados em microestruturas cristalinas anisotrópicas, os emissores de diferentes GSH se juntam resultando em um intenso GSH. (12) Alguns exemplos destes materiais biológicos são grânulos de amido de plantas, alguns polissacarídeos, colágeno, músculos estriados e cloroplastos, ou seja, em tecidos que apresentam fibras em geral a GSH aparece com maior intensidade.

Microscopia por GSH surgiu como uma modalidade poderosa para a imagem latente de colágeno fibrilar em uma grande quantidade de tecidos. Devido à sua

origem física subjacente, é altamente sensível à estrutura de fibras de colágeno, e, mais importante, a mudanças que ocorrem em doenças tais como cancro, fibrose e doenças do tecido conjuntivo. (25-28)

A GSH pode ser usada para obter informações estruturais no conjunto de colágeno, através da microscopia, e nos fornecer informações quanto a sua saúde, se estão saudáveis ou não. A microscopia por GSH permitiu o desenvolvimento da investigação básica em biologia e medicina, fornecendo meios quantitativos para o diagnóstico de uma grande variedade de doenças e possuindo grandes aplicações na biomedicina.

2.4 Microscopia por GTH

A GTH é um fenômeno óptico não linear presente em qualquer tipo de material, pois não é limitado por condições de simetria, como acontece no caso da GSH. A técnica de GTH é valiosa para a caracterização de não linearidades cúbicas em materiais ópticos, sendo importante para determinar se um dado material tem potencial para aplicações em dispositivos ópticos como chaves e moduladores rápidos. (13)

A GTH ocorre como resposta do meio devido um intenso feixe de luz que se propaga em um meio material que apresenta susceptibilidade não linear de terceira ordem ($\chi^{(3)}$). Para a GTH, o processo é análogo ao de GSH, sendo que a resposta do meio material é uma polarização não linear $P^{(3)}$ na frequência 3ω (terceiro harmônico) em um material (Figura 6).

Figura 6 - Diagrama de níveis de energia de GTH.

Fonte: Elaborado pelo autor.

No regime de forte focalização, a GTH aparece como um efeito de interface entre dois meios diferentes. Na microscopia por GTH, o terceiro harmônico é gerado no ponto focal do feixe de laser fortemente focalizado. Quando o meio do ponto focal é homogêneo o terceiro harmônico (TH) gerado antes e depois do foco se interfere destrutivamente não gerando o TH “livre”. No entanto quando o meio é heterogêneo, como a interface entre dois meios, o TH é produzido. Assim, heterogeneidades com contraste advindo do parâmetro $\chi^{(3)}$, podem levar ao surgimento do sinal de terceiro harmônico. Portanto, a alta resolução lateral obtida permite a utilização de microscopia em amostras transparentes, técnica que tem sido uma ferramenta extensivamente usada nas ciências biológicas e de materiais. A imagem de microscopia por GTH é feita ponto por ponto, este método permite coletar e detectar regiões em um tempo curto de coleta. (14-18)

3 Microscopia por rotação não linear da polarização elíptica

A RNLPE é um processo óptico não linear que apresenta grande resolução podendo ser aplicada em microscopia. Como veremos a seguir, esse sinal tem grande potencial para uso em microscopia devido à sensibilidade, simplicidade e precisão. Trata-se de um processo similar a A2F (29) com feixe de frequência central (comprimento de onda) única, mas com sensibilidade muito maior, uma vez que se trata de um processo refrativo e não absorutivo, o qual normalmente fornece um sinal de medida maior em meios transparentes.

Neste caso, a configuração confocal pode ser obtida com o uso de duas objetivas alinhadas e posicionadas a duas distâncias focais uma da outra (configuração $2f$) em que a amostra a ser analisada deve se colocada entre essas duas objetivas.

A microscopia por RNLPE consiste na formação de imagens a partir da não linearidade local de determinada amostra. Esta não linearidade local é conseguida a partir da rotação de um feixe elipticamente polarizado e este giro ocorre quando o feixe passa por um meio (amostra) não linear.

A seguir serão apresentadas as principais características, embasamento teórico e a estrutura experimental para explicar a origem do sinal da RNLPE e depois serão apresentadas algumas imagens conseguidas a partir desta técnica.

3.1 Considerações iniciais

A RNLPE é um efeito não linear refrativo que ocorre quando um intenso feixe de laser elipticamente polarizado se propaga ao longo de uma amostra. (30) Estas amostras apresentam susceptibilidade não linear de terceira ordem ($\chi^{(3)}$) e mais especificamente vamos considerar estes meios como sendo isotrópicos.

A susceptibilidade não linear de terceira ordem é representada por um tensor de ordem quatro. Tensor com esta estrutura apresenta 81 componentes, mas em materiais isotrópicos (que é o nosso material de estudo), devido o grau de simetria, ($\chi^{(2)}=0$), esta quantidade de termos reduz a 4 componentes diferentes de zero e 2 elementos livres. Estes dois elementos independentes podem ser escrito na forma de dois coeficientes: A e B . (31)

A razão entre esses dois coeficientes depende da natureza do processo físico que produz a não linearidade. Por exemplo, para orientação molecular, $B/A=6$, efeito eletrônico não ressonante, $B/A=1$, ou para efeitos térmicos, $B/A=0$. Além disso, diferentes técnicas experimentais sob diferentes condições de polarização do laser acessam distintamente esses dois coeficientes. Por exemplo, na técnica de varredura-z, os sinais obtidos com feixe de laser linearmente ou circularmente polarizados dependem dos coeficientes A e B , ou somente do coeficiente A , respectivamente. Por outro lado, o sinal da RNLPE depende somente do coeficiente B . Dessa forma, o estudo da dependência do sinal com o estado de polarização do feixe laser e pelo uso de diferentes técnicas experimentais é possível fazer um estudo mais aprofundado de não linearidades refrativas em geral.

Lasers comerciais que produzem pulsos de femtossegundos (fs) serão utilizados devido à capacidade de induzir facilmente o processo não linear da RNLPE. No procedimento experimental utilizaremos um sistema laser amplificado de Ti:safira que produz pulsos com 150 fs, 0,8 mJ em 775 nm com taxa de repetição de 1 kHz (Clark MXR, Inc, CPA-2000).

3.2 Implementação e aperfeiçoamento de um método preciso para a medida da RNLPE

Para explorar a RNLPE para a microscopia, é necessário a determinação do ângulo de rotação da polarização. Técnicas tradicionais determinam a rotação a partir do uso de um polarizador estacionário que separa as componentes ortogonais de polarizações de um feixe com polarização elíptica. A partir da mudança de intensidade das componentes com polarização ortogonais é possível determinar o estado de polarização do feixe. (32-35) No entanto, esses métodos tradicionais são bastante imprecisos para pequenas mudanças do estado de polarização do feixe de laser. Caso a rotação provocada pelo meio não linear seja bastante significativa é possível utilizar tal método.

Existe uma maneira bastante interessante de se medir o ângulo de rotação da polarização usando um polarizador (analisador) girante e um amplificador sensível à fase dupla (*dual phase lock-in*). (7-8) O princípio de funcionamento da medida se baseia no fato de que é possível medir a mudança do eixo principal de uma polarização elíptica pela fase ao rodar periodicamente um polarizador.

O Polarizador girante (Figura 07), no experimento, tem por função, modular o sinal do feixe elípticamente polarizado. Ele serve para determinar o ângulo físico entre o eixo maior do feixe elípticamente polarizado (com a amostra longe do foco) e o eixo do polarizador. Uma vez determinado este ângulo, o mesmo servirá como uma referência para a medida do ângulo de rotação.

Figura 7 - Sistema mecânico desenvolvido pelo grupo de Fotônica. A referência de "trigger" serve para que tenhamos uma referência para a medida do ângulo de rotação.
Fonte: Elaborado pelo autor.

O sinal de luz transmitida pelo polarizador girante é do tipo cosseno ao quadrado (lei de Malus). O máximo do sinal corresponde quando o eixo do polarizador se encontra na direção do eixo maior da elipse, e caso o eixo maior da elipse mude, devido a um efeito óptico não linear, haverá uma mudança de fase na onda cossenoidal. Em outras palavras, é possível medir uma mudança do eixo da elipse pela mudança de fase do feixe de laser, pois a rotação da polarização elíptica está relacionada com esta mudança de fase entre o feixe incidente e o feixe transmitido (Figura 8).

Figura 8 – (a) Feixe incidente e transmito modulado pelo polarizador e (b) ângulo θ do eixo rotacionado.

