



Universidade Estadual de Maringá

Centro de Ciências Exatas

Departamento de Física

Pós-Graduação em Física

Dissertação de Mestrado

GABRIEL MARINO DE OLIVEIRA

**INSTRUMENTAÇÃO DA TÉCNICA DE
MICROSCOPIA DE LENTE TÉRMICA**

Maringá, 11 de julho de 2025

GABRIEL MARINO DE OLIVEIRA

**INSTRUMENTAÇÃO DA TÉCNICA DE
MICROSCOPIA DE LENTE TÉRMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Física da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Física.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Guilherme Castelli Astrath
Coorientador: Dr. Bruno Anghinoni

Maringá, 11 de julho de 2025

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

O48i

Oliveira, Gabriel Marino de

Instrumentação da técnica de microscopia de lente térmica / Gabriel Marino de Oliveira. -- Maringá, PR, 2025.
xii, 50 f. : il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Guilherme Castelli Astrath.

Coorientador: Prof. Dr. Bruno Anghinoni.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Física, Programa de Pós-Graduação em Física, 2025.

1. Fenômenos fototérmicos. 2. Lente térmica. 3. Microscopia de lente térmica. 4. Microscópio. 5. Imageamento. I. Astrath, Nelson Guilherme Castelli, orient. II. Anghinoni, Bruno, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Exatas. Departamento de Física. Programa de Pós-Graduação em Física. IV. Título.

CDD 23.ed. 535.843

Elaine Cristina Soares Lira - CRB-9/1202

GABRIEL MARINO DE OLIVEIRA

INSTRUMENTAÇÃO DA TÉCNICA DE MICROSCOPIA DE LENTE TÉRMICA

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

Aprovado em: Maringá, 05 de julho de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Nelson Guilherme Castelli Astrath
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Prof. Dr. Otávio Augusto Capeloto
Instituto de Saúde e Biotecnologia de Coari
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Prof. Dr. Luis Carlos Malacarne
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Dedico aos meus pais, Osman (*in memoriam*)
e Vera, que sempre incentivaram e apoiaram
seus filhos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha família por todo o apoio e incentivo. Agradeço especialmente à minha mãe, Vera, e à minha tia, Andréia, por me apoiarem nos momentos desafiadores de 2024.

Quero agradecer aos professores Dr. Nelson G. C. Astrath, Dr. Luis C. Malacarne e Dr. Vitor S. Zanuto pela paciência e pelos ensinamentos. Especialmente ao professor Nelson, que tornou o microscópio possível.

Aos meus amigos Travain, Lucax, Renan, João, Victoria, Piza, Bandeira, Jhonatan, Brenno e Thiago, obrigado pela amizade. Aos meus colegas, Zé Guilherme, Zucas, Brandel, Borowieck, Ian, Nicolas, Sophia, Grazi, Virto, Angelo e Robson, obrigado pelos bons momentos, principalmente nas sessões de RPG, nos almoços no RU e nas pausas para um café.

Quero agradecer também a todas as pessoas que contribuíram para a minha formação, tanto no DFI quanto no PFI, mesmo que eu não possa citar nomes. Agradeço ainda a todos os servidores da UEM que tornam nosso trabalho possível, em especial à Mônica, secretária do PFI.

Por fim, agradeço às agências de fomento CNPq, Capes, Finep e Fundação Araucária.

Teoria é quando você conhece tudo e nada funciona.
Prática é quando tudo funciona, mas ninguém sabe
por quê.
Neste trabalho, teoria e prática são combinadas:
Nada funciona e ninguém sabe por quê.

*I met a traveller from an antique land,
Who said—“Two vast and trunkless legs of stone
Stand in the desert. ... Near them, on the sand,
Half sunk a shattered visage lies, whose frown,
And wrinkled lip, and sneer of cold command,
Tell that its sculptor well those passions read
Which yet survive, stamped on these lifeless things,
The hand that mocked them, and the heart that fed;
And on the pedestal, these words appear:
My name is Ozymandias, King of Kings;
Look on my Works, ye Mighty, and despair!
Nothing beside remains. Round the decay
Of that colossal Wreck, boundless and bare
The lone and level sands stretch far away.”*

Percy Bysshe Shelley, *Ozymandias*.

