UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

PEDRO RAMON ALMEIDA OITICICA

Microscopia por geração de soma de frequências em interfaces
líquidas e sólidas

São Carlos
2015

PEDRO RAMON ALMEIDA OITICICA

Microscopia por geração de soma de frequências em interfaces
líquidas e sólidas

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

Área de concentração: Física Aplicada
Orientador: Prof. Dr. Paulo Barbeitas Miranda.

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2015

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

Oiticica, Pedro Ramon Almeida

Microscopia por geração de soma de frequências em interfaces líquidas e sólidas / Pedro Ramon Almeida Oiticica; orientador Paulo Barbeitas Miranda - versão corrigida -- São Carlos, 2015.

160 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2015.

1. Óptica não linear. 2. Microscopia. 3. Geração de soma de frequências. 4. Superfícies e interfaces. 5. Filmes de Langmuir-Blodgett. I. Miranda, Paulo Barbeitas, orient. II. Título.

Dedico este trabalho a minha mãe Eliana e aos meus avós Elenita e Manoel, que me criaram com muito amor e me deram a força necessária para vencer todos os desafios.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Física de São Carlos e o Grupo de Polímeros “Prof. Bernhard Gross”.

Ao Prof. Dr. Paulo Barbeitas Miranda, pelo crédito e dedicação demonstrada.

À minha mãe Eliana, minha fortaleza.

Aos meus avós Elenita e Manoel, por me apoiarem e pela sabedoria repassada.

À minha namorada Victória pelo carinho.

A Hiroshi Kabumoto da empresa Watec, pela atenção dedicada e por ter concedido uma câmera CCD que foi peça fundamental para a finalização a montagem do microscópio SFG.

Aos amigos Bruno, Marcos Felipe, Ademir, Níbio, Berto, pelo suporte técnico.

Aos técnicos da oficina mecânica pela dedicação na montagem das peças e por me emprestarem algumas ferramentas quando precisei.

Ao professor Francisco Guimarães pela ajuda com o microscópio confocal.

Aos amigos que me deram uma força no laboratório: Cora Castelo Branco, Vananeia e Adriano.

Aos colegas de grupo e de laboratório pelas ricas discussões: Jaciara, Caio, Diogo, Douglas Coutinho, Nathália Aprile, Douglas José, Silvia, Pedro (polenta), Leonardo (telesp).

À Capes pelo apoio financeiro.

“Não sabendo que era impossível, foi lá e fez”

(Jean Cocteau)

RESUMO

OITICICA, P. R. A. **Microscopia por geração de soma de frequências em interfaces líquidas e sólidas**. 2015, 160 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

Estudos em interfaces são importantes para o completo entendimento de muitos processos em química, física e biologia. Esses sistemas são governados principalmente pelas propriedades interfaciais dos materiais. Nas duas últimas décadas, o desenvolvimento de novos métodos experimentais melhorou o nosso entendimento das propriedades interfaciais. O advento de uma série de técnicas de espectroscopia a laser baseadas em óptica não linear e o desenvolvimento das técnicas de microscopia por ponta de prova, possibilitaram estudos antes inimagináveis em superfícies e interfaces. Entre as técnicas de espectroscopia não linear, destacamos a espectroscopia por Geração de Soma de Frequências (espectroscopia SFG). Essa técnica foi desenvolvida por *Shen et al.* em 1987 e, desde então, é aplicada a muitos estudos em superfícies e interfaces. A espectroscopia SFG pode fornecer informações sobre a natureza química por meio do espectro vibracional e sobre o ordenamento médio das moléculas em uma única monocamada. O sinal SFG só pode ser gerado em meios não centrossimétricos, isso inclui superfícies ou interfaces entre meios centrossimétricos, onde há quebra da simetria de inversão. A combinação da espectroscopia SFG com a microscopia óptica tem sido proposta como uma nova técnica experimental para obter imagens em interfaces com sensibilidade química pelo espectro vibracional e contraste pela orientação e ordenamento das moléculas. Neste trabalho, apresentamos o desenvolvimento, construção e caracterização de um Microscópio SFG (MSFG). Esse MSFG foi especialmente projetado para estudos em superfícies ou interfaces tanto líquidas quanto sólidas. Testes iniciais de desempenho do MSFG foram realizados na interface líquido/ar da solução binária água/acetonitrila ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$). Foram obtidas imagens do sinal SFG ressonante com o estiramento simétrico do grupo metil (CH_3) da acetonitrila na interface líquido/ar da solução binária. Variando a fração molar da acetonitrila na solução entre 4% e 20% observamos a dependência da intensidade do sinal SFG na interface em função da fração molar de acetonitrila no volume do líquido. Testes também foram feitos em filmes Langmuir-Blodgett

multicamada de ácido esteárico ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$). Obtivemos a espectromicroscopia SFG na ressonância dos grupos CH_2 e CH_3 do ácido graxo. Pelas diferenças entre os espectros SFG das regiões ordenadas e desordenadas, a espectromicroscopia revelou distribuições microscópicas do ordenamento das cadeias alquila que formam o filme. A sensibilidade da detecção do sinal SFG foi caracterizada e revelou a possibilidade de obter imagens na superfície da água em menos de um minuto. A caracterização óptica e os testes nas interfaces líquido/ar e sólido/ar demonstraram a completa capacidade do MSFG como ferramenta para investigar qualquer superfície ou interface, seja essa líquida ou sólida.

Palavras chave: Óptica não linear. Microscopia. Geração de soma de frequências. Superfícies e interfaces. Filmes de Langmuir-Blodgett.

ABSTRACT

OITICICA, P. R. A. **Sum frequency generation microscopy at liquid and solid interfaces.** 2015, 160 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

Interface studies are important for the complete understanding of many processes in chemistry, physics and biology. These systems are mainly governed by the interfacial properties of the materials. In the last two decades, the development of new experimental methods improved our understanding of interfacial properties. The advent of a host of laser spectroscopy techniques based on nonlinear optics and the development of the scanning probe microscopy techniques, opened up unimaginable possibilities of studies at surfaces and interfaces. Among these nonlinear spectroscopies we turned our attention to Sum Frequency Generation spectroscopy (SFG spectroscopy). This technique was developed by *Shen et al.* in 1987 and, since then, it has been applied to many studies of surfaces and interfaces. SFG spectroscopy can provide information about the chemical nature by the vibrational spectra and about the average of molecular ordering in a single monolayer. The SFG signal only can be generated in a noncentrosymmetric media, this includes surfaces or interfaces between centrosymmetric media, where there is a broken in the inversion symmetry. The combination of SFG spectroscopy with optical microscopy has been proposed as a novel experimental technique to obtain images at interfaces with chemical sensitivity by the vibrational spectra as well as contrast by the ordering and orientation of the molecules. In this work we present the development, construction and characterization of an SFG Microscope (SFGM). This SFGM was specially designed to perform studies on surfaces or interfaces of liquids and solids. Initial SFGM performance tests were performed at the liquid/air interface of the water/acetonitrile ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$) binary solution. The images of the SFG signal were acquired on the resonance of the methyl group (CH_3) of acetonitrile present at the liquid/air interface of the binary solution. By varying the molar fraction of acetonitrile in the solution between 4% and 20% we observed the dependency of the SFG signal intensity as a function the acetonitrile bulk mole fraction. We also performed tests in multi-layered Langmuir-Blodgett films of stearic acid ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$). We obtained the SFG spectromicroscopy in the

resonance of CH_2 and CH_3 groups of the fatty acid. By the differences between the SFG spectra of ordered and disordered regions, the spectromicroscopy revealed microscopic distribution of the conformational ordering in the alkyl chains that composes the film. The sensitivity of the SFG microscope was characterized and it was shown that images could be acquired at the water surface in less than one minute. The optical characterization and the performed tests at the liquid/air and solid/air interfaces demonstrated the full capabilities of the SFGM as a tool for investigations in any liquid or solid interface.

Keywords: Nonlinear optics. Microscopy. Sum frequency generation. Surfaces and interfaces. Langmuir-Blodgett films.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Representação da geração de soma de frequências em uma superfície. Dois feixes incidentes na superfície do líquido gera um terceiro feixe representado na cor azul. O terceiro feixe azul tem frequência corresponde à soma das frequências das ondas incidentes.	29
Figura 2	- Átomo excitado por uma radiação eletromagnética tendo sua nuvem eletrônica distorcida pela ação do campo elétrico.	30
Figura 3	- Como é idealizado no modelo de Drude-Lorentz, um elétron oscila com uma frequência de ressonância ω_0 como em um sistema massa mola simples.	31
Figura 4	- Nesse modelo de molécula temos frequências de ressonância vibracionais ω_i . A imagem a) representa um modelo clássico de molécula com suas ligações formadas por molas. b) A molécula possui um conjunto de ressonâncias vibracionais que caracterizamos pelos ω_i e fatores de amortecimento γ_i	32
Figura 5	- Esquema da geração de soma de frequências.	38
Figura 6	- Modelo representativo da geração de soma de frequências em uma interface.	39
Figura 7	- O volume do material é sendo centrossimétrico teremos quebra de simetria de inversão na interface, na direção z. A interface é considerada isotrópica nas direções x e y.	43
Figura 8	- Convenção usada para o conjunto de polarizações dos feixes envolvidos na espectroscopia SFG.	44
Figura 9	- Níveis de energia que representam a geração de soma de frequências em uma molécula.	45
Figura 10	- Esquema simples de microscópio SFG.	49
Figura 11	- Representação da espectromicroscopia. Cada ponto da amostra possui um espectro diferente.	50
Figura 12	- Obtenção de espectromicroscopia por meio de um conjunto de imagens.	50
Figura 13	- Nesta imagem temos o detalhe da estrutura em três dimensões dos terminais de um circuito integrado. Esta imagem foi obtida com um microscópio de visão oblíqua.	52
Figura 14	- A obtenção de imagens com o objeto inclinado em relação ao eixo óptico gera distorções geométricas. Esse problema é encontrado, por exemplo, em mapeamento geográfico.	52
Figura 15	- A formação da imagem em um microscópio de visão oblíqua tem a imagem projetada na CCD de maneira comprimida em uma direção. Se pudermos desconsiderar outras distorções geométricas, podemos corrigir completamente a imagem multiplicando a dimensão comprimida por $1/\cos\theta$, onde θ é o ângulo entre a normal da amostra e o eixo focal.	53
Figura 16	- Padrão de difração de duas fontes pontuais. a) As fontes estão distinguíveis. b) A distância entre as fontes pontuais é a mínima possível para serem distinguidas. c) A separação entre as fontes pontuais é menor que a distância mínima, portanto, a imagem aparente é de apenas uma fonte pontual.	54
Figura 17	- A abertura numérica é relacionada com o cone de luz que incide ou que sai da lente. Podemos definir a abertura numérica tanto no espaço objeto quanto no espaço imagem	55
Figura 18	- A imagem de um objeto circular projetada num chip CCD é convertida em um conjunto de quadrados ou pixels. Na ultima linha quando a imagem tem diâmetro igual a 32 <i>pixels</i> , podemos ver que, nesse caso, o tamanho da imagem que o chip CCD detecta não depende da posição em que o círculo imagem é projetado. Ou seja, o tamanho da imagem convertida é o mesmo quando a imagem é projetada no centro ou nos cantos dos pixels de leitura do chip CCD.	57
Figura 19	- O limite de resolução espacial imposto pela CCD é dado no plano imagem por duas vezes a distância entre os centros de dois pixels adjacentes.	58
Figura 20	- A medida do contraste da imagem de um padrão de linhas repetidas.	59

Figura 21	- Contraste vs. Frequência espacial. Essa figura mostra a curva do MTF de um sistema óptico ideal, limitado pela difração, e uma curva típica de um sistema com aberrações ópticas geométricas.	60
Figura 22	- Ilustração da função de transferência óptica de um sistema sem aberrações ópticas . a) MTF de um sistema óptico bem focalizado b) imagem do padrão de difração de uma fonte pontual (PSF) c) imagem de um padrão de calibração de microscópio utilizado para medir o MTF d) MTF de um sistema mal focalizado e) imagem mal focalizada do padrão de difração de uma fonte pontual (PSF) f) imagem mal focalizada de um padrão de calibração de microscópio que caracteriza o MTF.....	61
Figura 23	- A profundidade de campo é a região ao longo do eixo óptico e próxima ao plano objeto em que a imagem parece estar em foco. Fora dessa região a imagem é considerada borrada. Esse fenômeno pode ser observado tanto em microscopia por visualização oblíqua quanto em fotografia.	63
Figura 24	- A profundidade de campo está diretamente relacionada com o máximo diâmetro aceitável do círculo de confusão.....	64
Figura 25	- O círculo de confusão (CoC) é definido com relação ao tamanho do objeto que se deseja distinguir na imagem. Quando o círculo de confusão se torna igual a 0.5 mm as trilhas não será mais bem resolvida na imagem.	65
Figura 26	- Feixe Gaussiano. A profundidade de campo ou de foco para um feixe gaussiano é dada pela distancia b . Nessa região o feixe é considerado como focalizado.	65
Figura 27	- A formação da imagem de um feixe gaussiano por uma lente convergente. Nessa imagem, prolongamos o feixe gaussiano para antes da amostra apenas para melhor visualização da região, que é focalizada na amostra devido ao DOF. Não confundir, pois o feixe gaussiano que aqui referimos é o SFG gerado na superfície da amostra e se propaga em direção à lente.....	66
Figura 28	- Esta imagem representa um padrão de trilhas com espaçamento de 10 μm , formando um ângulo oblíquo com o eixo óptico de um microscópio por visão oblíqua. A imagem de uma das trilhas se propagando como um feixe Gaussiano. A imagem da trilha localizada atrás do plano focal objeto, é projetada com um círculo de confusão no detector. A espessura aparente da trilha é 6.9 μm devido à inclinação da amostra. O círculo de confusão $C=2 \times 6.9=13.8\mu\text{m}$ se refere ao modelo ilustrado na Figura 26.	67
Figura 29	- Essa figura ilustra como a largura aparente das trilhas se torna 6.9 μm , quando as trilhas possuem 10 μm de largura, mas estão inclinadas de 44° em relação ao eixo focal.	68
Figura 30	- Ilustração de um microscópio por visão oblíqua utilizando uma fonte de iluminação laser. Esse exemplo se assemelha ao microscópio por ângulo de Brewster (BAM).	70
Figura 31	- Detalhe do detector da ICCD. Os fótons SFG incidem num fotocatodo gerando elétrons espalhados. Os elétrons são acelerados para uma placa micro canal onde espalham nas paredes dos tubos gerando uma cascata de elétrons que incide numa tela de fósforo e gera um ponto luminoso. Um conjunto de fibras ópticas conduz os pontos luminosos da tela de fósforo para a CCD.	71
Figura 32	- Em a) Esquema do intensificador de imagem e os potenciais aplicados para acionar e amplificar a detecção de imagem. b) Placa de micro canal MCP. Em c) um corte do microcanal onde é gerada a cascata de elétrons.	72
Figura 33	- Esquema de montagem óptica do laser utilizado no LENI.....	75
Figura 34	- Esquema de montagem do MSFG.....	78
Figura 35	- Pelo ajuste do diâmetro do feixe infravermelho médio na amostra pela lente L2, podemos otimizar a superposição espacial dos feixes na amostra e variar a intensidades do infravermelho na amostra.	79
Figura 36	- Imagem do feixe 532 nm, na polarização S, incidente na superfície amostra. Em a) e b) a imagem é a mesma exceto que em a) mostramos a linha em que plotamos o perfil de intensidade na direção horizontal (direção y), que corresponde ao plano de incidência. Em b) mostramos a linha em que plotamos a intensidade na direção vertical (direção x), que é perpendicular ao plano de incidência.	79

Figura 37	- Imagens do formato do feixe infravermelho de frequência 2880 cm^{-1} incidente na superfície da amostra para diferentes posições da lente L2	81
Figura 38	- Microscópio SFG do LENI.	82
Figura 39	- Microscópio auxiliar com a câmera Watec. O alinhamento é o mesmo da detecção do MSFG. Esse microscópio é usado para ajustar a posição e focalização da amostra para medidas de microscopia SFG.	83
Figura 40	- Imagem SFG obtida num cristal de quartzo. A frequência do infravermelho usada foi 2945 cm^{-1}	85
Figura 41	- Imagem SFG de um defeito no filme de ZnS. Imagens como essa são úteis para verificar a focalização do microscópio.	86
Figura 42	- Imagem de um defeito no filme de ZnS obtida no microscópio auxiliar pela iluminação do feixe 532 nm. Imagens com essa são úteis pra calibrar a focalização do microscópio auxiliar para servir de referência para focalizar as amostras para fazer a imagem no MSFG.	86
Figura 43	- Painel de controle do programa ImageJ.	87
Figura 44	- Painel de controle do programa AstroImageJ.	87
Figura 45	- Tela do programa AstroImageJ que aparece quando abrimos um arquivo de imagem.	88
Figura 46	- Estrutura das ligações de hidrogênio na interface água/ar.	91
Figura 47	- Esquema da porta-amostra para medida da sensibilidade do MSFG. Este mesmo é utilizado em todas as medidas de microscopia SFG na interface líquido/ar.	92
Figura 48	- Imagens do sinal SFG devido à ressonância vibracional do grupo OH livre da água pura em 3700 cm^{-1} com os tempos de aquisição indicados nas imagens. A polarização utilizada foi S para o feixe 532 nm e P para o infravermelho. Os gráficos correspondentes são o perfil de intensidade ao longo do quadrado amarelo desenhado.	93
Figura 49	- Padrão de calibração de microscópio USAF 1951.	95
Figura 50	- Contatos interdigitados de ouro sobre vidro. a) Representação dos microcontatos. b) foto das trilhas de ouro interdigitadas.	96
Figura 51	- Sistema de eixos cartesianos no sistema de coordenadas do laboratório.	97
Figura 52	- Imagem de microcontatos interdigitados de ouro com espaçamento de $10\text{ }\mu\text{m}$. Essa imagem foi obtida na câmera ICCD utilizando iluminação do feixe 532 nm.	97
Figura 53	- Imagem do USAF 1951, obtida no MSFG, pela iluminação direta de uma lâmpada branca.	98
Figura 54	- Imagem do padrão USAF 1951 com detalhe melhor dos grupos seis e sete.	98
Figura 55	- Determinação da resolução espacial pela imagem do padrão USAF 1951. Estão circulados os padrões de linhas que estão no limite de resolução do microscópio. a) detalhe dos grupos 6 e 7. b) grupo 7 em foco. c) grupo 6 em foco. A imagem em d) foi obtida nas mesmas condições de iluminação em b) e c) mas sem a remoção do ruído devido ao 532 nm que foi feita nas anteriores.	99
Figura 56	- Região onde foram obtidas as curvas de perfil utilizadas para o cálculo do MTF.	100
Figura 57	- Imagem de micro contatos interdigitados de $10\mu\text{m}$ de espaçamento. a) Imagem com as trilhas espaçadas ao longo da direção paralela ao plano de incidência (direção y) que mostra a perda de foco pela profundidade de campo. b) Imagens com as trilhas espaçadas na direção vertical, não sofrem com a profundidade de campo. Isso se dá porque, primeiro a resolução óptica é melhor na direção x e segundo as trilhas estão espaçadas ao longo do plano focal do microscópio e assim todas as trilhas estão em foco no centro da imagem. Essas foram obtidas no microscópio auxiliar.	105
Figura 58	- Modelos propostos para a estrutura da interface da acetonitrila pura nas interfaces líquido/vapor, líquido/sílica e sílica/vapor. A estrutura é comparada com uma bicamada de lipídios.	115
Figura 59	- Esquema experimental para medidas de microscopia SFG em interfaces líquidas, usado para as medidas na interface líquido/ar da solução $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$	118

Figura 60	- Esquema experimental para medidas de espectroscopia SFG em interfaces líquidas, usado nas medidas da interface líquido/ar da solução H ₂ O/ACN. A diferença básica entre os esquemas de microscopia e espectroscopia é que na espectroscopia não usamos lente objetiva para formar imagem no sensor, e em lugar de uma câmera ICCD usamos um monocromador e um fotomultiplicador.	118
Figura 61	- Microscopia SFG na interface líquido/ar da solução H ₂ O/ACN nas concentrações molares 4%, 7%, 12%, 20% e 100%.	122
Figura 62	- Microscopia SFG resolvida no tempo. As imagens correspondem à solução H ₂ O/ACN, concentração molar 12% de acetonitrila.	124
Figura 63	- Microscopia SFG resolvida no tempo na superfície do cristal de quartzo, para avaliar a flutuação temporal do padrão espacial dos feixes de excitação. Os perfis de linha abaixo são obtidos na mesma região delimitada pelo retângulo amarelo para três imagens consecutivas.	126
Figura 64	- Esquema 3D da estrutura química do ácido esteárico.	131
Figura 65	- Isoterma de um filme de Langmuir, pressão superficial (mN/m) versus área em (Å ² /molécula). Cada região da isoterma corresponde a uma fase. A estrutura das fases LE, LE-LC, e LC são ilustradas.	133
Figura 66	- Preparação de filmes Langmuir-Blodgett.	134
Figura 67	- Esquema 3D da estrutura química do ácido pentadecanóico.	134
Figura 68	- Imagens SFG de três defeitos encontrados num filme LB de ácido esteárico. O tempo de acumulação de sinal é 10 segundos. Cada linha contém três imagens de um dado ponto da amostra. Esses pontos são denotados P1, P2 e P3.	139
Figura 69	- Espectromicroscopia do filme LB SA 3L no ponto P1 da amostra.	140
Figura 70	- Modelo proposto para o contraste de sinal SFG medido na região P1 do filme LB SA 3L.	141
Figura 71	- Espectromicroscopia no ponto P2 do filme LB SA 3L. Em verde estão representadas as regiões que emitem sinal SFG ressonante com a frequência 2854 cm ⁻¹ do infravermelho. Em azul estão representadas as regiões da amostra que emitem sinal SFG ressonante com o infravermelho em 2875 cm ⁻¹	142
Figura 72	- Modelo para proposto para o contraste de sinal SFG medido nos pontos P2 e P3 do filme LB SA 3L.	143
Figura 73	- Espectromicroscopia no ponto P3 do filme LB SA 3L. Em verde estão representadas as regiões que emitem sinal SFG ressonante com a frequência 2854 cm ⁻¹ do infravermelho. Em azul estão representadas as regiões da amostra que emitem sinal SFG ressonante com o infravermelho em 2875 cm ⁻¹	144

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	- Exemplo de potencial não centrossimétrico.....	34
Gráfico 2	- Curva de transmissão para o filtro notch 532nm.....	77
Gráfico 3	- Curva de transmissão do filtro passa banda para detecção SFG. Esse filtro bloqueia o restante do feixe 532 nm que passa pelo filtro notch, além de bloqueia a luz ambiente em comprimentos de onda abaixo de 440 nm e acima de 510 nm.	77
Gráfico 4	- Espectro de transmissão em uma janela de fluoreto de bário, BaF ₂ . Esse material transmite bem desde 200 nm, no ultravioleta, até 12000 nm, no infravermelho médio.	78
Gráfico 5	- Curva de Transmissão do filtro BG7.	83
Gráfico 6	- Gráfico que representa a contagem por fotoelétrons em função do fator de ganho utilizado na câmera ICCD Andor.	89
Gráfico 7	- Espectro SFG da superfície da água pura obtido utilizando o conjunto de polarizações SSP.	90
Gráfico 8	- Perfil de linha e valores do MTF para as frequências de linha do USAF	100
Gráfico 9	- Espectro SFG da interface líquido/ar da solução água/acetonitrila na região do estiramento CN da acetonitrila.	109
Gráfico 10	- Espectro SFG da interface líquido/ar da solução água/acetonitrila na região do estiramento CH simétrico da acetonitrila.	110
Gráfico 11	- Variação do sinal SFG do modo CH (s) da acetonitrila na interface líquido/ar da solução H ₂ O/ACN em função da concentração molar de ACN na solução.	110
Gráfico 12	- Estimativa da concentração molar de acetonitrila na interface líquido/ar da solução água/acetonitrila em função da concentração molar de acetonitrila no volume da solução.	111
Gráfico 13	- Espectro SFG da interface líquido/ar da solução H ₂ O/ACN na região de ressonância do grupo OH da água. Em (a) o espectro na polarização SSP. Em b) o espectro na polarização PPP.	112
Gráfico 14	- Em (A) é apresentado o gráfico da tensão superficial da solução H ₂ O/ACN em função da concentração molar de ACN na solução. Em (B) é apresentada a curva teórica da concentração de ACN na interface em função da concentração de ACN no volume da solução.	114
Gráfico 15	- Espectro SFG da acetonitrila pura nas interfaces líquido/vapor, líquido/sílica e sílica/vapor. Os conjuntos de polarização usados são SSP e PPP.	115
Gráfico 16	- Espectro SFG da interface líquido/ar da solução H ₂ O/ACN em diferentes frações molares de ACN.....	120
Gráfico 17	- Intensidade do pico de ressonância do estiramento CH ₃ simétrico, CH (s), da acetonitrila na interface líquido/ar, em função da sua fração molar no volume da solução H ₂ O/ACN.	123
Gráfico 18	- Do lado esquerdo mostramos os espectros SFG no filme Langmuir de PDA, na região do estiramento CH. Em 1a), 1b) e 1c) os espectros foram medidos no conjunto de polarizações SSP. Nos gráficos 2a), 2b) e 2c) os espectros foram medidos no conjunto de polarizações SPS. Do lado direito é mostrada a isoterma medida no mesmo filme, mostrando as regiões de área por molécula onde o filme se encontra nos estados LE e LC. As letras a, b e c na isoterma indicam as áreas moleculares em que foram medidos os espectros SFG mostrados do lado esquerdo.	135

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Comparação entre a técnica SFG e outras técnicas usados em estudos de superfícies e interfaces.....	24
Tabela 2	- Parâmetros utilizados para aquisição de imagens nas medidas de sensibilidade de detecção do MSFG.	93
Tabela 3	- Nesta tabela consta para cada elemento do padrão de calibração USAF 1951, o número de linhas por milímetro.....	96
Tabela 4	- Resolução espacial medida pelo MTF.	101
Tabela 5	- Resolução espacial limitada pelo tamanho do pixel.....	103
Tabela 6	- Parâmetros da câmera ICCD usados nas medidas.	137

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	GERAÇÃO DE SOMA DE REQUÊNCIAS.....	29
2.1	Interação da luz com a matéria	29
2.1.1	<i>Interação linear</i>	<i>30</i>
2.1.2	<i>Polarização não linear: solução clássica</i>	<i>33</i>
2.2	Geração de soma de frequências em interfaces	37
2.2.1	<i>Intensidade do sinal SFG</i>	<i>39</i>
2.2.2	<i>Propriedades de $\chi(2)$ na interface.....</i>	<i>42</i>
2.2.3	<i>Regras de seleção para a espectroscopia SFG</i>	<i>45</i>
2.3	Microscopia SFG no estudo de interfaces	48
2.3.1	<i>Espectromicroscopia de interfaces.....</i>	<i>49</i>
3	TEORIA DA MICROSCOPIA POR VISÃO OBLÍQUA.....	51
3.1	Microscopia por visão oblíqua.....	51
3.2	Distorção da imagem	52
3.3	Resolução limitada pela difração.	53
3.4	Resolução limitada pela CCD.....	56
3.5	Medida da resolução óptica pelo MTF	59
3.6	Profundidade de Campo	62
3.7	Deteção de imagem por um chip CCD intensificado	71
4	O MICROSCÓPIO SFG	73
4.1	Montagem do microscópio SFG	73
4.2	Obtenção da imagem SFG	84
4.3	Sensibilidade de detecção	88
4.3.1	<i>Metodologia utilizada para medir a sensibilidade.....</i>	<i>91</i>
4.3.2	<i>Imagens do sinal SFG na superfície da água pura</i>	<i>92</i>

4.4 Resolução espacial do MSFG	95
4.5 Resolução limitada pela difração	102
4.6 Medida da resolução limitada pelo tamanho do pixel	102
4.7 Medida da profundidade de campo do MSFG (DOF)	104
5 ESTUDO DA INTERFACE LÍQUIDO/AR DA SOLUÇÃO ÁGUA/ACETONITRILA UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA E MICROSCOPIA SFG	107
5.1 Revisão da literatura	108
5.2 Metodologia e materiais utilizados	117
5.3 Resultados e discussões	119
5.4 Conclusões preliminares	127
6 ESPECTROMICROSCOPIA SFG EM FILMES LANGMUIR-BLODGETT DE ÁCIDO ESTEÁRICO	131
6.1 Introdução	131
<i>6.1.1 Formação de filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett</i>	<i>132</i>
<i>6.1.2 Espectroscopia SFG em filmes Langmuir</i>	<i>134</i>
6.2 Metodologia e materiais	137
6.3 Resultados e discussões	138
6.4 Conclusões preliminares	145
7 CONCLUSÃO	147
REFERÊNCIAS	153

1 INTRODUÇÃO

O estudo de interfaces é importante para o entendimento de muitos processos em física, química e biologia. Processos como, por exemplo, catálise heterogênea, deposição de filmes finos, corrosão, processos de adesão, formação de membranas biológicas, dentre outros são completamente dominados pelas propriedades superficiais dos materiais. Estudos em interfaces mostram que as propriedades dos materiais na interface são muito diferentes das propriedades no volume. (1) (2) Técnicas que combinam a microscopia óptica com técnicas espectroscópicas vêm sendo propostas para estudos de superfícies e interfaces. (3) (4) (5)

Técnicas baseadas em óptica não linear, específicas a interfaces, como a geração de soma de frequências (SFG, do inglês Sum Frequency Generation) e a geração de segundo harmônico (SHG, do inglês Second Harmonic Generation), vêm sendo combinadas com técnicas de microscopia óptica como a microscopia por varredura confocal e microscopia por visão oblíqua (6). Assim é possível obter uma imagem do sinal SHG e SFG em superfícies e interfaces ou em meios que contêm a propriedade da quiralidade. Além dessas, são também técnicas de microscopia específicas para o estudo de interfaces: A microscopia de força atômica (AFM do inglês Atomic Force Microscopy) (7), técnicas de microscopia de varredura por ponta de prova (SPM do inglês Scanning Probe Microscopy), microscopia em ângulo de Brewster (BAM do inglês Brewster Angle Microscopy) (8), microscopia eletrônica de varredura (MEV) (9), Microscopia por geração de íons secundários medidos por tempo de voo (TOF-SIMS do inglês *Time Of Flight Secondary Ions Mass Spectroscopy*) (10), dentre outras. Essas técnicas abriram a possibilidades para estudos, antes impraticáveis por medidas diretas, contribuindo tanto para o entendimento da natureza como também para o desenvolvimento de novas tecnologias.

Dentre as ferramentas analíticas para o estudo de superfícies e interfaces destacamos a espectroscopia Raman com amplificação de superfície (SERS, do inglês “*Surface Enhanced Raman Spectroscopy*”), a espectroscopia de massa por tempo de voo (SIMS do inglês *Secondary Ion Mass Spectroscopy*), espectroscopia por absorção e reflexão de infravermelho com polarização modulada (PM-IRRAS do inglês *Polarization Modulation Infra Red Reflection Absorption Spectroscopy*), a espectroscopia por Geração de Soma de Frequências (SFG) e Geração de Segundo Harmônico (SHG). Nesse trabalho focaremos na técnica de espectroscopia SFG combinada à microscopia óptica para estudos em interfaces líquidas e sólidas. A espectroscopia SFG e SHG são as únicas técnicas podem ser usadas para obter a

estrutura molecular e a natureza química pelo espectro vibracional em quaisquer superfícies ou interfaces enterradas. A Tabela 1 compara as características e aplicabilidades de algumas técnicas aplicáveis ao estudo de interfaces. A técnica SHG mede o espectro eletrônico e a orientação média das moléculas na interface, enquanto que a técnica SFG mede o espectro vibracional, dando assim o contraste químico e também sendo sensível à orientação molecular. Essas técnicas foram desenvolvidas por *Shen et. al.* (11) da Universidade da Califórnia em Berkeley no começo da década de 80. Desde então muitas aplicações da espectroscopia SFG vem sendo descritas na literatura. (2) (3) (12) (13) (14) (15) (16)

Tabela 1 - Comparação entre a técnica SFG e outras técnicas usados em estudos de superfícies e interfaces.