Fonte: Adaptada de Miguez. (36)

Como já mencionado, a medida precisa de mudança de fase pode ser feita utilizando um polarizador girante e um *lock-in* de fase dupla. O polarizador girante é utilizado para modular o sinal do feixe de laser. Para melhor polarização de um feixe no infravermelho e leveza, foi utilizado polarizadores de grade de fios (*wire grid polarizer*). Em que, por sua vez, é modulado o sinal com a amostra distante do foco, onde o sinal da RNLPE é desprezível (sinal de referência), e do sinal transmitido (o feixe já transposto a amostra). O *lock-in* é capaz de detectar pequenas variações de fase entre o sinal de referência e o sinal medido. Esse sinal de fase (α é proporcional à θ) é obtido de dois sinais gerados no *lock-in*: o Sinal em Fase X e o Sinal em Quadratura Y em que, $\alpha = \arctg(Y/X)$.

Devido à sensibilidade e precisão dos amplificadores sensíveis à fase comerciais, é possível obter esse sinal de fase e/ou variação de fase com bastante precisão. Portanto, é possível utilizar essa característica para se determinar a mudança do ângulo de polarização de um feixe laser à medida que o feixe passa pelo meio não linear.

Como outros efeitos ópticos não lineares, a rotação da polarização elíptica também depende da intensidade do feixe incidente. Portanto a montagem da técnica varredura-z pode ser usada para indução da rotação em função da posição z da amostra. No foco ($z=0$) a rotação deve ser máxima e longe do foco ($z \gg +z_R$ ou $z \ll -z_R$), onde a intensidade é pequena, não haverá rotação da polarização, ou a rotação poderá ser desprezível (Figura 9).

Figura 9 - Diagrama esquemático mostrando a rotação da polarização elíptica do feixe laser causada pela amostra não linear quando a mesma passa pela região focal.
Fonte: Adaptada de Gomes. (37)

3.3 Rotação não linear da polarização elíptica

Para o melhor entendimento do sinal de RNLPE, nesta secção fazemos as considerações teóricas fundamentais. Por se tratar de um processo óptico não linear ainda pouco explorado para caracterização de materiais, vários conceitos serão explicados em detalhes.

3.3.1 Equação de ondas

Para escrever a equação não linear da interação da luz (laser) com a matéria, é necessário, em primeiro lugar, a utilização das equações de Maxwell:

$$\nabla \cdot \vec{D} = \rho \quad (1.a)$$

$$\nabla \cdot \vec{B} = 0 \quad (1.b)$$

$$\nabla \times \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \quad (1.c)$$

$$\nabla \times \vec{H} = \vec{J} + \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} \quad (1.d)$$

em que: $\vec{E}$ é o campo elétrico, $\vec{H}$ é o campo magnético, $\vec{B}$ é o campo de indução magnética, $\vec{D}$ é o campo de deslocamento elétrico, ρ é a densidade de cargas livres e $\vec{J}$ é a densidade de corrente.

É necessário, também, levar em consideração as relações constitutivas:

$$\vec{D} = \epsilon_0 \vec{E} + \vec{P} \quad (2.a)$$

$$\vec{H} = \frac{\vec{B}}{\mu_0} - \vec{M} \quad (2.b)$$

Em que por sua vez: $\vec{P}$ é a polarização elétrica, como resposta do meio devido à presença de um campo elétrico, e $\vec{M}$ é a magnetização devido a presença de um campo magnético. ϵ_0 e μ_0 são constantes de permissividade elétrica e permeabilidade magnética respectivamente.

Considerando o caso de um meio não magnético ($\vec{M}=0$), e que não temos cargas livres ($\rho=0$), nem correntes livres ($\vec{J}=0$). Substituindo as equações (2.a) e (2.b) em (1.d) e fazendo as alterações necessárias a Equação (1.d) fica:

$$\nabla \times \left(\frac{\vec{B}}{\mu_0} \right) = \frac{\partial(\epsilon_0 \vec{E} + \vec{P})}{\partial t} \quad (3.a)$$

$$\nabla \times \vec{B} = \mu_0 \frac{\partial(\epsilon_0 \vec{E} + \vec{P})}{\partial t} \quad (3.b)$$

Aplicando o rotacional nos dois lados da Equação (3.b), obtemos:

$$\nabla \times (\nabla \times \vec{E}) = \nabla \times \left(-\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \right) \quad (4.a)$$

$$\nabla(\nabla \cdot \vec{E}) - \nabla^2 \vec{E} = -\frac{\partial(\nabla \times \vec{B})}{\partial t} \quad (4.b)$$

substituindo a Equação (3.b) na Equação (4.b) temos:

$$\nabla(\nabla \cdot \vec{E}) - \nabla^2 \vec{E} = - \frac{\partial \left(\mu_0 \frac{\partial(\epsilon_0 \vec{E} + \vec{P})}{\partial t} \right)}{\partial t} \quad (5)$$

Como $\nabla \cdot \vec{E} = 0$ ($\rho=0$), temos que:

$$\nabla^2 \vec{E} - \mu_0 \epsilon_0 \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} = \mu_0 \frac{\partial^2 \vec{P}}{\partial t^2} \quad (6)$$

o lado esquerdo da Equação (6) representa uma onda luminosa se propagando no vácuo, já o lado direito representa a interação da luz com a matéria.

Na óptica não linear, a polarização induzida depende do campo elétrico ($\vec{E}$) de acordo com a equação a seguir:

$$\vec{P} = \epsilon_0 \chi \vec{E} \quad (7)$$

em que χ é a susceptibilidade elétrica do meio. O caráter tensorial da susceptibilidade indica que a polarização e o campo elétrico podem não ser paralelos (meios anisotrópicos).

Em um regime de alta intensidade do campo elétrico, a polarização pode ser escrita:

$$\vec{P} = \vec{P}^1 + \vec{P}^{NL} \quad (8)$$

em que $\vec{P}^1$ é a parte da polarização que depende linearmente do campo elétrico e $\vec{P}^{NL}$ possui uma dependência não linear. Uma vez que:

$$\vec{P}^1 = \epsilon_0 \chi^{(1)} \vec{E} \quad (9.a)$$

$$\vec{P}^{NL} = \epsilon_0 \chi^{(2)} \vec{E} \cdot \vec{E} + \epsilon_0 \chi^{(3)} \vec{E} \cdot \vec{E} \cdot \vec{E} + \dots \quad (9.b)$$

Substituindo a Equação (8) em (6), obtemos:

$$\nabla^2 \vec{E} - \mu_0 \epsilon_0 \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} = \mu_0 \frac{\partial^2 (\epsilon_0 \chi^{(1)} \vec{E} + \vec{P}^{(NL)})}{\partial t^2} \quad (10.a)$$

$$\nabla^2 \vec{E} - \mu_0 \epsilon_0 (1 + \chi^{(1)}) \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} = \mu_0 \frac{\partial^2 \vec{P}^{(NL)}}{\partial t^2} \quad (10.b)$$

Usando as definições que $\frac{1}{c^2} = \mu_0 \epsilon_0$ e $\epsilon^{(1)} = 1 + \chi^{(1)}$, em que $\epsilon^{(1)}$ é a constante dielétrica do meio. Portanto a Equação (10.b) fica:

$$\nabla^2 \vec{E} - \frac{\epsilon^{(1)}}{c^2} \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} = \frac{1}{\epsilon_0 c^2} \frac{\partial^2 \vec{P}^{(NL)}}{\partial t^2} \quad (11)$$

A expressão (11) é conhecida como a equação de ondas para um meio óptico não linear.

3.3.2 Determinação do ângulo da RNLPE e mecanismos físicos gerados pela não linearidade de um meio

Nesse modelo tensorial da refração não linear de terceira ordem, os coeficientes A e B são referentes aos seguintes termos tensoriais da susceptibilidade de terceira ordem:

$$A = 6\chi_{1122} \quad \text{ou} \quad 3\chi_{1122} + 3\chi_{1212} \quad (12)$$

$$B = 6\chi_{1221} \quad (13)$$

Vamos considerar um feixe de laser que se propaga através de um material, cuja polarização não linear pode ser escrita (através dos coeficientes A e B) da seguinte forma: (31)

$$\vec{P}^{NL} = \epsilon_0 A (\vec{E} \cdot \vec{E}^*) \vec{E} + \frac{1}{2} \epsilon_0 B (\vec{E} \cdot \vec{E}) \vec{E}^* \quad (14)$$

O que queremos mostrar é que apenas a luz linearmente ou circularmente polarizada é transmitida através desse meio com o estado de polarização inalterado. Para um feixe com polarização elíptica, quando se propaga através de um material

que apresenta propriedades não lineares, a orientação da elipse gira em função da distância percorrida dentro do material.