A lente térmica é uma técnica fototérmica que se baseia na indução de gradientes de índice de refração provocados por variações locais nos parâmetros termodinâmicos de um material. As técnicas fototérmicas são altamente sensíveis, possibilitam a caracterização térmica e óptica de materiais e possuem natureza não destrutiva, fundamentando-se na interação luz-matéria no qual a luz absorvida é convertida em calor, alterando propriedades termodinâmicas locais. Como a geração de calor é proporcional à irradiância — fluxo luminoso por unidade de área —, a minimização da área de incidência intensifica os efeitos fototérmicos. Nesse cenário, a microscopia de lente térmica tem se destacado como uma ferramenta relevante para investigação de propriedades termo-ópticas em escala micrométrica, configurando-se também como uma alternativa promissora às técnicas convencionais de microscopia. Este trabalho apresenta a instrumentação dessa técnica, abordando inicialmente as principais técnicas de microscopia óptica e não óptica, os fundamentos dos fenômenos fototérmicos e um modelo simplificado do efeito de lente térmica. São descritos e analisados resultados obtidos com aplicação da técnica em amostras vítreas e histológicas, comparando-se o desempenho do microscópio desenvolvido com uma montagem convencional. Entre os resultados destacam-se imagens de absorbância geradas a partir da amplitude do sinal capturado por *lock-in*, assim como transientes de lente térmica dos materiais mapeados. Conclui-se que os objetivos de instrumentação foram alcançados, além de apontar possíveis melhorias para a montagem e perspectivas para estudos futuros.

Palavras-chave: Microscópio fototérmico. Microscopia de lente térmica. Mapeamento.

ABSTRACT

Thermal lensing is a photothermal technique based on the induction of refractive index gradients caused by local variations in a material's thermodynamic parameters. Photothermal techniques offer several advantages, including high sensitivity, the ability to characterize materials both thermally and optically, and a non-destructive nature. They rely on light-matter interactions in which absorbed light is converted into heat, inducing changes in the material's thermodynamic properties. Since heat generation is proportional to irradiance — that is, optical power per unit area — it is advantageous to minimize the illuminated area to enhance photothermal effects. In this context, thermal lens microscopy has emerged over the past decades as a powerful tool for investigating the thermo-optical properties of materials at the micrometer scale, representing a promising alternative to conventional microscopy techniques. This study presents the instrumentation of the thermal lens microscopy technique. First, key optical and non-optical microscopy methods are reviewed, followed by the fundamentals of photothermal phenomena and a simplified model of the thermal lens effect. Finally, results from experiments on vitreous and histological samples are reported and discussed, comparing the performance of the developed microscope with that of a conventional setup. Among the results are absorbance images generated from the amplitude of the lock-in signal, as well as transient thermal lens signals obtained from the mapped materials. In conclusion, the instrumentation objectives were achieved, and potential modifications to the experimental setup and future research directions are discussed.

Keywords: Photothermal microscopy. Thermal lens microscope. Scanning.