Característica/Técnica	SFG	SHG	PM-IRRAS	FTIR	SERS	AFM	TOF-SIMS	BAM	MEV
Microscopia	X	X		X	X	X	X	X	X
Específica de superfícies/interfaces	X	X			X	X	X	X	X
Sensibilidade química	X		X	X	X	X	X		X
Sensível à orientação e estrutura molecular	X	X	X	X	X	X		X	
Espectroscopia vibracional	X		X	X	X				
Espectroscopia eletrônica	X	X							X
Interface Líquido/vapor	X	X	X					X	
Interface líquido/sólido	X	X			X	X		X	
Interfaces sólido/sólido	X	X						X	
Interface metal/polímero	X	X			X			X	X
Filmes de Langmuir	X	X	X					X	

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tanto o SFG quanto o SHG são fenômenos que se baseiam na óptica não linear, sendo gerados pela polarização não linear de segunda ordem da matéria. A polarização não linear de segunda ordem por sua vez é descrita pela susceptibilidade não linear de segunda ordem e pelo quadrado do campo elétrico incidente. Para polarizar não linearmente um meio é necessário usar um laser pulsado incidindo em altas intensidades no material. O fenômeno SHG consiste em incidir um feixe de luz de frequência angular ω num meio não linear e gerar

um feixe com o dobro da frequência incidente 2ω . O fenômeno SFG consiste em incidir dois feixes com frequências ω_1 e ω_2 num meio não linear e gerar um terceiro feixe com a soma das frequências incidentes $\omega_1 + \omega_2$. Usualmente utiliza-se um feixe no visível e outro no infravermelho médio para que o sinal SFG seja um feixe na região do espectro visível. Essas técnicas são específicas de interfaces, pois a susceptibilidade não linear de segunda ordem é nula em meios centrossimétricos, sendo diferente de zero em superfícies e interfaces. Quando um dos feixes de luz envolvidos no experimento de SFG excita níveis vibracionais ou eletrônicos do material, a susceptibilidade não linear de segunda ordem cresce ressonantemente, dando origem ao caráter espectroscópico e à sensibilidade química da técnica SFG.

A microscopia por Geração de Soma de Frequências (microscopia SFG) consiste na combinação da espectroscopia SFG com a microscopia óptica. A combinação da microscopia com a informação espectral em cada ponto da imagem é chamada espectro microscopia. É possível realizar Espectro Microscopia por Geração de Soma de Frequências (EMSFG) e obter imagens com contraste químico e orientacional em interfaces, ou seja, a orientação média das moléculas em uma região microscópica em relação a uma região adjacente. Não há necessidade de utilizar marcadores sintéticos para obter uma imagem SFG. Essa técnica permite a obtenção de imagens em interfaces enterradas ou qualquer interface acessível aos feixes de laser envolvidos. A medida não é destrutiva, uma vez ajustadas as intensidades dos feixes de bombeio.

Utilizamos, no Laboratório de Espectroscopia Não linear de Interfaces (LENI), a espectroscopia SFG para determinar a natureza química, as interações, e a orientação média de moléculas em superfícies e interfaces. Para estudar filmes ou interfaces heterogêneas no nível microscópico, precisamos combinar a técnica de espectroscopia SFG com a microscopia óptica. Desde que *Flörsheimer et al.* publicou a primeira montagem de microscópio SFG para obter imagens de ilhas de moléculas em um filme de Langmuir Blodgett, em 1999, (17) outras montagens e aplicações foram sendo exploradas, como nos trabalhos de *Schaller, et al.* (18), *Hoffmann, et al.* (19) (20), *Mizutani, et al.* (21), *Baldelli et al.* (22) (23), *Raghunathan, et al.* (24) e *Lee, et al.* (25). A microscopia SFG tem sido aplicada a estudos em sistemas biológicos (21) (24) (26), filmes automontados (17) (19) (20) (22) (23) (27) e transistores por efeito de campo polimérico (OFET do inglês *Organic Field Effect Transistor*) (12). Até o presente as aplicações da microscopia SFG tem se limitado a interfaces metálicas, poliméricas, ou interfaces que sejam fixas durante um grande intervalo de tempo. A razão é que um microscópio SFG comercial chega a levar horas para obter uma única imagem. A proposta do

presente trabalho é o desenvolvimento e construção de um microscópio SFG para o estudo de interfaces tanto sólidas quanto líquidas. As interfaces líquidas além de emitir sinal SFG fraco, podem se mover livremente durante curtos intervalos de tempo. Portanto há necessidade de um microscópio SFG mais sensível que os modelos até então publicados, que permita a obtenção de sinais mais fracos como, por exemplo, o sinal SFG emitido pela água.

Para medir a não centrossimetria na direção normal à interface é necessário ter incidência oblíqua dos feixes, pois o sinal de SFG obtido com feixes oblíquos permite combinações de polarizações dos feixes de entrada e saída, paralelas e perpendiculares ao plano de incidência. Assim a montagem do microscópio SFG será baseada num microscópio por visão oblíqua de campo distante. O projeto do microscópio SFG deverá conter poucos elementos ópticos para minimizar perdas de sinal SFG. Utilizaremos um feixe de laser em 532nm e outro no infravermelho médio que poderá ser sintonizado entre 1000 a 4000 cm^{-1} , e o sinal SFG deve ser detectado utilizando uma câmera intensificada (ICCD), usando uma objetiva que projete a imagem da amostra diretamente no detector após filtros espectrais para eliminar ruído devido aos feixes de bombeio espalhados.

Após a montagem e caracterização do microscópio SFG, utilizaremos a técnica de microscopia SFG para estudar a estrutura e composição na interface líquido/ar da solução água/acetonitrila em diferentes concentrações molares. O objetivo desse estudo é determinar a relação entre a fração molar de acetonitrila no volume da solução com a concentração e distribuição espacial das moléculas de acetonitrila na superfície do líquido. A solução água/acetonitrila é largamente utilizada em cromatografia líquida (28) (29), eletroquímica (30), síntese de moléculas orgânicas (31) (32), dentre muitas outras aplicações de importância científica, na medicina e industrial. Pesquisas sobre a estrutura no volume e na interface da solução água/acetonitrila foram publicadas utilizando técnicas como espectroscopia SFG (33) (34) (35) (36) (37) (38), espalhamento de nêutrons em baixo ângulo (39), difração de raios X (40), simulação computacional (41) (42) (43) (44) (45), dentre outras. Simulações e experimentos mostram que a solução água/acetonitrila possui micro heterogeneidade no volume, com a formação de clusters da ordem de poucos Angstroms, que pode ocorrer em frações molares entre 20% a 60% de acetonitrila na solução. (42-45) Estudos com espectroscopia SFG mostram que a composição superficial da solução não corresponde ao comportamento de uma mistura ideal (36-39), mas ela ainda não é completamente entendida. Até então, nenhuma medida experimental foi capaz de desvendar completamente e de forma direta a natureza interfacial da solução água/acetonitrila. Nesse sentido, acreditamos que a microscopia SFG pode ser a única técnica experimental capaz de desvendar a estrutura

microscópica na interface dessa solução. Além do estudo de interfaces líquidas utilizamos o microscópio SFG para estudar também filmes automontados, filmes de Langmuir e Langmuir Blodgett. Essa dissertação de mestrado será organizada em sete capítulos. Os capítulos 2 e 3 serão dedicados às bases teóricas para entender a geração de soma de frequências em interfaces e a caracterização linear e resolução espacial na microscopia óptica. No capítulo 4 apresentaremos a montagem e caracterização do microscópio SFG. A aplicação ao estudo da interface líquido/ar da solução água /acetonitrila será apresentada no capítulo 5 e por fim no capítulo 6 apresentaremos estudos feitos em filmes de Langmuir-Blodgett. A conclusão do trabalho será apresentada no capítulo 7.

2 GERAÇÃO DE SOMA DE REQUÊNCIAS

Neste capítulo abordaremos conceitos básicos de óptica não linear para entendermos como ocorre a geração de soma de frequências com a combinação de dois feixes de luz, sendo um no visível e outro no infravermelho médio, gerando um terceiro feixe de luz cuja frequência corresponde à soma das frequências dos feixes envolvidos no processo, como esquematizado na figura 1. Na seção 2.1, trataremos da interação não linear da luz com a matéria, enquanto que na seção 2.2, será explicado o fenômeno de geração de soma de frequências em interfaces (SFG do inglês *Sum Frequency Generation*). Por fim, na seção 2.3, discutiremos a aplicação da espectroscopia SFG combinada com a microscopia óptica no estudo de superfícies e interfaces.

Figura 1 - Representação da geração de soma de frequências em uma superfície. Dois feixes incidentes na superfície do líquido gera um terceiro feixe representado na cor azul. O terceiro feixe azul tem frequência corresponde à soma das frequências das ondas incidentes.

Fonte: CAICE... (46).

2.1 Interação da luz com a matéria

Quando o campo elétrico da onda eletromagnética incide num átomo ou molécula, a nuvem eletrônica e os núcleos são polarizados sob a ação do campo elétrico, dando origem a fenômenos de espalhamento e dispersão do espectro eletromagnético. Quando um átomo interage com a luz, sua nuvem eletrônica é perturbada gerando uma polarização que oscila com a frequência da onda incidente, conforme ilustra a Figura 2.

Figura 2 - Átomo excitado por uma radiação eletromagnética tendo sua nuvem eletrônica distorcida pela ação do campo elétrico.

Fonte: Elaborada pelo autor.

2.1.1 Interação linear

No regime de óptica linear, quando os campos são muito menores que os atômicos ou moleculares, podemos considerar como uma boa aproximação o modelo de Drude-Lorentz para descrever o comportamento óptico. (47) Escrevemos a polarização como uma função do campo elétrico incidente. Neste capítulo as equações serão expressas no sistema internacional de unidades (SI).

$$\vec{P}(\vec{r}, t) = \int_{-\infty}^{+\infty} \epsilon_0 \chi^{(1)}(\vec{r} - \vec{r}', t - t') \vec{E}(\vec{r}', t') d\vec{r}' dt' \quad (1)$$

Onde $\chi^{(1)}$ é a susceptibilidade elétrica linear. Escrevendo o campo elétrico como uma onda plana, $\vec{E}(\vec{r}', t') = \vec{E}(\vec{k}, \omega) e^{i\vec{k} \cdot \vec{r}' - i\omega t'}$ e tomando a transformada de Fourier da polarização para o domínio dos vetores de onda $\vec{k}$ e da frequência ω ficamos com a expressão mais familiar da polarização.

$$\vec{P} = \epsilon_0 \chi^{(1)}(k, \omega) \vec{E}(k, \omega) \quad (2)$$

Na aproximação de dipolo elétrico $e^{i\vec{k}\cdot\vec{r}} \approx 1$ podemos considerar que não há dependência no vetor de onda $\mathbf{k}$ do campo elétrico sobre a polarização e que a susceptibilidade linear não depende da direção de propagação da luz. Sabendo que a faixa espectral da luz visível compreende as frequências entre 400 THz a 750 THz e que as amplitudes de oscilação eletrônicas serão (no máximo) da ordem de $\text{\AA}$ (10^{-10} m), podemos ver que:

$$k \cdot r = n \frac{\omega}{c} r = n \frac{2\pi \times 10^{14}}{3 \times 10^8} \times 10^{-10} \quad (3)$$

Essa aproximação resulta em $k \cdot r \approx 2 \times 10^{-2}$ (considerando $n=1$). Assim teremos:

$$\vec{P}(\omega) = \epsilon_0 \chi^{(1)}(\omega) \vec{E}(\omega) \quad (4)$$

Podemos deduzir classicamente a susceptibilidade linear utilizando o modelo de Drude-Lorentz (veja Figura 3). A susceptibilidade elétrica relaciona a capacidade de polarizar um meio material ou molécula ao aplicar um campo elétrico. A partir da susceptibilidade elétrica, podemos deduzir o índice de refração do material para um dado campo luminoso aplicado.

Figura 3 - Como é idealizado no modelo de Drude-Lorentz, um elétron oscila com uma frequência de ressonância ω_0 como em um sistema massa mola simples.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A equação de movimento para o elétron sujeito à força de Lorentz, no sistema SI, é dada por:

$$m \frac{d^2 \mathbf{x}}{dt^2} = -q\mathbf{E} - e\mathbf{V} \times \mathbf{B} - m\gamma \frac{d\mathbf{x}}{dt} - m\omega_0^2 \mathbf{x} \quad (5)$$

Onde $\mathbf{x}$ é o deslocamento da carga, $-e$ é a carga do elétron, $\mathbf{V}$ é a velocidade, γ é o coeficiente de amortecimento, m é a massa de repouso do elétron e ω_0 é a frequência natural do movimento harmônico do elétron. Para velocidades não relativísticas $V \ll c$, a contribuição

do campo magnético da luz é desprezível já que a amplitude do campo B é $1/c$ da amplitude do campo E no SI. Ficamos então com a seguinte equação.

$$\ddot{x} + \gamma\dot{x} + \omega_0^2 x = -\frac{e}{m} E(t) \quad (6)$$

Obtemos a solução complexa para o movimento do elétron:

$$x(t) = \frac{-e \mathbf{E}}{m(\omega_0^2 - \omega^2 - i\gamma\omega)} e^{-i\omega t} \quad (7)$$

O dipolo elétrico induzido será obtido pela parte real da solução acima. Ficamos então com a seguinte expressão para a polarização linear microscópica:

$$\vec{p}_{mic}(t) = Re \left\{ \frac{e^2 \mathbf{E}}{m(\omega_0^2 - \omega^2 - i\gamma\omega)} e^{-i\omega t} \right\} \quad (8)$$

Em um meio contendo N moléculas por unidade de volume e cada molécula contendo um número n_j de elétrons com frequência natural ω_j e coeficiente de amortecimento γ_j a polarização será dada por (veja Figura 4).

$$\vec{P}(t) = N \sum_j^{1,2,3,\dots} n_j Re \left\{ \frac{e^2 \vec{E}(\omega)}{m(\omega_j^2 - \omega^2 - i\gamma_j\omega)} e^{-i\omega t} \right\} \quad (9)$$

Figura 4 - Nesse modelo de molécula temos frequências de ressonância vibracionais ω_i . A imagem a) representa um modelo clássico de molécula com suas ligações formadas por molas. b) A molécula possui um conjunto de ressonâncias vibracionais que caracterizamos pelos ω_i e fatores de amortecimento γ_i .

Fonte: Elaborada pelo autor.

A expressão para a susceptibilidade elétrica linear complexa será então:

$$\chi^{(1)} = \frac{e^2}{\epsilon_0 m (\omega_0^2 - \omega^2 - i\gamma\omega)} = |\chi^{(1)}| e^{i\delta} \quad (10)$$

Onde a parte real da susceptibilidade é dada por:

$$|\chi^{(1)}| = \frac{e^2}{\epsilon_0 m} \frac{1}{\sqrt{(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + \gamma^2 \omega^2}} \quad (11)$$

De forma que o fator δ é dado por:

$$\delta = \arctan \frac{\gamma\omega}{\omega_0^2 - \omega^2} \quad (12)$$

Então, a polarização linear, sendo uma grandeza real, é expressa por:

$$\vec{P}(t) = N \sum_j^{1,2,3,\dots} n_j \frac{e^2}{\epsilon_0 m} \frac{\vec{E}(\omega)}{\sqrt{(\omega_j^2 - \omega^2)^2 + \gamma_j^2 \omega^2}} \cos(\omega t - \delta) \quad (13)$$

Onde na equação acima N é o número de moléculas por unidade de volume e cada molécula contendo um número n_j de elétrons com frequência natural ω_j e coeficiente de amortecimento γ_j . Mostramos que, usando o modelo simples de Drude-Lorentz, a polarização linear oscila com a mesma frequência do campo incidente.

2.1.2 Polarização não linear: solução clássica

Em um oscilador harmônico, quando a amplitude de oscilação é muito grande a equação de movimento passa a não ser bem representada pela lei de Hook, em que a força é linear com o estiramento e, portanto, a frequência natural de oscilação não será mais a mesma do caso linear. Neste caso, a polarização ainda pode ser obtida usando o modelo clássico, incluindo forças não lineares no deslocamento. Ainda teremos um comportamento diferente se a força restauradora não linear for uma função simétrica ou assimétrica. Veremos mais tarde que essas funções são idealizações das interações intermoleculares e que podem servir como modelo para descrever as interações não lineares. Para entender a geração de soma de frequências em interfaces aplicaremos o modelo clássico utilizando uma força assimétrica (47). Em um meio não centrossimétrico (que não tem simetria de inversão) temos que as interações moleculares em uma direção serão diferentes se invertemos o sentido das

moléculas. Um exemplo de potencial que pode caracterizar uma molécula que não tem simetria de inversão no eixo x é descrito na Gráfico 1 abaixo (47).

Gráfico 1 - Exemplo de potencial não centrossimétrico.

Fonte: BOYD (47).

Para ilustrar os efeitos não lineares observados, idealizamos um oscilador não harmônico unidimensional com uma força restauradora na direção x representada na equação (14), que contém um elemento não linear correspondente a um potencial não centrossimétrico da equação. (15)

$$F_{rest} = -m\omega_0^2 x - max^2 \quad (14)$$

$$U(x) = -\int F_{rest} dx = \frac{1}{2}m\omega_0^2 x^2 + \frac{1}{3}max^3 \quad (15)$$

Na equação (15) o primeiro termo corresponde à energia potencial do oscilador harmônico e o segundo termo adiciona um termo não harmônico ao potencial, deixando a função assimétrica. Resolveremos então um oscilador não harmônico para representar matematicamente uma aproximação física de um elétron ligado a um núcleo em um meio não centrossimétrico (48). A equação de movimento desse oscilador excitado por uma onda eletromagnética será:

$$\ddot{x} + \gamma\dot{x} + \omega_0^2 x + ax^2 = -\frac{e}{m}E(t) \quad (16)$$

Esta equação não possui uma solução geral, mas se considerarmos que a contribuição não linear é muito menor que a contribuição linear, poderemos usar o método de perturbação de

Rayleigh-Schrödinger e obter uma solução aproximada tal como esse problema é tratado na mecânica quântica. O método consiste em considerar a solução da equação como uma série infinita e convergente, obter a solução homogênea e somar com termos de correção para considerar o efeito da perturbação. Então seja λ real pertencente ao intervalo $(0,1]$ (aberto em zero e fechado em 1), escrevemos $E(t)$ como $\lambda E(t)$, e buscamos por uma solução do tipo:

$$x(t) = \lambda x^{(1)} + \lambda^2 x^{(2)} + \lambda^3 x^{(3)} + \dots \quad (17)$$

Nesse método λ representa a força da perturbação, mas seu valor não importa para a solução do problema apenas precisa estar no intervalo entre zero e um para a solução ser finita. Substituindo a equação (17) na equação (16), do oscilador, teremos uma equação para cada potência de λ considerada.

$$\begin{aligned} & \lambda \left[\ddot{x}^{(1)} + \gamma \dot{x}^{(1)} + \omega_0^2 x^{(1)} - \frac{e}{m} E(t) \right] + \\ & \lambda^2 \left[\ddot{x}^{(2)} + \gamma \dot{x}^{(2)} + \omega_0^2 x^{(2)} \right] + \lambda^3 \left[\ddot{x}^{(3)} + \gamma \dot{x}^{(3)} + \omega_0^2 x^{(3)} \right] + \dots \\ & = -a(\lambda x^{(1)} + \lambda^2 x^{(2)} + \lambda^3 x^{(3)} + \dots)^2 \end{aligned} \quad (18)$$

$$\ddot{x}^{(1)} + \gamma \dot{x}^{(1)} + \omega_0^2 x^{(1)} - \frac{e}{m} E(t) = 0 \text{ equação homogênea} \quad (19)$$

$$\ddot{x}^{(2)} + \gamma \dot{x}^{(2)} + \omega_0^2 x^{(2)} = -a[x^{(1)}]^2 \text{ primeira correção não linear} \quad (20)$$

$$\ddot{x}^{(3)} + \gamma \dot{x}^{(3)} + \omega_0^2 x^{(3)} = -a[2x^{(1)}x^{(2)}] \text{ segunda correção não linear} \quad (21)$$

⋮

Escrevemos o campo elétrico como uma soma de ondas planas de frequências angulares ω_j mas para simplificar o tratamento e aplicar mais tarde à geração de soma de frequências, consideramos apenas duas frequências angulares incidentes, ω_1 e ω_2 e seus respectivos complexos conjugados.

$$E(t) = \sum_{j=1}^2 E_j e^{-i\omega_j t} + C.C. \quad (22)$$

A solução da equações 1.15b será:

$$x^{(1)}(t) = -\frac{e}{m} \sum_j^{1,2} \frac{E_j}{[\omega_0^2 - \omega_j^2 - i\gamma\omega_j]} e^{-i\omega_j t} + C.C. \quad (23)$$

A solução expressa na equação (23) corresponde ao caso do oscilador harmônico tratado na seção 2.1.1. Substituindo a equação (23) na equação (20) obtemos a solução para $x^{(2)}$ que representa a resposta não linear de segunda ordem que dará origem à susceptibilidade não linear $\chi^{(2)}$. Como a solução será proporcional ao quadrado da solução de primeira ordem, então teremos que será proporcional ao quadrado do campo elétrico incidente, contendo os produtos mistos entre campos elétricos dois a dois de cada frequência.

$$x^{(2)}(t) = -a \frac{e^2}{m^2} \text{Re} \left\{ \begin{aligned} & \frac{E_1^2}{D(2\omega_1)D(\omega_1)D(\omega_1)} e^{-i2\omega_1 t} + \\ & + \frac{E_2^2}{D(2\omega_2)D(\omega_2)D(\omega_2)} e^{-i2\omega_2 t} + \\ & + 2 \frac{E_1 E_2}{D(\omega_1 + \omega_2)D(\omega_1)D(\omega_2)} e^{-i(\omega_1 + \omega_2)t} + \\ & + 2 \frac{E_1 E_2^*}{D(\omega_1 - \omega_2)D(\omega_1)D^*(\omega_2)} e^{-i(\omega_1 - \omega_2)t} + \\ & + 2 E_1 E_2^* \end{aligned} \right\} \quad (24)$$

Definimos as funções “D” para diminuir a notação da solução.

$$D(\omega) = [\omega_0^2 - \omega^2 - i\gamma\omega] \quad (25)$$

Como vemos na equação acima, a solução de segunda ordem não linear leva a dois termos que oscilam com o dobro de cada frequência incidente, um que oscila com a soma das frequências incidentes, outro que oscila com a diferença das frequências incidentes e um ultimo que é constante no tempo. Considerando apenas o termo que oscila com a soma das frequências $\omega_3 = \omega_1 + \omega_2$, temos:

$$x^{(2)}(\omega_3) = -2a \frac{e^2}{m^2} \left\{ \frac{E_1 E_2}{D(\omega_1)D(\omega_2)D(\omega_3)} e^{-i\omega_3 t} + C.C. \right\} \quad (26)$$

Se considerarmos apenas o dipolo elétrico e tomando λ do método perturbativo igual a um teremos a polarização dada pelas seguintes equações:

$$P(t) = -Nex(t) \quad (27)$$

$$P(t) = N \left(-ex^{(1)}(t) - ex^{(2)}(t) - ex^{(3)}(t) + \dots \right) \quad (28)$$

$$P(t) = P^{(1)} + P^{(2)} + P^{(3)} + \dots \quad (29)$$

$$P_{\omega_3}^{(2)}(t) = 2Na \frac{e^3}{m^2} \left\{ \frac{E_1 E_2}{D(\omega_1) D(\omega_2) D(\omega_3)} e^{-i\omega_3 t} + C.C. \right\} \quad (30)$$

Onde $P_{\omega_3}^{(2)}(t)$ é uma polarização não linear que oscila na frequência $\omega_3 = \omega_1 + \omega_2$. Quando dois feixes luminosos de frequências diferentes (diferentes comprimentos de onda) incidem em um meio material, o material será polarizado nas frequências incidentes, podendo haver absorção ou espalhamento. Mas se as intensidades dos feixes forem altas o suficiente para provocar efeitos não lineares, haverá além dos termos lineares da polarização, os termos não lineares. A geração de soma de frequências (SFG) é um efeito da susceptibilidade não linear de segunda ordem $\chi^{(2)}$ (não confundir com o $x^{(2)}$ da equação (26) que representa o deslocamento das cargas que geram os momentos de dipolo elétrico). O processo SFG ocorre com combinação dos feixes incidentes provocando no meio uma polarização não linear que oscila com a soma das frequências incidentes. Além do SFG, são efeitos de $\chi^{(2)}$: a geração de diferença de frequências (DFG do inglês *Difference Frequency Generation*), a geração de segundo harmônico (SHG do inglês *Second Harmonic Generation*) e a retificação óptica (OR do inglês *Optical Rectification*), que representa uma polarização constante no tempo.

2.2 Geração de soma de frequências em interfaces

A primeira observação da geração de soma de frequência foi publicada por Bass et al. em 1962, usando um laser de rubi e um cristal de sulfato de triglicina. (49) A geração de soma de frequência ocorre quando dois feixes de laser com diferentes frequências ou comprimentos de onda, incidem com intensidades consideravelmente altas (da ordem de GW/cm^2) num meio que contem susceptibilidade não linear de segunda ordem não nula. Para gerar SFG no volume de um cristal não linear, é necessário que certas condições de casamento de fases entre os feixes incidentes e o feixe SFG gerado sejam satisfeitas. Na Figura 5 temos um

diagrama do efeito de geração de soma de frequências em um meio contendo não linearidade de segunda ordem. Nesse diagrama representamos dois feixes de laser por meio das setas verde e vermelha, incidindo num meio não linear. Na saída temos três setas que representam a parte dos feixes incidentes que atravessam ou são refletidos pelo meio material e um terceiro feixe (representado pela seta azul) que corresponde ao feixe com a soma das frequências.

Figura 5 - Esquema da geração de soma de frequências

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nessa dissertação, trataremos da espectroscopia SFG em superfícies e interfaces com feixes incidentes no visível em 532 nm e no infravermelho médio, que pode ser sintonizado entre 2300 e 10000 nm de modo que sinal SFG será gerado no visível entre 505 nm a 435 nm no azul. A espectroscopia SFG é uma técnica muito utilizada no estudo de superfícies e interfaces, podendo ser aplicada a qualquer sistema acessível às radiações envolvidas. Exemplos de aplicação da espectroscopia SFG estão em sistemas biológicos, deposição de vapores químicos, plasma, corrosão, reações em interfaces de líquidos e sólidos, interfaces enterradas e dinâmica na superfície de líquidos, como trataremos nessa dissertação.

O sinal SFG só pode ser gerado em meios onde há quebra de simetria de inversão espacial (meios não centrossimétricos, como no exemplo da seção anterior, onde o termo proporcional a x^3 no potencial quebra a simetria do potencial parabólico), tornando-se uma técnica ideal para o estudo de superfícies e interfaces líquidas ou sólidas cujo volume do material é centrossimétrico. Como será discutido nas próximas seções, o espectro vibracional da interface é obtido pela varredura em frequência do feixe infravermelho médio (que por conveniência chamaremos apenas de IR, do inglês *InfraRed*) incidente na amostra (aqui referimos ao comprimento de onda da radiação, não confundir com a frequência de pulsação do laser). Usualmente, na espectroscopia SFG em interfaces, três conjuntos de polarizações dos feixes envolvidos são possíveis: SSP, SPS e PPP, na ordem feixe SFG, visível e IR onde S representa a polarização linear na direção perpendicular ao plano de incidência e P a polarização linear paralela ao plano de incidência. O espectro SFG para cada conjunto de polarização pode ser usado para obter a orientação molecular média das moléculas na

interface. Nas próximas seções será discutida a matemática que descreve o SFG em interfaces. Na seção 2.2.1 trataremos da intensidade do sinal SFG gerado enquanto que na seção 2.2.2 falaremos das propriedades de $\chi^{(2)}$ na interface e na seção 2.2.3 serão discutidas as regras de seleção para a geração do sinal SFG em interfaces.

2.2.1 Intensidade do sinal SFG

Nesta seção mostraremos a matemática usada para descrever a intensidade da geração de soma de frequências aplicada à espectroscopia vibracional em interfaces. Esse formalismo matemático já foi bem descrito na literatura (48) (50). Aqui, descreveremos de onde surgem as principais equações e aplicaremos ao caso de estudo de superfícies e interfaces. Considere-se a susceptibilidade não linear $\tilde{\chi}^{(2)}$ como um tensor de posto três e o produto diádico entre os campos incidentes $\vec{E}(\omega_1)$ e $\vec{E}(\omega_2)$. Representaremos a polarização de segunda ordem da soma de frequências por:

$$\vec{P}^{(2)}(\omega_3 = \omega_1 + \omega_2) = \epsilon_0 \tilde{\chi}^{(2)} : \vec{E}(\omega_1) \vec{E}(\omega_2) \quad (31)$$

$$\vec{P}^{(2)}(\omega_3 = \omega_1 + \omega_2) = \epsilon_0 \sum_{ijk} \chi_{ijk}^{(2)} E_j(\omega_1) E_k(\omega_2) \quad (32)$$

O meio que gera a não linearidade é, somente, uma interface que possui susceptibilidade não linear de segunda ordem $\tilde{\chi}^{(2)}$. Consideremos o seguinte modelo de interface (Figura 6).