O campo elétrico de um feixe com polarização arbitrária propagando-se em uma direção z pode ser escrita como uma combinação de componente circularmente polarizada à esquerda ($\hat{\sigma}_+$) e à direita ($\hat{\sigma}_-$) de acordo com a expressão seguinte:

$$\vec{E} = E_+ \hat{\sigma}_+ + E_- \hat{\sigma}_- \quad (15)$$

Os versores $\hat{\sigma}_+$ e $\hat{\sigma}_-$ podem ser escritos como em função das componentes $\hat{x}$ e $\hat{y}$ através da equação:

$$\hat{\sigma}_\pm = \frac{\hat{x} \pm i\hat{y}}{\sqrt{2}} \quad (16)$$

A partir da equação (16) é possível afirmar que:

$$\hat{\sigma}_\pm^* = \hat{\sigma}_\mp, \quad \hat{\sigma}_\pm \cdot \hat{\sigma}_\pm = 0, \quad \hat{\sigma}_\pm \cdot \hat{\sigma}_\mp = 1 \quad (17)$$

Utilizando as Equações (15), (16) e (17), a Equação (14) fica:

$$\vec{P}^{\text{NL}} = \epsilon_0 A (|E_+|^2 + |E_-|^2) \vec{E} + \epsilon_0 B (E_+ E_-) \vec{E}^* \quad (18)$$

A Equação (18) pode ser escrita em função de suas componentes circulares:

$$\vec{P}^{\text{NL}} = P_+ \hat{\sigma}_+ + P_- \hat{\sigma}_- \quad (19)$$

A polarização ainda pode ser escrita de forma mais compacta, em que introduzimos a susceptibilidade não linear efetiva ($\chi_\pm$):

$$P_\pm = \epsilon_0 \chi_\pm E_\pm \quad (20)$$

em que:

$$\chi_{\pm} = A|E_{\pm}|^2 + (A + B)|E_{\mp}|^2 \quad (21)$$

Substituindo a Equação (20) na equação de ondas para um meio óptico não linear, Equação (11), obtém:

$$\nabla^2 E_{\pm}(z, t) - \frac{\epsilon^{(1)}}{c^2} \frac{\partial^2 E_{\pm}(z, t)}{\partial t^2} = \frac{\chi_{\pm}}{c^2} \frac{\partial^2 E_{\pm}(z, t)}{\partial t^2} \quad (22.a)$$

$$\nabla^2 E_{\pm}(z, t) = \frac{\epsilon_{\pm}^{(eff)}}{c^2} \frac{\partial^2 E_{\pm}(z, t)}{\partial t^2} \quad (22.b)$$

em que:

$$\epsilon_{\pm}^{(eff)} = \epsilon^{(1)} + \chi_{\pm} \quad (23)$$

A Equação (22.b) possui solução de uma onda plana que se propaga em um meio, com velocidade de fase $c/n_{\pm}$, em que $n_{\pm} = \sqrt{\epsilon_{\pm}^{(eff)}}$. Sendo $n_0^2 = \epsilon^{(1)}$, a Equação (23) pode ser reescrita da seguinte forma:

$$n_{\pm}^2 = n_0^2 + \chi_{\pm} = n_0^2 \left\{ 1 + \frac{1}{n_0^2} [A|E_{\pm}|^2 + (A + B)|E_{\mp}|^2] \right\} \quad (24)$$

Usando a condição de que o valor para a correção $n_{\pm}$ é pequeno comparado ao valor de n_0 , podemos reescrever a expressão anterior da seguinte forma mais simplificada:

$$n_{\pm} \approx n_0 + \frac{1}{2n_0} [A|E_{\pm}|^2 + (A + B)|E_{\mp}|^2] \quad (25)$$

De acordo com a Equação (25) observa-se que a componente com polarização a esquerda apresenta velocidade de fase diferente da componente a direita. Uma vez com velocidades de fase diferentes a elipse da polarização da luz gira conforme o feixe se propaga através de um material não linear.

Para determinar qual o valor do ângulo de rotação da elipse, vamos considerar a propagação de uma onda plana, portanto:

$$\vec{E}(z, t) = Ae^{i(kz - \omega t)} \quad (26.a)$$

em que, para $t = 0$:

$$\vec{E}(z, t) = Ae^{i(kz)} \quad (26.b)$$

uma vez que $k = \frac{n\omega}{c}$, obtemos:

$$\vec{E}(z, t) = Ae^{in\omega z / c} \quad (26.c)$$

Partindo da Equação (15) e escrevendo o campo elétrico da onda propagante na forma da Equação (26.c), temos que:

$$\vec{E}(z) = E_+(z)\hat{\sigma}_+ + E_-(z)\hat{\sigma}_- \quad (27)$$

$$\vec{E}(z) = A_+e^{in_+\omega z / c}\hat{\sigma}_+ + A_-e^{in_-\omega z / c}\hat{\sigma}_- \quad (28)$$

$$\vec{E}(z) = (A_+e^{i(1/2)\Delta n\omega z / c}\hat{\sigma}_+ + A_-e^{-i(1/2)\Delta n\omega z / c}\hat{\sigma}_-)e^{i(1/2)(n_++n_-)\omega z / c} \quad (29)$$

em que Δn é dado por:

$$\Delta n = n_+ - n_- \quad (30)$$

De acordo com a Equação (25), temos que:

$$n_+ = n_0 + \frac{1}{2n_0} [A|E_+|^2 + (A+B)|E_-|^2] \quad (31.a)$$

$$n_- = n_0 + \frac{1}{2n_0} [A|E_-|^2 + (A+B)|E_+|^2] \quad (31.b)$$

Portanto a Equação (30) pode ser reescrita da seguinte forma:

$$\Delta n = \frac{B}{2n_0} (|E_-|^2 - |E_+|^2) \quad (32)$$

Podemos introduzir o vetor de propagação (k_m) e o ângulo (θ) de rotação, por:

$$k_m = \frac{1}{2} (n_+ + n_-) \frac{\omega}{c} \quad (33)$$

$$\theta = \frac{1}{2} \Delta n \frac{\omega}{c} z \quad (34)$$

Portanto a Equação (29) pode ser reescrita da seguinte forma:

$$\vec{E}(z) = (A_+ \hat{\sigma}_+ e^{i\theta} + A_- \hat{\sigma}_- e^{-i\theta}) e^{ik_m z} \quad (35)$$

A Equação (33) descreve uma onda cuja polarização elíptica é a mesma da onda incidente, mas com o eixo da elipse rotacionado de um ângulo (θ) (Figura 10).

Figura 10 – Figura representando uma onda com polarização elíptica rotacionado de um ângulo (θ) após sua propagação em um meio não linear.

Fonte: Adaptada de Boyd (31).

Temos dois casos particulares em que não é possível determinar o ângulo de rotação da polarização elíptica: quando a luz incidente está linearmente polarizada ou quando a luz está com polarização circular.

No primeiro caso (luz linearmente polarizada), o feixe incidente não muda a polarização ao atravessar um meio não linear, neste caso temos que $|E|^2 = 2|E_+|^2 = 2|E_-|^2$. Portanto a Equação (25) fica:

$$n = n_0 + \frac{1}{4n_0} [A|E|^2 + (A + B)|E|^2] \quad (36.a)$$

$$n = n_0 + \frac{1}{2n_0} \left(A + \frac{1}{2} B \right) |E|^2 \quad (36.b)$$

portanto a correção do índice de refração é dada por:

$$\delta n_{\text{linear}} = \frac{1}{2n_0} \left(A + \frac{1}{2} B \right) |E|^2 \quad (37)$$

Para o caso da luz circularmente polarizada, somente uma componente prevalece. E neste caso a RNLPE é máxima, porém não é possível determinar a rotação do eixo principal da elipse devido à degenerescência da circunferência. No entanto, um feixe circularmente polarizado sofre uma variação do índice de refração ao se propagar pelo meio. A Equação (25) fica da seguinte forma:

$$n = n_0 + \frac{1}{2n_0} A |E|^2 \quad (38)$$

neste acontecimento a correção do índice de refração é dada por:

$$\delta n_{\text{circular}} = \frac{1}{2n_0} A |E|^2 \quad (39)$$

Então uma maneira de determinar a origem do mecanismo físico que gera a não linearidade é observando a relação do $\delta n_{\text{linear}} / \delta n_{\text{circular}}$:

$$\frac{\delta n_{\text{linear}}}{\delta n_{\text{circular}}} = 1 + \frac{B}{2A} \quad (40)$$

uma vez que se:

$$\frac{\delta n_{\text{linear}}}{\delta n_{\text{circular}}} = 4 \rightarrow \frac{B}{A} = 6 \text{ (orientacional)} \quad (41.a)$$

$$\frac{\delta n_{\text{linear}}}{\delta n_{\text{circular}}} = \frac{3}{2} \rightarrow \frac{B}{A} = 1 \text{ (eletrônico puro não ressonante)} \quad (41.b)$$

$$\frac{\delta n_{\text{linear}}}{\delta n_{\text{circular}}} = 1 \rightarrow \frac{B}{A} = 0 \text{ (térmico, populacional e eletroestricção)} \quad (41.c)$$

Grosso modo, a técnica de varredura-z é sensível a esse δn , ou seja, é possível identificar a origem da não linearidade com medidas de varredura-z com feixe laser com diferentes polarizações. (7)

3.3.3 Equação da rotação não linear da polarização elíptica (RNLPE)

O campo elétrico pode ser escrito em função da intensidade da radiação segundo a seguinte equação: (31)

$$|E|^2 = \frac{I}{2n_0\epsilon_0 c} \quad (42)$$

Para o caso de efeito de rotação da polarização elíptica, o feixe possui uma componente de campo elétrico circularmente polarizado à direita e outra componente de campo elétrico circularmente polarizado à esquerda. Cada uma dessas componentes do feixe propaga-se no meio com velocidade de fase diferente, a diferença de índice de refração por cada uma dessas componentes é dada pela Equação (32).