LISTA DE FIGURAS

1.1	Microscópio de Leeuwenhoek.	7
1.2	Diagrama do caminho percorrido pela luz em diferentes técnicas de microscopia.	9
1.3	Diagrama de como são produzidas imagens através da técnica <i>STORM</i>	11
1.4	Diagrama do aparato dos microscópios eletrônicos de varredura e de transmissão.	13
1.5	Diagrama esquemático de um <i>AFM</i>	15
2.1	Mecanismos pelos quais ocorrem a relaxação de um estado excitado.	17
2.2	Representação da montagem utilizada, por Gordon et al. onde fora observada pela primeira vez o efeito de lente térmica.	19
2.3	Representação do caminho óptico e imagem formada por um feixe gaussiano ao passar por uma aberração cromática.	19
2.4	Representação da montagem experimental utilizada por Shen et al.	20
2.5	Montagem moderna genérica de espectrometria lente térmica.	26
2.6	Disposição espacial dos parâmetros geométricos em um experimento de lente térmica usual.	27
3.1	Representação da montagem de microscopia de lente térmica utilizada.	36
4.1	Transientes de lente térmica em tempos curtos para água ultrapura.	38
4.2	Transientes de lente térmica para água ultrapura em uma montagem convencional.	39
4.3	Mapeamento realizado em vidro CaBAI co-dopado com 2,5% de Európio e 3,0% de Prata.	40
4.4	Transientes de lente térmica para o vidro de CaBAI co-dopado com Európio e Prata em uma montagem convencional.	41
4.5	Fotografia da amostra de tecido hepático bovino utilizado.	42
4.6	Mapeamento realizado em lâmina de microscopia preparada com tecido hepático bovino.	42

4.7	Transientes de lente térmica para o tecido hepático bovino tingido com hematoxilina-eosina em uma montagem convencional.	43
4.8	Ilustração do comportamento dos feixes de excitação e de prova ao atravessarem uma lente.	44

Resumo	vii
Abstract	viii
1 Introdução	5
1.1 Microscopia óptica	7
1.1.1 Técnicas de aprimoramento de contraste	8
1.1.2 Técnicas de aprimoramento de resolução	10
1.2 Microscopia não-óptica	12
2 Fenômenos fototérmicos	16
2.1 Técnicas fototérmicas	17
2.2 Espectroscopia de lente térmica	18
2.2.1 Retrospectiva histórica	18
2.2.2 Modelo quantitativo para a lente térmica	21
2.3 Microscopia de lente térmica	28
3 Materiais e metodologia	35
3.1 Materiais	35
3.2 Metodologia	35
4 Resultados e discussão	38
5 Considerações finais	45
Bibliografia	47

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A microscopia desempenha um papel fundamental no desenvolvimento das ciências naturais. Na área da saúde, a microscopia permitiu compreender aspectos essenciais que sustentam a vida, bem como diagnosticar patologias. Na área de materiais, o entendimento da estrutura e de outros detalhes invisíveis à percepção humana permite desenvolver novos e melhores materiais. Dessa forma, o microscópio, em suas diversas versões, desempenha um papel central em múltiplas áreas do conhecimento [1].

A origem da primeira lente é desconhecida. Indícios arqueológicos podem ser encontrados em fragmentos de vidro polido expostos em museus. No entanto, análises mais detalhadas indicam que tais fragmentos podem ser somente remanescentes de joias. Há também relatos de que o imperador romano Nero utilizava uma esmeralda côncava para observar lutas de gladiadores. No início do século I d.C., Sêneca descreveu o conceito de amplificação óptica, relatando que a observação de letras por meio de um globo de vidro com água resultava na ampliação das mesmas. O acadêmico árabe Hasan Ibn al-Haytham, conhecido no latim como Alhazen, escreveu um trabalho fundamental para a óptica, com descrições de princípios ópticos, da anatomia do olho e da forma como as lentes funcionam. Por esse motivo, é tido como o pai da óptica moderna [1].

No século XIII, em Florença, na Itália, surgiu uma das primeiras aplicações da óptica moderna: a redescoberta da ampliação causada por lentes levou à invenção dos primeiros óculos. Embora haja incerteza quanto à autoria, essa invenção é frequentemente atribuída a um homem chamado Amati. Com a popularização dos óculos fora uma questão de tempo até a descoberta que a combinação de várias lentes produzem uma ampliação maior. No final do século XVI, surgiram os primeiros relatos da invenção do microscópio, atribuída a Hans Jensen ou a seu filho Zacharias. O microscópio seria composto por duas lentes e diafragmas montados em três tubos móveis. Um equívoco comum é a crença de que Galileu teria descoberto o microscópio ao inverter um de seus telescópios, como se bastasse inverter um telescópio para obter um

microscópio [1].