Figura 6 - Modelo representativo da geração de soma de frequências em uma interface.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Dois feixes incidentes de frequências ω_1 e ω_2 e polarizações que podem ser paralela (P), ou perpendicular (S) ao plano de incidência. Os feixes de luz polarizam a matéria não linearmente, gerando o feixe soma de frequências. Denotamos as constantes dielétricas dos meios: ar, volume do material e interface como ϵ_1 , ϵ_2 e ϵ' respectivamente (o mesmo tratamento valeria para uma interface enterrada entre dois meios centrossimétricos). As constantes dielétricas ϵ_1 , ϵ_2 e ϵ' estão associadas aos índices de refração linear $n_1(\omega)$, $n_2(\omega)$ e $n_s(\omega)$, respectivamente. O meio que gera a não linearidade é uma fina camada de espessura muito menor que $\frac{\lambda}{2\pi}$. A polarização de segunda ordem para soma de frequências na interface é dada por:

$$\vec{P}_{\omega_3=\omega_1+\omega_2}^{(2)} = \epsilon_0 \tilde{\chi}_s^{(2)} : \vec{E}_l(\omega_1) \vec{E}_l(\omega_2) \quad (33)$$

Onde $\tilde{\chi}_s^{(2)}$ é a susceptibilidade não linear da interface que oscila na soma de frequências, e $\vec{E}_l(\omega_1)$, $\vec{E}_l(\omega_2)$ e $\vec{E}_l(\omega_3)$ são os campos elétricos locais na interface para os feixes visível, IR e feixe SFG. A relação dos campos incidentes e emitidos com os campos na interface é obtida pelos fatores de Fresnel na interface, $L(\omega)$, que relacionam os campos incidentes com os campos na interface, assegurando que condições de contorno dos campos devem ser satisfeitas.

$$\begin{aligned} \vec{E}_l(\omega_1) &= \vec{L}(\omega_1) \vec{E}(\omega_1), \quad \vec{E}_l(\omega_2) = \vec{L}(\omega_2) \vec{E}(\omega_2), \\ \vec{E}_l(\omega_3) &= \vec{L}(\omega_3) \vec{E}(\omega_3) \end{aligned} \quad (34)$$

$$L_{yy}(\omega) = \frac{2n_1(\omega)\cos\theta'}{n_1(\omega)\cos\theta' + n_2\cos\theta} \quad (35)$$

$$L_{xx}(\omega) = \frac{2n_1(\omega)\cos\theta}{n_1(\omega)\cos\theta' + n_2(\omega)\cos\theta'} \quad (36)$$

$$L_{zz}(\omega) = \frac{2n_2(\omega)\cos\theta}{n_1(\omega)\cos\theta' + n_2(\omega)\cos\theta'} \left(\frac{n_1(\omega)}{n_s(\omega)} \right)^2 \quad (37)$$

Onde $n_1(\omega)$, $n_2(\omega)$ e $n_s(\omega)$ são os índices de refração nos meio 1, 2 e na interface l respectivamente, θ é o ângulo de incidência do feixe considerado e θ' é o ângulo de refração do mesmo feixe no meio 2. Como a interface é geralmente muito fina, da ordem de monocamadas atômicas, seu índice de refração é difícil de ser determinado. Uma prática usual

é considerar a aproximação em que o índice da interface é igual ao índice do meio um ou dois, mas na determinação da orientação molecular, essa aproximação deve ser tomada com cuidado [5]. A polarização superficial fica então:

$$\vec{P}_l^{(2)} = \epsilon_0 \tilde{\chi}_l^{(2)} : [\vec{L}(\omega_1) \vec{E}(\omega_1)] [\vec{L}(\omega_2) \vec{E}(\omega_2)] \quad (38)$$

A polarização não linear gerada na interface age como uma fonte de radiação eletromagnética. Inserindo essa fonte na equação de onda eletromagnética, obtemos a solução para o campo elétrico do feixe soma de frequências, que é gerada pela polarização não linear na interface. É escrita abaixo a solução de campo elétrico do feixe SFG em suas componentes S (perpendicular) e P (paralela ao plano de incidência) (50).

$$E_p(\omega_3) = i \frac{2\pi\omega_3}{c} \left[L_{yy}(\omega_3) \chi_{s, xjk}^{(2)} L_{jj}(\omega_1) L_{kk}(\omega_2) + \left(\frac{k_x(\omega_3)}{k_{1z}(\omega_3)} \right) L_{zz}(\omega_3) \chi_{s, zjk}^{(2)} L_{jj}(\omega_1) L_{kk}(\omega_2) \right] E_{1j}(\omega_1) E_{1k}(\omega_2) \quad (39)$$

$$E_s(\omega_3) = i \frac{2\pi\omega_3}{c} \left(\frac{k_1(\omega_3)}{k_{1z}(\omega_3)} \right) L_{xx}(\omega_3) \chi_{s, yjk}^{(2)} L_{jj}(\omega_1) L_{kk}(\omega_2) E_{1j}(\omega_1) E_{1k}(\omega_2) \quad (40)$$

A intensidade do feixe soma de frequências será dada por:

$$I(\omega_3) = \frac{8\pi^3 \omega_3^2 \sec^2 \theta_\omega}{c^3 n_1(\omega_3) n_1(\omega_1) n_1(\omega_2)} \left| \chi_{eff}^{(2)} \right|^2 I_1(\omega_1) I_1(\omega_2) \quad (41)$$

$$\chi_{eff}^{(2)}(\omega_3 = \omega_1 + \omega_2, \omega_1, \omega_2) = [\hat{e}(\omega_3) \square \vec{L}(\omega_3)]^\dagger \chi_s^{(2)} : [\vec{L}(\omega_1) \square \hat{e}(\omega_1)] [\vec{L}(\omega_2) \square \hat{e}(\omega_2)] \quad (42)$$

Se o laser for pulsado com largura temporal T e a superposição espacial na amostra dos dois feixes incidentes tiver área A, então podemos escrever a intensidade do SFG na unidade de fótons por pulso S(ω).

$$S(\omega) = \frac{8\pi^3 \omega \sec^2 \theta_\omega}{\hbar c^3 n_1(\omega) n_1(\omega_1) n_1(\omega_2)} \left| \chi_{eff}^{(2)} \right|^2 I_1(\omega_1) I_1(\omega_2) A T \quad (43)$$

2.2.2 Propriedades de $\chi^{(2)}$ na interface

Como já discutido, a geração de soma de frequências é um efeito específico de meios onde há quebra de simetria espacial. Na seção 2.1.2, mostramos como um oscilador não harmônico, com uma força não linear devida a um potencial não centrossimétrico pode gerar uma polarização não linear que oscila com a soma das frequências incidentes. Se resolvermos o mesmo oscilador não harmônico e usarmos uma força restauradora característica de um potencial centrossimétrico, não teremos o efeito de geração de soma de frequências, pois a correção de primeira ordem da solução do oscilador pelo método de perturbação será nula $\chi^{(2)}(t) = 0$. Esse modelo clássico pode ser útil para entender como a susceptibilidade não linear $\chi^{(2)}$ se anula em meios com simetria de inversão. Em cristais que possuem estrutura cristalina não centrossimétrica, como o quartzo, pode haver geração de soma de frequências se houverem condições de casamento de fases entre os feixes envolvidos. Na superfície da água, as moléculas se organizam de maneira diferente das moléculas do volume, quebrando a rede de ligações de hidrogênio e dando lugar a um grupo OH livre que só existe na interface. A espectroscopia SFG da superfície da água pura é capaz de revelar a existência do grupo OH livre, pois o espectro obtido provém exclusivamente das moléculas da superfície da água, e nenhum sinal é gerado no volume do líquido. O mesmo acontece no estudo de interfaces enterradas, que geralmente são impossíveis de ser investigadas por técnicas de superfície como microscopia de força atômica ou outra espectroscopia por feixes de íons ou elétrons. A quebra de simetria de inversão na interface faz com que alguns elementos de $\chi^{(2)}$ que contenham dependência na direção z , normal à interface, sejam não nulos. Para um conjunto de frequências $\omega_3 = \omega_1 + \omega_2$, o tensor de posto três $\vec{\chi}^{(2)}$ possui 27 elementos que são representados abaixo.

$$\vec{P}^{(2)}(\omega_3 = \omega_1 + \omega_2) = 2\epsilon_0 \sum_{ijk} \chi_{ijk}^{(2)} E_j(\omega_1) E_k(\omega_2) \quad (44)$$

$$\begin{aligned}
\vec{P}^{(2)}(\omega_3 = \omega_1 + \omega_2, \omega_1, \omega_2) = & \\
= 2\epsilon_0 \begin{bmatrix} \chi_{xxx}^{(2)} & \chi_{xyy}^{(2)} & \chi_{xzz}^{(2)} & \chi_{xyz}^{(2)} & \chi_{xzy}^{(2)} & \chi_{xxz}^{(2)} & \chi_{xxz}^{(2)} & \chi_{xxy}^{(2)} & \chi_{xyx}^{(2)} \\ \chi_{yxx}^{(2)} & \chi_{yyy}^{(2)} & \chi_{yzz}^{(2)} & \chi_{yyz}^{(2)} & \chi_{yzy}^{(2)} & \chi_{yzx}^{(2)} & \chi_{yxz}^{(2)} & \chi_{yxy}^{(2)} & \chi_{yyx}^{(2)} \\ \chi_{zxx}^{(2)} & \chi_{zyy}^{(2)} & \chi_{zzz}^{(2)} & \chi_{zyz}^{(2)} & \chi_{zzy}^{(2)} & \chi_{zzx}^{(2)} & \chi_{zxx}^{(2)} & \chi_{zxy}^{(2)} & \chi_{zyx}^{(2)} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} E_x(\omega_1)E_x(\omega_2) \\ E_y(\omega_1)E_y(\omega_2) \\ E_z(\omega_1)E_z(\omega_2) \\ E_y(\omega_1)E_z(\omega_2) \\ E_z(\omega_1)E_y(\omega_2) \\ E_z(\omega_1)E_x(\omega_2) \\ E_x(\omega_1)E_z(\omega_2) \\ E_x(\omega_1)E_y(\omega_2) \\ E_y(\omega_1)E_x(\omega_2) \end{bmatrix} \quad (45)
\end{aligned}$$

Onde $\chi_{xyz}^{(2)}$ corresponde a $\chi_{xyz}^{(2)}(\omega_3 = \omega_1 + \omega_2, \omega_1, \omega_2)$. O fator 2 serve para compensar os elementos equivalentes por permutação intrínseca onde a polarização e frequência do sinal SFG é mantida enquanto as polarizações e frequências dos feixes de bombeio são permutadas ao mesmo tempo. (47) Em Espectroscopia SFG em interfaces apenas 4 dos 27 tensores serão diferentes de zero e independentes. Consideremos uma interface no plano perpendicular ao eixo z, isotrópica nas direções y e x, com simetria de rotação C_∞ em torno no eixo z (veja Figura 7 abaixo).

Figura 7 - O volume do material é sendo centrossimétrico teremos quebra de simetria de inversão na interface, na direção z. A interface é considerada isotrópica nas direções x e y.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como a interface possui simetria de rotação em torno do eixo z, a inversão no sentido de uma das coordenadas x ou y de um elemento $\chi_{xyz}^{(2)}$ do tensor $\chi^{(2)}$ deve resultar no mesmo elemento de tensor, pois preservando o sentido no eixo z o fenômeno físico descrito pelos elementos de tensor seria o mesmo. Por exemplo, a troca de x por $-x$ não deve alterar os elementos que possuem dependência na direção x. Na direção z, pela quebra de simetria de inversão existente na interface, a inversão da coordenada z num elemento resulta em um elemento diferente. No entanto, a cada troca de sinal de uma componente cartesiana, ou a inversão de

uma coordenada de um elemento do tensor $\chi^{(2)}$ resulta no elemento original com sinal trocado. A inversão de duas coordenadas inverte duas vezes o sinal do elemento de maneira que o elemento com duas coordenadas invertidas resulta no mesmo elemento original. O mesmo raciocínio é aplicado quando três das coordenadas envolvidas são invertidas. Assim, teremos que para o elemento $\chi_{xzx}^{(2)}$, trocando x por $-x$ teremos o elemento $\chi_{(-x)(z)(-x)}^{(2)}$ resultando em $\chi_{(-x)(z)(-x)}^{(2)} = \chi_{xzx}^{(2)}$, que concorda com a isotropia na direção x da interface e portanto $\chi_{xzx}^{(2)} \neq 0$. Por outro lado, para o elemento $\chi_{zzx}^{(2)}$, trocando x por $-x$ obtemos o elemento $\chi_{z(-x)z}^{(2)} = -\chi_{zzx}^{(2)}$, mas como a inversão em x não altera a susceptibilidade na interface temos que $\chi_{zzx}^{(2)} = \chi_{z(-x)z}^{(2)} = -\chi_{zzx}^{(2)} = 0$, e esse elemento é nulo na interface. Aplicando esse raciocínio para os demais elementos da matriz veremos que dos 27 elementos apenas quatro serão independentes e não nulos: $\chi_{zzz}^{(2)}$, $\chi_{xxz}^{(2)} = \chi_{yyz}^{(2)}$, $\chi_{xzx}^{(2)} = \chi_{yzy}^{(2)}$ e $\chi_{zyy}^{(2)} = \chi_{zxx}^{(2)}$. No laboratório, em condições experimentais típicas, os elementos de tensor xzx e zxx são iguais ($\chi_{xzx}^{(2)} = \chi_{zxx}^{(2)}$) (50) (51), de maneira que apenas três elementos do tensor $\chi^{(2)}$ são necessários para determinar a orientação molecular média das moléculas na interface usando espectroscopia SFG. Os elementos de tensor são $\chi_{zzz}^{(2)}$, $\chi_{xxz}^{(2)} = \chi_{yyz}^{(2)}$ e $\chi_{xzx}^{(2)} = \chi_{yzy}^{(2)}$ que correspondem aos conjuntos de polarização PPP, SSP e SPS respectivamente. Por convenção, representamos o conjunto de polarizações do processo na ordem dos feixes SFG, visível, IR (veja Figura 8).

Figura 8 - Convenção usada para o conjunto de polarizações dos feixes envolvidos na espectroscopia SFG.

Fonte: Elaborada pelo autor

2.2.3 Regras de seleção para a espectroscopia SFG

A polarização não linear que gera a soma de frequências $P^{(2)}$ foi deduzida classicamente na seção 2.1.2. Devemos considerar o caso quântico e levar em consideração os níveis vibracionais quânticos permitidos para um dado potencial molecular bem como os níveis excitados apenas em transições não lineares. No diagrama abaixo, um fóton no infravermelho e um fóton no visível interagem não linearmente, levando a molécula do nível fundamental g para o nível virtual n . Num intervalo de tempo dado pelo princípio de incerteza $\Delta t \geq 1/4\pi\nu$, onde ν é a soma das frequências incidentes, o sistema volta ao estado fundamental g emitindo um fóton com a soma das energias dos fótons incidentes. Esse processo é chamado de paramétrico porque não há absorção de energia pelo meio, ou seja, a molécula não é excitada e permanece no mesmo estado inicial, como representamos no diagrama de energias da Figura 9 a seguir.

Figura 9 - Níveis de energia que representam a geração de soma de frequências em uma molécula.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Quando a frequência do infravermelho médio está em ressonância com um nível vibracional real permitido no Raman e no infravermelho da molécula o sinal SFG é aumentado, pois o processo de geração é favorecido pela ressonância. O mesmo acontece se houver ressonância com algum nível eletrônico do material. No entanto, mesmo que os feixes de luz incidentes

não estejam nas ressonâncias eletrônicas e vibracionais características do material ainda haverá geração não ressonante de soma de frequências. Nesse caso, todos os níveis envolvidos são níveis virtuais, ou seja, são níveis que só existem na condição de excitação do material em regime não linear, com feixes de alta intensidade. A geração não ressonante de frequências não depende das frequências dos feixes incidentes, se mantendo constante durante a varredura espectral. Quando a frequência do infravermelho se aproxima de um nível vibracional característico do material, o sinal SFG aumenta consideravelmente dando informações sobre a natureza química do material analisado.

A expressão microscópica para o valor médio da susceptibilidade não linear quadrática relacionada à geração de soma de frequências $\langle \chi^{(2)}(\omega_{sfg} = \omega_m + \omega_{mn}) \rangle$ é obtida usando a teoria de perturbação na equação de Schrödinger.

$$\chi_{ijk}^{(2)}(\omega_{sfg}) = \frac{P_i^{(2)}}{\epsilon_0 E_j(\omega_1) E_k(\omega_2)} \quad (46)$$

$$= \frac{N \rho_{gg}^{(0)}}{\epsilon_0 \hbar^2} \sum_{g,m,n} \frac{\langle g|\mu_i|n\rangle \langle n|\mu_j|m\rangle \langle m|\mu_k|g\rangle}{(\omega_{sfg} - \omega_{ng} + i\Gamma_{ng})(\omega_2 - \omega_{mg} + i\Gamma_{mg})}$$

$$+ \frac{\langle g|\mu_i|n\rangle \langle n|\mu_k|m\rangle \langle m|\mu_j|g\rangle}{(\omega_{sfg} - \omega_{ng} + i\Gamma_{ng})(\omega_1 - \omega_{mg} + i\Gamma_{mg})}$$

$$+ \frac{\langle n|\mu_i|g\rangle \langle m|\mu_j|n\rangle \langle g|\mu_k|m\rangle}{(\omega_{sfg} + \omega_{ng} + i\Gamma_{ng})(\omega_2 + \omega_{mg} + i\Gamma_{mg})}$$

$$+ \frac{\langle n|\mu_i|g\rangle \langle m|\mu_k|n\rangle \langle g|\mu_j|m\rangle}{(\omega_{sfg} + \omega_{ng} + i\Gamma_{ng})(\omega_1 + \omega_{mg} + i\Gamma_{mg})}$$

$$- \frac{\langle n|\mu_j|g\rangle \langle m|\mu_i|n\rangle \langle g|\mu_k|m\rangle}{(\omega_{sfg} - \omega_{nm} + i\Gamma_{nm})(\omega_2 + \omega_{mg} + i\Gamma_{mg})}$$

$$- \frac{\langle n|\mu_i|g\rangle \langle m|\mu_j|n\rangle \langle g|\mu_k|m\rangle}{(\omega_{sfg} - \omega_{nm} + i\Gamma_{nm})(\omega_1 - \omega_{ng} + i\Gamma_{ng})}$$

$$- \frac{\langle n|\mu_k|g\rangle \langle m|\mu_i|n\rangle \langle g|\mu_j|m\rangle}{(\omega_{sfg} - \omega_{nm} + i\Gamma_{nm})(\omega_2 - \omega_{ng} + i\Gamma_{ng})}$$

$$- \frac{\langle n|\mu_k|g\rangle \langle m|\mu_i|n\rangle \langle g|\mu_j|m\rangle}{(\omega_{sfg} - \omega_{nm} + i\Gamma_{nm})(\omega_1 + \omega_{mg} + i\Gamma_{mg})}$$

Onde $N\rho_{gg}^{(0)}$ é a densidade de moléculas por unidade de volume no estado fundamental g. Os vetores (“kets”) $|g\rangle$, $|n\rangle$, $|m\rangle$ representam as funções de onda dos estados quânticos g, n e m respectivamente. As componentes do momento dipolar elétrico no referencial do laboratório ao longo dos eixos i, j e k são representadas por μ_i , μ_j e μ_k respectivamente, ω_{nm} é a frequência de transição entre os estados n e m, e Γ_{ng} é o fator de amortecimento associado com a largura de linha da transição.

A susceptibilidade não linear de segunda ordem $\chi^{(2)}$ é uma propriedade macroscópica do material, correspondendo à soma das hiperpolarizabilidades moleculares β (também chamada de hiperpolarizabilidade de segunda ordem ($\beta^{(2)}$)). Quando a frequência ω_{IR} do feixe no infravermelho se aproxima de uma ressonância vibracional, ω_0 , de uma molécula, a hiperpolarizabilidade β será dada por:

$$\beta_{ijk} = -\frac{1}{2\hbar} \sum_s \left\{ \frac{\langle g|\mu_i|s\rangle\langle s|\mu_j|\vartheta\rangle}{\hbar(\omega_{sg} - \omega_{sg})} + \frac{\langle g|\mu_j|s\rangle\langle s|\mu_i|\vartheta\rangle}{\hbar(\omega_{vis} - \omega_{s\vartheta})} \right\} \times \left\{ \frac{\langle \vartheta|\mu_j|g\rangle}{\omega_{IR} - \omega_0 + i\Gamma} \right\} \quad (47)$$

Onde g, ϑ e s correspondem ao estado inicial, um estado vibracional excitado, e um estado virtual não linear qualquer. O primeiro termo entre chaves dessa soma corresponde à polarizabilidade da transição Raman, enquanto o segundo termo entre chaves corresponde ao momento de dipolo da transição infravermelho. Assim, um modo vibracional molecular é um modo ativo no SFG se este for ativo tanto no Raman quanto no infravermelho. Portanto, para uma molécula centrossimétrica não ocorre geração de soma de frequências, pois os modos vibracionais são ativos no espectro infravermelho ou no espectro Raman, mas nunca simultaneamente em ambos.

É importante notar que $\chi^{(2)}$ é um tensor polar, portanto depende da orientação das moléculas na interface. Se a orientação média for randômica, de modo que a hiperpolarizabilidade das moléculas seja, em média, nula no espaço, a susceptibilidade será nula. Esse é o mesmo argumento que discutimos na seção anterior, que torna $\chi^{(2)} = 0$ em meios centrossimétricos. A hiperpolarizabilidade de uma molécula ou grupo molecular $\beta_{\rho\sigma\varphi}$, nas coordenadas moleculares $\hat{\rho}$, $\hat{\sigma}$ e $\hat{\varphi}$, podem ser relacionadas com a susceptibilidade não linear de segunda ordem $\chi_{ijk}^{(2)}$ nas coordenadas de laboratório $\hat{i}$, $\hat{j}$ e $\hat{k}$ pela expressão:

$$\chi_{ijk}^{(2)} = N \langle (\hat{i} \cdot \hat{\rho})(\hat{j} \cdot \hat{\sigma})(\hat{k} \cdot \hat{\phi}) \rangle \beta_{\rho\sigma\phi} \quad (48)$$

Onde N é a densidade de moléculas na interface e os “brackets” representam a média espacial da orientação molecular.

A susceptibilidade não linear de segunda ordem pode ser representada por uma parte ressonante que se deve ao caso em que ω_1, ω_2 , ou $\omega_1 + \omega_2$ se aproximam das frequências naturais de ressonância do material, e um termo não ressonante.

$$\chi^{(2)}(\omega) = \chi_{NR}^{(2)} + \sum_q \frac{A_q}{\omega - \omega_q + i\Gamma_q} \quad (49)$$

Onde a somatória em q representa os níveis vibracionais que podem estar em ressonância. Essa equação é usada para ajustar e interpretar os espectros SFG. Na parte ressonante é importante notar que o termo A_q é proporcional ao produto dos elementos de matriz das transições Raman e infravermelho do nível vibracional q.

2.3 Microscopia SFG no estudo de interfaces

A espectroscopia SFG é considerada hoje uma das técnicas mais poderosas no estudo de superfícies e interfaces. Essa técnica pode ser aplicada a diversos sistemas permitindo o estudo de interfaces que por outras técnicas seria impraticável. É utilizada como técnica para estudos em modelos de membrana biológica, dispositivos eletrônicos semicondutores, filmes finos automontados, eletroquímica, e até em soluções coloidais. Devemos considerar também a importância das técnicas de microscopia e varredura superficial que são dedicadas ao estudo de interfaces como, Microscopia de Ângulo de Brewster (BAM), Microscopia de varredura por Força Atômica (AFM), Microscopia de varredura por tunelamento, microscopia confocal por fluorescência e por geração de segundo harmônico, dentre outras que vêm sendo desenvolvidas especificamente para estudo de interfaces. A microscopia por Geração de Soma de Frequências (microscopia SFG) é uma técnica específica de superfícies e interfaces que utiliza as propriedades da Geração de Soma de Frequências (SFG) e da microscopia óptica para obter imagens da composição química de uma interface ou a distribuição dos componentes químicos que compõem a interface (veja na Figura 10 um modelo esquemático de montagem do microscópio SFG). A primeira aplicação dessa técnica foi publicada por

Flörsheimer et al. em 1999 para obter imagens de um filme de Langmuir-Blodgett. Desde então, outras aplicações foram sendo exploradas como: Estudo de sistemas biológicos, filmes automontados e Transistores orgânicos (OFETs). Até o presente, as aplicações da microscopia SFG tem se limitado a interfaces metálicas, ou interfaces poliméricas que sejam fixas, ou estáveis durante um grande intervalo de tempo. A razão é que um microscópio SFG comercial chega a levar horas para obter uma única imagem em uma interface metálica ou polimérica. Nesse trabalho desenvolvemos e construímos, no Laboratório de Espectroscopia não Linear em Interfaces (LENI) do IFSC/USP, um microscópio SFG mais sensível. O microscópio SFG implementado no LENI é capaz de obter imagens de interfaces metálicas ou poliméricas em dezenas de segundos. Capturar imagens em um menor tempo de acumulação de sinal é fundamental para que seja possível aplicar a técnica de microscopia SFG ao estudo de interfaces líquidas, que além de emitir sinal SFG fraco, podem se mover lateralmente durante curtos intervalos de tempo.

Figura 10 - Esquema simples de microscópio SFG.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A descrição do projeto de desenvolvimento, construção, caracterização do funcionamento e as aplicações que foram exploradas serão detalhadas nos capítulos seguintes dessa dissertação.

2.3.1 Espectromicroscopia de interfaces

Espectromicroscopia é uma técnica que combina dados de espectroscopia com microscopia. O conjunto de dados consiste em uma série de imagens tomadas cada uma com um comprimento de onda da luz num dado intervalo de energia, como representamos na

Figura 11e Figura 12. Assim, podemos obter o espectro luminoso de cada região ou ponto da amostra. Para obter espectromicroscopia SFG, tomamos ao menos uma imagem de microscopia SFG para cada comprimento de onda no infravermelho médio na região que se deseja obter o espectro. Devemos obter a mesma sequência de imagens em uma amostra uniforme padrão, tal como o quartzo ou sulfeto de zinco, para normalizar o conjunto de imagens e corrigir distorções no espectro devido a variações de intensidade e sobreposição espacial dos feixes de excitação. Dessa forma podemos obter a distribuição química e estrutural das moléculas que compõem a interface.

Figura 11 - Representação da espectromicroscopia. Cada ponto da amostra possui um espectro diferente.

Fonte: FRITZ-HABER... (52)

Figura 12 - Obtenção de espectromicroscopia por meio de um conjunto de imagens.

Fonte: CARL... (53)

3 TEORIA DA MICROSCOPIA POR VISÃO OBLÍQUA

Neste capítulo será apresentada um pouco da teoria de microscopia óptica para entender o projeto de construção do microscópio SFG e quais podem ser as vantagens e desvantagens de utilizar a técnica de microscopia óptica por visão oblíqua para a implementação da microscopia SFG no laboratório. Serão abordados tópicos sobre distorção da imagem, resolução espacial (limites e métodos de caracterização), profundidade de campo em microscopia por visão oblíqua e detecção de imagem utilizando uma câmera CCD intensificada.

3.1 Microscopia por visão oblíqua

Como discutimos no capítulo 2, a espectroscopia SFG em interfaces pode ser medida em três conjuntos de polarizações de entrada e saída dos feixes. Essas polarizações são SSP, SPS e PPP, na ordem dos feixes SFG, 532 nm e infravermelho, onde S significa polarização perpendicular ao plano de incidência e P a polarização paralela ao plano de incidência. Para que possamos fazer medidas de microscopia SFG nesses três conjuntos de polarização o feixe de bombeio 532 nm e o feixe infravermelho devem ser incididos obliquamente na amostra gerando um sinal SFG que sai também em ângulo oblíquo. Assim a configuração do microscópio para melhor coletar o sinal SFG emitido é a configuração de microscopia por visão oblíqua. Nessa montagem, o eixo focal da objetiva faz um ângulo oblíquo com o eixo normal do plano da amostra. Um exemplo de microscópio desse tipo é o microscópio de ângulo de Brewster (BAM) (54). Devemos citar também a diferença entre essa montagem e a do microscópio por iluminação oblíqua (55), onde eixo focal da objetiva é colinear com o eixo normal do plano da amostra. Nessa montagem é usado um bloqueador para selecionar apenas os raios que partem obliquamente da amostra.

A microscopia oblíqua tem vantagens e desvantagens. Das vantagens podemos citar que os contornos são resolvidos de modo a destacar melhor o aspecto tridimensional do objeto (veja na Figura 13 uma imagem obtida utilizando um microscópio por visão oblíqua em um contato de circuito impresso). No caso da microscopia por ângulo de Brewster e da microscopia SFG essa vantagem não é aproveitada, pois geralmente são estudados filmes ultrafinos ou até formados por uma única monocamada atômica. Para essas técnicas a vantagem da microscopia por visão oblíqua está em possibilitar o uso de luz na polarização P.

Figura 13 - Nesta imagem temos o detalhe da estrutura em três dimensões dos terminais de um circuito integrado. Esta imagem foi obtida com um microscópio de visão oblíqua.

Fonte: CALTEX scientific... (56).

A maior desvantagem da técnica é que poderá haver distorção e perda de foco nas laterais da imagem, por conta da inclinação do plano da amostra em relação ao eixo óptico. O plano focal do microscópio coincide apenas com uma região da amostra. Em torno do plano focal há uma região onde a amostra é focalizada em níveis aceitáveis, ou seja, há uma região que podemos considerar em foco, que é chamada de profundidade de campo. O termo profundidade de campo também é usado em fotografia para relacionar a porção da imagem que esta fora de foco. Discutiremos melhor a profundidade de campo na seção 3.6.

3.2 Distorção da imagem

A microscopia por visão oblíqua produz imagens distorcidas na direção em que há a inclinação do plano da imagem. Como a amostra é oblíqua em relação ao eixo óptico da objetiva, a imagem obtida com um microscópio por visão oblíqua, é comprimida em uma direção (veja Figura 14).

Figura 14 - A obtenção de imagens com o objeto inclinado em relação ao eixo óptico gera distorções geométricas. Esse problema é encontrado, por exemplo, em mapeamento geográfico.

Fonte: NATURAL resources canada... (57).

A imagem será projetada em um plano oblíquo que faz um ângulo α com o eixo focal do sistema óptico, inclinada em relação ao plano do chip CCD. Considerando que a magnificação

é aproximadamente a mesma em todos os pontos do plano da amostra, o plano da imagem fará mesmo ângulo α com o eixo focal (veja Figura 15).

Figura 15 - A formação da imagem em um microscópio de visão oblíqua tem a imagem projetada na CCD de maneira comprimida em uma direção. Se pudermos desconsiderar outras distorções geométricas, podemos corrigir completamente a imagem multiplicando a dimensão comprimida por $1/\cos\theta$, onde θ é o ângulo entre a normal da amostra e o eixo focal.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Se considerarmos $\alpha = 44^\circ$ a imagem projetada na CCD será dada simplesmente pela projeção cartesiana da imagem real como mostra a Figura 15. Nesse caso o sinal SFG sai com um ângulo de 46° em relação ao eixo normal ao plano da amostra. A distorção da imagem detectada pelo chip CCD pode ser corrigida esticando a imagem digitalmente pelo fator $1/\cos 46^\circ \approx 1.44$. Ferramentas para ajuste de escala de imagem podem ser encontradas em vários softwares de processamento de imagem. Para analisar e processar as imagens de microscopia utilizamos o software AstroImageJ e o ImageJ. (58) (59)

3.3 Resolução limitada pela difração

A resolução espacial limitada pela difração depende basicamente da abertura numérica do sistema óptico e do comprimento de onda da luz utilizada. Pelo critério de Rayleigh a menor distância entre dois pontos distinguíveis é alcançada quando o primeiro mínimo da difração de um ponto coincide com o máximo do outro ponto. Quando fazemos a imagem de uma fonte pontual, devido à natureza ondulatória da luz, é formado um padrão de difração no plano imagem. Esse padrão contém anéis concêntricos chamados círculos de Airy (veja Figura 16). Quando dois pontos estão muito próximos os dois padrões de difração se

superpõem. Nesse caso os pontos não são mais distinguíveis. A distância mínima entre dois pontos distinguíveis define o limite de resolução óptica do sistema. Essa distância de acordo com o critério de Rayleigh é a distância entre o máximo da difração de uma fonte e o primeiro mínimo dos discos de Airy da mesma fonte.

Figura 16 - Padrão de difração de duas fontes pontuais. a) As fontes estão distinguíveis. b) A distância entre as fontes pontuais é a mínima possível para serem distinguidas. c) A separação entre as fontes pontuais é menor que a distancia mínima, portanto, a imagem aparente é de apenas uma fonte pontual.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A equação para a menor separação entre duas fontes pontuais pelo critério de Rayleigh será.

$$R_R = 0,61 \frac{\lambda}{NA} \quad (50)$$

Onde λ é o comprimento de onda da luz, e NA é abertura numérica da lente utilizada. Outra aproximação teórica para a resolução espacial limitada pela difração foi publicada por Ernst Karl Abbe, que em seus trabalhos demonstrou que o limite de resolução de um microscópio é dado por.

$$R_A = \frac{\lambda}{2NA} \quad (51)$$

A abertura numérica de uma lente é um número adimensional definido como o seno do ângulo do cone de luz que compreende o feixe de entrada ou saída da lente, como representamos na Figura 17. Para uma fonte pontual no foco de uma lente, de acordo com a óptica geométrica, abertura numérica é definida como:

$$NA = n \sin \theta = \frac{D}{2f} \quad (52)$$

Onde n é o índice de refração do meio, θ é o ângulo que compreende o cone de luz, D é a abertura ou diâmetro da lente e f é a distância focal da lente.

Figura 17 - A abertura numérica é relacionada com o cone de luz que incide ou que sai da lente. Podemos definir a abertura numérica tanto no espaço objeto quanto no espaço imagem

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em fotografia o termo mais utilizado é o número-f (f-number, ou f-stop) representado por N ou $f/\#$ onde o valor $\#$ corresponde ao número-f (N é o valor $\#$ em $f/\#$, não confundir com a divisão do foco da lente pelo número $\#$). Para uma lente, o número-f é definido como a razão entre a distância focal e o diâmetro de abertura da entrada da lente.

$$N = \frac{f}{D} = \frac{1}{2NA} \quad (53)$$

Se o objeto não está no foco da lente, podemos escrever analogamente a abertura numérica e o número-f efetivos da lente, no espaço objeto e no espaço imagem.

No espaço objeto:

$$N_{eff} = N \left(\frac{1+m}{m} \right) \quad (54)$$

No espaço imagem:

$$N_{eff} = N(1+m) \quad (55)$$

Onde N é o número-f com a imagem projetada no infinito (geralmente esse número é informado nas especificações da lente) e m é o módulo do valor da magnificação.

A resolução espacial também pode ser representada pelo inverso da distância R_A em ciclos por milímetro ou par de linhas por milímetro (lp/mm do inglês *line pairs per milimeter*) significando a maior frequência de separação entre linhas que podem ser distinguidas. Usualmente medimos a resolução espacial por meio de padrões de calibração que contem linhas periodicamente espaçadas. Por exemplo, se a menor distância entre dois pontos distinguíveis for $10\ \mu\text{m}$, escrevemos que a resolução espacial é dada e $100\ \text{lp/mm}$, significando a maior frequência de linhas distinguíveis pelo dado sistema óptico.