As amplitudes de cada componente circular relacionam-se com a amplitude do campo elétrico E e com o grau de elipticidade Θ da polarização através da equação que segue: (38)

$$|E_{\pm}|^2 = \frac{(1 \pm \Theta)^2}{2(1 + \Theta^2)} |E|^2 \quad (43)$$

em que $\Theta = \tan \phi$ (ϕ é o ângulo entre o feixe incidente e a lâmina birrefringente de quarto de onda) e representa o grau de elipticidade da polarização do feixe ($\Theta=0$, linear e $\Theta=1$, circular).

Para um feixe incidente com polarização elíptica, o valor do Δn pode ser obtido usando a Equação (32) e a relação entre as amplitudes dos campos com polarização circular e a amplitude total do campo expressa na Equação (43). Substituindo a Equação (43) na Equação (32), obtemos:

$$\Delta n = \frac{B}{n_0} \left[\frac{\Theta}{1+\Theta^2} \right] |E|^2 \quad (44)$$

O ângulo de rotação da polarização elíptica sofrido pelo feixe de laser é dado pela Equação (34). Substituindo a Equação (44) na Equação (34), e utilizando a Equação (42), e usando $z=L$ como espessura do meio e α como ângulo de rotação da elipse após a propagação do feixe, obtém-se:

$$\alpha = \frac{1}{2} \frac{B}{n_0} \left[\frac{\Theta}{1+\Theta^2} \right] |E|^2 \frac{\omega}{c} L \quad (45.a)$$

$$\alpha = \frac{\omega}{c} \left[\frac{\Theta}{1+\Theta^2} \right] \left[\frac{B}{4n_0^2 \epsilon_0 c} \right] LI \quad (45.b)$$

Como $\Theta = \tan \phi = \left(\frac{\sin \phi}{\cos \phi} \right)$, a Equação (45.b) fica:

$$\alpha = \frac{\omega}{c} \left[\frac{\sin (2\phi)}{2} \right] \left[\frac{B}{4n_0^2 \epsilon_0 c} \right] LI \quad (46)$$

A Equação (46) é uma relação utilizando ondas planas, contudo, é utilizado feixe de laser com perfil transversal gaussiano, portanto a intensidade da onda plana deve ser dividida por 2. (34) Então a mudança de fase, ou rotação máxima da polarização, de um feixe gaussiano com intensidade I que se propaga por uma distância z será dado por:

$$\alpha_{\text{máx}} = \frac{\omega}{c} \left[\frac{\sin (2\phi)}{2} \right] \left[\frac{B}{8n_0^2 \epsilon_0 c} \right] LI \quad (47)$$

A rotação não linear da polarização elíptica depende apenas do coeficiente B da não linearidade refrativa. Essa dependência única permite que não haja dúvida

com relação à origem do sinal de rotação da polarização e, portanto, a obtenção precisa dessa rotação é muito importante para o estudo de processos não lineares.

Segundo (31), o índice de refração não linear de um material pode ser escrito da seguinte forma:

$$n_2 = \frac{3}{4} \frac{\chi}{n_0^2 \epsilon_0 c} \quad (48)$$

A susceptibilidade não linear da Equação (48) está relacionada com a componente χ_{1111} . Para materiais isotrópicos, temos que:

$$\chi_{1111} = \chi_{1122} + \chi_{1212} + \chi_{1221} \quad (49.a)$$

A RNLPE depende apenas do coeficiente $B = 6\chi_{1221}$. Multiplicando a equação anterior por 3, obtemos:

$$3\chi_{1111} = \underbrace{3\chi_{1122} + 3\chi_{1212}}_A + \underbrace{3\chi_{1221}}_{B/2} \quad (49.b)$$

Para um processo eletrônico não ressonante ($A=B$). Então a Equação (49.b) fica:

$$\chi_{1111} = \frac{1}{2}B \quad (49.c)$$

A Equação (48) pode ser reescrita da seguinte forma:

$$\frac{n_2}{3} = \frac{B}{8n_0^2 \epsilon_0 c} \quad (50)$$

Substituindo a Equação (50) na Equação (47), obtemos:

$$\alpha_{\text{máx}} = \frac{\omega}{c} \left[\frac{\sin(2\phi)}{2} \right] \left[\frac{n_2}{3} \right] L I \quad (51)$$

Para efeitos mais rápidos que a duração de um pulso, devemos utilizar uma média temporal ($\langle \alpha_{m\acute{a}x} \rangle = \frac{\alpha_{m\acute{a}x}}{\sqrt{2}}$). (39) Em que o ângulo real da rotação da polarização elíptica é metade daquela medida pelo *lock-in* devido a Lei de Malus, então:

$$\langle \alpha_{m\acute{a}x} \rangle_{lock-in} = \frac{\omega}{c} \left[\frac{\sin(2\phi)}{3\sqrt{2}} \right] n_2 L I \quad (52)$$

Através da Equação (52) é possível observar que a medida de rotação do ângulo α depende da frequência angular do feixe (ω), do ângulo entre o feixe incidente e a lâmina de um quarto de onda (ϕ), do tipo de material (n_2), do comprimento da amostra (L) bem como da intensidade do feixe de laser (I).

Uma equação representando o ângulo (α), rotação do feixe elipticamente polarizado, deve-se considerar primeiramente dois tipos de regimes: amostra fina e amostra grossa. O regime de amostra fina ocorre quando a espessura da amostra é menor que o parâmetro confocal do feixe gaussiano (vamos considerar z_R como sendo o intervalo de Rayleigh e $2z_R$ como o parâmetro confocal), já o de amostra grossa ocorre quando sua espessura é maior que este parâmetro.

Para o regime de amostra fina, o ajuste dos dados experimentais é dado por uma Lorentziana (proporcional à irradiação e inversamente proporcional ao quadrado da cintura do feixe) e seu ângulo de rotação em função de z (posição da amostra) pode ser expresso por:

$$\langle \alpha(z) \rangle_{lock-in} = \frac{\langle \alpha_{m\acute{a}x} \rangle}{\left[1 + \left(\frac{z}{z_R} \right)^2 \right]} \quad (53)$$

em que o $\langle \alpha_{m\acute{a}x} \rangle$ é a máxima fase (rotação) alcançada pela polarização elíptica do feixe, definido por ϕ e z_R , o qual está diretamente relacionado com I .

$$\langle \alpha(z) \rangle_{lock-in} = \frac{\frac{\omega}{c} \left[\frac{\sin(2\phi)}{3\sqrt{2}} \right] n_2 L I}{\left[1 + \left(\frac{z}{z_R} \right)^2 \right]} \quad (54)$$

em que, para amostra fina, $L < z_R$.

3.4 RNLPE em amostras grossas

Amostras grossas são materiais que possuem um comprimento maior que o parâmetro confocal ($2z_R$) do feixe de laser. Neste caso, regiões pequenas na amostra podem ser sondadas e, portanto, melhor resolução espacial pode ser adquirida. Além disso, também há um aumento na amplitude do sinal devido à maximização da região de interação da amostra com o laser (intervalo de Rayleigh). (40)

Para amostra grossa, a não linearidade da rotação da polarização elíptica é muito semelhante à absorção de dois fótons utilizando a técnica de varredura-z, portanto as equações são similares: (29)

$$\langle \alpha(z) \rangle_{\text{lock-in}} = \frac{\omega}{c} \left[\frac{\sin(2\phi)}{3\sqrt{2}} \right] n_2 n_0 z_R I \left[\text{tg}^{-1} \left(\frac{z_b}{z_R} \right) - \text{tg}^{-1} \left(\frac{z_a}{z_R} \right) \right] \quad (55)$$

em que: $z_b = z + \frac{L}{2n_0}$ e $z_a = z - \frac{L}{2n_0}$, e a espessura efetiva da amostra passa a ser $n_0 z_R$. Quanto menor z_R , melhor é a resolução possível. No limite de amostra fina ($L \ll n_0 z_R$), a Equação (55) reduz-se a Equação (51). (Apêndice A)

3.5 Configuração esquemática para microscopia por RNLPE

Usando uma montagem parecida da técnica de varredura-z tradicional (39-41), pode-se medir a não linearidade refrativa (coeficiente B) pela determinação da rotação da polarização em função do deslocamento z da amostra. Essa rotação se caracteriza pela mudança da direção do eixo principal da polarização elíptica.