O desenvolvimento de um instrumento capaz de produzir imagens amplificadas se torna essencial ao considerar que a menor distância que o olho humano consegue distinguir — ou seja, sua resolução — é da ordem de $40 \mu m^\dagger$, pois muitos detalhes do mundo natural estão escondidos em escalas para além da capacidade do olho humano. Assim, pode-se definir o microscópio como qualquer instrumento capaz de produzir imagens ampliadas de objetos com dimensões inferiores a $40 \mu m$. Além do conceito de resolução, é importante compreender também os conceitos de contraste — quantificado pela variação nos níveis de cinza da imagem, indicando a capacidade de distinguir objetos — e de nitidez, que expressa a capacidade de diferenciar o objeto do fundo. O termo “microscópio” foi cunhado por membros da *Accademia dei Lincei*, em 1624, a partir dos termos gregos *mikrós* (“pequeno”) e *skopéō* (“ver”) [1].

No século XVII, Robert Hooke produziu um dos primeiros trabalhos fundamentais em microscopia, intitulado *Micrographia*, no qual descreveu diversas espécies microscópicas e cunhou o termo “célula” para designar a unidade fundamental da vida. Também no século XVII, Antonie van Leeuwenhoek realizou observações pioneiras de micro-organismos como bactérias, eritrócitos e espermatozoides. Seus microscópios, simples em construção, utilizavam somente uma lente e podiam atingir ampliações de até 300 vezes, com resolução de $1,4 \mu m$ [1, 3]

Nas seções seguintes, são abordadas distintas técnicas de microscopia, desde abordagens elementares até métodos avançados, com ênfase em suas aplicações em diferentes contextos científicos. O segundo capítulo trata dos fundamentos dos fenômenos fototérmicos, com destaque para a técnica de lente térmica. No terceiro capítulo, apresenta-se a metodologia experimental empregada, incluindo a montagem instrumental, as amostras analisadas e os parâmetros de aquisição de dados. Por fim, o trabalho é concluído com a apresentação e discussão dos resultados obtidos, bem como com a proposição de possíveis aprimoramentos e aplicações futuras.

Neste estudo, buscou-se reproduzir, com base na literatura especializada, a técnica de microscopia de lente térmica, visando à sua implementação em laboratório e à aplicação em diferentes materiais. A montagem experimental foi construída com equipamentos típicos de um laboratório de fotônica, tais como fontes laser contínuas, modulação mecânica e detecção síncrona. Embora o sistema não tenha sido concebido com ênfase em miniaturização, sua compactação é explorada na literatura e constitui um tema relevante para investigações futuras. A técnica foi empregada na análise de amostras vítreas co-dopadas com európio e prata, bem como de tecidos histológicos fixados e corados. A partir do microscópio de lente térmica, foram obtidos mapeamentos resultantes em imagens nas quais cada ponto está associado à difusividade térmica local do material. Para a amostra de água ultrapura, os transientes obtidos com o microscópio de lente térmica foram comparados com aqueles de uma configuração fototérmica convencional. Nas demais amostras, os transientes foram registrados com o propósito de demonstrar a presença do efeito fototérmico e apoiar a interpretação dos mapeamentos. Os resultados evidenciam a re-

[†]A resolução do olho humano depende fortemente com a saúde da visão de cada indivíduo, fatores até mesmo como a idade podem fazer com a resolução seja degradada [2].

produtibilidade e a sensibilidade do arranjo implementado para mapeamentos micrométricos termo-ópticos.

1.1 Microscopia óptica

Na sua forma mais básica, a microscopia pode ser realizada em um microscópio simples ou composto[†], e se observa a imagem gerada pela luz transmitida (diascópico) através do ou refletida (episcópico) pelo espécime. Enquanto microscópios simples possuem apenas a ampliação gerada por sua única lente, os microscópios compostos possuem uma ampliação igual ao produto das ampliações de cada lente que o compõem. Microscópios compostos possuem ao menos duas lentes, sendo elas denominadas objetiva e ocular. A primeira é responsável por coletar a luz difratada[‡] pelo espécime e a segunda por focar a luz no interior do olho [4]. Embora os microscópios compostos apresentem maior capacidade de amplificação, por um período, houve cautela em relação à sua utilização, em virtude das aberrações luminosas, que eram exacerbadas pela adição de lentes [1]. Figura 1.1, o microscópio de Leeuwenhoek é um exemplo de microscópio simples.