3.4 Resolução limitada pela CCD

O tamanho de pixel do chip CCD usado para detectar a imagem estabelece um limite de resolução de imagem que pode ser capturada. Considere um objeto circular cuja imagem é projetada num sensor CCD. Se a imagem projetada tiver tamanho menor que o tamanho de um pixel de leitura (raio de até $1/2\ \text{pixels}$), a imagem capturada corresponderá a um quadrado ou pixel (veja Figura 18). Ou seja, a imagem projetada é detectada pelo chip CCD e convertida em um quadrado ou pixel. Ainda na mesma análise, se a mesma imagem for projetada na borda de um dos pixels de leitura, o chip CCD converterá esta em quatro quadrados ou pixels (veja Figura 18). Mesmo que a imagem projetada seja maior que o tamanho da célula unitária de leitura do chip CCD, a imagem será detecta como um conjunto de pixels.

Figura 18 - A imagem de um objeto circular projetada num chip CCD é convertida em um conjunto de quadrados ou pixels. Na ultima linha quando a imagem tem diâmetro igual a $3\sqrt{2}$ pixels, podemos ver que, nesse caso, o tamanho da imagem que o chip CCD detecta não depende da posição em que o círculo imagem é projetado. Ou seja, o tamanho da imagem convertida é o mesmo quando a imagem é projetada no centro ou nos cantos dos pixels de leitura do chip CCD.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Um círculo imagem que fosse projetado com diâmetro de mais de $3\sqrt{2}$ pixels seria detectado e convertido pelo chip CCD na forma que mais se aproxima de um círculo. Portanto poderíamos construir um modelo no qual, o menor raio de círculo que tem sua forma circular distinguível na imagem capturada pelo chip CCD seja $R_{\min} = 3/\sqrt{2}$ pixels. Nesse modelo, o menor raio de imagem, distinguível, seria comparado ao raio do círculo de Airy que determina a resolução espacial limitada pela difração. Seguindo esse raciocínio o limite de resolução do chip CCD seria:

$$R_{CCD} = \frac{3}{\sqrt{2}} \text{ pixels} \quad (56)$$

Portanto, dados dois pontos no plano objeto que tem suas imagens projetadas num chip CCP. A menor distância entre esses pontos que permite a distinção individual dos pontos poderia ser aproximada por:

$$R_p = \frac{2.12 \text{ Pixel}}{\text{Magnificação}} \quad (57)$$

Essa seria a resolução óptica no plano da amostra limitada pelo tamanho da unidade de leitura do chip CCD (tamanho do pixel). Para entender melhor veja a ilustração da Figura 19.

Agora imagine a imagem de um padrão de linhas repetidas, com uma dada frequência. Se a frequência de repetição das linhas no espaço for maior que a metade da frequência dos pixels da CCD, as linhas não seriam distinguíveis na imagem capturada pelo chip. O teorema de Nyquist diz que a frequência de uma amostragem digital deve ser pelo menos o dobro da frequência da amostra analógica (60). Isso significa que a frequência de Nyquist para um sensor CCD é dada pelo inverso da distância medida a partir do centro entre um pixel e outro. A expressão encontrada acima na equação (57) se aproxima da previsão do teorema de Nyquist.

Figura 19 - O limite de resolução espacial imposto pela CCD é dado no plano imagem por duas vezes a distância entre os centros de dois pixels adjacentes.

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.5 Medida da resolução óptica pelo MTF

Uma maneira muito utilizada para caracterizar um sistema óptico é medindo o MTF (do inglês *Modulation Transfer Function*). O MTF representa o grau de modulação do sinal de saída em função da frequência do sinal de entrada. Em microscopia a modulação do sinal de saída corresponde ao contraste da imagem projetada em relação ao contraste do objeto e a frequência do sinal corresponde à frequência de espaçamento ou a periodicidade das linhas que formam o objeto. A medida consiste em obter a imagem de um objeto na forma de uma onda senoidal de frequência dada em ciclos por milímetro (cl/mm) e determinar o contraste da imagem pela razão entre as modulações da imagem e do objeto.

Figura 20 - A medida do contraste da imagem de um padrão de linhas repetidas.

Fonte: Adaptado de NIKON... (61).

O gráfico do MTF é o contraste da imagem em função da frequência do objeto (veja Figura 21). A obtenção de um objeto ou um padrão de calibração de microscópio da forma de uma onda senoidal não é simples. Usualmente é utilizado um padrão que contém linhas

periodicamente espaçadas na forma de onda quadrada. No caso específico de medirmos a resposta em frequência com utilizando um objeto ou um padrão de linhas no formato de onda quadrada, a resposta em frequência não é mais definida como MTF, mas sim como função de transferência de contraste ou CTF (do inglês “*Contrast Transfer Fncion*”), contudo o significado é o mesmo do MTF, e a frequência pode ser dada em lp/mm (do inglês *line pair per milimeters*), veja Figura 20. Para padrões de linhas de frequências altas próximo do limite de resolução do microscópio o MTF e o CTF tornam-se sinônimos. Muitas vezes o MTF é referenciado em especificações técnicas, mesmo que a medida tenha sido feita usando um padrão na forma de onda quadrada, (62)

Figura 21 - Contraste vs. Frequência espacial. Essa figura mostra a curva do MTF de um sistema óptico ideal, limitado pela difração, e uma curva típica de um sistema com aberrações ópticas geométricas.

Fonte: TRIOPTICS... (63).

Existem diversos tipos de padrões de calibração de microscópio que podem ser usados para medir o MTF. Num sistema ideal, limitado apenas pela difração, o gráfico do MTF cai quase linearmente com a frequência. O MTF é derivado da função de transferência óptica OTF (do inglês “*Optical Transfer Function*”). Formalmente a OTF é definida como a transformada de Fourier do padrão de espalhamento da imagem de uma fonte pontual ou PSF (do inglês “*Point Spread Function*”), veja Figura 16. A componente em frequência (ν) da OTF é escrita da seguinte forma:

$$OTF(\nu) = MTF(\nu)e^{if(\nu)} \quad (58)$$

Onde $f(\nu)$ é a função de transferência de fase que depende da frequência ν e pode representar aberrações ópticas do sistema. Por exemplo, se $f(\nu)$ é uma função linear da frequência, essa função representa um deslocamento na imagem característico de uma aberração geométrica. (61) Em geral considera-se o sistema óptico como ideal e sem aberrações ópticas. Assim

quando o objeto está bem centralizado no eixo focal consideramos o termo complexo igual a um e o MTF fica igual ao OTF. O MTF é normalizado pela intensidade total detectada, dessa forma a medida não depende da intensidade da iluminação incidente na amostra durante a medida.

Figura 22 - Ilustração da função de transferência óptica de um sistema sem aberrações ópticas . a) MTF de um sistema óptico bem focalizado b) imagem do padrão de difração de uma fonte pontual (PSF) c) imagem de um padrão de calibração de microscópio utilizado para medir o MTF d) MTF de um sistema mal focalizado e) imagem mal focalizada do padrão de difração de uma fonte pontual (PSF) f) imagem mal focalizada de um padrão de calibração de microscópio que caracteriza o MTF

Fonte: WIKIPEDIA... (64).

O MTF pode ser medido de várias formas. Uma é através do padrão de difração (PSF) no plano imagem devido a uma fonte pontual. Nesse caso o MTF será dado pela transformada de Fourier da função PSF medida. Outra forma de medir o MTF é utilizando padrões de linhas como o que é mostrado na Figura 20 ou por padrões de calibração em forma de degrau ou linha (veja Figura 22). Para obter o MTF utilizando linhas periodicamente espaçadas utilizamos a seguinte expressão para o cálculo do MTF em função da frequência de espaçamento das linhas.

$$MTF(\nu) = \frac{\text{Modulação da imagem}}{\text{Modulação do objeto}} \quad (59)$$

$$\text{Modulação} = \frac{(I_{\max} - I_{\min})}{(I_{\max} + I_{\min})} \quad (60)$$

Onde I_{max} e I_{min} representam as intensidades máxima e mínima da imagem respectivamente, ou as amplitudes máxima e mínima do objeto. A modulação é o mesmo que o contraste relativo do objeto ou da imagem. Ou seja, o MTF é dado pela razão entre a modulação da imagem pela modulação do objeto, sendo que a modulação é dada pela razão entre a amplitude da onda senoidal do sinal detectado, e a intensidade média do sinal detectado.

A medida do MTF, utilizando um padrão de linhas, tem certas desvantagens para representar o poder de resolução de um sistema óptico. Essa medida pode ser usada para determinar o poder de resolução óptica em todo espectro de frequências espaciais, mas para determinar o limite de resolução óptica é preciso estabelecer qual contraste mínimo corresponde ao limite de resolução espacial. Frequentemente são considerados para contraste mínimo: 10%, 5% ou até 3%, onde esses valores representam a capacidade de distinguir contraste do olho humano ou do sistema utilizado para a detecção do padrão de linhas. Acredita-se que o olho humano seja capaz de detectar contrastes mínimos entre 15% até 5% (62), mas esse contraste mínimo depende de fatores como a distância luminosidade, ângulo de visão, dentre outros fatores. Estabelecer o limite de resolução de um microscópio como frequência espacial detectada com contraste mínimo de 3% pode não corresponder ao limite detectável pelo olho humano, sem um tratamento prévio da imagem. Outro problema é o formato dos padrões utilizados para medir o contraste. Esses padrões em geral tem forma de onda quadrada (a medida devia assim ser chamada de CTF), uma vez que a fabricação de padrões em forma senoidal é complicada. A medida do MTF é modelada considerando a imagem em forma de onda senoidal de um objeto que também tem forma senoidal. Quando utilizamos um padrão de calibração de formato de onda quadrada, o limite de resolução medido será melhor que o valor que obteríamos com um padrão de forma senoidal. A causa é que a onda quadrada é composta de um conjunto de ondas senoidais de diferentes frequências, sendo que a fundamental tem amplitude maior que a amplitude da onda quadrada.

3.6 Profundidade de Campo

Nessa seção trataremos da profundidade de campo. Denotaremos aqui a profundidade de campo por DOF (do inglês *Depth of Field*). O DOF é muito aproveitado por fotógrafos para evidenciar regiões em detrimento de outras. No linguajar dos profissionais de fotografia, o DOF é também referenciado como “*Bokeh*”, significando a qualidade da fotografia obtida com uma profundidade de campo bem otimizada. Na Figura 23 abaixo são mostradas duas

fotografias que ilustram o conceito de profundidade de campo, onde temos uma região da foto bem focalizada e uma região menos focalizada ou borrada.

Figura 23 - A profundidade de campo é a região ao longo do eixo óptico e próxima ao plano objeto em que a imagem parece estar em foco. Fora dessa região a imagem é considerada borrada. Esse fenômeno pode ser observado tanto em microscopia por visualização oblíqua quanto em fotografia.

Fonte: WIKIPEDIA... (65).

Para entender a profundidade de campo, imagine a formação de uma imagem real por uma lente convergente. Inicialmente temos um objeto na posição S e sua imagem real e invertida projetada em um anteparo posicionado em S' . Se mantivermos fixos, o anteparo e a lente, variando a posição do objeto ao longo do eixo óptico, a imagem desse objeto projetada no mesmo anteparo se tornará borrada quanto mais distante da posição inicial S . Se o objeto fosse um ponto material, a imagem borrada seria um círculo de diâmetro C , que é chamado círculo de confusão. A profundidade de campo ou DOF é definida como a região ao longo do eixo óptico, em torno do plano objeto, em que um objeto pontual terá sua imagem projetada no plano imagem, formando um círculo de confusão de dimensões aceitáveis. É necessário definir o tamanho máximo aceitável para o círculo de confusão. Isso vai definir o que consideraremos na imagem como em foco e fora de foco.

A aproximação teórica para o DOF dada pela óptica geométrica pode ser obtida de maneira simples utilizando o esquema da Figura 24. Considerando que a magnificação é a mesma nos pontos S_1 e S_2 teremos que a profundidade de campo será:

$$DOF = 2N_{ef}C = 2CN\left(\frac{1+m}{m}\right) \quad (61)$$

Onde, N_{ef} é o número-f efetivo no espaço do objeto, N é o número-f com a imagem projetada no infinito (informada nas especificações da lente) e C é o diâmetro do círculo de confusão no espaço do objeto.

Figura 24 - A profundidade de campo está diretamente relacionada com o máximo diâmetro aceitável do círculo de confusão.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Essa aproximação pode funcionar bem para microscópios cuja resolução espacial é próxima do limite imposto pela difração (66) (67), ou em casos que podem ser descritos bem apenas usando óptica geométrica. No caso do microscópio SFG nenhum desses pré-requisitos é satisfeito, pois a imagem é projetada numa CCD que tem tamanho de pixel muito maior que o limite de resolução da difração, e os feixes envolvidos se propagam como feixes Gaussianos.

A definição do círculo de confusão máximo depende do sistema óptico, de como a imagem é detectada e da resolução espacial que é requerida. Se o círculo de confusão for adotado como o diâmetro do círculo de Airy que limita a resolução espacial pela difração, o DOF será a região em torno do plano focal em que o objeto pode se distanciar e ainda ser distinguido no limite de resolução determinado pela difração. Mas, na prática, nem sempre esse critério será adotado. Por ser um fator subjetivo, o círculo de confusão é muitas vezes mal entendido. A melhor maneira de definir o tamanho aceitável do círculo de confusão é, considerar qual resolução espacial é necessária para distinguir os detalhes desejados. Por exemplo, consideremos que a resolução do olho humano, a uma distancia de 25 cm, seja de 5 pares de linhas por milímetro (5 lp/mm), um círculo de confusão de diâmetro 0,2 mm seria suficiente para tornar esse mesmo padrão de linhas não mais distinguível (veja Figura 25). Agora considere o mesmo individuo observando, nas mesmas condições, um padrão de linhas de frequência 2 lp/mm. O limite de resolução do olho sendo 5 lp/mm, seria mais que o suficiente para distinguir um padrão de 2 lp/mm e o círculo de confusão que tornaria

completamente indistinguível um padrão de 2 lp/mm deveria ter 0,5 mm de diâmetro. Com isso podemos concluir que o círculo de confusão pode ser considerado como o inverso da resolução requerida. (68)

Figura 25 - O círculo de confusão (CoC) é definido com relação ao tamanho do objeto que se deseja distinguir na imagem. Quando o círculo de confusão se torna igual a 0,5 mm as trilhas não será mais bem resolvida na imagem.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O DOF também pode ser definido pela região onde um feixe gaussiano se encontra focalizado. Nesse caso, o DOF será a região do feixe Gaussiano conhecida como zona de Rayleigh, onde as ondas são colimadas e a cintura do feixe atinge diâmetro máximo de $2\sqrt{2}w_0$, com w_0 sendo o raio da cintura do feixe. Na Figura 26, a distância b representa o DOF. (69)

Figura 26 - Feixe Gaussiano. A profundidade de campo ou de foco para um feixe gaussiano é dada pela distancia b . Nessa região o feixe é considerado como focalizado.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A cintura de um feixe gaussiano que se propaga ao longo da direção z é descrita pelas seguintes equações. (69)

$$W[z] = W_0 \sqrt{1 + \left(\frac{z}{Zr}\right)^2} \quad (62)$$

$$Zr = \frac{\pi W_0^2}{\lambda} \quad (63)$$

Onde $W[z]$ representa a cintura do feixe ao longo o eixo z e Zr a zona de Rayleigh. Nesse caso o DOF será considerado como sendo duas vezes a zona de Rayleigh.

$$DOF = 2Zr \quad (64)$$

A equação (64) considera que o círculo de confusão máximo aceitável vale $2(\sqrt{2}W_0)$. Essa consideração leva um valor para o DOF menor do que o aparente em algumas medidas. Assim para obter uma boa expressão para o DOF considerando a propagação dos feixes Gaussianos, devemos considerar a imagem formada por um feixe gaussiano e as dimensões aceitáveis do círculo de confusão dada pelo inverso da resolução requerida (veja Figura 25).

Figura 27 - A formação da imagem de um feixe gaussiano por uma lente convergente. Nessa imagem, prolongamos o feixe gaussiano para antes da amostra apenas para melhor visualização da região, que é focalizada na amostra devido ao DOF. Não confundir, pois o feixe gaussiano que aqui referimos é o SFG gerado na superfície da amostra e se propaga em direção à lente.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A formação da imagem por feixes gaussianos segue a mesma equação de lentes da óptica geométrica, mas diferentemente do tratamento geométrico ao considerar que a imagem é focalizada em uma região que é a zona de Rayleigh. Como podemos ver na Figura 27, uma porção da amostra se encontra a frente e outra parte atrás do plano focal objeto. Assim, na microscopia por visão oblíqua a resolução óptica varia ao longo do plano da amostra. A

região que consideramos bem focalizada dependerá da profundidade de campo e também do ângulo α entre a imagem formada e o eixo óptico. A região em foco ao longo da amostra, L , será dada então por:

$$L = \frac{DOF}{\cos \alpha} \quad (65)$$

Consideremos a imagem de um padrão de trilhas de ouro de 10 μm de largura, espaçadas também de 10 μm , ou seja, um padrão de 50 lp/mm, como ilustrado na Figura 28. Para distinguir esse padrão de calibração, é necessária a resolução óptica de 20 μm (ou 50 lp/mm). Como já afirmamos anteriormente, um círculo de confusão de 20 μm poderia tornar a imagem do padrão borrada. Vamos obter o DOF de uma imagem das trilhas de ouro como mostra a Figura 28. Cada trilha emitirá um feixe de luz gaussiano. A trilha que estiver no limite da região que compreende o DOF emitirá um feixe que sai com a cintura mínima dada pela espessura da trilha vista, e chegará ao plano focal objeto com o diâmetro do círculo de confusão máximo aceitável.

Figura 28 - Esta imagem representa um padrão de trilhas com espaçamento de 10 μm , formando um ângulo oblíquo com o eixo óptico de um microscópio por visão oblíqua. A imagem de uma das trilhas se propagando como um feixe Gaussiano. A imagem da trilha localizada atrás do plano focal objeto, é projetada com um círculo de confusão no detector. A espessura aparente da trilha é 6.9 μm devido à inclinação da amostra. O círculo de confusão é dado por $C=2 \times 6.9=13.8 \mu\text{m}$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 29 - Essa figura ilustra como a largura aparente das trilhas se torna 6.9 μm , quando as trilhas possuem 10 μm de largura, mas estão inclinadas de 44° em relação ao eixo focal.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A projeção dos feixes emitidos pelas trilhas no plano focal objeto corresponde ao tamanho aparente da trilha vista pelo sistema óptico. Dessa maneira, como mostra a Figura 29 uma trilha que tem 10 μm de largura aparenta ter 6.9 μm (veja a seção 3.2, sobre a distorção da imagem). A projeção da trilha oblíqua no plano focal do objeto irá então resultar em trilhas de 6.9 μm espaçadas pela mesma distância. A resolução necessária para distinguir essa frequência espacial de trilhas é 72 lp/mm (13,9 μm). Com isso podemos considerar que o círculo de confusão máximo vale $CoC=13.8 \mu\text{m}$, pois corresponde à resolução requerida para distinguir o padrão de linhas considerado. Como podemos ver, o círculo de confusão depende apenas do tamanho do objeto que queremos distinguir na imagem. Adicionalmente o diâmetro da cintura do feixe é dado pelo tamanho aparente do objeto, ou seja, o tamanho projetado no plano focal objeto. Isso leva à seguinte relação entre o círculo de confusão CoC e a cintura do feixe gaussiano W_0 .

$$CoC = 4W_0 \quad (66)$$

Para obter a expressão para o DOF, escrevemos a equação (62) de propagação do feixe gaussiano até a cintura do feixe, $W[z]$, atingir o raio do círculo de confusão, onde z corresponderá à metade do DOF.

$$\frac{CoC}{2} = W_0 \sqrt{1 + \left(\frac{DOF / 2}{Zr} \right)^2} \quad (67)$$

Dessa forma, o DOF poderá ser calculado a partir da expressão:

$$DOF = 2Zr \sqrt{\frac{CoC^2}{4W_0^2} - 1} \quad (68)$$

Substituindo a equação(66), podemos mostrar que o DOF dependerá basicamente do tamanho do objeto que se deseja focalizar no microscópio.

$$DOF = 2\sqrt{3}Zr = 2\sqrt{3} \frac{\pi W_0^2}{\lambda} \quad (69)$$

Onde W_0 é o raio da cintura do feixe emitido pelo objeto e λ é o comprimento de onda da luz. Também podemos escrever essa mesma equação em função do tamanho do objeto, mas nesse caso devemos especificar além do tamanho do objeto, o ângulo que o plano do objeto faz com o eixo óptico, pois como discutimos acima W_0 é a projeção do tamanho do objeto no plano focal objeto que é perpendicular ao eixo óptico da lente.

$$DOF = \sqrt{3} \frac{\pi d^2 \sin^2 \theta}{2\lambda} \quad (70)$$

Onde λ é o comprimento de onda da luz, θ é o ângulo entre o plano da amostra e o eixo óptico da lente e “ d ” é o diâmetro do objeto que se deseja focalizar no microscópio.

A aproximação acima difere dos modelos presentes na literatura. (70) (71) Na literatura geralmente se considera o DOF como dado pela equação (61) deduzida da óptica geométrica ou pela equação (64) deduzida pela propagação do feixe gaussiano (71). A equação (70) que deduzimos acima é análoga à equação (64), mas aqui, consideramos o círculo de confusão máximo permitido como sendo dado pela menor distância entre linhas que queremos distinguir, ou seja, $CoC = 2(2W_0)$, enquanto que na aproximação da equação (64) ($DoF = b = 2Zr$) o círculo de confusão é definido como, $CoC = \sqrt{2}(2W_0)$. Como podemos ver, a expressão do DOF baseada na propagação do feixe gaussiano depende basicamente do tamanho mínimo de objeto que desejamos distinguir no microscópio.

Analisemos um caso particular. Imagine um microscópio por visão oblíqua que tem o ângulo α entre o plano da amostra e o eixo óptico dado por 37° , como mostra a Figura 30. Nesse microscópio um feixe laser de comprimento de onda $\lambda=630$ nm incide na amostra com

um ângulo dado por 53° (ângulo de Brewster da superfície da água). Na imagem obtida teremos uma região central onde a amostra aparece em foco, enquanto que fora dessa região a imagem apresenta-se desfocada.

Figura 30 - Ilustração de um microscópio por visão oblíqua utilizando uma fonte de iluminação laser. Esse exemplo se assemelha ao microscópio por ângulo de Brewster (BAM).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Aplicando a equação (70), o DOF será dado em função do tamanho mínimo do objeto d (em metros) que queremos distinguir na região que estará em foco.

$$DOF = d^2 \cdot 1,56 \cdot 10^6 \quad (71)$$

Assim, a região da amostra que estará em foco será dada por:

$$L = \frac{DOF}{\cos 37^\circ} = d^2 \cdot 1,96 \cdot 10^6 \quad (72)$$

Se quisermos, por exemplo, distinguir objetos de no mínimo $10 \mu m$, a região da amostra que focalizará bem objetos desse tamanho corresponde a $L = 196 \mu m$.

Outro termo também muito utilizado é a profundidade de foco. Define-se profundidade de foco no espaço da imagem como a distância em que o plano da imagem pode mudar (ao longo do eixo óptico) e ainda assim a imagem continuar bem focalizada, ou o círculo de confusão não ultrapassar o valor considerado aceitável.

3.7 Detecção de imagem por um chip CCD intensificado

A Câmera ICCD consiste de um chip CCD e um intensificador de imagem. O intensificador consiste de uma rede de fotomultiplicadores, um para cada pixel do chip CCD conhecido como placa de microcanal (MCP do inglês *Micro Chanel Plate*).

Figura 31 - Detalhe do detector da ICCD. Os fótons do sinal SFG incidem num fotocatodo gerando elétrons espalhados. Os elétrons são acelerados para uma placa micro canal onde espalham nas paredes dos tubos gerando uma cascata de elétrons que incide numa tela de fósforo e gera um ponto luminoso. Um conjunto de fibras ópticas conduz os pontos luminosos da tela de fósforo para a CCD.

Fonte: ANDOR... (72).

O sinal luminoso espalha elétrons no fotocátodo e esses são acelerados por um potencial elétrico de cerca de 200 volts para os microtubos do MCP como esquematizado na Figura 31. O potencial elétrico entre o fotocátodo e a MCP é controlado por um sinal que só aciona o intensificador durante o tempo em que o sinal SFG é gerado na amostra. Entre os terminais do amplificador MCP é aplicado um potencial elétrico que pode variar com o fator de ganho da ICCD de 500 a 1000 Volts. Assim, os elétrons acelerados no interior dos microtubos espalham elétrons secundários, gerando uma cascata de elétrons (veja Figura 32c). Os tubos do MCP têm cerca de $\approx 10\mu m$ de diâmetro e as paredes internas são cobertas de um material resistivo que tem facilidade em espalhar elétrons. O feixe eletrônico que sai do MCP é acelerado por um potencial eletrostático de cerca de 5000 volts até uma tela de fósforo. Ao incidir na tela, produz um ponto luminoso, para melhor resposta de eficiência quântica do sistema a tela foi otimizada para emitir luz entre 530 a 540 nm que é a frequência em que o chip CCD detecta com melhor eficiência. O ponto luminoso gerado na tela de fósforo pelo feixe eletrônico decai a 10% do brilho entre 200 ns até 2 ms. A imagem formada na tela de

fósforo é então conduzida por um conjunto de fibras ópticas até o chip CCD. Cada elemento ou pixel do Chip CCD recebe o sinal luminoso e converte esse sinal em carga elétrica acumulada. A leitura da carga elétrica de cada pixel da CCD é processada digitalmente para ser visualizada finalmente na tela do computador.

Figura 32 - Em a) Esquema do intensificador de imagem e os potenciais aplicados para acionar e amplificar a detecção de imagem. b) Placa de micro canal MCP. Em c) um corte do microcanal onde é gerada a cascata de elétrons.

Fonte: ANDOR... (72).

Como a câmera só é ligada no intervalo de tempo em que o sinal SFG é gerado o ruído ambiente praticamente não contribui para a medida utilizando uma câmera intensificada. Podemos programar o atraso (*Delay*) e o tempo de acumulação (*Gate*) para que a câmera seja perfeitamente sincronizada com a emissão dos pulsos que saem do laser e com a geração de sinal na amostra.

4 O MICROSCÓPIO SFG

Será descrito nesse capítulo o desenvolvimento, construção e caracterização de um Microscópio por Geração de Soma de Frequências (MSFG). O objetivo é a obtenção de um MSFG que possa ser usado em estudos de interfaces dielétricas, tanto líquidas quanto sólidas.

O MSFG que descrevemos aqui consiste basicamente de um microscópio por visão oblíqua de campo distante. Esse projeto teve por objetivo principal obter imagens SFG em amostras que emitem baixo sinal como, por exemplo, a superfície da água pura. A fim de otimizar a sensibilidade do microscópio, decidiu-se utilizar a menor quantidade de elementos ópticos necessários e minimizar ao máximo as perdas de sinal através da utilização de componentes ópticos específicos para os comprimentos de onda dos feixes laser utilizados.

Apresentamos inicialmente a montagem do microscópio, em sequência mostramos a caracterização da resolução espacial, e por fim a caracterização de sensibilidade na detecção do sinal SFG.

4.1 Montagem do microscópio SFG

A montagem óptica do MSFG foi feita no Laboratório de Espectroscopia Não linear de Interfaces (LENI) do grupo de Polímeros IFSC/USP São Carlos. Para gerar as fontes de laser necessárias, utilizamos um LASER *mode-locked* de Nd³⁺:YAG modelo PL2143A20 da EKSPLA (Lituânia) operando em 1064 nm com taxa de repetição de 20 Hz, produzindo pulsos de 30 ps de duração e 30 mJ de energia. Em uma unidade geradora de harmônicos, utilizamos cristais não lineares para obter, por geração de segundo harmônico, um feixe laser de comprimento de onda 532 nm. Na mesma unidade de harmônicos é gerado, por soma de frequências entre o feixe 532 nm e o feixe 1064 nm original do laser, um feixe laser de comprimento de onda 355 nm. Os feixes 355 nm e 1064 nm que saem da unidade de harmônicos interagem não linearmente em um gerador/amplificador paramétrico óptico (OPA/OPG, Ekspla modelo PG401/DFG) com gerador de diferença de frequências (DFG do inglês “*Difference Frequency Generation*”). No OPA/OPG obtemos um feixe no infravermelho médio sintonizável entre 2,3 e 10 μm (o intervalo corresponde à faixa de 1000 a 4300 cm^{-1}). Além disso, é possível obter na saída do OPA/OPA um feixe laser sintonizável entre 420 e 2300 nm.

Uma parte do feixe de comprimento de onda 532 nm gerado na unidade de harmônicos é usada para bombear a amostra no processo de geração de soma de frequências. No caminho óptico do feixe 532 nm até a amostra, encontra-se um estágio de filtragem do padrão espacial do feixe, uma unidade de atraso usada para ajustar a superposição temporal com o feixe infravermelho na amostra e um conjunto composto de uma lâmina de meia-onda, um polarizador e outra lâmina de meia-onda para ajuste da intensidade e da polarização desse feixe na amostra. O feixe 532 nm é focalizado na amostra por uma lente de distância focal 500 mm (L1). O diâmetro do feixe 532 nm na amostra mede aproximadamente 600 μm de diâmetro e a energia média por pulso pode ser ajustada para valores entre 700 μJ e 16 μJ .

O feixe infravermelho médio que sai do OPA/OPG/DFG passa por um periscópio formado por espelhos de ouro para ajustar a polarização desse feixe na amostra. O periscópio é montado em uma base magnética que permite a substituição por outro periscópio que ajusta outra polarização do infravermelho na amostra. Dessa maneira, podemos escolher a polarização do infravermelho médio na amostra como S (perpendicular ao plano de incidência), ou P (paralela ao plano de incidência). Para controlar a intensidade do infravermelho médio, podemos ajustar o ângulo em uma placa de meia onda situada na unidade de harmônicos. Essa placa de meia onda controla a intensidade do feixe 1064 nm que é usado para bombear o cristal DFG da unidade OPA/OPG que gera o infravermelho médio. Geralmente usamos o bombeio no máximo valor seguro para o cristal de DFG, que é de 6 mJ. A intensidade do feixe infravermelho na amostra dependerá da focalização. Utilizamos uma lente de Fluoreto de Bário (BaF_2) de distância focal 100 mm (L2) que pode focalizar o feixe infravermelho na amostra com diâmetros entre 200 μm e 2 mm. A energia média dos pulsos do laser infravermelho na amostra pode variar entre 50 a 200 μJ , a depender do comprimento de onda utilizado. Para alinhar o caminho óptico do feixe infravermelho médio, usamos uma mira laser vermelha contínua (comprimento de onda de aproximadamente 650 nm), previamente alinhada com a ajuda de uma câmera sensível ao infravermelho médio. Utilizamos as aberturas AP1, AP2, AP3 e AP4 para conservar o alinhamento óptico dos feixes 532 nm e infravermelho médio. Assim conservamos os ângulos de incidência na amostra a cada dia de experimento. Na Figura 33 é detalhada a geração dos feixes laser utilizados e as posições dos elementos descritos no texto acima.

Figura 33 - Esquema de montagem óptica do laser utilizado no LENI.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na montagem do MSFG incidimos os feixes 532 nm e infravermelho médio na amostra com os ângulos $\theta_{vis} = 45^\circ$ e $\theta_{IR} = 55^\circ$, respectivamente. Assim o sinal SFG será

emitido num ângulo próximo a $\theta_{sfg} = 46^\circ$, a depender da frequência do infravermelho médio usada. Como o processo de geração de soma de frequência conserva o momento dos feixes de luz incidentes ao longo do plano da amostra, os ângulos de incidência dos feixes 532 nm e infravermelho se relacionam com o ângulo de saída do sinal SFG pela equação (73) abaixo.

$$k_{sfg} \sin \theta_{sfg} = k_{vis} \sin \theta_{vis} + k_{ir} \sin \theta_{IR} \quad (73)$$

Onde k representa o vetor de onda de cada um dos feixes SFG, visível e infravermelho médio. Os ângulos de incidência, como sempre, são medidos em relação à normal.