O feixe de luz ao sair do laser (linearmente polarizado) normalmente não tem um modo espacial bem definido, dessa forma, para se obter um modo espacial gaussiano de ordem TEM_{00} , utiliza-se um sistema de filtragem utilizando um telescópio e pinholes adequados. Depois uma lâmina de 1/4 de onda é utilizada para gerar o feixe elípticamente polarizado. Normalmente se utiliza lâminas de onda de ordem zero e acromáticos para uma ampla banda espectral, adequadas para pulsos ultracurtos.

O feixe, já elipticamente polarizado, passa por uma lente objetiva com o intuito de focalizar o feixe na amostra. Então a amostra é transladada ao longo da direção z em torno do ponto focal da lente a fim de variar a intensidade do feixe na amostra. Na posição da região do parâmetro confocal do feixe gaussiano ($-z_R < z < +z_R$), a intensidade do feixe é alta, portanto é onde o efeito não linear acontece. Fora dessa região ($z > z_R$ ou $z < -z_R$) o efeito não linear é baixo e pode ser desconsiderado. Devido a não linearidade do meio, o feixe elipticamente polarizado sofrerá uma rotação. Esta rotação está associada a uma mudança de fase do feixe ao passar pela amostra a qual está sendo transladada nas direções xyz que são controladas através de um programa de computador (LabView).

O movimento da amostra nestas direções é necessário para que toda uma região seja varrida pelo feixe para que posteriormente seja possível a construção de uma imagem através da magnitude da não linearidade local.

Após o feixe passar pela amostra, o mesmo atravessa um polarizador girante, que tem por função modular o sinal do feixe, o qual é transmitido para o *lock-in* de duas fases. Depois o mesmo feixe é coletado em um fotodetector e os dados são colhidos e transferidos para um computador. A seguir está representada uma figura que descreve resumidamente o arranjo experimental (Figura 11).

Figura 11 - Diagrama esquemático do sistema experimental que é semelhante à montagem da técnica de varredura- z tradicional. Neste caso, a rotação da polarização elíptica do feixe é determinada pelo uso do lock-in e de um polarizador girante.

Fonte: Adaptada de Miguez (40).

Para a realização da microscopia, ou em alguma medida da RNLPE, ao fazer girar um polarizador (analisador), uma modulação tipo cosseno pode ser observada no osciloscópio. Em uma volta completa (360°) do analisador, é possível observar um sinal da forma cossenoidal com um total de dois períodos, uma vez que o analisador é degenerado a cada 180 graus. Usamos um motor elétrico para fazer o polarizador girar com frequência constante de forma a se gerar um sinal contínuo (Figura 12), a ser analisado pelo *lock-in*.

Figura 12 - Típico sinal observado num osciloscópio mostrando os pulsos modulados pela rotação do analisador de um feixe com polarização elíptica. O *lock-in* só detecta a sinal modulado de baixa frequência.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para sincronizar o *lock-in*, utiliza-se um sinal tipo TTL gerado pelo polarizador girante. Utilizamos uma pá de *chopper* com duas aberturas e um sensor composto de um emissor e um receptor para detectar a passagem da pá do *chopper* e assim gerar o sinal de referência que fornece a orientação exata do eixo principal do polarizador. Essa pá é fixa ao polarizador de forma que eles girem sincronizadamente.

É importante salientar que a frequência de rotação do polarizador deve ser sempre menor que a taxa de repetição do laser para que em cada ciclo de rotação do analisador se tenha muitos pulsos do laser, de forma que haja uma “envoltória” (Figura 12) de formato cossenoidal que permita a determinação de atraso de fase pelo *lock-in*. Como o *lock-in* é “travado” com o sinal de referência do polarizador girante, usando constantes de tempo adequadas, o *lock-in* só detecta a fase da modulação de baixa frequência. Além disso, a constante de integração do *lock-in* dever ser grande o suficiente para que a taxa de repetição do laser não gere ruído no sinal medido.

Como o polarizador é relativamente grande, o sistema eletromecânico desenvolvido para girá-lo tem um limite de frequência da ordem de 40 Hz, ou seja, é adequado para ser usado com lasers pulsados com frequências bem acima desse valor. Usualmente utilizamos lasers amplificados com taxa de repetição da ordem de 0,5 - 1 kHz o que permite um bom funcionamento da técnica.

4 Resultados de microscopia por RNLPE

4.1 Calibração do feixe de laser para sua utilização em microscopia

A determinação dos parâmetros fundamentais do feixe laser é fundamental para uma correta interpretação das imagens obtidas pelo sinal óptico não linear. Basicamente é necessário saber a intensidade do laser no foco (I_0), a cintura do feixe (w_0) e o parâmetro Rayleigh (z_R). Esses parâmetros permitem, por exemplo, determinar a magnitude absoluta da não linearidade local do meio, evitar dano na amostra, entre outros. Como a técnica de medida de RNLPE utilizando o amplificador *lock-in* de fase dupla e polarizador girante já foi calibrada (7), usamos ela para essa função. Utilizamos como amostra de calibração uma lamínula de microscópio (vidro soda lime), pois sua não linearidade é conhecida e tem uma espessura adequada ($\sim 150 \mu\text{m}$) para as lentes utilizadas no sistema experimental.

4.1.1 Varredura em lamínula como método de calibração

A calibração é feita a partir da caracterização da lamínula de microscópio. Trata-se de uma medida simples em que há apenas um meio não linear a ser caracterizado na condição de amostra grossa. A lamínula sofre uma varredura na direção z e é observado o surgimento do sinal da RNLPE (Figura 13). A intensidade do laser é ajustada até que seja observado um sinal adequado de RNLPE em que não haja nem saturação nem que seja muito pequeno dificultando a análise do sinal. Uma vez obtido o sinal desejado, é possível a determinação das características do feixe de laser como o z_R (consequentemente o w_0), bem como a intensidade do feixe incidente na amostra utilizando a não linearidade da lamínula como referência.

Figura 13 – Varredura de uma lamínula na direção z, para calibração do feixe incidente em uma amostra.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 13 mostra o sinal de RNLPE de uma lamínula em função da posição da amostra, na qual a curva cheia (em vermelho) é o ajuste teórico, representado pela Equação 55, e os pontos são os dados experimentais. A amplitude do sinal está relacionada com a não linearidade do material (ângulo de rotação), enquanto a abertura da mesma, no eixo z (em destaque na Figura 13), se correlaciona com o comprimento L da amostra.

O ângulo de rotação relaciona-se com a não linearidade do material e com sua espessura de acordo com a Equação 55 e cujo gráfico é mostrado na Figura 13.

4.1.2 Determinação do z_R , w_0 e potência

A determinação do z_R do feixe gaussiano é feito a partir do ajuste da curva teórica com a experimental. Uma vez determinado o intervalo de Rayleigh (z_R), é possível a determinação da cintura do feixe (w_0) através da equação que segue: (31)

$$w_0^2 = \frac{z_R \lambda}{\pi n_0} \quad (56)$$

Em que: λ é o comprimento de onda do feixe (775 nm) e n_0 é o índice de refração do ar.

De posse dos valores z_R e w_0 e da Equação 55, é possível determinar a intensidade do feixe gaussiano. Uma vez determinada essa intensidade é possível o cálculo da potência média através da equação seguinte: (42)

$$P = \frac{I_0 \pi^{3/2} W_0^2 \tau T}{4 (\ln 2)^{1/2}} \quad (57)$$

Em que I_0 é a intensidade do feixe, τ tempo de duração do pulso (150 fs) e T é a taxa de repetição (1 kHz) do feixe de laser e para esta medida a potência foi de 3,94 μW . Os medidores de potência convencionais não conseguem fazer esta medida por ser considerada muito pequena e sendo então necessário o seu cálculo.

É importante observar que cada vez em que altera algo no microscópio por RNLPE é necessário fazer a calibração do feixe. Troca da objetiva, alteração do diâmetro do feixe de entrada, mudança de potencia são os principais fatores que modificam os parâmetros do feixe.