Obtemos por meio de uma lente objetiva Helios-44 M5 a imagem do sinal SFG emitido pela amostra. Essa lente possui distância focal 58 mm e número-f igual a 2,0. A imagem real e invertida da amostra é projetada numa câmera ICCD Andor Istar modelo DH720-18F-63, após ser refletida por um grande espelho dielétrico M8. Esse espelho possui as dimensões de largura e comprimento 6x12 cm e foi projetado para refletir luz na faixa de comprimentos de onda do sinal SFG com refletividade de 99% em ângulos de 68° . Utilizamos filtros para separar o sinal SFG dos feixes 532nm infravermelho e da mira vermelha que refletem da amostra. Um filtro notch 532 nm, OD 3,0 com largura de banda 27 nm (F1) é usado imediatamente antes da lente objetiva para evitar possíveis danos à lente causados pelo feixe 532 nm (veja no Gráfico 2 a curva de transmissão do filtro notch F1). Para filtrar o que resta dos raios em 532 nm que passam pelo filtro notch (F1) bem como uma parte do espectro luminoso presente na iluminação ambiente, utilizamos três filtros passa banda (F2, F3 e F4) na entrada da ICCD. Esses filtros são específicos para detecção do sinal SFG, tendo alta transmissão para comprimentos de onda entre 435 nm e 505 nm (ver Gráfico 3) e bloqueio de OD 6,0 fora dessa faixa.

Gráfico 2 - Curva de transmissão para o filtro notch 532nm.

Fonte: EDMUND optics... (73).

Gráfico 3 - Curva de transmissão do filtro passa banda para detecção SFG. Esse filtro bloqueia o restante do feixe 532 nm que passa pelo filtro notch, além de bloqueia a luz ambiente em comprimentos de onda abaixo de 440 nm e acima de 510 nm.

Fonte: Obtido diretamente do fabricante CHROMA optics.

O quadrado pontilhado da Figura 33 acima é detalhado na Figura 34. Este é o esquema de montagem do MSFG.

Figura 34 - Esquema de montagem do MSFG.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A focalização dos feixes é feita pelas lentes L1 e L2. A lente L1, de distância focal 500 mm, focaliza o feixe 532 nm numa região após a amostra, de maneira que na amostra o feixe 532 nm tenha um diâmetro médio de 600 μm . A lente L2 tem distância focal 100 mm e é feita de fluoreto de bário (BaF_2). Esse material é transparente para o infravermelho de comprimentos de onda entre 0,2 e 10 μm (veja Gráfico 4).

Gráfico 4 - Espectro de transmissão em uma janela de fluoreto de bário, BaF_2 . Esse material transmite bem desde 200 nm, no ultravioleta, até 12000 nm, no infravermelho médio.

Fonte: JANOS technology... (74).

A superposição espacial entre os feixes e a focalização do feixe infravermelho na amostra é feita ajustando a posição da lente L2 por meio de três estágios de translação controlados por

parafusos de micrômetro como o da Figura 35. Um dos três parafusos ajusta o tamanho do feixe infravermelho na amostra que pode variar entre 200 μm até 2 mm de diâmetro.

Figura 35 - Pelo ajuste do diâmetro do feixe infravermelho médio na amostra pela lente L2, podemos otimizar a superposição espacial dos feixes na amostra e variar a intensidades do infravermelho na amostra.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O diâmetro do feixe 532 nm na superfície da amostra foi medido utilizando uma interface de vidro. Incidimos o feixe 532 nm polarizado perpendicularmente ao plano de incidência (polarização S), na superfície do vidro nas mesmas condições experimentais das medidas de microscopia SFG. A imagem da região iluminada pelo feixe 532 nm foi obtida na câmera ICCD. Para que o feixe pudesse ser detectado foi removido o filtro notch em 532 nm e dois dos três filtros passa banda que ficam na entrada da ICCD. O perfil de linha do feixe é mostrado na Figura 36.

Figura 36 - Imagem do feixe 532 nm, na polarização S, incidente na superfície amostra. Em a) e b) a imagem é a mesma exceto que em a) mostramos a linha em que plotamos o perfil de intensidade na direção horizontal (direção y), que corresponde ao plano de incidência. Em b) mostramos a linha em que plotamos a intensidade na direção vertical (direção x), que é perpendicular ao plano de incidência.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A curva de intensidade mostrada na figura acima foi obtida na linha amarela desenhada, na Figura 36. A estimativa do diâmetro do feixe 532 foi feita no nível em que a intensidade cai de $1/e^2$ do valor máximo.

O perfil do feixe infravermelho médio incidente na superfície da amostra foi medido utilizando uma câmera especial sensível ao infravermelho médio. O sensor de captura dessa câmera foi posicionado nas mesmas condições da amostra nos experimentos de microscopia SFG. Variamos a posição da lente L2 e medimos o tamanho do feixe infravermelho na amostra para algumas posições da lente. Essa medida foi feita também para alguns comprimentos de onda. Para cada comprimento de onda o padrão espacial do feixe é diferente e a posição da lente que o focaliza com menor tamanho na amostra varia com o comprimento de onda. Abaixo na Figura 37 mostramos como muda a incidência do feixe infravermelho médio (número de onda 2880 cm^{-1}) na amostra quando variamos a lente L2.

Figura 37 - Imagens do formato do feixe infravermelho de frequência 2880 cm^{-1} incidente na superfície da amostra para diferentes posições da lente L2

Fonte: Elaborada pelo autor.

A energia por pulso do feixe infravermelho médio vale aproximadamente $120\text{ }\mu\text{J}$ podendo variar a com a frequência utilizada (comprimento de onda sintonizado). Abaixo é mostrada na Figura 38 uma foto do microscópio SFG (MSFG) montado no LENI. Como podemos ver na Figura 38 utilizamos uma caixa preta de metal para evitar o ruído proveniente da luz ambiente.

Figura 38 - Microscópio SFG do LENI.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para fazer as medidas de microscopia SFG é necessário ajustar a posição da amostra na altura padrão, de 21,3 cm em relação à mesa óptica, e o ângulo para que a superfície esteja o mais plana possível. Os ajustes da altura da amostra, alinhamento dos feixes de bombeio e da focalização da lente objetiva na superfície da amostra são feitos com a ajuda de um microscópio óptico auxiliar que projeta a imagem da superfície da amostra numa câmera CCD Watec modelo WAT-920H Ultimate. Essa câmera é apropriada para medidas com pouca luz, de maneira que as imagens na CCD Watec são obtidas pela porção do feixe 532 nm que passa pelo filtro notch localizado antes da lente objetiva (veja Figura 34). A câmera Watec foi posicionada à mesma distância da objetiva que a câmera ICCD. Assim, quando a imagem da amostra encontra-se em foco na CCD Watec, ela também estará focalizada no microscópio SFG. A fração do feixe 532 nm que passa pelo filtro notch é aproximadamente um milésimo da potência refletida da amostra (aproximadamente $0,5 \mu\text{W}$ de potência). Essa porção do feixe 532 nm que atravessa o filtro notch não causa problemas na detecção do sinal SFG, pois temos ainda três filtros passa banda F2, F3 e F4 na entrada da ICCD Andor. Um filtro de cor BG7, representado na Figura 34 por F5, foi colocado antes da CCD Watec para evitar a saturação da CCD pelo feixe 532 nm e pela mira laser vermelha que sai do OPA/OPG. As imagens da CCD Watec possuem 384 por 288 pixels e o tamanho efetivo do pixel é de

aproximadamente $17.6 \times 10 \mu\text{m}$. Esta câmera foi concedida pela Watec do Japão. Abaixo na Figura 39 é mostrado o esquema do microscópio óptico auxiliar usando a câmera Watec.

Figura 39 - Microscópio auxiliar com a câmera Watec. O alinhamento é o mesmo da detecção do MSFG. Esse microscópio é usado para ajustar a posição e focalização da amostra para medidas de microscopia SFG.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para remover parte da luz ambiente nas medidas usando o microscópio auxiliar adicionamos um tubo de PVC preto na entrada na CCD. No Gráfico 5 mostramos o gráfico de transmissão em função do comprimento de onda da luz para o filtro BG7.

Gráfico 5 - Curva de Transmissão do filtro BG7.

Fonte: PRÄZISIONS glass & optik... (75).

4.2 Obtenção da imagem SFG

Ajustamos os feixes 532 nm e infravermelho nas referências AP1 até AP4 para que os ângulos de incidência e o plano de incidência dos feixes se mantenham como parâmetros fixos do microscópio. A posição da lente objetiva também é um parâmetro que deve ser mantido fixo para que não se perca o alinhamento entre um dia de medida e outro. Um cristal de quartzo ou uma lâmina de vidro com um filme fino (~ 300 nm de espessura) de sulfeto de zinco (ZnS), são utilizados para otimizar as superposições espacial e temporal entre os feixes 532 nm e infravermelho. A focalização da amostra é otimizada utilizando um padrão de calibração de microscópio ou mesmo as imperfeições que existem no cristal de ZnS que temos. Uma vez otimizado os parâmetros do MSFG utilizando essas amostras de referência marcamos a posição da amostra utilizando o microscópio auxiliar. A partir de então as amostras devem ser posicionadas nas mesmas condições em que foram feitas as otimizações do alinhamento óptico do microscópio.

Utilizamos o software controlador do laser e do OPA/OPG para sintonizar o comprimento de onda do feixe infravermelho. A câmera ICCD Andor é controlada por outro software. No software da câmera ICCD, devemos ajustar: o modo de leitura da CCD, o tempo de leitura e acumulação de sinal, o ganho do fotomultiplicador MCP e a sincronização com os pulsos emitidos pelo laser.

Caso haja algum sinal de ruído externo ou sinal indesejado podemos subtrair a imagem desse sinal da imagem do sinal SFG automaticamente utilizando o software controlador da câmera Andor.

Os feixes 532 nm e infravermelho podem conter imperfeições em seus perfis espaciais, e o alinhamento e/ou a energia média do infravermelho pode mudar quando trocamos a frequência do infravermelho. Essas e outras possíveis variáveis que podem alterar a imagem ou as condições experimentais podem ser corrigidas por uma imagem em uma amostra padrão que seja plana, sem elementos ou artefatos. A não linearidade da amostra padrão deve ser independente do comprimento de onda dos feixes envolvidos. Para normalizar as imagens utilizamos as mesmas amostras de quartzo ou ZnS. Em geral quando trabalhamos com frequências no infravermelho entre 4000 e 2000 cm^{-1} utilizamos o quartzo como amostra padrão de normalização já para frequências menores entre 2000 e 1000 cm^{-1} utilizamos um filme de ZnS para fazer a normalização. Abaixo na Figura 40 é mostrada uma imagem do sinal luminoso SFG gerado na superfície de um cristal de quartzo. O conjunto de polarizações utilizado foi S para o feixe 532 nm, P para o feixe infravermelho resultando em S

para o feixe soma de frequências (SSP). Utilizamos o feixe 532 nm no máximo de potência e o infravermelho na frequência de 2945 cm^{-1} . O tempo de captura dessa imagem foi de 5 segundos e na câmera ICCD o fator de ganho foi igual a 80.

Figura 40 - Imagem SFG obtida num cristal de quartzo. A frequência do infravermelho usada foi 2945 cm^{-1} .

Fonte: Elaborada pelo autor.

A imagem acima apresenta pequenos artefatos que se devem a imperfeições ou até mesmo partículas de pó presentes nos componentes ópticos utilizados. A forma da área iluminada e o padrão de intensidades detectado se devem ao perfil de intensidades dos feixes de bombeio em 532 nm e no infravermelho. Como discutimos, a região que gera o sinal SFG é a região onde ocorre a superposição espacial e temporal dos feixes de bombeio.

Na Figura 41 abaixo mostramos uma imagem SFG na amostra de ZnS. Como podemos ver esse filme contém imperfeições. Essas imperfeições são úteis para o ajuste de focalização do microscópio. Em seguida apresentamos na Figura 42 a mesma imagem obtida com o microscópio auxiliar, comprovando que ambos possuem os mesmos alinhamentos ópticos.

Figura 41 - Imagem SFG de um defeito no filme de ZnS. Imagens como essa são úteis para verificar a focalização do microscópio.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A imagem acima (Figura 41) foi obtida com o infravermelho em 2880 cm^{-1} . O feixe 532 foi atenuado para evitar danos no cristal. O conjunto de polarizações utilizado foi S para o feixe 532 nm, P para o feixe infravermelho e S para o feixe soma de frequências (SSP). O tempo de acumulação dessa imagem foi de 20s e na câmera ICCD usou-se o fator de ganho igual a 10. A imagem tem aproximadamente $600\text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro. O tamanho se deve a dois fatores: o tamanho do feixe infravermelho na amostra e a variação da posição do feixe 532 nm durante a acumulação da imagem (flutuação pulso-a-pulso).

Figura 42 - Imagem de um defeito no filme de ZnS obtida no microscópio auxiliar pela iluminação do feixe 532 nm. Imagens com essa são úteis pra calibrar a focalização do microscópio auxiliar para servir de referência para focalizar as amostras para fazer a imagem no MSFG.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A focalização do MSFG deve estar igual à focalização do microscópio auxiliar. Assim o procedimento experimental para obtenção de imagens no MSFG é: Primeiro ajustamos a posição da amostra até que consigamos ver a região desejada bem focalizada na câmera do microscópio auxiliar, depois removemos o periscópio preso na base magnética (veja Figura 39) e capturamos a imagem SFG na câmera ICCD. Ajustamos previamente a focalização e a posição da imagem no MSFG iguais às das imagens feitas no microscópio auxiliar. Esse método torna o alinhamento e posicionamento da amostra mais rápido e eficiente, do que se fizéssemos tudo apenas usando a câmera ICCD. Dessa maneira as medidas serão feitas todas nas mesmas condições de focalização e superposição dos feixes.

O processamento e tratamento das imagens são feitos utilizando o software AstroImage J (veja Figura 43 e Figura 44). Os softwares Image J (IJ) e AstroImage J são softwares livres e podem ser baixados e instalados facilmente. O objetivo do processamento digital das imagens é fazer as operações necessárias para processar as imagens que em princípio podem conter ruído de fundo ou mesmo imperfeições ópticas em imagens que representem o sinal SFG gerado na superfície da amostra. Esses programas também permitem analisar o perfil espacial do sinal, fazer análises estatísticas ponto a ponto em um dado conjunto de imagens. Esses softwares permitem converter o formato das imagens para formatos mais comuns, além de serem bons para ajustar as escalas e aplicar filtros. Processamentos automáticos em conjuntos de imagens são particularmente úteis quando são feitas medidas de espectro microscopia.

Figura 43 - Painel de controle do programa ImageJ.

Fonte: Adaptado de IMAGEJ... (59).

Figura 44 - Painel de controle do programa AstroImageJ.

Fonte: Adaptado de ASTROIMAGEJ... (58).

Abaixo, na Figura 45, mostramos a um recorte da tela do programa AstroImageJ quando uma imagem é aberta. A tela permite o ajuste de brilho e contraste, além de mostrar os valores de contagem. As ferramentas nessa tela permitem fazer análises estatísticas em um conjunto de imagens. O AIJ possui todas as ferramentas do IJ além de outras que podem ser úteis quando queremos fazer estatística ponto a ponto em um conjunto de imagens. Utilizando a função DP (do inglês *Digital Processing*), podemos fazer alterações ao mesmo tempo em um conjunto de imagens, como remover ruído de fundo e normalizar imagens a partir de uma imagem que contenha apenas o ruído de fundo.

Figura 45 - Tela do programa AstroImageJ que aparece quando abrimos um arquivo de imagem.

Fonte: Obtida pelo autor.

4.3 Sensibilidade de detecção

A detecção do sinal SFG é feita com uma câmera CCD intensificada, tem o disparo (trigger) sincronizado com o tempo em que os pulsos de laser incidem na amostra e o intervalo de tempo de captura pode ser ajustado até um mínimo de 5 ns (Gate). Para amplificar o sinal SFG recebido podemos ajustar o ganho da ICCD até o fator 255 que corresponde a 247,23 contagens por fotoelétron. A eficiência quântica da ICCD Andor pode alcançar até 45% em comprimentos de onda entre 350 e 700 nm. O limite de resolução espacial informada pelo fabricante é de 28.9 μm , medida pela largura meia altura (FWHM do inglês *Full Half Width Maximum*). A ICCD Andor DH720 18F 63 possui 690 x 255 pixels ativos, sendo que cada pixel tem tamanho efetivo de 26 μm . A sensibilidade espectral do

fotocatodo vai de 265 nm até cerca de 740 nm. A sensibilidade de detecção dessa câmera aumenta exponencialmente com o fator de ganho de acordo com o Gráfico 6.

Gráfico 6 - Gráfico que representa a contagem por fotoelétrons em função do fator de ganho utilizado na câmera ICCD Andor.

Fonte: Adaptado de ANDOR... (72).

Para estimar a sensibilidade do MSFG fizemos imagens do sinal SFG emitido pela água pura nas frequências de vibração dos modos OH presentes na superfície. Esse sinal é considerado como um dos mais fracos que se mede no aparato para espectroscopia SFG do LENI. Existem muitos trabalhos sobre a estrutura superficial da água pura utilizando espectroscopia SFG. (76) (77) (78) (79) O Gráfico 7 abaixo representa o espectro SFG da superfície da água pura, nas frequências de ressonância dos modos OH presentes na interface líquido/ar. O conjunto de polarizações utilizado para a obtenção dessa medida foi o SSP (na ordem feixe SFG, feixe 532 nm, feixe infravermelho).

Gráfico 7 – Espectro SFG da superfície da água pura obtido utilizando o conjunto de polarizações SSP.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Esse espectro pode ser representado por três picos de ressonância com o infravermelho nas frequências 3700 cm^{-1} , 3400 cm^{-1} e 3200 cm^{-1} . Em 3700 cm^{-1} temos um pico estreito que é atribuído ao modo vibracional de um grupo OH que aponta para ar, também chamado de OH livre (OH free). Esse modo vibracional é característico da superfície da água pura, isso indica que o espectro é proveniente de uma monocamada da superfície da água. Centrado em 3200 cm^{-1} temos uma banda que atribuímos a modos vibracionais das moléculas de água da primeira monocamada que tem suas ligações OH com as moléculas da segunda camada de moléculas de água. Na segunda camada de moléculas de água os grupos OH apontados para cima (para o ar) também contribuem com a banda centrada em 3200 cm^{-1} . Em 3400 cm^{-1} temos outra banda que pode ser atribuída às vibrações dos grupos OH apontam para baixo da segunda camada no sentido do volume da água. As bandas em 3200 cm^{-1} e 3400 cm^{-1} observadas na espectroscopia SFG também são observadas nas espectroscopias FTIR e Raman, sendo o modo em 3200 cm^{-1} característico da água no estado sólido (gelo) e o modo em 3400 cm^{-1} característico das vibrações no volume da água no estado líquido. Assim denominamos o pico em 3700 cm^{-1} como OH free, o 3200 cm^{-1} como OH *Ice-like* e o 3400 cm^{-1} como OH *liquid-like*. Veja na Figura 46 uma representação esquemática das ligações de hidrogênio entre as moléculas de água da interface com as moléculas do volume do líquido e a quais delas contribuem para os modos OH free, OH *ice-like* e OH *liquid-like*.

Figura 46 - Estrutura das ligações de hidrogênio na interface água/ar.

Fonte: Adaptada de FAN et al. (77).

4.3.1 Metodologia utilizada para medir a sensibilidade

Para medir a sensibilidade da detecção do MSFG utilizamos água Milli-Q (resistividade 18,3 MΩ-cm), e um porta-amostra de teflon contendo um filtro de cor para atenuar o espalhamento do feixe 532 nm no seu fundo branco. Antes da medida é fundamental que os utensílios utilizados estejam muito limpos, pois qualquer contaminação pode eliminar o OH livre da superfície da água. Os utensílios foram limpos utilizando solução de limpeza nochromix (persulfato de amônio em ácido sulfúrico concentrado, concentração de aproximadamente 9 g/L). O processo de limpeza consiste em deixar os utensílios imersos na solução nochromix durante 24 horas, após isso estes são enxaguados em água Milli-Q por alguns minutos. Esse processo garante que não haja contaminantes de natureza orgânica no porta-amostra e nos filtros utilizados. Incidimos o feixe 532 de maneira que este seja atenuado no fundo do porta-amostra por um filtro de cor para evitar ruídos na detecção do sinal SFG.

Figura 47 - Esquema da porta-amostra para medida da sensibilidade do MSFG. Este mesmo é utilizado em todas as medidas de microscopia SFG na interface líquido/ar.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Mesmo utilizando um filtro como mostra a Figura 47, a imagem SFG conterá uma porção de ruído proveniente do feixe 532 nm que espalha no fundo do porta-amostras. Isso ocorre porque os filtros utilizados na detecção do SFG não são tão eficientes em filtrar raios espalhados que incidem em ângulos oblíquos no filtro. Uma forma de corrigir esse problema é obter uma imagem apenas do ruído (sem o feixe infravermelho), e subtrair essa imagem daquela que contém o sinal SFG. Teremos assim uma imagem contendo apenas o sinal SFG.

Para detectar o sinal SFG da água, que é muito fraco, tivemos que focalizar o feixe infravermelho na amostra. Assim o diâmetro da região da amostra iluminada foi de apenas 260 μm (metade do tamanho do feixe 532 nm). Essa focalização corresponde à posição 0 mm no micrômetro de ajuste da lente L2 (veja Figura 34). Isso significa que na posição 0 mm do micrômetro da lente L2, o feixe infravermelho de frequência 3700 cm^{-1} possui cerca de 260 μm de diâmetro. Sabemos que o feixe 532 nm possui diâmetro de 550 μm (veja Figura 36). Assim a região onde ocorre a superposição espacial entre os feixes 532 nm e infravermelho será de aproximadamente 260 μm .

4.3.2 Imagens do sinal SFG na superfície da água pura

As imagens do sinal SFG emitido da superfície da água Mili-Q, foram obtidas com o sinal SFG ressonante com a vibração do modo OH livre (OH free) em 3700 cm^{-1} . As polarizações utilizadas foram: S para o feixe 532 nm e P para o infravermelho. O sinal SFG será gerado na polarização S. Abaixo na Tabela 2 são mostrados os parâmetros utilizados na câmera ICCD para as medidas. Na Figura 48 são mostradas três imagens SFG da superfície da água pura, obtidas nos tempos de exposição: 10s, 50s e 200s.

Tabela 2 - Parâmetros utilizados para aquisição de imagens nas medidas de sensibilidade de detecção do MSFG.

Parâmetro da ICCD	Valor
Fator de ganho	255
Gate	10ns
Tempo de leitura por pixel	16 μ s
Modo de aquisição	Single Scan

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 48 - Imagens do sinal SFG devido à ressonância vibracional do grupo OH livre da água pura em 3700 cm^{-1} com os tempos de aquisição indicados nas imagens. A polarização utilizada foi S para o feixe 532 nm e P para o infravermelho. Os gráficos correspondentes são o perfil de intensidade ao longo do quadrado amarelo desenhado.

continua

continuação

Fonte: Elaborada pelo autor.

A partir da contagem total do sinal detectado em cada uma das imagens, estimamos o número aproximado de fotoelétrons detectados. O fator de ganho utilizado foi 255, assim podemos considerar que, se cada fotoelétron que é absorvido pelo sensor gera uma contagem de 247.23 contagem/fotoelétron, obtemos que para 10 segundos de aquisição foram detectados 8000 fotoelétrons, para 50 segundos de aquisição foram detectados 40100 fotoelétrons e para 200 segundos foram detectados 125500 fotoelétrons. Esses dados são aproximados. De acordo com esses dados o sinal SFG da água foi detectado com um fluxo de aproximadamente 700 fotoelétrons por segundo, ou 35 fótons detectados/pulso. Esse resultado demonstra o poder de detecção e sensibilidade do MSFG. A baixa intensidade do sinal SFG detectado explica também porque as imagens acima têm uma aparência “granulada”. Isso se deve ao ruído estatístico de contagens de fótons e à subtração do ruído da luz verde (532 nm) espalhada.

4.4 Resolução espacial do MSFG

Para medir a resolução espacial do MSFG, utilizamos um padrão de calibração de microscópio 1951 USAF, que contém vários padrões de linhas de diferentes espaçamentos (veja Figura 49 e Tabela 3). Também usamos trilhas de ouro interdigitadas depositadas em vidro, um com largura e espaçamento de 10 μm (veja Figura 50).

Figura 49 - Padrão de calibração de microscópio USAF 1951.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 3 - Nesta tabela consta para cada elemento do padrão de calibração USAF 1951, o número de linhas por milímetro.

Resolution of USAF 1951 Targets*

Element	Group Number									
	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7
1	0.250	0.500	1.00	2.00	4.00	8.00	16.00	32.00	64.00	128.00
2	0.280	0.561	1.12	2.24	4.49	8.98	17.95	36.0	71.8	144.0
3	0.315	0.630	1.26	2.52	5.04	10.10	20.16	40.3	80.6	161.0
4	0.353	0.707	1.41	2.83	5.66	11.30	22.62	45.3	90.5	181.0
5	0.397	0.793	1.59	3.17	6.35	12.70	25.39	50.8	102.0	203.0
6	0.445	0.891	1.78	3.56	7.13	14.30	28.50	57.0	114.0	228.0

* Units are line pairs per millimeter

Fonte: THORLABS... (80).

Figura 50 - Contatos interdigitados de ouro sobre vidro. a) Representação dos microcontatos. b) foto das trilhas de ouro interdigitadas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Devido ao fato da amostra estar inclinada em relação ao eixo óptico da objetiva, teremos uma região da amostra bem focalizada no centro da imagem e as regiões afastadas do centro mal focalizadas. Isso ocorre por causa do distanciamento do plano focal como discutimos no capítulo 3 (seção 3.6). A resolução óptica do MSFG será considerada aqui como a resolução no centro da região focal onde a resolução é a melhor possível. Outro efeito da microscopia oblíqua é que a resolução na direção em que a amostra está inclinada é menor que a resolução na direção em que a amostra é perpendicular ao eixo óptico.

Denotaremos nesse trabalho, as coordenadas de laboratório: x, y e z de acordo com o sistemas de eixos mostrado na Figura 38. Dessa forma, consideramos o eixo x como a direção perpendicular ao plano de incidência e o eixo y como a direção paralela ao eixo de incidência

dos feixes incidentes na amostra. Esse sistema de coordenadas é representado na Figura 51 abaixo.

Figura 51 - Sistema de eixos cartesianos no sistema de coordenadas do laboratório.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nessa seção obtemos o limite de resolução óptica por meio da medida de imagens do padrão USAF 1951 (veja Figura 52, Figura 53 e Figura 54), e pelo cálculo do MTF, medido utilizando o mesmo padrão de calibração.

Figura 52 - Imagem de microcontatos interdigitados de ouro com espaçamento de 10 μm . Essa imagem foi obtida na câmera ICCD utilizando iluminação do feixe 532 nm.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 53 - Imagem do USAF 1951, obtida no MSFG, pela iluminação direta de uma lâmpada branca.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 54 - Imagem do padrão USAF 1951 com detalhe melhor dos grupos seis e sete.

Fonte: THORLABS... (80).

Para estimar rapidamente a resolução espacial, consideramos a maior frequência de linha distinguível entre as linhas do padrão USAF 1951. As medidas que fizemos (Figura 55) mostram que podemos visualizar razoavelmente as linhas espaçadas na direção x, até o elemento 2 do grupo 7 (Figura 55 b). De acordo com a Tabela 3, a frequência do grupo 7 elemento 2 é 144 lp/mm, o que corresponde ao espaçamento de 6,9 μm . Na direção y, podemos considerar que a maior resolução de linhas distinguível é o elemento 6 do grupo 6 (Figura 55 d), correspondendo à frequência de 114 lp/mm e espaçamento entre linhas de 8,7 μm .

Figura 56 - Região onde foram obtidas as curvas de perfil utilizadas para o cálculo do MTF.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Gráfico 8 - Perfil de linha e valores do MTF para as frequências de linha do USAF

Fonte: Elaborada pelo autor.

Podemos então considerar que o limite de resolução óptica do MSFG seja determinado pela frequência que tem a imagem com contraste mínimo. Dessa forma o elemento 3 do grupo 7 com contraste de 3%. Esses resultados expressam a resolução espacial ao longo do eixo x da amostra. A resolução ao longo do eixo y será proporcional à inclinação da amostra em relação ao eixo óptico, como discutimos no Capítulo 3, podemos relacionar a resolução na direção x com a resolução na direção y (horizontal da imagem) pelo fator de distorção da imagem. Assim, a resolução em y (horizontal) será a resolução em x (vertical da imagem), medida em par de linhas por milímetro, vezes o $\cos 46^\circ$, que é o ângulo de saída do sinal SFG, em relação ao eixo normal da amostra.

Assim considerando o elemento 3 do grupo 7 do USAF 1951 como o menor espaçamento entre linhas distinguíveis, ao longo da direção x, a resolução espacial do MSFG será dada pela frequência de 161 lp/mm (veja Tabela 3) ao longo da direção x (vertical da imagem) e 111 lp/mm ao longo da direção y (horizontal da imagem). A separação entre linhas corresponde a 6,2 μm em x e 8,9 μm em y. Esse resultado é comparável com o obtido da análise visual feita inicialmente. Sumarizamos na Tabela 4, o limite de resolução espacial do MSFG obtido pelo cálculo do MTF, considerando que o contraste mínimo distinguível seja 3%.

Tabela 4 - Resolução espacial medida pelo MTF.

Direção	Resolução espacial
x - Perpendicular ao plano de incidência	6,2 μm
y - Paralela ao plano de incidência	8,9 μm

Fonte: Elaborada pelo autor.

A medida da resolução espacial usando um padrão de calibração espacial não é tão simples quanto parece, pois embora seja rápido obter uma imagem e determinar visualmente o poder de resolução do microscópio, há certas desvantagens que devem ser consideradas. Tivemos que considerar que o padrão era perfeito e que continha linhas em forma de onda quadrada de mesma altura, mas o padrão pode conter imperfeições nas linhas de alguns elementos.

4.5 Resolução limitada pela difração

A resolução do MSFG limitada pela difração depende da abertura numérica e do comprimento de onda utilizado. Para a objetiva Helios-44, o número-f vale 2,0 (f/2,0, N=2.0). Sendo assim, ao longo de x (vertical da imagem), a resolução espacial limitada pela difração do MSFG será dada pelo critério de Abbe como:

$$R_A = \frac{\lambda}{2NA} = 0,92\mu m \quad (74)$$

$$Resolução = \frac{1}{R_A} = \frac{2NA}{\lambda} = \frac{1}{N\lambda} = \frac{1}{0,92}\mu m^{-1} = 1080 lp / m \quad (75)$$

Onde o sinal SFG é gerado em 460 nm. Como consequência da microscopia oblíqua, a resolução é menor na direção y (ao longo do plano de incidência). Se usássemos um filme fotográfico, a difração poderia ser o fator limitante da resolução, mas como veremos na seção seguinte, temos que o tamanho do pixel da ICCD é muito grande para obter imagens com a resolução prevista acima. Ainda que esse não fosse o fator limitante, deveríamos considerar outros fatores que ainda podem limitar a resolução, como a relação sinal-ruído e aberrações ópticas. Vale ainda comentar que podemos medir a resolução óptica pela imagem de objetos pontuais muito menores que o limite de resolução. A imagem desses pontos corresponde a uma função de espalhamento conhecida como PSF (do inglês *Point Spread Function*). A largura dessa função é usada para definir o limite de resolução espacial.

4.6 Medida da resolução limitada pelo tamanho do pixel

No caso do MSFG, a célula unitária do sensor que é composta por vários estágios de amplificação, possui tamanho efetivo de 26 μm . A magnificação do MSFG foi obtida pelas imagens do padrão USAF 1951, sabendo o tamanho das trilhas do USAF e o tamanho da imagem pelo número de pixels. Como se trata de um microscópio por visão oblíqua a magnificação será diferente nas direções paralela e perpendicular ao plano de incidência. Obtivemos magnificações de 8,7x na direção perpendicular ao plano de incidência (direção x em relação às coordenadas de laboratório) e 6,0x na direção paralela ao plano de incidência (direção y). Assim cada pixel da imagem obtida na câmera ICCD corresponde, no plano da amostra, aos valores aproximados de 3,0 μm na direção x e 4,3 μm na direção y. Podemos

calibrar a barra de escala das imagens com esses valores. Um recurso que pode ser utilizado consiste em esticar as imagens na direção y pelo do fator 1,44 e assim obter uma imagem que tenha mesma escala na horizontal e na vertical. Esse processo é feito digitalmente utilizando o software ImageJ pela função *image/scale/* (o mesmo que no AstroImageJ). Utilizando esse processo, os pixels da imagem terão fatores de escala diferente, passando a valer 2,6 μm nas duas direções (x e y). Isso não significa que a resolução do sistema será maior, pois como dito anteriormente, na imagem original o pixel corresponderá a 3,0 μm na direção x e 4,3 μm na direção y.

Com base no que discutimos no capítulo 3, a resolução máxima possível limitada pelo tamanho do pixel e pela magnificação do MSFG será obtida pela equação (57). Na Tabela 5 resumizamos os resultados medidos da resolução óptica do MSFG dada pelo tamanho do pixel.

Tabela 5 - Resolução espacial limitada pelo tamanho do pixel.

Direção	Resolução espacial
x - Perpendicular ao plano de incidência	$R_x \cong 2 \frac{26\mu\text{m}}{8,7} \cong 6,0 \mu\text{m}$
y - Paralela ao plano de incidência	$R_y \cong 2 \frac{26\mu\text{m}}{6,0} \cong 8,6\mu\text{m}$

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como vemos esses valores coincidem com os valores obtidos nas medidas de MTF apresentadas na seção anterior. Podemos concluir disso que a resolução óptica do MSFG é limitada essencialmente pelo tamanho do pixel da câmera ICCD e pela magnificação. Portanto, uma alternativa para conseguir melhores resoluções seria aumentar a magnificação do microscópio.

O tamanho do pixel da CCD Watec é aproximadamente 8.8 x 9.8 μm , mas a leitura desse chip CCD é feita em colunas de pixels alternadas com colunas de pixels ativos de maneira que o tamanho efetivo do pixel da CCD Watec é de aproximadamente 17,6 μm x 10 μm . Como a magnificação do microscópio é de aproximadamente 8x, a resolução espacial limitada pela CCD, no plano objeto, pode valer até 2,5 μm para o microscópio auxiliar. Entretanto, esses valores são apenas limites teóricos. Como o pixel da CCD Watec é menor

em uma direção que na outra, o resultado será que nessa direção a resolução será melhor. Na prática o ruído de leitura da CCD também contribui e pode limitar a resolução óptica.

4.7 Medida da profundidade de campo do MSFG (DOF)

Podemos utilizar a aproximação teórica obtida na seção 3.6 do capítulo 3, dada pela equação (70) para calcular o DOF para o MSFG. Devemos considerar o ângulo entre a amostra e o eixo óptico da objetiva $\theta = 44^\circ$, dado que o ângulo entre o feixe de sinal SFG e a normal da amostra é 46° . Para o comprimento de onda da luz podemos considerar 460 nm, que corresponde ao sinal SFG gerado pelo feixe 532 nm e o infravermelho em 2900 cm^{-1} . Para medir o DOF utilizamos um padrão de linhas de ouro em vidro espaçadas de $10 \mu\text{m}$ (veja Figura 50). A imagem das linhas de ouro se torna desfocada, quanto mais afastadas as linhas estão do centro da imagem. A região que conseguimos distinguir as linhas visualmente pode ser medida utilizando a barra de escala mostrada na Figura 57. Dessa forma podemos considerar por inspeção visual que a região em que conseguimos distinguir as trilhas vale aproximadamente $400 \mu\text{m}$.

Abaixo mostramos duas imagens obtidas dos microcontatos de ouro em vidro utilizando o microscópio auxiliar que possui o mesmo sistema óptico do MSFG. A primeira imagem mostra como as linhas mais afastadas do centro da imagem são “borradas”. A imagem seguinte mostra o mesmo padrão rotacionado de 90° (em torno do eixo z). Nessa imagem as linhas não se apresentam borradas por que todas estão no mesmo plano focal, mostrando que a profundidade de campo só ocorre na direção paralela ao plano de incidência. (direção y nas coordenadas de laboratório).

Figura 57 - Imagem de micro contatos interditados de 10µm de espaçamento. a) Imagem com as trilhas espaçadas ao longo da direção paralela ao plano de incidência (direção y) que mostra a perda de foco pela profundidade de campo. b) Imagens com as trilhas espaçadas na direção vertical, não sofrem com a profundidade de campo. Isso se dá porque, primeiro a resolução óptica é melhor na direção x e segundo as trilhas estão espaçadas ao longo do plano focal do microscópio e assim todas as trilhas estão em foco no centro da imagem. Essas foram obtidas no microscópio auxiliar.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Visualmente estimamos que a região em foco na imagem acima é de aproximadamente 400 µm. Esse valor corresponde a uma profundidade de campo de 287,8 µm. Ou seja, a profundidade de campo para objetos que medem 10µm é 287 µm.

$$DOF_{10\mu m} = L \sin 46 = 287 \mu m \quad (76)$$

Podemos comparar o resultado acima com a previsão utilizando o modelo teórico discutido na equação (70) do capítulo 3. Abaixo aplicamos a equação (70) ao caso um objeto ou trilha medindo 10 µm e o ângulo da microscopia sendo $\theta = 44^\circ$ (corresponde a ângulo do sinal SFG de 46° em relação ao eixo normal da amostra).

$$DOF(d = 10\mu m) = \sqrt{3} \frac{\pi(10 \cdot 10^{-6})^2 \sin^2 44}{2 \cdot 460 \cdot 10^{-9}} \cong 285 \mu m \quad (77)$$

De acordo com o esse modelo teórico a região considerada em foco da amostra, L , corresponde a:

$$L_{10\mu m} = \frac{285 \cdot 10^{-6}}{\sin 46^\circ} \cong 396 \mu m \quad (78)$$

Como constatamos, a aproximação teórica é confirmada pela imagem obtida das trilhas na Figura 57. Essa aproximação Gaussiana para o DOF pode ser usada para outros tamanhos de objetos e assim obter qual a região da amostra onde esses objetos serão bem focalizados e distinguidos.

A profundidade de campo será menor para objetos menores, ou seja, quanto menor o objeto mais difícil será distingui-lo fora do centro de focalização. Por analogia, se considerarmos que o campo de visão máximo do MSFG seja até 900 μm ao longo do plano de incidência, objetos com diâmetro de até 15 μm poderia ser distinguíveis por todo campo de visão.

5 ESTUDO DA INTERFACE LÍQUIDO/AR DA SOLUÇÃO ÁGUA/ACETONITRILA UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA E MICROSCOPIA SFG

Nesse capítulo trataremos de uma aplicação da microscopia SFG ao estudo da interface líquido/ar da solução água/acetonitrila ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$), em diferentes concentrações molares. A acetonitrila (ACN) é um líquido muito usado em processos químicos como cromatografia líquida, eletroquímica, em sínteses orgânicas, dentre outros. (28) (29) (30) (31) (32) Esse líquido é um solvente polar aprótico que dissolve uma ampla gama de componentes orgânicos e iônicos. Pela baixa viscosidade e reatividade química, esse solvente é um ótimo candidato para a cromatografia líquida. Na indústria, a acetonitrila está presente em processos desde a síntese de fármacos até a produção de filmes fotográficos.

Na fase líquida, as moléculas de acetonitrila tem uma preferência por um pareamento antiparalelo de dipolos, o que explica a baixa constante dielétrica no volume desse líquido em relação ao alto valor do momento de dipolo da molécula isolada. (81) Estudos utilizando simulação computacional (41) (43) (44), espalhamento de nêutrons em baixo ângulo (39), técnicas de difração de raios X e espectroscopia no infravermelho (40) (82), mostram que a solução $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ é heterogênea em certa gama de concentrações molares, formando clusters na escala de Angstroms. Esses estudos apontam a coexistência de clusters nanométricos de água e de acetonitrila no volume da solução quando as frações molares de acetonitrila estão entre 20% e 80%. Além disso, de acordo com esses estudos o máximo de heterogeneidade ocorre em torno de 40% de acetonitrila na solução.

Inicialmente foram feitas medidas de espectroscopia e microscopia SFG na interface líquido/ar da solução $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$, nas regiões do espectro vibracional do estiramento simétrico e assimétrico do grupo CH_3 da acetonitrila. Obtivemos espectros SFG em diferentes concentrações molares de acetonitrila, variando entre 4% e 20% na solução, repetindo algumas medidas já bem conhecidas da literatura. Obtivemos a relação entre a concentração molar de acetonitrila na solução e o sinal SFG.

Imagens de microscopia SFG foram obtidas da interface líquido/ar da solução $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$. As imagens foram feitas com o infravermelho sintonizado na frequência de vibração do modo simétrico do grupo metil CH_3 da acetonitrila, pois este foi o modo que apresentou maior intensidade do sinal SFG dentre as medidas realizadas. De acordo com os espectros obtidos a frequência do modo CH_3 simétrico é 2945 cm^{-1} . Medidas de microscopia

SFG nas frequências de ressonância dos modos OH da água também foram feitas, mas como o sinal SFG da água é muito fraco, os resultados não serão mostrados aqui.

A microscopia e a espectroscopia SFG são técnicas capazes de estudar a composição e estrutura espacial da interface líquido/ar da solução binária H₂O/ACN. Esses líquidos têm aproximadamente o mesmo índice de refração ($n_{H_2O} = 1,3330$ e $n_{H_2O} = 1,3440$), tornando impraticáveis estudos utilizando microscopia por ângulo de Brewster (BAM).

5.1 Revisão da literatura

A interface da solução água/acetonitrila tem sido investigada por espectroscopia SFG (43) (37) (38) (34) (36) (33). Em 1993 *Zhang et al.* (33) obteve o espectro SFG na interface líquido/ar da solução H₂O/ACN na região de vibração do grupo CN da acetonitrila. Foi observado que a frequência de ressonância do estiramento CN muda abruptamente quando a concentração molar da acetonitrila no volume da solução passa de 7% ($\chi_{ACN} = 0.07$). Para soluções em concentrações molares de acetonitrila menores que 0,07 a frequência do modo CN é centrada em aproximadamente 2265 cm⁻¹, já para soluções com frações molares de acetonitrila maiores que 0,07 a ressonância do grupo CN estará centrada em aproximadamente 2255 cm⁻¹ que corresponde ao valor da frequência de ressonância do grupo CN na acetonitrila pura. O autor interpretou esse resultado como uma mudança de fase abrupta. De acordo com o modelo proposto por *Zhang et al.* (33), nas concentrações molares abaixo de 0,07 (fração molar da acetonitrila na solução H₂O/ACN) haveria ligações de hidrogênio entre algumas moléculas de acetonitrila e as moléculas de água da superfície do líquido, esse efeito tornaria a frequência do modo CN maior que a frequência do mesmo na acetonitrila pura. Em concentrações maiores que 0,07 as moléculas de acetonitrila (cuja concentração na superfície é bem maior que no volume) se agregam na interface, passando a interagir entre si por forças dipolo-dipolo, tornando a frequência do estiramento CN mais próxima daquela na interface líquido/ar da acetonitrila pura (veja Gráfico 9).

Gráfico 9 - Espectro SFG da interface líquido/ar da solução água/acetonitrila na região do estiramento CN da acetonitrila.

Fonte: ZHANG, D. et al. (33).

Em 2003, *Kim et al.* (34) publicou o espectro SFG na interface líquido/ar da solução $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ na região do estiramento simétrico do grupo CH_3 da acetonitrila. Foi observado (veja Gráfico 10) um único pico de ressonância em 2944 cm^{-1} , atribuído ao estiramento simétrico do grupo CH da acetonitrila. O que essa publicação destaca é a variação da intensidade do sinal SFG desse pico com a variação da concentração molar de acetonitrila na solução. A intensidade do sinal SFG, gerado pela ressonância com o estiramento CH simétrico na interface, aumenta com a fração molar para valores entre 1% e 10% de acetonitrila ($\chi_{\text{ACN}} = 0,01$ e $\chi_{\text{ACN}} = 0,1$), chegando ao máximo na fração molar 10% ($\chi_{\text{ACN}} = 0,1$). Para valores maiores que 10% (entre $\chi_{\text{ACN}} = 0,1$ e $\chi_{\text{ACN}} = 1$) de acetonitrila, obtemos um sinal SFG mais fraco quanto maior for a fração molar de acetonitrila no volume, até que o sinal SFG corresponda ao da acetonitrila pura. A dependência do sinal SFG com a fração molar de ACN no volume da solução é expressa no Gráfico 11. No modelo proposto nesse artigo (34) a estrutura da interface do líquido ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$) depende da fração molar de acetonitrila na solução, onde o máximo do sinal SFG é devido a um rápido aumento da concentração de moléculas de acetonitrila na interface e uma mudança abrupta de orientação molecular.

Gráfico 10 - Espectro SFG da interface líquido/ar da solução água/acetonitrila na região do estiramento CH simétrico da acetonitrila.

Fonte: KIM et al. (34).

Gráfico 11 - Variação do sinal SFG do modo CH (s) da acetonitrila na interface líquido/ar da solução H₂O/ACN em função da concentração molar de ACN na solução.

Fonte: KIM et al. (34).

Para obter teoricamente a composição superficial em função da concentração molar no volume da acetonitrila na solução H₂O/ACN, Kim *et al.* (34) utilizou a equação de adsorção de Gibbs, ajustada com dados de tensão superficial obtidos da literatura. (83) A concentração superficial de acetonitrila em função da fração molar no volume calculada teoricamente por Kim *et al.* é mostrada no Gráfico 12. Nesse gráfico entre 1% até 10% ($\chi_{ACN} = 0,01$ até $\chi_{ACN} = 0,1$) a concentração de moléculas na interface aumentaria mais rápido que a concentração no volume.

Gráfico 12 - Estimativa da concentração molar de acetonitrila na interface líquido/ar da solução água/acetonitrila em função da concentração molar de acetonitrila no volume da solução.

Fonte: Adaptado de KIM et al. (34).

Os dois trabalhos que foram resumidos acima tentam explicar a mudança abrupta na frequência do CN e na intensidade do sinal SFG na ressonância do modo CH₃ simétrico por uma reorientação das moléculas de acetonitrila na interface. Ambos obtiveram uma concentração molar onde ocorre a mudança de fase ($\chi_{ACN}=0,07$ e $\chi_{ACN}=0,1$) e uma variação da orientação angular média das moléculas de acetonitrila na interface em torno dessa concentração. Ambos os artigos não respondem o porquê das mudanças abruptas observadas nos espectros, mas apontam que há uma mudança na estrutura da superfície quando as moléculas de acetonitrila presentes na superfície deixam de interagir por ligação de hidrogênio e passam a interagir apenas por interação dipolo-dipolo com outras moléculas de acetonitrila. Esses modelos tratam a superfície do líquido como uma única monocamada formada pelas moléculas da solução binária.

Eisenthal et al. publicaram em 2009 um estudo voltado para a questão da mudança na estrutura da água na interface líquido/ar da solução H₂O/ACN com o aumento da concentração de acetonitrila no volume da solução. (35) Foram publicados espectros SFG da solução H₂O/ACN na região de vibração dos modos ressonantes OH da água na interface líquido/ar. Foi usada nessas medidas água deuterada (D₂O). Os picos que caracterizam o espectro SFG na superfície da água são chamados de OD *free*, OD *ice-like* e OD *liquid-like* (veja capítulo 4, seção 4.3). Os espectros publicados são mostrados no Gráfico 13.

Gráfico 13 - Espectro SFG da interface líquido/ar da solução H₂O/ACN na região de ressonância do grupo OH da água. Em (a) o espectro na polarização SSP. Em b) o espectro na polarização PPP.

Fonte: EISENTHAL et al. (35).

Com o aumento da concentração molar de acetonitrila no volume da solução os picos característicos da água diminuem até desaparecer quase que completamente em concentrações de 0,1 e 0,2 ou maiores. Isso indica que não há moléculas de água na superfície do líquido

fazendo ligações de hidrogênio. O pico característico do modo OD *free* em 2737 cm^{-1} aparece em concentrações molares até 3% de acetonitrila na solução ($\chi_{ACN} = 0.03$). Observou-se um deslocamento para o vermelho da frequência do modo OD *free* de 2737 cm^{-1} para 2710 cm^{-1} com o aumento da concentração de acetonitrila na solução. Os autores explicam que para ainda haver o pico referente ao OD *free* é necessário que haja uma quantidade de moléculas de água com os grupos OD na mesma orientação dividindo espaço com as moléculas de acetonitrila na interface da solução (ilhas de água na acetonitrila). Já o deslocamento na frequência do modo OD *free* poderia ser explicado como interações do tipo Van der Waals entre os grupos OD e as moléculas de acetonitrila na interface. Nesse sentido dois cenários são imaginados para explicar a existência do pico OD *free* em 2737 cm^{-1} em concentrações até 3% de acetonitrila ($\chi_{ACN} = 0,03$). No primeiro, as moléculas de água se posicionam entre uma monocamada de acetonitrila superior e outra inferior. No segundo as moléculas de água são imaginadas ocupando espaços entre as moléculas de acetonitrila na primeira monocamada da superfície, formando ilhas de água onde poderia haver OD *free*.

Ainda no artigo de *Eisenthal et al.* são apresentadas medidas de tensão superficial na interface líquido/ar da solução H₂O/ACN variando a concentração molar de ACN na solução de 0 a 100%. (35) Utilizando a equação de adsorção de Gibbs, obtiveram um gráfico teórico da concentração molar de ACN na interface em função da concentração de ACN no volume da solução. Esses resultados são mostrados no Gráfico 14.

Gráfico 14 - Em (A) é apresentado o gráfico da tensão superficial da solução $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ em função da concentração molar de ACN na solução. Em (B) é apresentada a curva teórica da concentração de ACN na interface em função da concentração de ACN no volume da solução.

Fonte: EISENTHAL et al. (35).

A acetonitrila foi investigada em 2010 por *Weeks et al.* (43) Foram publicadas simulações computacionais de dinâmica molecular na estrutura da acetonitrila pura nas interfaces líquido/vapor, sólido/líquido e sólido/vapor. (43) Em seus resultados os autores concluíram que a interface líquido/vapor da acetonitrila pura tinha uma tendência por alinhamento antiparalelo mais forte que no volume. Assim, a estrutura da superfície da acetonitrila pura não difere significativamente daquela no volume, no que se refere à estrutura antiparalela causada pela interação dipolo-dipolo entre as moléculas de acetonitrila. No mesmo ano *Weeks et al.* também publicaram resultados de medidas de espectroscopia SFG (37), mostrando que a interface sílica/líquido da acetonitrila pura possui uma estrutura mais organizada, que se assemelha a uma bicamada lipídica. No modelo proposto, as moléculas de acetonitrila mais próximas da superfície da sílica tem uma forte tendência de apontar o nitrogênio do grupo CN na direção da superfície. Essa preferencia de alinhamento das moléculas de acetonitrila se deve à distribuição de hidrogênio doador dos grupos silanol presentes na superfície da sílica. Então haverá a formação de uma monocamada de moléculas de acetonitrila com as moléculas todas na mesma orientação, e abaixo dessa monocamada se

formará outra monocamada de acetonitrila com as moléculas orientadas em direção contrária numa formação antiparalela, conforme ilustrado na Figura 58.

Figura 58 - Modelos propostos para a estrutura da interface da acetonitrila pura nas interfaces líquido/vapor, líquido/sílica e sílica/vapor. A estrutura é comparada com uma bicamada de lipídios.

Fonte: Elaboradas pelo autor, exceto a da bicamada lipídica UIC... (84).

No Gráfico 15 mostramos os espectros SFG da acetonitrila pura, publicados por Weeks *e* Fourkas *et al.* em 2010. (37). Foram utilizados os conjuntos de polarização SSP e PPP.

Gráfico 15 - Espectro SFG da acetonitrila pura nas interfaces líquido/vapor, líquido/sílica e sílica/vapor. Os conjuntos de polarização usados são SSP e PPP.

Fonte: WEEKS J. D. *et al.* (37).

É notável a variação da frequência do pico relacionado à ressonância do modo simétrico do CH_3 da acetonitrila. Uma mudança de 10 cm^{-1} na frequência do pico referente à vibração do estiramento simétrico do grupo CH_3 da acetonitrila é observada quando é mudado o conjunto de polarizações de SSP para PPP. Quando o espectro SFG vem de um único modo vibracional, não é esperado que o pico dessa frequência fosse diferente para os conjuntos de polarizações. Talvez a resposta para esse efeito esteja na natureza microscópica da estrutura interfacial da acetonitrila.

Como discutimos no Capítulo 2 dessa dissertação, o sinal SFG é nulo se a amostra estiver em um meio contendo simetria de inversão. Assim como *Weeks et al.* explicam ter observado o sinal SFG da acetonitrila, ao mesmo tempo que propõem um modelo de estrutura interfacial em que as moléculas se organizam antiparalelamente ou com uma estrutura parecida com a de uma bicamada lipídica? Três possíveis respostas foram propostas:

- 1- Pode ser devido a um desbalanço da quantidade de moléculas de acetonitrila entre uma monocamada e outra, produzindo um sinal SFG não nulo, proveniente das moléculas que não estão pareadas antiparalelamente. No entanto as simulações computacionais realizadas mostraram que o número de moléculas nas monocamadas seria aproximadamente o mesmo.
- 2- A orientação entre as monocamadas poderia ser diferente quebrando a simetria de inversão.
- 3- Considerando que as moléculas de acetonitrila em contato com a superfície da sílica interagem por ligação de hidrogênio entre o grupo CN da acetonitrila e o grupo silanol, presente na superfície da sílica, as frequências do estiramento CN e do estiramento simétrico do CH_3 da acetonitrila ligada poderiam ser diferentes daquelas para moléculas presentes na segunda monocamada. Assim as duas camadas emitiriam sinal SFG em frequências diferentes tornando o sinal detectado uma soma dos sinais da primeira e da segunda camada que não seria nulo.

Weeks et al. (37) consideraram a terceira proposta e modelaram seus resultados de espectroscopia SFG assumindo que a susceptibilidade de segunda ordem é composta de duas Lorentzianas de sinais contrários, sendo uma proveniente da primeira monocamada e outra proveniente da segunda monocamada de moléculas de acetonitrila. Os resultados obtidos foram satisfatórios em relação aos espectros medidos. Entretanto, eles não respondem o porquê da diferença entre as frequências dos espectros SSP e PPP da acetonitrila na interface

líquido/vapor. Ainda nota-se que foi usado no ajuste do espectro SFG da interface acetonitrila/vapor duas frequências diferentes. Os autores apontam que a frequência maior corresponde à frequência de vibração das moléculas que fazem ligações de hidrogênio com a sílica, enquanto que a frequência menor corresponde às moléculas da camada seguinte, que não fazem ligações de hidrogênio. Nesse caso não há como explicar o porquê das frequências da acetonitrila na interface líquido/vapor serem diferentes, uma vez que as mesmas simulações computacionais concluem que na interface líquido/vapor as moléculas de acetonitrila se estruturam apenas por interação dipolo-dipolo, como no volume do líquido puro. Não haveria nesse modelo ligações de hidrogênio entre as moléculas de acetonitrila na interface para explicar a diferença entre as duas frequências.

Visto que esse sistema já tem sido muito estudado pela espectroscopia SFG, nosso objetivo ao utilizar a microscopia SFG era investigar se a heterogeneidade proposta na interface líquido/vapor poderia ocorrer na escala espacial micrométrica, resultando na existência de ilhas de ACN na superfície da solução, separadas por regiões ricas em água.

5.2 Metodologia e materiais utilizados

Para as medidas utilizamos água Milli-Q (resistividade 18,2 M Ω e temperatura de 20°C), acetonitrila da Sigma-Aldrich com 99,9% de pureza e um porta-amostra na forma de um poço de teflon como mostrado na Figura 60. Um filtro de cor é posicionado no fundo do porta-amostras para absorver parte do feixe 532 nm que incide no fundo e pode causar espalhamento e aumento do ruído da detecção do sinal SFG.

O esquema do microscópio SFG bem como do sistema óptico utilizado e o laser são apresentados detalhadamente no capítulo 4. Mostramos na Figura 59 e na Figura 60, de maneira simplificada, os esquemas experimentais utilizados para as medidas de espectroscopia e microscopia SFG.

Figura 59 - Esquema experimental para medidas de microscopia SFG em interfaces líquidas, usado para as medidas na interface líquido/ar da solução $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 60 - Esquema experimental para medidas de espectroscopia SFG em interfaces líquidas, usado nas medidas da interface líquido/ar da solução $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$. A diferença básica entre os esquemas de microscopia e espectroscopia é que na espectroscopia não usamos lente objetiva para formar imagem no sensor, e em lugar de uma câmera ICCD usamos um monocromador e um fotomultiplicador.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O porta-amostra, o filtro de cor, e os objetos que serão usados para manipular a água Milli-Q e a acetonitrila são previamente lavados com solução de limpeza nochromix. O processo de limpeza já foi descrito na seção 4.3.1 do Capítulo 4.

As medidas de espectroscopia SFG foram feitas nas frequências de ressonância do grupo metil CH_3 da acetonitrila. Também foram feitas medidas de espectroscopia SFG nas frequências dos modos OH da superfície da água, mas essas apresentaram ruído muito alto e, portanto, não serão apresentados nesse trabalho. A partir dos resultados dos espectros, determinamos a frequência central do pico de ressonância do modo vibracional do estiramento simétrico do grupo metil CH_3 da acetonitrila na interface líquido/ar.

Nosso objetivo é obter imagens do sinal SFG, ao longo do tempo, da interface líquido/ar da solução líquida $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ contendo diferentes frações molares de acetonitrila na solução. As imagens serão obtidas com o infravermelho sintonizado na frequência de vibração do grupo metil (CH_3) da acetonitrila. Dessa maneira as imagens obtidas poderão dar informações sobre a distribuição espacial de acetonitrila na superfície livre da solução $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$.

5.3 Resultados e discussões

Os espectros SFG da solução $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ são mostrados no Gráfico 16 abaixo. Esses espectros foram obtidos na interface líquido/ar entre 2900 cm^{-1} e 3050 cm^{-1} à temperatura ambiente de 20°C . Cada ponto do espectro é resultado da acumulação de 100 pulsos adquiridos, com o fator de ganho do tubo fotomultiplicador no máximo. As frações molares de acetonitrila na solução (χ_{ACN}) investigadas foram 4%, 8%, 20% e 100%. O conjunto de polarizações utilizado foi SSP (S- sinal SFG, S- feixe 532nm e P- feixe infravermelho).

Gráfico 16 - Espectro SFG da interface líquido/ar da solução H₂O/ACN em diferentes frações molares de ACN.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O pico em 2945 cm^{-1} corresponde à ressonância com o modo vibracional simétrico do grupo metil (CH_3) da acetonitrila. Entre 3000 cm^{-1} e 3020 cm^{-1} estaria a ressonância do modo assimétrico do grupo metil, mas como podemos ver esse modo praticamente não contribui para o espectro SFG. O máximo da intensidade do sinal SFG correspondendo à solução de fração molar 8% já era esperado de resultados anteriormente da literatura, conforme descrito na seção 5.1.

A microscopia SFG da solução H₂O/ACN foi obtida nas concentrações molares 4%, 7%, 12 %, 20% e 100% de acetonitrila na solução. A câmera ICCD foi resfriada a $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$ por seu refrigerador termoeletrônico, que utilizou um fluxo de água de refrigeração externa à temperatura de 11°C . O fator de ganho da câmera foi fixado em 255 (máximo). O feixe infravermelho foi focalizado na amostra de forma a se superpor com o mesmo tamanho do feixe 532 nm. Assim, o sinal SFG gerado e a área iluminada são otimizados nos máximos. A posição no micrômetro da lente L2 (lente de BaF_2 que focaliza o infravermelho) foi a 3.5 mm. Essa posição faz com que a área que gera o sinal SFG seja de aproximadamente $650\text{ }\mu\text{m}$ ao longo da direção y (que corresponde à direção paralela ao plano de incidência e à horizontal da imagem). O conjunto de polarizações dos feixes foi SSP (S- sinal SFG, S- feixe 532 nm e P- feixe infravermelho). A frequência do feixe infravermelho é fixada em 2945 cm^{-1} que é a

frequência central da ressonância do modo simétrico do grupo metil da acetonitrila. As imagens foram obtidas no modo de aquisição *Kinectic series*. Nesse modo as imagens foram sendo adquiridas sucessivamente ao longo do tempo. Cada imagem foi capturada com tempo de exposição de apenas 5 segundos. No início do experimento, obtivemos um conjunto de imagens nas mesmas condições experimentais apenas com a incidência dos feixes 532 nm e a mira vermelha do OPA/OPG, ou seja, com a fonte de infravermelha desligada. Essas imagens são consideradas como o ruído incluído nas medidas e, portanto, foram subtraídas das imagens feitas com o infravermelho ligado. No fim do experimento, capturamos um conjunto de imagens nas mesmas condições experimentais da superfície de um cristal de quartzo. As imagens no quartzo servem para normalizar o formato do sinal SFG gerado na superfície pela superposição dos feixes 532 nm e infravermelho. Na Figura 61 abaixo mostramos uma das imagens SFG obtidas, para cada uma das concentrações molares analisadas. Mostramos também uma das imagens obtidas no cristal de quartzo. Plotamos abaixo de cada imagem um perfil de linha traçado pela média de contagem por pixel ao longo da direção x na região do retângulo amarelo desenhado em cada imagem. As imagens apresentadas abaixo não foram editadas. Por isso, a barra de escala no canto inferior direito corresponde a 100 μm na direção horizontal (direção y nas coordenadas de laboratório). Na direção vertical da imagem (direção x nas coordenadas de laboratório) essa barra de escala vale 70 μm .

Figura 61 - Microscopia SFG na interface líquido/ar da solução H₂O/ACN nas concentrações molares 4%, 7%, 12%, 20% e 100%.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como podemos ver, o perfil de linha da imagem obtida no cristal de quartzo se assemelha com os perfis de linha das imagens obtidas no líquido. A imagem obtida na superfície do cristal de quartzo não tem aspecto granuloso como as imagens obtidas na superfície líquida. Isso ocorre porque a quantidade de sinal luminoso SFG gerado na superfície o cristal é muitas vezes maior. As intensidades medidas na microscopia SFG para cada fração molar são plotadas no Gráfico 17.

Gráfico 17 - Intensidade do pico de ressonância do estiramento CH_3 simétrico, CH (s) , da acetonitrila na interface líquido/ar, em função da sua fração molar no volume da solução $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

As medidas nas diferentes concentrações molares da solução $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ apresentam a mesma variação de intensidade observada anteriormente por espectroscopia SFG, como mostramos no Gráfico 17 acima. Mas variações locais de intensidade do sinal SFG também foram observadas ao longo do tempo. Variações espaciais do sinal foram observadas em todas as concentrações molares estudadas. A seguir na Figura 62, mostramos a evolução do perfil espacial das imagens SFG medidas ao longo do tempo na solução $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ com concentração de 12% de acetonitrila.

Figura 62 - Microscopia SFG resolvida no tempo. As imagens correspondem à solução $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$, concentração molar 12% de acetonitrila.

Fonte: Elaborada pelo autor

Como vemos na Figura 62, o padrão espacial do sinal muda no tempo. Essas mudanças podem ser interpretadas como resultado de um conjunto de efeitos.

- Variações locais da susceptibilidade não linear de segunda ordem na superfície da amostra. Poderiam ocorrer flutuações aleatórias na concentração de moléculas de acetonitrila, pela formação de ilhas ricas que emitiriam sinal SFG alto. Um aumento local no ordenamento das moléculas também poderia causar tal efeito.

- Mudanças no padrão espacial dos feixes 532 nm e infravermelho, mudando o padrão do sinal SFG na região de superposição espacial. Os feixes 532 nm e infravermelho podem incidir na amostra com distribuição de energia em formatos diferentes. Esse efeito depende da frequência do feixe infravermelho, da focalização dos feixes. A incidência do feixe 532 nm na superfície da amostra naturalmente varia pulso a pulso, incidindo em posições ligeiramente diferentes. São variações de poucos micrometros que não causam problemas em imagens de mais de 10 segundos (acumulação de 50 pulsos). Uma maneira de determinar a variação no sinal SFG causada pela oscilação dos feixes é fazer uma imagem na superfície limpa do quartzo. Podemos usar qualquer amostra que seja considerada uniforme, sem artefatos.
- A depender da amostra a quantidade, devemos considerar o ruído proveniente do feixe 532 nm que pode acompanhar o sinal SFG e passar pelos filtros. No caso das medidas na superfície livre de líquidos feitas com o porta-amostra aqui descrito o ruído do feixe 532 nm foi atenuado com um filtro e um pequeno poço no fundo do porta-amostra. No entanto uma parcela de sinal em 532 nm ainda é detectada na câmera ICCD, principalmente quando o fator de ganho é ajustado no máximo (255).
- Raios cósmicos podem causar picos muito intensos em um ou mais pixels da imagem. Como a relação sinal ruído aqui é baixa a eliminação de raios cósmicos não é simples.