4.2 Imagens obtidas por RNLPE

Na microscopia, para se obter uma resolução espacial, é necessário fazer uma focalização forte de forma que a região focal do laser seja pequena o suficiente para resolver uma determinada estrutura complexa. É importante destacar que para a microscopia por RNLPE é necessário fazer um mapeamento local da amostra (ponto a ponto) e assim a imagem é constituída a partir da não linearidade local absoluta da amostra. É bom salientar que apesar da técnica de varredura-z ser a mais utilizada para medir não linearidades refrativas em geral, ela não pode ser usado para microscopia não linear devido o seu efeito de auto focalização.

Como prova de conceito para verificar a possibilidade da utilização da RNLPE em microscopia, foram feitos algumas testes que demonstraram a viabilidade da obtenção de imagens utilizando tal técnica. Iniciamos os testes com amostras relativamente grande e uma vez observado que a técnica funcionava partimos para microscopia em amostras menores (cilíndricas e esféricas) e depois para amostras com estruturas mais complexas como células biológicas (células de cebola).

De início utilizamos uma configuração mais simples em que o objeto a ser caracterizado era um capilar dentro de uma cubeta de quartzo. Utilizamos uma cubeta de 1,2 mm de caminho óptico, preenchida com acetona e com um pequeno capilar de vidro (1,6 mm por 1,2 mm diâmetro externo e interno, respectivamente) dentro dela (Figura 14). Devido às dimensões desse objeto não era necessário utilizar uma lente com foco muito curto. Utilizando uma lente (objetiva 10x) de foco curto ($f \sim 3$ cm, $z_R \sim 0,04$ mm, $w_0 \sim 2,6$ μ m).

Figura 14 – (a) Cubeta preenchida com acetona e um capilar imerso; (b) como a varredura foi feita em xz a figura é como se estivesse vendo por cima.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Neste teste preliminar para demonstrar a possibilidade de obtenção de uma imagem (43), através da movimentação sistemática da amostra ao longo do eixo z (direção de propagação do feixe laser) e x (transversal ao capilar) foi possível fazer um mapeamento da magnitude da não linearidade da amostra, e através de uma escala de cores, em que a região mais escura a não linearidade é maior, foi possível a construção de uma imagem (Figura 15). Usando a montagem proposta na condição de amostra grossa, fez-se várias medidas do ângulo médio de rotação da polarização para o capilar dentro da acetona. Como o melhor sinal ruído é obtido com uma polarização elíptica intermediária, o ângulo de rotação da lâmina de onda, ϕ , foi ajustado em $22,5^\circ$, o que corresponde a uma elipticidade de $\theta \sim 0,414$.

Figura 15 - Imagem obtida por RNLPE de um capilar dentro de uma cubeta preenchida com acetona. (a) Plano xz de 2x4 mm de tamanho. (b) Sinal de RNLPE (ângulo) em função da direção z para uma determinada posição x (perto da parte central do capilar).

Fonte – Elaborado pelo autor.

Como mostra a Figura 15, o contraste da imagem é a magnitude local da rotação da polarização. Quanto maior a não linearidade do meio, maior é a rotação de polarização do feixe de laser. É possível observar o sinal da sílica, $\sim 10^\circ$ (ombro lateral na Figura 15(b)), o sinal da acetona, que é grande, $\sim 40^\circ$. O capilar aparece como um vale de $\sim 25^\circ$ na Figura 15(b), o que é condizente com a não linearidade de um vidro comum. Neste caso foi utilizado uma potência média do laser de $P \sim 50 \mu\text{W}$ (50 nJ por pulso). Apesar da simplicidade do sistema experimental montado, é possível observar claramente a imagem circular do capilar dentro da cubeta. Uma melhor resolução poderá ser obtida com a substituição da objetiva de 10x ($f \sim 3 \text{ cm}$) por objetivas com focos menores. É válido observar que a escolha do foco das objetivas leva em conta a região da amostra a ser analisada e a resolução desejada.

Para verificarmos a eficiência da técnica utilizando objetivas menores (foco curto), fizemos um teste utilizando amostras cilíndricas como, por exemplo, uma fibra óptica. Foi utilizado uma objetiva de 40x, com um comprimento Rayleigh ($z_R \sim 6 \mu\text{m}$) e uma cintura ($w_0 \sim 1 \mu\text{m}$). A fibra óptica foi colocada entre duas lamínulas de microscópio ($\sim 150 \mu\text{m}$ de espessura cada) juntamente com um gel (silicone com propriedades ópticas) para casar o índice de refração (Figura 16).

Figura 16 – (a) Fibra entre duas lamínulas junto com um gel casador de índice de refração;
(b) figura em perfil.
Fonte – Elaborado pelo autor.

Essa amostra foi posicionada próxima de região $2f$ da montagem experimental. A seguir, a amostra foi transladada em três planos xy , distanciados de $50 \mu\text{m}$, com cada plano xy formando um quadrado de dimensões $1 \times 1 \text{ mm}^2$. A fibra possui um diâmetro de $120 \mu\text{m}$, que está de acordo com as dimensões do plano como pode ser observado na Figura 17.

Figura 17 – Imagem de uma fibra óptica em um sistema de eixos xyz a partir do sinal da RNLPE, os três planos xy estão distanciados de $50 \mu\text{m}$ ao longo do eixo z .
Fonte – Elaborado pelo autor.

Ainda utilizando lentes com foco curto (objetiva de 40x), verificamos a viabilidade da técnica em amostras esféricas, tal como microesferas de vidros. A

amostra foi preparada da mesma forma que a da fibra óptica. Colocamos as microesferas entre duas lamínulas juntamente com um gel e neste caso foram varridos quatro planos xy.

Em nossa configuração experimental o intervalo de Rayleigh foi de $z_R \sim 5 \mu\text{m}$ e consequentemente a cintura do feixe (w_0) foi de $\sim 1,11 \mu\text{m}$. A potência do laser utilizada foi $P = 9,82 \mu\text{W}$ (9,82 nJ por pulso), e nesse caso a intensidade do laser foi de $I_0 = 3,18 \times 10^3 \text{ GW/cm}^2$. Para cada posição de z , espaçados de $50 \mu\text{m}$, um plano xy foi obtido (Figura 18).

Figura 18 – Microesferas de vidros em 4 planos xy diferentes espaçados de $50 \mu\text{m}$.
Fonte – Elaborado pelo autor.

Na imagem das microesferas ficamos com dúvidas em algumas regiões. As regiões em vermelho seriam as microesferas ou se as regiões em azul representavam as mesmas? E qual região seria o gel casador de índice de refração (a região em vermelho ou azul)? Para tirar as dúvidas quanto às regiões foi medida a não linearidade do gel utilizando a técnica da RNLPE (Figura 19). Foi colocado o gel entre duas lamínulas e foi feita sua caracterização (medida sua não linearidade).

Figura 19 – Não linearidade do gel utilizando a técnica da RNLPE.
Fonte – Elaborado pelo autor.

Na Figura 19 é possível observar claramente o sinal da não linearidade da lamínula e do gel. A lamínula mostra uma não linearidade em aproximadamente $0,3^\circ$ e o gel em 1° . Como o ângulo de rotação está relacionado com a não linearidade do material (utilizando a técnica RNLPE), podemos concluir que o gel apresenta uma não linearidade maior que a da lamínula. A não linearidade em uma escala de cores pode representada na forma que segue (Figura 20).

Figura 20 – Escala em cores da não linearidade do gel.
Fonte – Elaborado pelo autor.

A partir disto podemos afirmar, sem dúvidas, que as regiões em azul são as microesferas.

Como último teste iniciou-se a obtenção de imagem por RNLPE em amostras que apresentam estruturas mais complexas como células de plantas. Utilizamos uma amostra de cebola, ao qual foi colocada entre duas lamínulas de microscópio. A Figura 21(a) representa uma região retangular da cebola, em dimensões de $150\ \mu\text{m}$ em relação ao eixo x e $300\ \mu\text{m}$ em relação ao eixo y, mostrando a não linearidade

refrativa local utilizando a RNLPE (as regiões claras correspondem às que tiveram maior sinal não linear). A Figura 21(b) mostra a imagem de células da mesma cebola obtida com o auxílio de um microscópio óptico tradicional, e as correspondentes células da Figura 21(a) são as destacadas na Figura 21(b).

Figura 21 – Imagens de células de uma cebola. (a) representa a imagem de células de cebola utilizando a técnica de RNLPE e em (b) temos uma imagem da região correspondente obtida a partir de um microscópio óptico.

Fonte – Elaborado pelo autor.