Para investigar a variação do sinal SFG devida às possíveis variações nos padrões espaciais dos feixes de bombeio, foram feitas imagens SFG na superfície de um cristal de quartzo. Como a susceptibilidade não linear de segunda ordem do quartzo é muito alta na frequência 2945 cm^{-1} , o fator de ganho da câmera ICCD foi ajustado para 80. Os demais parâmetros experimentais se mantiveram iguais aos usados nas medidas feitas no líquido. Abaixo, na Figura 63, mostramos uma sequência de perfis de linha obtidos de imagens no quartzo.

Figura 63 - Microscopia SFG resolvida no tempo na superfície do cristal de quartzo, para avaliar a flutuação temporal do padrão espacial dos feixes de excitação. Os perfis de linha abaixo são obtidos na mesma região delimitada pelo retângulo amarelo para três imagens consecutivas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nas imagens dos perfis acima podemos ver que pequenas variações microscópicas na intensidade do sinal SFG ocorrem devido à flutuação dos feixes. Essas imagens sendo capturadas em 5 segundos são formadas pela soma de 25 pulsos de laser.

5.4 Conclusões preliminares

Obtivemos imagens de microscopia SFG na interface líquido/ar da solução $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ variando a fração molar de acetonitrila, na solução, entre 4% e 20%. As imagens obtidas aqui mostram algumas variações de intensidade microscópicas, ao longo do tempo, No entanto ainda não foi possível obter uma correlação entre as flutuações temporais observadas e as possíveis causas discutidas. Como discutimos na seção anterior, Se houvesse algum caráter dinâmico da estrutura ou composição na interface líquido/ar da solução $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$, poderíamos confundir essa dinâmica com variações no perfil espacial dos feixes de bombeio na superfície da amostra ou com as fontes de ruído aleatório, por exemplo, do feixe 532 espalhado na amostra.

Obtivemos conjuntos de até 30 imagens para cada uma das frações molares estudadas entre 4% e 20% de acetonitrila na solução $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$. Observamos flutuações no padrão espacial da imagem SFG, em todos os conjuntos para cada concentração molar de acetonitrila. Devemos lembrar que o sinal SFG total emitido é diferente para cada concentração molar de acetonitrila na solução (veja Gráfico 17). Contudo, por constatação visual, podemos afirmar que as flutuações se apresentaram na mesma proporção do sinal SFG emitido, ou seja, as flutuações no padrão espacial da imagem SFG detectadas não apresentam dependência aparente com a fração molar de acetonitrila na solução. Assim para as frações molares de acetonitrila estudadas o padrão aleatório de variações de perfil espacial é semelhante ao apresentado na Figura 62 que representa a variação ao longo do tempo da imagem SFG na solução $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ com 12% de acetonitrila.

Contudo não foi possível obter uma análise estatística mais detalhada das flutuações no perfil espacial das imagens SFG. Devemos considerar três fatores que dificultam essa análise.

- Não possuímos uma quantidade significativa de imagens para fazer estatística. Como as medidas foram feitas na superfície do líquido em contato direto com o ar, não foi possível controlar a evaporação do líquido e com isso a posição da amostra varia no tempo. Em minutos, a evaporação do líquido altera a posição da amostra de

tal maneira que a superposição espacial entre os feixes muda significativamente e as condições experimentais não são mais consideradas as mesmas.

- O tempo de acumulação das imagens SFG sendo 5 segundos pode ser considerado razoável para obter uma imagem nessa amostra. Mas devemos lembrar que a resolução espacial do microscópio é limitada em até 9 μm . Imaginamos que, se houvesse heterogeneidade na superfície da solução de acetonitrila ou mesmo ilhas de dezenas de micrometros, essas ilhas flutuariam com uma dada velocidade lateral e assim uma imagem longa (mais de um segundo) não conseguira registrar com precisão a existência das ilhas. Contudo a obtenção de imagens rápidas não acumula a quantidade de fótons ou sinal luminoso SFG necessária para podermos desprezar as flutuações no padrão espacial dos feixes 532 nm e infravermelho. Uma imagem muito rápida acumula pouco sinal e pode apresentar granulações confundíveis com ilhas.
- As imagens apresentadas aqui foram tratadas da seguinte forma: Obtivemos uma imagem apenas do ruído, do feixe 532 e da mira vermelha, na amostra. Subtraímos essa imagem das imagens que contem o sinal SFG. Mas ainda assim essas fontes de ruído apresentam flutuações aleatórias que não são removidas das imagens. Por exemplo, na Figura 61, imagem em que mostra o perfil da concentração $\chi_{ACN} = 0,04$, é notável a ocorrência de um pixel muito brilhante fora da região onde ocorre a superposição espacial entre os feixes 532 nm e infravermelho. No perfil de linha esse pixel contribui com um pico considerável. Pontos brilhantes como esse aparecem em toda a imagem e podem ser considerados como um ruído aleatório. A origem desse ruído pode estar no feixe 532 nm ou em raios cósmicos.

As dificuldades discutidas acima são particulares da metodologia usada e do tipo amostra. Nos estudos em que o tempo de acumulação da imagem seja maior (da ordem de minutos), as flutuações nos padrões espaciais dos feixes serão somadas e não afetarão o perfil da imagem SFG. A quantidade de ruído presente nas imagens depende principalmente de como a amostra espalha o feixe 532 nm. No caso do estudo reportado aqui, o ruído foi considerável, pois utilizarmos como porta-amostra de teflon branco em forma de poço que espalhava consideravelmente o feixe 532 nm.

As indicativas da literatura de que possa haver a formação de agregados microscópicos de acetonitrila nas interfaces líquido/ar e líquido/sólido da solução líquida $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ (34) (33) (36) (35) ainda não foram comprovadas experimentalmente. Acreditamos que esse seria

um tópico possível de ser investigado por meio da microscopia SFG. Os dados obtidos utilizando microscopia SFG concordam com os estudos anteriores feitos com espectroscopia SFG (34). Contudo, a coleção de dados apresentados aqui ainda não é suficiente para tirar conclusões definitivas sobre a organização superficial da solução $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$.

Em suma, os resultados aqui apresentados demonstram a plena capacidade de estudar a superfície da solução $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ por microscopia SFG, além disso, abrem perspectivas para estudos mais detalhados não só desse sistema, mas também em outros tipos de interfaces líquidas. Essa é a primeira vez que é reportada uma imagem utilizando a técnica microscopia SFG na superfície de um líquido.

6 ESPECTROMICROSCOPIA SFG EM FILMES LANGMUIR-BLODGETT DE ÁCIDO ESTEÁRICO

O microscópio SFG (MSFG) demonstrado nesse trabalho pode ser usado para estudar interfaces dielétricas como filmes de Langmuir, Langmuir-Blodgett (LB), dentre outras. Aqui demonstramos um estudo em filmes LB utilizando a técnica de espectromicroscopia SFG.

6.1 Introdução

A espectroscopia SFG é muito utilizada no estudo de sistemas biológicos (85) (86). Até o presente, poucos estudos em sistemas biológicos utilizando microscopia SFG foram publicados. (21) (24) (26) (17) (87) Em 1999 *Flörsheimer et al.* (17) foi o primeiro a publicar uma imagem de microscopia SFG em um filme de Langmuir-Blodgett. Filmes Langmuir-Blodgett (LB) são utilizados em estudos com modelo de membrana biológica (88). O ácido esteárico é um ácido graxo saturado que contém 17 carbonos numa cadeia alquila e um grupo carboxila em sua fórmula química, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$ (veja Figura 64).

Figura 64 - Esquema 3D da estrutura química do ácido esteárico.

Fonte: WIKIPEDIA... (89).

Apresentamos aqui um estudo de microscopia SFG em filmes Langmuir-Blodgett multicamada de ácido esteárico. Estudamos filmes LB de 3 monocamadas, estruturados de forma que a camada superior tem a parte hidrofóbica apontada para o ar. Imagens utilizando microscopia em ângulo de Brewster (BAM) obtidas por Paulo B. Miranda e Natália Gonçalves (mestranda do Instituto de Química da Unicamp, sob orientação do prof. Edvaldo Sabadini), revelaram imperfeições nos filmes a nível microscópico (dezenas de micrômetros). Caracterizamos algumas imperfeições presentes nos filmes de ácido esteárico (SA, do inglês *Stearic Acid*) por espectromicroscopia SFG. Pelo espectro vibracional em cada ponto da

amostra podemos conhecer a conformação e o ordenamento das cadeias do ácido esteárico do filme LB nas regiões que contêm imperfeições.

6.1.1 Formação de filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett

Um filme Langmuir–Blodgett (LB) consiste de uma ou mais monocamadas de moléculas orgânicas anfifílicas depositadas em um substrato sólido a partir de uma monocamada de moléculas na interface líquido/ar (em geral na superfície da água), que é chamado filme de Langmuir. O método de deposição, que leva o nome de seus desenvolvedores, (90) consiste em emergir ou submergir um substrato sólido na superfície da água onde há um filme de moléculas anfifílicas na superfície. Por essa técnica é possível obter filmes de fosfolipídios estruturados em multicamadas, por exemplo, na forma de bicamadas que mimetizam as membranas biológicas. (91) (92) (93) Filmes LB podem ser construídos com alto controle de organização, estrutura molecular e espessura.

Para preparar um Filme de Langmuir, a molécula com a qual se deseja formar o filme é diluída em um solvente apropriado (clorofórmio é muito utilizado) e com auxílio de uma microseringa espalhamos essa solução na superfície da água (normalmente água Milli-Q, resistividade 18,2 M Ω -cm) em um recipiente de material inerte que possui barreiras móveis para fazer variar a área da superfície, denominado cuba de Langmuir. Após a evaporação do solvente (aproximadamente 10 min) inicia-se a compressão da monocamada de Langmuir. Durante a compressão da barreira o filme é compactado. Curvas de pressão *versus* área ($\pi \times A$) são obtidas, onde π é a diferença entre a tensão superficial da água limpa e da água recoberta pelo filme (medida em mN/m) e A representa a área por molécula (medida em $\text{\AA}^2/\text{molécula}$). Essas isotermas são assinaturas da composição química e das interações intermoleculares do filme bidimensional. As curvas da isoterma correspondem a estados de compactação e ordenamento das moléculas do filme. Um exemplo é mostrado na Figura 65. A monocamada passa por mudanças de fase desde uma fase Gasosa (G), passando por uma fase chamada Líquido-Expandida (LE), até a chamada Líquido-Condensada (LC). Na fase gasosa as moléculas não interagem entre si. Com a compressão das barreiras a pressão superficial começa a aumentar indicando que o filme se encontra na fase LE e a interação entre as cadeias alquila se tornam significativas. Alguns filmes podem apresentar fases mistas LE-LC onde há a coexistência das fases LE e LC. Nesse caso a isoterma apresenta região onde a pressão se mantém constante com a diminuição da área (chamado “plateau”), indicando uma

transição de fase de primeira ordem (94). Na fase mista LE-LC existem microdomínios de fase LC em meio a moléculas na fase LE (veja Figura 65). A fase LC é caracterizada por moléculas densamente empacotadas onde a interação entre as cadeias alquila se torna grande, não permitindo defeitos gauche nas cadeias. (86) Na fase LC com o aumento da pressão a monocamada atinge a pressão crítica e o filme colapsa, podendo levar parte das moléculas a ir para a subfase ou a se empilhar sobre o restante da monocamada.

Figura 65 - Isoterma de um filme de Langmuir, pressão superficial (mN/m) versus área em ($\text{\AA}^2/\text{molécula}$). Cada região da isoterma corresponde a uma fase. A estrutura das fases LE, LE-LC, e LC são ilustradas.

Fonte: SHEN, Y. R. et al. (95).

O filme LB é uma transferência do filme de Langmuir da superfície líquido/ar para um substrato sólido. Para obter um filme LB posicionamos na superfície do líquido, um sensor de pressão superficial e um substrato sólido (comumente utilizamos vidro, filmes de ouro ou substratos modificados quimicamente), submerso na subfase com auxílio de um dispositivo imersor (*dipper*). Nesse caso, o filme LB será depositado em ambos os lados de um substrato hidrofílico com o grupo polar em contato com o substrato e a cadeia hidrofóbica para fora. Primeiramente prepara-se o filme de Langmuir como descrito anteriormente. Entretanto, a compressão é interrompida quando o sensor registrar a pressão superficial (mN/m) desejada. Inicia-se então o processo de deposição do filme LB no substrato sólido. O substrato é emerso da superfície enquanto a barreira se move no sentido de compressão do filme a fim de manter a pressão da monocamada constante. Desta forma, a primeira camada é depositada, deixando a cadeia hidrofóbica da molécula anfifílica voltada para fora. Em seguida, o substrato é

imerso novamente e a segunda camada é depositada, deixando a parte hidrofílica voltada para fora. Essas etapas são repetidas até a obtenção do número de camadas desejadas. Na Figura 66 ilustramos a fabricação dos filmes LB multicamadas.

Figura 66 - Preparação de filmes Langmuir-Blodgett.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.1.2 Espectroscopia SFG em filmes Langmuir

A espectroscopia SFG pode dar informações sobre as propriedades microscópicas em filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett. A natureza química e a orientação média das moléculas são obtidas diretamente do espectro SFG. *Guyot-Sionnest et al.* foi o primeiro a publicar o estudo em filmes Langmuir utilizando a espectroscopia SFG. (96) Nesse artigo, *Guyot-Sionnest et al.* estudaram a conformação e orientação do filme de Langmuir de ácido pentadecanóico (PDA), cuja fórmula química é $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH}$ (veja Figura 67).

Figura 67 - Esquema 3D da estrutura química do ácido pentadecanóico.

Fonte: WIKIPEDIA... (97).

Quando o filme Langmuir de PDA está na fase LE as cadeias alquílica se encontram “dobradas”, ou seja, com defeitos conformacionais *gauche* (veja Figura 65). Na fase LC o aumento da densidade de moléculas faz com que as cadeias alquílica se reorientem

perpendicularmente à superfície líquido/ar e adotem uma conformação estendida, *all trans*. Assim, quando as moléculas se encontram nesse estado de organização, os únicos modos vibracionais da cadeia alquila ativos serão os estiramentos simétrico e assimétrico do grupo metil (CH_3) do último carbono da cadeia. Esse grupo estará apontado para o ar, num ângulo que poderá depender da pressão superficial do filme Langmuir. Os grupos CH_2 presentes ao longo da cadeia terão suas contribuições para o espectro SFG canceladas por simetria de inversão. No Gráfico 18 é representado o espectro SFG na região dos estiramentos CH da cadeia alquila do filme de PDA nas fases LE e LC, medidas com os conjuntos de polarizações SSP e SPS (96). As fases LE e LC são ilustradas na isoterma obtida do mesmo filme, ao lado dos espectros.

Gráfico 18 - Do lado esquerdo mostramos os espectros SFG no filme Langmuir de PDA, na região do estiramento CH. Em 1a), 1b) e 1c) os espectros foram medidos no conjunto de polarizações SSP. Nos gráficos 2a), 2b) e 2c) os espectros foram medidos no conjunto de polarizações SPS. Do lado direito é mostrada a isoterma medida no mesmo filme, mostrando as regiões de área por molécula onde o filme se encontra nos estados LE e LC. As letras a, b e c na isoterma indicam as áreas moleculares em que foram medidos os espectros SFG mostrados do lado esquerdo.

Fonte: SHEN, Y. R. et al. (95).

Na fase LE (áreas por molécula entre 47 e 34 Å²/molécula), o espectro SSP apresenta dois picos em 2850 cm⁻¹ e 2875 cm⁻¹, atribuídos ao estiramento simétrico do grupo CH_2 e ao estiramento simétrico do grupo metil (CH_3) presentes nas cadeias alquila do PDA. Um pequeno pico em 2920 cm⁻¹ presente nesses espectros está associado ao estiramento assimétrico dos grupos CH_2 . Na fase LC o pico em 2875 cm⁻¹ aumenta consideravelmente seguido do desaparecimento do pico em 2850 cm⁻¹. Um pico largo em torno de 2950 cm⁻¹ é atribuído à ressonância de Fermi do estiramento CH_3 simétrico com o sobretom do seu modo de dobramento simétrico. O espectro SFG no conjunto de polarizações SPS apresenta um pico

em 2962 cm^{-1} atribuído ao estiramento assimétrico do grupo metil (CH_3). No início da fase LE (área por molécula igual a $47\text{ Å}^2/\text{molécula}$) o espectro SFG no conjunto de polarizações SPS apresenta um sinal fraco proveniente do estiramento CH_3 simétrico em 2875 cm^{-1} .

Dos espectros no Gráfico 18, conclui-se que a existência dos picos em 2850 cm^{-1} , referente ao estiramento simétrico do grupo CH_2 indica que na fase LE as moléculas de PDA tem suas cadeias alquila “dobradas” por torções (isomerizações) ao longo das ligações C–C, formando os chamados defeitos *gauche*. Esses defeitos permitem a quebra de simetria espacial entre os grupos CH_2 presentes na cadeia alquila, tornando esses modos ativos no SFG. Com a compressão do filme, as moléculas ficam mais próximas umas das outras, o pico referente ao estiramento CH_2 diminui e o pico referente ao estiramento simétrico do grupo metil (CH_3) aumenta, indicando que as cadeias se tornaram mais ordenadas na direção perpendicular à interface, e com menos defeitos *gauche*. Na fase LC as cadeias alquila do ácido graxo se organizam na direção perpendicular à interface, e o ordenamento entre as cadeias torna o modo vibracional do estiramento CH_2 inativo por simetria de inversão. Assim haverá apenas o pico em 2875 cm^{-1} referente ao estiramento CH_3 simétrico, proveniente do carbono terminal da cadeia, além do pico em 2950 cm^{-1} atribuído à sua ressonância de Fermi. Nos espectros com o conjunto de polarizações SPS o estiramento assimétrico do CH_3 é dominante (2962 cm^{-1}), sugerindo que os grupos CH_3 estão orientados em um ângulo mais próximo da normal à interface líquido/ar. (86) (96)

Em suma conclui-se que em filmes de Langmuir de PDA a fase LC é caracterizada pelas cadeias alquila ordenadas e orientadas em ângulo próximo ao eixo normal da interface. E contraste na fase LE as cadeias alquila se encontram com conformação desordenada, que leva a um menor ordenamento orientacional dos grupos metil no final das cadeias. A assinatura espectral SFG da estrutura no filme de Langmuir já é bem conhecida da literatura. (86) (96) No filme LB multicamada, o modos CH_3 bem como os modos CH_2 presentes nas cadeias alquila em uma bicamada, como a representada na Figura 66, se anulam por simetria de inversão. (98) Assim, em um filme LB de três monocamadas (veja Figura 66) o sinal das duas mais internas é inativo no SFG por simetria de inversão e apenas a monocamada mais externa contribui para o espectro detectado. Dessa forma o sinal SFG, em princípio, será dominado por picos referentes aos estiramentos simétrico e assimétrico dos grupos CH_3 presentes no carbono terminal da monocamada mais externa do filme. As afirmativas anteriores supõem que os filmes LB multicamada não possuem imperfeições, como aqueles representados na Figura 66.

6.2 Metodologia e materiais

A fabricação dos filmes LB multicamada de ácido esteárico, utilizados aqui, são parte do trabalho de mestrado, intitulado “Dinâmica de Impacto de Gotas em Superfícies Estruturadas Molecularmente”, desenvolvido por Natália Gonçalves do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), orientado pelo professor Edvaldo Sabadini. As subfases contêm acetato de zinco, que induz um maior empacotamento do filme de SA e torna-o mais rígido (menor compressibilidade lateral).

A caracterização por espectromicroscopia foi feita utilizando o MSFG descrito no capítulo 4. As imagens SFG foram obtidas com o feixe infravermelho sintonizado em torno das frequências de ressonância dos estiramentos simétricos dos grupos CH_2 (2854 cm^{-1}) e CH_3 (2875 cm^{-1}) da cadeia alquila do ácido esteárico (faixa de varredura entre 2840 e 2900 cm^{-1}). Como nesse intervalo de frequências as energias e o padrão espacial do feixe infravermelho não variam significativamente, não foi feita a normalização das imagens obtidas utilizando imagens de referência no cristal de quartzo. As medidas aqui reportadas foram obtidas com os feixes nas polarizações: S- feixe 532 nm , e P- feixe infravermelho. Não há polarizador na detecção do sinal, mas pelas regras de simetria a polarização do feixe soma de frequências será S, perpendicular ao plano de incidência (ou seja, combinação de polarizações SSP). Os parâmetros de detecção e captura de imagem da câmera ICCD são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6 - Parâmetros da câmera ICCD usados nas medidas.

Parâmetro da ICCD	Valor
Fator de ganho	255
Gate	20ns
Tempo de leitura por pixel	$16\mu\text{s}$
Modo de aquisição	Single Scan
Tempo de aquisição (s)	10
Temperatura CCD ($^{\circ}\text{C}$)	-25

Fonte: Elaborada pelo autor.

Algumas imagens foram feitas utilizando o microscópio auxiliar, mas como este não é capaz de capturar as imperfeições nos filmes LB. Essas imagens não foram apresentadas aqui.

Obtivemos imagens de microscopia SFG para frequências do infravermelho entre 2840 cm^{-1} e 2900 cm^{-1} , coletando uma imagem a cada 3 cm^{-1} . Cada imagem foi capturada em

10 segundos de exposição, utilizando o máximo fator de ganho da câmera ICCD. O foco do infravermelho foi ajustado no micrômetro da lente de Fluoreto de Bário (BaF_2) na posição 4 mm. Nessa posição o feixe infravermelho terá um diâmetro entre 600 a 700 μm na amostra. Para remoção de ruídos obtivemos uma imagem na câmera ICCD com infravermelho desligado, ou seja, apenas o feixe 532 nm e a mira vermelha do OPA/DFG incidindo na amostra. Essa imagem foi subtraída das imagens que contêm o sinal SFG do filme LB. Para obtenção dos espectros SFG nas regiões (círculos) desenhadas nas imagens usamos o software AstroImageJ. Os pontos dos espectros representam a média de contagem no círculo, para uma imagem obtida naquela frequência do infravermelho.

6.3 Resultados e discussões

Os filmes LB de 3 camadas de ácido esteárico (SA) estudados continham muitas regiões com imperfeições. Mostramos o resultado da espectromicroscopia em três pontos (regiões) da amostra contendo imperfeições. Denotaremos a amostra por LB SA 3L e os pontos P1, P2 e P3. Aqui chamamos de imperfeições, as regiões do filme que apresentem descontinuidades. Por exemplo, não emitem sinal SFG na ressonância do estiramento CH_3 simétrico que pode indicar regiões onde há buracos ou ausência do filme ou até a ausência de uma das monocamadas. As imagens dos três pontos P1, P2 e P3 são mostradas na Figura 68.

Figura 68 - Imagens SFG de três defeitos encontrados num filme LB de ácido esteárico. O tempo de acumulação de sinal é 10 segundos. Cada linha contém três imagens de um dado ponto da amostra. Esses pontos são denotados P1, P2 e P3.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A série de imagens no ponto P1 só apresenta sinal SFG apreciável em torno da frequência 2875 cm^{-1} , enquanto que as séries de imagens nos pontos P2 e P3 apresentam regiões onde o sinal SFG é emitido principalmente em torno da frequência 2875 cm^{-1} e/ou da frequência 2854 cm^{-1} . Por exemplo, nas imagens no ponto P3 da amostra podemos ver que a região clara da imagem obtida com o infravermelho em 2854 cm^{-1} tem a mesma forma da região escura da imagem obtida com o infravermelho em 2875 cm^{-1} , e vice versa.

Para cada um dos pontos estudados obtivemos a espectromicroscopia SFG que apresentaremos a seguir. Para o ponto P1 a espectromicroscopia obtida com passo de 3 cm^{-1} entre cada frequência é mostrada na Figura 69.

Figura 69 - Espectromicroscopia do filme LB SA 3L no ponto P1 da amostra.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O espectro SFG é apresentado pela média de contagem por pixel nas regiões circulares desenhadas. O diâmetro dos círculos é de 13 μm correspondendo a uma área de aproximadamente 132 μm^2 . Os pontos C1 e C2 estão fora da região onde é gerado o sinal SFG. O espectro em C1 corresponde ao ruído aleatório do feixe 532 nm que ainda pode estar presente mesmo após a subtração da imagem sem o feixe infravermelho. O círculo C2 está situado num ponto da amostra onde não ocorre o ruído proveniente do feixe 532 nm. Lembramos que tanto a distribuição quanto a intensidade do ruído devido ao feixe 532 nm na amostra dependem do tipo de amostra. Como no ponto C1 o sinal é apenas ligeiramente maior

que em C2 (que é praticamente nulo), a contribuição do ruído do feixe de excitação em 532 nm ao espectro obtido é desprezível.

No ponto C3 o espectro SFG aparenta apenas um pico na frequência 2875 cm^{-1} . Fora da região brilhante (ponto C4) o espectro SFG tem praticamente o mesmo formato, exceto com uma intensidade menor. Os filmes LB com 3 monocamadas de ácido esteárico foram depositados a partir do filme Langmuir na fase LC. Assim podemos considerar duas possibilidades para haver regiões que emitem sinal SFG adjacentes a regiões que não emitem sinal SFG (ou emitem com menor intensidade). Primeiro, poderíamos supor que as regiões que emitem sinal contêm três monocamadas enquanto as que não emitem contêm apenas duas. Nas regiões onde temos uma bicamada antiparalela o sinal das cadeias alquila se anulariam por simetria de inversão. Segundo, as regiões que não emitem sinal poderiam ser buracos no filme onde não haveria moléculas de ácido esteárico. A Figura 70 ilustra esses dois modelos

Figura 70 - Modelo proposto para o contraste de sinal SFG medido na região P1 do filme LB SA 3L.
Modelo da Região P1 do filme LB SA 3L

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para o ponto P2 do filme LB SA 3L, obtivemos a espectromicroscopia utilizando o mesmo diâmetro para os círculos de $13\text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro. Nesse ponto observamos a alternância da região brilhante quando a frequência do infravermelho vale 2854 cm^{-1} e 2875 cm^{-1} . Para melhor visualizar esse efeito, representamos na cor verde as regiões da amostra que

emitem sinal SFG ressonante com a frequência do infravermelho igual a 2854 cm^{-1} , e em azul representamos as regiões que emitem sinal SFG ressonante com a frequência 2875 cm^{-1} . Na Figura 71 é mostrado o resultado da espectromicroscopia na região P2.

Figura 71 - Espectromicroscopia no ponto P2 do filme LB SA 3L. Em verde estão representadas as regiões que emitem sinal SFG ressonante com a frequência 2854 cm^{-1} do infravermelho. Em azul estão representadas as regiões da amostra que emitem sinal SFG ressonante com o infravermelho em 2875 cm^{-1} .

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na Figura 71 podemos ver regiões em verde que emitem apenas o sinal SFG ressonante na frequência 2854 cm^{-1} , e regiões azuis que emitem apenas sinal SFG ressonante na frequência 2875 cm^{-1} . Essas regiões são representadas nos espectros SFG das áreas C3 e C2. Também observamos algumas regiões que apresentam a cor verde mais escuro, que

emitem sinal SFG ressonante nas duas frequências anteriormente mencionadas. Nessas regiões o espectro SFG tem a mesma forma da curva C1 da Figura 71.

Um modelo para esse tipo de defeito no filme LB deve conter regiões onde as cadeias alquila estão ordenadas de maneira a só emitir sinal SFG ressonante com a frequência do estiramento simétrico do grupo metil (CH_3) em 2875 cm^{-1} e regiões desordenadas onde as cadeias alquila se encontram dobradas por defeitos *gauche* e assim emitem sinal SFG ressonante com estiramento simétrico do grupo CH_2 em 2854 cm^{-1} . Se a conformação não for muito desordenada, a contribuição do estiramento simétrico do grupo CH_3 pode ainda ser apreciável, conforme ilustra o Gráfico 18. Esse é o caso da região C1 da Figura 71.

Figura 72 - Modelo proposto para o contraste de sinal SFG medido nos pontos P2 e P3 do filme LB SA 3L.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na Figura 73 apresentamos a espectromicroscopia no ponto P3 do filme LB SA 3L. Os espectros são obtidos pela média por pixel na região circular da mesma forma que nas medidas anteriores, mas o círculo aqui tem diâmetro de $26\text{ }\mu\text{m}$. A configuração de cores também segue o mesmo padrão das imagens anteriores.

Figura 73 - Espectromicroscopia no ponto P3 do filme LB SA 3L. Em verde estão representadas as regiões que emitem sinal SFG ressonante com a frequência 2854 cm^{-1} do infravermelho. Em azul estão representadas as regiões da amostra que emitem sinal SFG ressonante com o infravermelho em 2875 cm^{-1} .

Fonte: Elaborada pelo autor.

É notável, no ponto P3 do filme LB, a existência de regiões em que o sinal SFG é mais seletivo em uma dada frequência do infravermelho (C1, C2 e C4) e outras (C3) em que o sinal SFG é gerado nas duas frequências de ressonância (estiramentos simétricos dos grupos CH_2 e CH_3). Poderíamos tomar como modelo de estrutura para as áreas C1, C3 e C4, o mesmo ilustrado na Figura 72, sendo que a área C3 deve ter conformação ligeiramente mais ordenada, com menos defeitos gauche por cadeia. Já a área C2 aparenta ter apenas

contribuição do grupo metila, em 2875 cm^{-1} , correspondendo a uma ou três camadas densamente empacotadas.

Não obtivemos ainda os espectros SFG nas regiões da ressonância de Fermi, nem na faixa de frequências dos estiramentos assimétricos dos grupos CH_2 e CH_3 da cadeia alquila do ácido esteárico, mas a extensão dessas medidas a outras faixas espectrais é direta. O único cuidado que é necessário se a faixa espectral for ampla é normalizar as imagens obtidas na amostra por outras obtidas nas mesmas condições em uma amostra de referência (cristal de quartzo), para remover o efeito das variações na intensidade e perfil espacial do feixe infravermelho, e também na sobreposição espacial dos dois feixes de bombeio.

6.4 Conclusões preliminares

As imagens de microscopia SFG apresentadas nesse capítulo mostram a sensibilidade do microscópio SFG para obtenção da estrutura molecular a nível microscópico em filmes LB, e o mesmo seria possível para aplicações em filmes de Langmuir. Ainda há muito que fazer para emitir conclusões mais precisas sobre a estrutura e ordenamento do filme LB com três monocamadas de ácido esteárico. Para entender completamente a estrutura desse filme seria necessário obter a espectromicroscopia nas polarizações SPS e PPP. As imagens apresentadas aqui também não foram normalizadas pelo sinal SFG emitido no cristal de quartzo. Para fazer a normalização dos espectros seria necessário obter o mesmo conjunto de imagens utilizando os mesmo parâmetros de posicionamento da amostra e superposição de feixes, num cristal de quartzo. Entretanto, os resultados aqui reportados representam um teste inicial do desempenho do MSFG, que mostra a plena capacidade de estudar qualquer filme de Langmuir ou Langmuir-Blodgett utilizando o MSFG do LENI.

Essa é a primeira vez que é reportada uma medida de microscopia SFG num filme LB de ácido esteárico. Se considerarmos a sensibilidade como a capacidade de obter imagens em menor intervalo de tempo ou menor acumulação de pulsos, o MSFG do LENI pode ser considerado mais sensível se comparado com os microscópios já publicados na literatura, até o momento. (17) (23) (26) (19) (25) Por exemplo, a imagem de microscopia SFG publicada por *Flörsheimer et al.* (17) em um filme LB foi acumulada em cerca de 30 minutos.

As imagens e a espectromicroscopia SFG obtidas no filme LB SA 3L mostraram o contraste orientacional na superfície do filme que é composto unicamente de moléculas de ácido esteárico. Os contrastes observados nas imagens SFG poderiam corresponder também à distribuição química no filme, se houvesse moléculas diferentes na composição deste. As

estruturas observadas aqui por microscopia SFG já haviam sido descobertas por microscopia em ângulo de Brewster. A principal vantagem na utilização da microscopia SFG nesse tipo de estudo em relação à microscopia em ângulo de Brewster (BAM) é que no BAM o contraste é obtido pela diferença entre os índices de refração linear ou espessura da amostra, já o MSFG tem sensibilidade química pelo espectro vibracional e orientacional, pelas regras de simetria da susceptibilidade não linear de segunda ordem. Nos casos em que temos dois componentes com índices de refração e espessuras próximos compondo o filme de Langmuir, esses não serão distinguidos por BAM.

7 CONCLUSÃO

O objetivo principal desse trabalho foi implementar a microscopia vibracional de interfaces através da geração de soma de frequências (a microscopia SFG), no Laboratório de Espectroscopia Não linear de Interfaces (LENI). Uma das exigências do projeto era que na montagem do microscópio fosse utilizada a menor quantidade possível de elementos ópticos, a fim de minimizar as perdas de sinal SFG, maximizando assim a sensibilidade de detecção do sinal. Outra exigência era que os dois feixes que geram o sinal SFG (feixe 532 nm e feixe infravermelho), incidissem na amostra em ângulos oblíquos. Isso permite que ambos os feixes possam ser polarizados paralelamente (P) em relação ao plano de incidência e assim obtermos uma componente de polarização na direção normal à superfície ou interface da amostra estudada, o que seria impossível se os feixes incidissem perpendicularmente à superfície ou interface da amostra. Para obter os parâmetros orientacionais e estruturais das moléculas presentes na interface são necessários espectros SFG obtidos por meio de feixes contendo polarizações nas direções paralela e perpendicular à superfície ou interface. Para cumprir essa exigência escolhemos a montagem de microscópio por visão oblíqua.

A maioria dos trabalhos anteriores sobre microscopia SFG por visão oblíqua (17) (19) (27) se basearam num modelo de microscópio desenvolvido por *Chastang, J. C. A. et al.*, patentado pela IBM em 1996. (99) Esse modelo de microscópio utiliza um sistema óptico contendo uma grade de difração para corrigir distorções e perdas de focalização ao longo das laterais da imagem que é obtida por feixes que incidem obliquamente. Acreditamos que esse modelo não é ideal para a detecção de sinais fracos, como é o sinal SFG, principalmente por conta da quantidade de sinal que seria perdido na grade de difração. O microscópio SFG do LENI foi projetado de forma mais simples, por meio da qual, aproveitamos melhor o sinal gerado e com isso fomos capazes de capturar imagens de microscopia SFG na superfície da água pura e em filmes Langmuir com tempos de acumulação de apenas 10 segundos (correspondendo à acumulação do sinal gerado por 200 pulsos de laser na amostra). Esse resultado pode ser considerado excelente se comparamos com o microscópio SFG comercializado pela empresa EKSPLA, que promete em seu catálogo uma imagem SFG obtida pela acumulação do sinal gerado por 5000 pulsos de laser (mais de 4 minutos, considerando a taxa de repetição do laser em 20 Hz), numa amostra que consiste de microcontatos de ouro com um filme depositado de octadecanotiol, cuja não linearidade é muitas vezes superior à da superfície da água.

Uma das possíveis limitações do microscópio SFG, apresentado aqui, poderia decorrer de não haver um sistema óptico para fazer as devidas correções nas distorções e perdas de foco nas laterais das imagens. Testes foram feitos para medir a profundidade de campo e o limite de resolução óptica do microscópio e, além disso, um modelo matemático específico foi elaborado para calcular a profundidade de campo em microscópios por visão oblíqua. A partir dos resultados dos testes e do modelo elaborado, concluímos que a resolução óptica do nosso microscópio SFG é limitada basicamente pela magnificação óptica e pelo poder de resolução da câmera ICCD utilizada (tamanho do pixel). Assim o microscópio tem limite de resolução óptica na direção paralela ao plano de incidência (direção y nas coordenadas de laboratório como ilustrado na Figura 51) dada por $8.6\ \mu\text{m}$ e na direção perpendicular ao plano de incidência (direção x nas coordenadas de laboratório como ilustrado na Figura 51) dada por $6,0\ \mu\text{m}$. O campo de visão da amostra é determinado pelo diâmetro com que os feixes 532 nm e infravermelho são superpostos na amostra e pela magnificação utilizada, que depende da distância focal da lente objetiva. O diâmetro do infravermelho pode ser ajustado para incidir na amostra com diâmetros entre 200 até $1000\ \mu\text{m}$. Entretanto o máximo campo de visão será limitado pelo diâmetro do feixe 532 nm na amostra que vale aproximadamente $600\ \mu\text{m}$. Calculamos a profundidade de campo do microscópio e determinamos que a região da amostra que será focalizada com limite de resolução de até $10\ \mu\text{m}$ será aproximadamente $400\ \mu\text{m}$ de largura na direção y. Ao longo da direção x (perpendicular ao plano de incidência) não há perda de focalização. Esses resultados são considerados razoáveis dadas as escolhas das intensidades dos feixes de bombeio na amostra e da lente objetiva (Hellios-44). Seria possível aumentar o poder de resolução espacial do microscópio pela substituição da lente objetiva Hellios-44 que tem distância focal 54 mm (número-f dado por 2,0) por outra que dispomos no laboratório com distância focal 27 mm (número-f dado por 2,8). Assim, a magnificação M da imagem seria maior e a resolução limitada pela ICCD ($2 \times \text{pixel} / M$) seria melhorada. Nesse caso específico não haveria alteração significativa na profundidade de campo (para o mesmo tamanho de objeto de $10\ \mu\text{m}$), pois a profundidade de campo será limitada pela abertura numérica dos feixes gaussianos envolvidos na imagem, que são muito menores que a abertura numérica da lente objetiva. Entretanto, uma maior magnificação diminuiria o campo de visão do microscópio, dado que a área do sensor ICCD é limitada. Entretanto se tivéssemos uma magnificação maior que a atual de teríamos de fazer considerações diferentes para estimar a profundidade de campo.

Neste trabalho duas aplicações foram exploradas utilizando a técnica de microscopia SFG: a microscopia SFG na interface líquido/ar da solução líquida $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ com diferentes concentrações de CH_3CN presente no volume da solução e a espectro microscopia SFG em filmes Langmuir Blodgett (LB) de ácido esteárico. Obtivemos imagens SFG na superfície da solução $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ com tempos de acumulação de até 5 segundos, gerando um vídeo em que cada frame é obtido a cada ~ 5 segundos (um pouco mais que isso levando em conta os tempos de leitura do sensor ICCD). Obtivemos uma sequência de imagens do sinal SFG gerado com o feixe infravermelho médio sintonizado na frequência de ressonância do modo simétrico do grupo metil (CH_3) das moléculas de acetonitrila presentes na superfície do líquido (2945 cm^{-1}) para soluções com diferentes frações molares de acetonitrila ($0 \leq \chi_{\text{ACN}} \leq 100\%$) no volume da solução. Observamos uma mudança de intensidade nas imagens para cada fração molar de acetonitrila no volume da solução, que está relacionada com a concentração de moléculas de acetonitrila na superfície do líquido (resultados equivalentes aos já obtidos na literatura utilizando espectroscopia SFG). Além disso, observamos flutuações e pontos brilhantes randômicos nas imagens que constituem uma dada sequência (a cada 5 segundos) e buscamos relacionar essas flutuações com possíveis variações espaciais da concentração de moléculas de acetonitrila na superfície do líquido. Entretanto não foi possível obter esse tipo de informação sobre a superfície líquida por dificuldades experimentais. Não conseguimos isolar as flutuações de perfil espacial presentes nas fontes de laser utilizadas, e assim não conseguimos obter uma sequência de imagens contendo apenas a dinâmica da superfície do líquido com uma acumulação de apenas 5 segundos. Acumulações mais longas poderiam esconder as flutuações espaciais de concentrações que estamos investigando. Destacamos que ainda não há registro ou previsão teórica na literatura sobre a existência flutuações espaciais da ordem de micrômetros na superfície líquida da solução $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$.

A espectromicroscopia em filmes LB compostos de três monocamadas de ácido esteárico foi obtida por uma série de imagens SFG, uma para cada frequência do feixe infravermelho médio, numa varredura entre 2840 cm^{-1} e 2900 cm^{-1} , que contem as ressonâncias dos modos de estiramento simétricos dos grupos CH_2 e CH_3 da cadeia alquila do ácido graxo que compõe o filme. Os resultados comprovaram a existência de micro regiões contendo diferentes ordenamentos ou defeitos do tipo gauche nas cadeias alquila do ácido esteárico, em meio a regiões onde as cadeias se encontram bem ordenadas e estendidas. Essas imperfeições ou diferenças de orientação e ordenamento geram contraste no índice de refração linear e, portanto, puderam ser observadas anteriormente, de forma indireta,

utilizando a técnica microscopia por ângulo de Brewster (BAM). Nossos resultados mostram a sensibilidade do microscópio SFG para obter imagens em superfícies e interfaces sólidas dielétricas com contraste químico, de ordenamento e orientação média das moléculas. As imagens apresentadas foram obtidas em tempos de acumulação de até 10 segundos, demonstrando a sensibilidade de detecção do microscópio e a possibilidade de explorar sistemas interfaciais dinâmicos nessa escala de tempo.

Para expandir ao máximo o potencial do microscópio SFG como ferramenta de pesquisa ainda é necessário a integração dos sistemas eletrônicos de controle. Os sistemas de controle do laser e do sistema de captura de imagens ainda operam de forma independente, com isso, para obter um conjunto de imagens em uma faixa de frequências do infravermelho é necessário adquirir imagem por imagem, ajustando manualmente as frequências do infravermelho e os tempos de aquisição. Para integrar os sistemas e automatizar o microscópio SFG é necessário um software que controle, ao mesmo tempo, o laser e a câmera ICCD. Esse software deverá permitir a obtenção de várias imagens com programação automática da frequência do infravermelho, dos atrasos de ativação da câmera, de todos os parâmetros de ajuste do laser e do sistema de captura de imagens.

Gostaria de abrir um parêntese para estudos e testes que foram iniciados, mas que não foram incluídos nesse trabalho por não terem sido concluídos. Imagens de microscopia SFG foram obtidas em transistores orgânicos (OFETS) com objetivo de determinar a distribuição de portadores de carga no canal do dispositivo a base do polímero conjugado P3HT, quando tensões foram aplicadas entre os terminais porta, dreno e fonte. Os dispositivos foram medidos em condições de alto vácuo. Resultados parciais revelaram pequenas variações da intensidade do sinal detectado em função da voltagem aplicada nos dispositivos. Medidas também foram feitas em filmes de Langmuir do fosfolípídio dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC), na região de transição de fase LE-LC contendo domínios na fase LC da ordem de dezenas de micrometros. Também foram feitas medidas em filmes de Langmuir do polímero conjugado P3HT. Esses estudos e teste não foram expandidos nesse trabalho por conta de não terem sido concluídos e por não formarem parte do escopo principal do trabalho.

O microscópio SFG apresentado nesse trabalho abre novas perspectivas para estudos de interfaces no LENI. Pela microscopia SFG é possível obter imagens de submonocamadas com contraste químico pelo espectro vibracional e contraste orientacional pelas regras de seleção da susceptibilidade não linear de segunda ordem. Essas características da técnica tornam o microscópio SFG aplicável a estudos em: filmes de Langmuir, Langmuir-Blodgett, soluções líquidas em geral, interfaces enterradas (contanto que seja acessível aos feixes 532

nm e infravermelho), em dispositivos eletrônicos poliméricos (em ambiente de alto vácuo ou exposto ao ar), superfícies metálicas e dielétricas em geral.

REFERÊNCIAS*

- 1 ADAMSON, A. W.; GAST, A. P. **Physical chemistry of surfaces**. 6th ed. New York: Wiley, 1997.
- 2 WILLIAMS, C. T.; BEATTIE, D. A. Probing buried interfaces with non-linear optical spectroscopy. **Surface Science**, v. 500, n. 1-3, p. 545-576, 2002.
- 3 OWEN, R. J.; HEYES, C. D.; KNEBEL, D.; RÖCKER, C.; NIENHAUS, G. U. An integrated instrumental setup for the combination of atomic force microscopy with optical spectroscopy. **Biopolymers**, v. 82, n. 4, p. 410-414, 2006.
- 4 MYROSHNYCHENKO, V. et al. Plasmon spectroscopy and imaging of individual gold nanodecahedra: a combined optical microscopy, cathodoluminescence, and electron energy-loss spectroscopy study. **Nano Letters**, v. 12, n. 8, p. 4172-4180, 2012.
- 5 BOUSTANY, N. N.; BOPPART, S. A.; BACKMAN, V. Microscopic imaging and spectroscopy with scattered light. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 12, n. 1, p. 285-314, 2010.
- 6 CHUNG, C. Y.; BOIK, J.; POTMA, E. O. Biomolecular imaging with coherent nonlinear vibrational microscopy. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 64, n. 1, p. 77-99, 2013.
- 7 BINNIG, G.; QUATE, C. F.; GERBER, C. Atomic force microscope. **Physical Review Letters**, v. 56, n. 1, p. 930-933, 1986.
- 8 KAERCHER, T.; HÖNIG, D.; MÖBIUS, D. Brewster angle microscopy. **International Ophthalmology**, v. 17, n. 6, p. 341-348, 1993.
- 9 RUNGE, M. B.; BOWDEN, N. B. Synthesis of high molecular weight comb block copolymers and their assembly into ordered morphologies in the solid state. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 34, p. 10551-10560, 2007.
- 10 MCQUAW, C. M.; SOSTARECZ, A. G.; Z. L.; EWING, A. G.; WINOGRAD, N. Lateral heterogeneity of dipalmitoylphosphatidylethanolamine-cholesterol Langmuir-Blodgett films investigated with imaging time-of-flight secondary ion mass spectrometry and atomic force microscopy. **Langmuir**, v. 21, n. 3, p. 807-813, 2005.
- 11 SHEN, Y. R. Surface properties probed by second-harmonic and sum-frequency generation. **Nature**, v. 337, n. 6207, p. 519-525, 1989.
- 12 NAKAI, I. F.; TACHIOKA, M.; UGAWA, A.; UEDA, T.; WATANABE, K.; Y., M. Molecular structure and carrier distributions at semiconductor/dielectric interfaces in organic field-effect transistors studied with sum frequency generation microscopy. **Applied Physics Letters**, v. 95, n. 24, p. 243304, 2009.

* De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 6023.

- 13 VOGEL, V.; SHEN, Y. R. Air/liquid interfaces and adsorbed molecular monolayers studied with nonlinear optical techniques. **Annual Review of Materials Science**, v. 21, n. 1, p. 515-534, 1991.
- 14 BUCK, M. Organic chemistry at interfaces studied by optical second-harmonic and ir-vis sum-frequency generation. **Applied Physics A**, v. 55, n. 5, p. 395-402, 1992.
- 15 BAIN, C. D. Sum-frequency vibrational spectroscopy of the solid/liquid interface. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions**, v. 91, n. 1, p. 1281-1296, 1995.
- 16 ROKE, S.; ROETERDINK, W. G.; WIJNHOFEN, J. E. G. J.; PETUKHOV, A. V.; KLEYN, A. W.; BONN, M. Vibrational sum frequency scattering from a submicron suspension. **Physical Review Letters**, v. 91, n. 25, p. 258302, 2003.
- 17 FLÖRSHEIMER, M.; BRILLERT, C.; FUCHS, H. Chemical imaging of interfaces by sum frequency microscopy. **Langmuir**, v. 1, n. 5, p. 5437-5439, 1999.
- 18 SCHALLER, R. D.; JOHNSON, J. C.; WILSON, K. R.; LEE, L. F.; HABER, L. H.; SAYKALLY, R. J. Nonlinear chemical imaging nanomicroscopy: from second and third harmonic generation to multiplex (broad-bandwidth) sum frequency generation near-field scanning optical microscopy. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 106, n. 20, p. 5143-5154, 2002.
- 19 HOFFMANN, D. M. P.; KUHNKE, K.; KERN, K. Sum-frequency generation microscope for opaque and reflecting samples. **Review of Scientific Instruments**, v. 73, n. 9, p. 3221-3226, 2002.
- 20 KUHNKE, K.; HOFFMANN, D. M. P.; WU, X. C.; BITTNER, A. M.; KERN, K. Chemical imaging of interfaces by sum-frequency generation microscopy: application to patterned self-assembled monolayers. **Applied Physics Letters**, v. 83, n. 18, p. 3830-3832, 2003.
- 21 MIZUTANI, G.; KOYAMA, T.; TOMIZAWA, S.; SANO, H. Distinction between some saccharides in scattered optical sum frequency intensity images.. **Spectrochimica Acta Part A: molecular and biomolecular spectroscopy**, v. 62, n. 4-5, p. 845-849, 2005.
- 22 CIMATU, K.; BALDELLI, S. Sum frequency generation microscopy of microcontact-printed mixed self-assembled monolayers. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 4, p. 1807-1813, 2006.
- 23 CIMATU, K.; BALDELLI, S. Sum frequency generation imaging microscopy of CO on platinum. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 50, p. 16016-16017, 2006.
- 24 RAGHUNATHAN, V.; HAN, Y.; KORTH, O.; GE, N. H.; POTMA, E. O. Rapid vibrational imaging with sum frequency generation microscopy. **Optics Letters**, v. 36, n. 19, p. 3891-3893, 2011.

* De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 6023.

- 25 LEE, E. S.; LEE, S.-W.; HSU, J.; POTMA, E. O. Vibrationally resonant sum-frequency generation microscopy with a solid immersion lens. **Biomedical Optics Express**, v. 5, n. 7, p. 2125-2134, 2014.
- 26 HAN, Y.; RAGHUNATHAN, V.; FENG, R. R.; MAEKAWA, H.; CHUNG, C. Y.; FENG, Y.; POTMA, E. O.; GE, N. H. Mapping molecular orientation with phase sensitive vibrationally resonant sum-frequency generation microscopy. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n. 20, p. 6149-6156, 2013.
- 27 CIMATU, K.; BALDELLI, S. Spatially resolved surface analysis of an octadecanethiol self-assembled monolayer on mild steel using sum frequency generation imaging microscopy. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 19, p. 7137-7143, 2007.
- 28 FALLAS, M. M.; NEUE, U. D.; HADLEY, M. R.; MCCALLEY, D. V. Further investigations of the effect of pressure on retention in ultra-high-pressure liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 3, p. 276-284, 2010.
- 29 GUILLAUME, Y. C.; GUINCHARD, C. Retention mechanism of weak polar solutes in reversed phase liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 17, p. 2869-2873, 1996.
- 30 HAMMERICH, O.; HENNING, L. **Organic electrochemistry**. 4th ed. London: CRC Press, 2000.
- 31 TANG, Y. B.; TENG, L.; SUN, F.; WANG, X. L.; PENG, L.; CUI, Y. Y.; HU, J. J.; LUAN, X.; HU, L.; CHEN, H. Z. Determination of glycine in biofluid by hydrophilic interaction chromatography coupled with tandem mass spectrometry and its application to the quantification of glycine released by embryonal carcinoma stem cells. **Journal of Chromatography B**, v. 905, p. 61-66, 2012. doi: 10.1016/j.jchromb.2012.08.003
- 32 FENG, S.; ZHAO, Q.; JIANG, J.; HU, P. Determination of phenylephrine in human plasma using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 915, n. 1, p. 28-32, 2013.
- 33 ZHANG, D.; GUTOW, J. H.; EISENTHAL, K. B.; HEINZ, T. F. Sudden structural change at an air/binary liquid interface: sum frequency study of the air/acetonitrile-water interface. **Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 6, p. 5099-5101, 1993.
- 34 KIM, J.; CHOU, K. C.; SOMORJAI, G. A. Structure and dynamics of acetonitrile at the air/liquid interface of binary solutions. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 7, p. 1592-1596, 2003.
- 35 RAO, Y.; TURRO, N. J.; EISENTHAL, K. B. Water structure at air/acetonitrile aqueous solution interfaces. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 32, p. 14384-14389, 2009.
- 36 RIVERA, C. A.; BENDER, J. S.; MANFRED, K.; FOURKAS, J. T. Persistence of acetonitrile bilayers at the interface of acetonitrile/water mixtures with sílica. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 117, n. 46, p. 12060-12066, 2013.

* De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 6023.

- 37 DING, F.; HU, Z.; ZHONG, Q.; MANFRED, K.; GATTASS, R. R.; BRINDZA, M. R.; FOURKAS, J. T.; WALKER, R. A.; WEEKS, J. D. Interfacial organization of acetonitrile: simulation and experiment. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 114, n. 41, p. 17651-17659, 2010.
- 38 HENRY, M. C.; PIAGESSI, E. A.; ZESOTARSKI, J. C.; MESSMER, M. C. Sum-frequency observation of solvent structure at model chromatographic interfaces: acetonitrile–water and methanol–water systems. **Langmuir**, v. 21, n. 14, p. 6521-6526, 2005.
- 39 TAKAMUKU, T.; NOGUCHI, Y.; MATSUGAMI, M. I. H.; OTOMO, T.; NAGAO, M. Heterogeneity of acetonitrile–water mixtures in the temperature range 279–307 K studied by small-angle neutron scattering technique. **Journal of Molecular Liquids**, v. 136, n. 1, p. 147-155, 2007.
- 40 TAKAMUKU, T.; TABATA, M.; YAMAGUCHI, A.; NISHIMOTO, J. K. M.; WAKITA, H.; YAMAGUCHI, T. Liquid structure of acetonitrile–water mixtures by X-ray diffraction and infrared spectroscopy. **Journal of Physical Chemistry B.**, v. 102, n. 44, p. 8880-8888, 1998.
- 41 MOUNTAIN, R. D. Microstructure and hydrogen bonding in water-acetonitrile mixtures. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 19, p. 3923-3929, 2010.
- 42 MOUNTAIN, R. D. Molecular dynamics simulation of water-acetonitrile mixtures in a silica slit. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 117, n. 8, p. 3923–3929, 2013.
- 43 HU, Z.; WEEKS, J. D. Acetonitrile on silica surfaces and at its liquid–vapor interface: structural correlations and collective dynamics. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 114, n. 22, p. 10202-10211, 2010.
- 44 SATOH, Y.; NAKANISHI, K. Theoretical studies of acetonitrile-water mixtures/monte carlo simulation. **Fluid Phase Equilibria**, v. 104, p. 41-45, 1995. doi: 10.1016/0378-3812(94)02638-H.
- 45 GULMEN, T. S.; THOMPSON, W. H. Grand canonical monte carlo simulations of acetonitrile filling of silica pores of varying hydrophilicity/hydrophobicity. **Langmuir**, v. 25, n. 2, p. 1103–1111, 2009.
- 46 CENTER for Aerosol Impacts on Climate and the Environment (CAICE). Disponível em: <<http://caice.ucsd.edu/index.php/interface-techniques/>>. Acesso em: 18 ago. 2014.
- 47 BOYD, R. W. **Nonlinear optics**. 3rd. ed. San Diego: Elsevier, 2008.
- 48 SHEN, Y. R. **The principles of nonlinear optics**. Hoboken, NJ: Wiley, 2002.
- 49 BASS, M.; FRANKEN, P. A.; HILL, A. E.; PETERS, C. W.; WEINREICH, G. Optical mixing. **Physical Review Letters**, v. 8, n. 1, p. 18-19, 1962.

* De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 6023.

- 50 ZHUANG, X.; MIRANDA, P. B.; KIM, D.; SHEN, Y. R. Mapping molecular orientation and conformation at interfaces by surface nonlinear optics. **Physical Review B**, v. 59, n. 19, p. 12632-12640, 1999.
- 51 LIU, S.; FOURKAS, J. T. Orientation time correlation functions for vibrational sum-frequency generation. 1. acetonitrile. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 117, n. 29, p. 5853-5864, 2013.
- 52 FRITZ-HABER - Institut der Max-Planck-gesellschaft, 2014. Disponível em: <<http://www.fhi-berlin.mpg.de/cp/smg/>>. Acesso em: 17 jul. 2014.
- 53 CARL Zeiss microscopy online campus. Disponível em: <<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/spectralimaging/introduction.html>>. Acesso em: 17 jul. 2014.
- 54 FEDER, A. **Optical studies of monolayers**. Cambridge, Massachusetts: Harvard University, 1997. p. 137.
- 55 FORD, T. N.; CHU, K. K.; MERTZ, J. Phase-gradient microscopy in thick tissue with oblique back-illumination. **Nature Methods**, v. 9, n. 1, p. 1195–1197, 2012.
- 56 CALTEX Scientific. Disponível em: <<http://caltexsystems.com/>>. Acesso em: 01 jul. 2014.
- 57 NATURAL resources Canada. Disponível em: <<http://www.nrcan.gc.ca/earth-sciences/>>. Acesso em: 09 jul. 2014.
- 58 ASTROIMAGEJ: imageJ for astronomy, 2014. Disponível em: <<http://www.astro.louisville.edu/software/astroimagej/>>. Acesso em: 10 nov. 2014.
- 59 IMAGEJ: image processing and analysis in java. Disponível em: <<http://imagej.nih.gov/ij/>>. Acesso em: 10 nov. 2014.
- 60 CHEN, T.; CATRYSSSE, P.; GAMAL, A. E.; WANDEL, B. **How small should pixel size be ?** California: Stanford University, 2001. Disponível em: < http://white.stanford.edu/~brian/papers/pdc/pixelSize_SPIE00.pdf >. Acesso em: 12 dez. 2014.
- 61 MICROSCOPYU the source for microscopy education, 2000. Disponível em: <<http://www.microscopyu.com/articles/optics/mtfintro.html>>. Acesso em: 10 nov. 2014.
- 62 SMITH, S. W. Special imaging techniques. In: _____ **The scientist and engineer's guide to digital signal processing**. San Diego, California: California Technical Publishing, 1997. cap. 25, p. 423-450.
- 63 TRIOPTICS. Disponível em: <<http://www.trioptics.com/knowledge-base/mtf-and-image-quality/>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

* De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 6023.

- 64 WIKIPEDIA optical transfer function. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Optical_transfer_function>. Acesso em: 24 jun. 2014.
- 65 WIKIPEDIA depth of field. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Depth_of_field>. Acesso em: 10 nov. 2014.
- 66 HAUSLER, G.; KÖRNER E. Imaging with expanded depth of focus. **Zeiss Information**, v. 29, n. 98, p. 9-13, 1986.
- 67 GOLDSMITH, N. T. Deep focus: a digital image processing technique to produce improved focal depth in light microscopy. **Image Analysis and Stereology**, v. 19, n. 3, p. 163-167, 2000.
- 68 DOF- demystifying the confusion, 2008. Disponível em: <www.rags-int-inc.com/PhotoTechStuff/DoF/>. Acesso em: 2 out. 2014.
- 69 ZILIO, S. C. Cavidades ópticas. In: ZILIO, S. C. **Óptica moderna: fundamentos e aplicações**. São Carlos: COMPACTA, 2009. cap. 11.
- 70 SMITH, W. J. **Modern optical engineering: the design of optical systems**. 3rd. ed. New York: McGraw-Hill, 2000.
- 71 CVI Melles Griot. **Fundamental optics**. Disponível em: <<http://www.astro.caltech.edu/~lah/ay105/pdf/Fundamental-Optics.pdf>>. Acesso em: 16 dez. 2014.
- 72 ANDOR. Disponível em: <www.andor.com>. Acesso em: 10 nov. 2014.
- 73 EDMUND optics. Disponível em: <<http://www.edmundoptics.com/>>. Acesso em: 19 jul. 2014.
- 74 JANOS technology. Disponível em: <<http://www.janostech.com/>>. Acesso em: 19 maio 2014.
- 75 PRÄZISIONS glass & optik. Disponível em: <http://www.pgo-online.com/intl/katalog/curves/optical_glassfilters/BG7.html>. Acesso em: 21 jul. 2014.
- 76 DU, Q.; SUPERFINE, R.; FREYSZ, E.; SHEN, Y. R. Vibrational spectroscopy of water at the vapor/water interface. **Physical Review Letters**, v. 70, n. 23, p. 2313-2316, 1993.
- 77 FAN, Y.; CHEN, X.; YANG, L.; CREMER, P. S.; GAO, Y. Q. On the structure of water at the aqueous/air interface. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, n. 34, p. 11672-11679, 2009.
- 78 FENG, R.; GUO, Y.; LÜ, R.; VELARDE, L.; WANG, H. Consistency in the sum frequency generation intensity and phase vibrational spectra of the air/neat water interface. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 115, n. 23, p. 6015-6027, 2011.

* De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 6023.

79 MIRANDA, P. B.; SHEN, Y. R. Liquid interfaces: a study by sum-frequency vibrational spectroscopy. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 103, n. 17, p. 3292-3307, 1999.

80 TORLABS. Disponível em:

<http://caltexsystems.comwww.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=4338>.

Acesso em: 10 out. 2014.

81 BERTAGNOLLI, H.; ZEIDLER, M. D. Molecular pair-correlation function of liquid acetonitrile from X-ray and neutron-diffraction studies. **Molecular Physics**, v. 35, n. 1, p. 177-192, 1978.

82 HUANG, N.; NORDLUND, D.; HUANG, C.; BERGMANN, U.; WEISS, T. M.; PETTERSSON, L. G. M.; NILSSON, A. X-ray Raman scattering provides evidence for interfacial acetonitrile-water dipole interactions in aqueous solutions. **Journal of Chemical Physics**, v. 125, n. 16, p. 164509, 2011.

83 CHEONG, W. J.; CARR, P. W. J. Surface tension of mixtures of methanol, acetonitrile, tetrahydrofuran, isopropanol, tertiary butanol and dimethyl sulfoxide with water at 25 degree C. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 10, n. 4, p. 561-581, 1987.

84 BIOLOGICAL membranes and the cell surface. Disponível em: <<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lectures/membranes.htm>>. Acesso em: 05 nov. 2014.

85 VOLPATI, D.; AOKI, P. H. B.; ALESSIO, P.; PAVINATTO, F. J.; MIRANDA, P. B.; CONSTANTINO, C. J. L.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Vibrational spectroscopy for probing molecular-level interactions in organic films mimicking biointerfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 207, n. 0, p. 199 - 215, 2014.

86 SUNG, W.; KIM, D.; SHEN, Y. R. Sum-frequency vibrational spectroscopic studies of Langmuir monolayers. **Current Applied Physics**, v. 13, n. 4, p. 619 - 632, 2013.

87 CHUNG, C.; BOIK, J.; POTMA, E. O. Biomolecular imaging with coherent nonlinear vibrational microscopy. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 64, n. 1, p. 77-99, 2013.

88 LAWRENCE, J. C.; SASLOWSKY, D. E.; EDWARDSON, J. M.; HENDERSON, R. M. Real-time analysis of the effects of cholesterol on lipid raft behavior using atomic force microscopy. **Biophysical Journal**, v. 84, n. 3, p. 1827 - 1832, 2003.

89 STEARIC acid. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Stearic_acid>. Acesso em: 17 nov. 2014.

90 BLODGETT, K. B.; LANGMUIR, I. Built-up films of barium stearate and their optical properties. **Physical Review**, v. 51, n. 11, p. 964-982, 1937.

* De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 6023.

- 91 ROSETTI, C. M.; MAGGIO, B.; OLIVEIRA, R. G. The self-organization of lipids and proteins of myelin at the membrane interface. molecular factors underlying the microheterogeneity of domain segregation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - biomembranes**, v. 1778, n. 7-8, p. 1665-1675, 2008.
- 92 MARSH, D. Lateral pressure in membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - reviews on biomembranes**, v. 1286, n. 3, p. 183-223, 1996.
- 93 BROCKMAN, H. Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions?. **Current Opinion in Structural Biology** , v. 9, n. 4, p. 438-443, 1996.
- 94 KAGANER, V. M.; MÖHWALD, H.; DUTTA, P. Structure and phase transitions in Langmuir monolayers. **Reviews of Modern Physics**, v. 71, n. 3, p. 779-819, 1999.
- 95 SUNG, W.; KIM, D.; SHEN, Y. R. Sum-frequency vibrational spectroscopic studies of Langmuir monolayers. **Current Applied Physics** , v. 13, n. 4, p. 619 - 632, 2013.
96. GUYOT-SIONNEST, P.; HUNT, J. H.; SHEN, Y. R. Sum-frequency vibrational spectroscopy of a Langmuir film: study of molecular orientation of a two-dimensional system. **Physical Review Letters**, v. 59, n. 14, p. 1597-1600, 1987.
- 97 WIKIPEDIA pentadecanoic acid. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Pentadecanoic_acid>. Acesso em: 18 nov. 2014.
- 98 NOBRE, T. M.; DE SOUSA E SILVA, H.; FURRIEL, R. P. M.; LEONE, F. A.; MIRANDA, P. B.; ZANIQUELLI, M. E. D. Molecular view of the interaction between Î¹-carrageenan and a phospholipid film and its role in enzyme immobilization. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, n. 21, p. 7491-7497, 2009.
- 99 INTERNATIONAL BUSINESS MACHINES, CORPORATION (IBM-C). J. C. A. CHASTANG.; K. B. KIRTLEY.; A. E. ROSENBLUTH. **Oblique viewing microscope system**. US5673144-A, 30 Sept. 1997.

* De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 6023.