É possível observar que as regiões que possuem apenas uma camada possuem um melhor sinal da RNLPE, e as regiões com mais de uma camada apresentaram muito ruído dificultando a visibilidade. Neste caso específico, apesar da microscopia óptica linear revelar muito mais detalhes das células de cebola que a microscopia óptica não linear, é preciso lembrar que a microscopia óptica não linear capta outras características da amostra. Como estamos ainda em fase de desenvolvimento e o aparato experimental é bastante simples, é possível prever que muito ainda pode ser feito para o aperfeiçoamento e obtenção de melhores imagens, maiores resoluções, obtenção de imagens mais rapidamente, etc.

5 Conclusão e perspectivas

Neste trabalho propusemos a utilização de uma nova técnica para a medida da RNLPE para microscopia óptica não linear. A RNLPE é uma não linearidade refrativa de terceira ordem que nunca havia sido explorada para microscopia óptica não linear. Apesar de ser uma não linearidade refrativa similar a auto focalização, diferentemente, essa pode ser utilizada para microscopia, pois ela pode ser usada para medir a não linearidade pontual e local de uma amostra e posterior construção de uma imagem bi- ou tridimensional (3D) do objeto. A possibilidade de obtenção de imagens 3D bem como a observação de novos contrastes, são fatores importantes que tem impulsionado o desenvolvimento da microscopia não linear.

Como prova de conceito implementamos um aparato simples para obtenção de imagens por RNLPE. Isso foi possível devido ao desenvolvimento de uma nova metodologia que permite a determinação rápida e precisa do sinal de RNLPE utilizando um polarizador girante e um amplificador *lock-in* de duas fases. Inicialmente fizemos medidas de calibração da técnica no regime de focalização forte necessário para obtenção de imagens microscópicas. Lamínulas de microscopia foram utilizadas como amostras de calibração. Dentre as características dessa nova técnica experimental podemos destacar: feixe e comprimento de onda único, alta sensibilidade, baixo ruído (boa relação sinal/ruído), determinação da não linearidade absoluta do n_2 local da amostra, procedimento experimental simples de ser executada, não adição de cromóforos fluorescente exógenos, entre outras. Lembrando que a microscopia por RNLPE é um método que ainda está em desenvolvimento

Uma vez comprovada que é possível a utilização da RNLPE na condição de focalização forte, procuramos verificar a possibilidade de sua medida para obtenção de imagens. Fizemos imagens de capilares de vidro embebido em acetona, fibras ópticas e micros esferas de vidro embebido em gel casador de índice, e também em células vegetais (células de cebola). Os resultados foram importantes e demonstraram a viabilidade da utilização da medida da RNLPE para microscopia óptica não linear.

Nessa fase de teste foi possível comprovar a viabilidade da obtenção de imagens não lineares usando como contraste o sinal da RNLPE, no entanto, muito ainda poderá ser feito para que a medida da RNLPE possa se tornar uma alternativa

viável frente às outros efeitos não lineares já regularmente utilizados para esse fim com GSH, GTH, A2F e FIA2F, por exemplo. A obtenção de imagens melhores bem como com maior velocidade (aqui se faz o uso do laser em MHz) são importantes para o desenvolvimento de um sistema comercial viável no futuro.

REFERÊNCIAS

- 1 HELMCHEN, F.; DENK, W. Deep tissue two-photon microscopy. **Nature Methods**, v.2, n.12, Dec.2005. doi:10.1038/nmeth818.
- 2 ZIPFEL, W. R.; WILLIAMS, R. M.; CHRISTIE, R.; NIKITIN, A. Y.; HYMAN, B. T.; WEBB W. W. Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. In: SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, 12., 2003. **Proceedings...** V.100, p.7075-7080, 2003.
- 3 BEWERSDORF, J.; PICK, R.; HELL, S. W. Multifocal multiphoton microscopy. **Optics Letters**, v.23, n.9, May.1998. doi:10.1364/OE.23.000655.
- 4 KONIG, K. Multiphoton microscopy in life sciences. **Journal of Microscopy**, v.200, Nov.2000. doi:10.1046/j.1365-2818.2000.00738.
- 5 DUNN, K. W.; YOUNG, P. A. Principles of multiphoton microscopy. **Nephron Experimental Nephrology**, v.103, n.2, Mar.2006. doi:10.1159/000090614.
- 6 MASTERS, B. R. Confocal microscopy and multiphoton excitation microscopy: the genesis of live cell imaging. Washington, USA: **SPIE –The International Society for Optical Engineering**. v.161. 208p., 2006.
- 7 MIGUEZ, M. L.; BARBANO, E. C.; ZILIO, S. C.; MISOGUTI, L. Accurate measurement of nonlinear ellipse rotation using a phase-sensitive method. **Optics Express**, v.22, n.21, Oct.2014. doi:10.1364/OE.22.025530.
- 8 GUEDES, I.; MISOGUTI, L.; BONI L.; ZILIO, S. C. Heterodyne z-scan measurements of slow absorbers. **Journal of Applied Physics**, v.101, n.6, Jan.2007. doi:10.1063/OE.12.713936.
- 9 MULLIGAN S, J.; VICAR, B. A. M. Two-photon Fluorescence microscopy: Basic Principles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.58, n.7, Aug.2006, p.788-808.
- 10 PELEGATI, V. B. **Microscopias de óptica não linear: fluorescência excitada por absorção de dois fótons, geração de segundo harmônico e geração de terceiro harmônico**. 2010. 108f. Dissertação (Mestrado em Física) - Instituto de Física “GlebWataghin”, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.
- 11 CARRILES, R. R.; SCHAFER, D. N.; SHEETZ, K. E.; FIELD J. J.; CISEK, R.; BARZDA, V.; SYLVESTER, A. W.; SQUIER, J. A. Invited review article: imaging techniques for harmonic and multiphoton absorption fluorescence microscopy. **The Review of Scientific Instruments**, v.80, n.8, Jun.2009. doi:10.1063/OE13.184828.
- 12 CHEN, X.; NADIARYNKH, O.; PLOTNIKOV, S.; CAMPAGNOLA, P. J. Second harmonic generation microscopy for quantitative analysis of collagen fibrillar structure. **Nature America**, v.7, n.4, Apr.2012. doi:10.1038/nprot.2012.009.

13 SQUIER, J. A.; MULLER, M. Third-harmonic generation imaging of laser-induced breakdown in glass. **Applied Optics**, v.38, n.27, Mar.2008. doi:10.1364/AO38.005789.

14 YELIN, D.; SILBERBERG, Y. Laser scanning third-harmonic-generation microscopy in biology. **Optics Express**, v.5, n.8, Apr.1999. doi:10.1364/OE.50.00169.

15 CANIONI, L.; RIVET, S.; SARGER L.; BARILLE R.; VACHER, P.; VOISIN P. Imaging of Ca²⁺ intracellular dynamics with a third-harmonic generation microscope. **Optics Letters**, v.26, n.8, 2001. doi:10.1364/OL.26.000515.

16 YELIN, D.; SILBERBERG, Y.; BARAD, Y.; PATEL J. S. Depth-resolved imaging of nematic liquid crystals by third-harmonic microscopy. **Applied Physics Letters**, v.74, n.21, Mar.1999. doi:10.1063/1.124077.

17 DEBARRE, D.; SUPATTO, W.; FARGE, E.; MOULIA, B.; KLEIN, M. C. S.; BEAUREPAIRE E. Velocimetric third-harmonic generation microscopy: micrometer-scale quantification of morphogenetic movements in unstained embryos. **Optics Letters**, v.29, n.24, Dec.2004. doi:10.1364/OL.29.002881.

18 PETZOLD, U.; BÜCHEL, A.; HALFMANN, T. Effects of laser polarization and interface orientation in harmonic generation microscopy. **Optics Express**, v.20, n.4, Dec.2011. doi:10.1364/OE.20.003654.

19 MAKER, P. D.; TERHUNE, R. W. Study of optical effects due to an induced polarization third order in the electric field strength. **Physical Review**, v.148, Feb.1965. doi:http://dx.doi.org/10.1103/PhysRev.137.A801.

20 SPRING K. R. Fluorescence Microscopy. **Encyclopedia of Optical Engineering**, 2003. doi:10.1081/OE.12.0009628.

21 BARBANO, E. C. **Técnica de varredura-Z com pulsos de femtossegundos e geração de terceiro harmônico**. 2012. 95 p. Dissertação (Mestrado em Ciências)– Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

22 DENK, W.; STRICKLER, J. H.; WEBB, W. W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. **Science**, v.248, n.4951, Apr.1990. doi:10.1126/science.2321027.

23 BRAKENHOFF, G. J.; SQUIER, J.; NORRIS, T.; BLITON, A. C.; WADE, M. H.; ATHEY, B. Real-time two-photon confocal microscopy using a femtosecond, amplified Ti:sapphire system. **Journal of Microscopy**, v.181, n.3, Mar.1996. doi:10.1046/j.1365-2818.1996.97379.

24 KIM, K. H.; Buehler, C.; SO, P. T. C. High-speed, two-photon scanning Microscope. **Applied Optics**, v.38, n.28, Oct.1999. doi:10.1364/AO.38.006004.

- 25 CAMPAGNOLA, P.; DONG, C. Y. Second harmonic generation microscopy: principles and applications to disease diagnosis. **Laser Photonics Reviews**, vol.5, n.1, Jan.2001. doi:10.1002/lpor.200910024.
- 26 CAMPAGNOLA, P. Second harmonic generation imaging microscopy: applications to diseases diagnostics. **Analytical Chemistry**, vol.83, n.9, Mar.2011. doi:10.1021/ac1032325.
- 27 COX, G.; KABLE, E.; JONES, A.; FRASER, A.; MANCONI, F.; GORRELL, M. D. 3-dimensional imaging of collagen using second harmonic generation. **Journal of Structural Biology**, v.141, n.1, Jan.2003. doi:10.1016/S1047-8477(02)00576-2.
- 28 ZOUMI, A.; YEH, A.; TROMBERG, B. J. Imaging cells and extracellular matrix in vivo by using second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence. In: NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, 17., 2002, Irvine, CA. **Proceedings...** Washington, USA: PNAS, 2002. v.99, p.11014-11019.
- 29 CHAPPLE, P. B.; STAROMLYNSKA, J.; HERMANN, J. A.; McKAY, T. J.; McDUFF, R. J. Z-scan Single-beam: Measurement techniques and analysis. **Journal of Nonlinear Optical Physics e Materials**, v.6, n.3, Sep.1997. doi:10.1142/S0218863597000204.
- 30 LIU, Z. B.; YAN, X. Q.; TIAN, J. G.; ZHOU, W. Y.; ZANG, W. P. Nonlinear ellipse rotation modified Z-scan measurements of third-order nonlinear susceptibility tensor. **Optics Express**, v.15, n.20, Sep.2007. doi:10.1364/OE.15.013351
- 31 BOYD, R. W. **Nonlinear Optics**. 3th ed. Academic Press, 2008. 613p.
- 32 MAKER, P. D.; TERHUNE, R. W.; SAVAGE, C. M. Intensity-dependent changes in the refractive index of liquids. **Physical Review Letters**, v.12, n.18, May.1964. doi:10.1103/PhysRevLett.12.507.
- 33 OWYOUNG, A. Ellipse rotation studies in laser host materials. **IEEE Journal of Quantum Electron**, v.9, n.11, Nov.1973. doi:10.1109/JQE.1973.1077417.
- 34 LEFKIR, M.; RIVOIRE, G. Influence of transverse effect on measurement of third-order nonlinear susceptibility by self-induced polarization state change. **Journal of the Optical Society of America B**, v.14, n.11, May.1997. doi:10.1364/JOSAB.14.002856.
- 35 KOKHHAROV, M.; BAKHROMOV, S. A.; MAKHMANOV, U. K.; KOKHKHAROV, R. A.; ZAKHIDOV, E. A. Self-induced polarization rotation of laser beam in fullerene (C70) solutions. **Optics Communications**, v.285, n.12, Jun.2012. doi:10.1016/j.optcom.2012.02.046.
- 36 MIGUEZ, M. L. **Estudo da rotação não linear da polarização elíptica**: influência da origem da não linearidade refrativa. Relatório científico parcial FAPESP, nº do processo:2013/11514-5.

- 37 GOMES, J. A. C. **Desenvolvimento de uma microscopia óptica não linear por rotação da polarização elíptica.** (Projeto de Mestrado, 2014).
- 38 MINKOVSKI, M.; PETROV, G. I.; SATIEL, S. M.; ALBERT, O.; ETCHEPARE, J. Nonlinear polarization rotation and orthogonal polarization generation experienced in a single-beam configuration. **Journal of the Optical Society of America B**, v.21, n.9, Sep.2004. doi:10.1364/JOSAB.21.001659.
- 39 SHEIK-BAHAE, M.; SAID, A. A.; WEI, T. H.; HAGAN, D. J.; STRYLAND, E. W. V. Sensitive measurement of optical nonlinearities using a single beam. **Journal of Quantum Electronics**, v.26, n.4, Apr.1990. doi:10.1109/3.53394.
- 40 MIGUEZ, M.L; BARBANO, E. C.; COURA, J. A.; ZÍLIO, S. C.; MISOGUTI, L. Nonlinear ellipse rotation measurements in optical thick samples. **Applied Physics B**, v.120, n.4, Jul.2015. doi:10.1007/s00340-015-6178-x.
- 41 SALEH, B. E. A.; TEICH, M. C. **Fundamentals of photonics.** 2nd. ed. Hoboken, N.J: John Wiley & Sons, 2007.
- 42 YARIV, A. **Quantum Electronics.** 3th ed. Academic Press, 1988. 676p.
- 43 MIGUEZ, M. L.; BARBANO, E. C.; COURA, J. A.; ZÍLIO, S. C.; MISOGUTI, L. High-resolution nonlinear ellipse rotation measurements for 3D microscopy. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON MULTI-PHOTON MICROSCOPY IN THE BIOMEDICAL SCIENCES, 15, 2015, San Francisco, CA. **Proceedings...** Washington, USA: SPIE, 2015. v.9329.

Apêndice A

A equação de amostras grossas é válida para amostras finas

Para que a equação de amostras grossas se reduza na equação de amostras finas é necessário fazer uma expansão de Taylor na parte da equação (de amostras grossas) que contém os termos da tangente.

Consideremos a equação de amostras grossas:

$$\langle \alpha(z) \rangle_{\text{lock-in}} = \frac{\omega}{c} \left[\frac{\sin(2\phi)}{3\sqrt{2}} \right] n_2 n_0 z_R I \left[\text{tg}^{-1} \left(\frac{z_b}{z_R} \right) - \text{tg}^{-1} \left(\frac{z_a}{z_R} \right) \right] \quad (1A)$$

em que: $z_b = z + \frac{L}{2n_0}$ e $z_a = z - \frac{L}{2n_0}$.

De início vamos aplicar a expansão no primeiro termo que contém a tangente:

$$\text{tg}^{-1} \left(\frac{z_b}{z_R} \right) = \text{tg}^{-1} \left(\underbrace{\frac{z}{z_R}}_{x_0} + \underbrace{\frac{L}{2n_0 z_R}}_{\varepsilon} \right) \quad (2A)$$

Utilizando uma expansão de Taylor da forma:

$$f(x_0 + \varepsilon) = f(x_0) + f'(x_0)\varepsilon \quad (3A)$$

e aplicando o limite de amostra fina, em que $L \ll z_R$, temos que $\varepsilon \rightarrow 0$, portanto:

$$f(x_0) = \text{tg}^{-1} \left(\frac{z}{z_R} \right) \quad (4A)$$

fazendo $\frac{z}{z_R} = u$, temos que:

$$f'(x_0) = \frac{1}{1+(u)^2} = \frac{1}{1+(\frac{z}{z_R})^2} \quad (5A)$$

Substituindo a Equação (5A) e (4A) em (3A), obtemos:

$$f(x_0 + \varepsilon) = \operatorname{tg}^{-1}\left(\frac{z}{z_R}\right) + \frac{1}{1+(\frac{z}{z_R})^2} \frac{L}{2n_0 z_R} \quad (6A)$$

Por analogia, expandindo o segundo termo que contém a tangente na Equação (1A) da RNLPE temos:

$$f(x_0 + \varepsilon) = \operatorname{tg}^{-1}\left(\frac{z}{z_R}\right) - \frac{1}{1+(\frac{z}{z_R})^2} \frac{L}{2n_0 z_R} \quad (7A)$$

Logo:

$$\left[\operatorname{tg}^{-1}\left(\frac{z_b}{z_R}\right) - \operatorname{tg}^{-1}\left(\frac{z_a}{z_R}\right) \right] = \frac{L}{[1+(\frac{z}{z_R})^2]n_0 z_R} \quad (8A)$$

Substituindo a Equação (8A) na Equação (1A), obtemos:

$$\langle \alpha \rangle_{lock-in} = \frac{\frac{\omega}{c} \left[\frac{\sin(2\phi)}{3\sqrt{2}} \right] n_2 L I}{\left[1 + \left(\frac{z}{z_R} \right)^2 \right]} \quad (9A)$$

A equação (9A) é exatamente igual à equação da RNLPE utilizado em amostras finas.