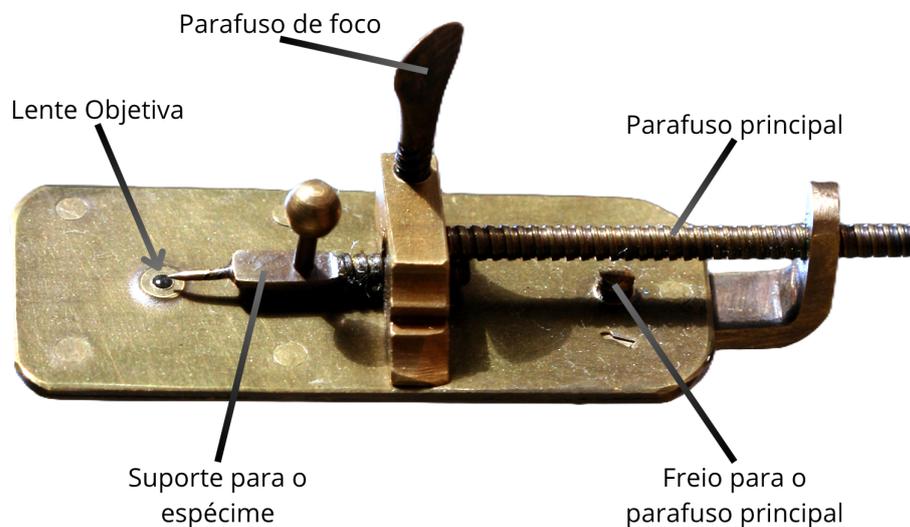


Figura 1.1: Microscópio de Leeuwenhoek, é um tipo de microscópio simples, pois é composto de apenas uma lente esférica posicionada entre duas chapas metálicas. Acredita-se que Leeuwenhoek tenha construído mais de 500 microscópios como este, sendo cada um para um único espécime [1]. Adaptado de Commons [5].

[†] Sendo o termo simples usado para designar microscópios de lente única e composto para designar microscópios que utilizam mais de uma lente.

[‡] Nesse contexto, luz difratada se refere à luz que, ao passar por um meio semi-transparente, como as estruturas dentro de uma célula, sofre alterações em sua direção e propriedades devido à refração e à difração.

1.1.1 Técnicas de aprimoramento de contraste

Embora o microscópio composto possua apenas duas partes fundamentais, a saber, a lente objetiva e a ocular, os componentes críticos para a formação da imagem são a objetiva e o condensador. O condensador consiste em um conjunto de lentes cuja função é focar a luz proveniente da fonte de luz no espécime. Os microscópios podem apresentar-se em duas configurações: direta ou invertida. Na primeira, o corpo do microscópio, ao qual as lentes são fixadas, possui uma plataforma (platina) que permite o deslocamento para o ajuste da posição e do plano focal da imagem do espécime. No microscópio invertido, a platina é fixada e as lentes são as responsáveis pelo movimento necessário para o posicionamento da imagem. Microscópios desse tipo têm ganhado popularidade devido a dois fatores: a facilidade de acesso à amostra após o posicionamento e a estabilidade, pois são menos sensíveis a vibrações [4].

A microscopia de campo claro (figura 1.2) constitui o método mais elementar de microscopia, cujo mecanismo é encontrado em outras técnicas. Ela consiste na observação da imagem formada pelos raios de luz transmitidos, tanto difratados quanto não difratados pelo espécime. Em geral, a luz não difratada também compõe a imagem gerada e é mais intensa que a luz difratada. Normalmente as imagens produzidas por esse método apresentam pouco contraste e possuem clarões, como uma fotografia que foi superexposta. Dessa forma, desenvolvem-se técnicas para aumentar o contraste, como a microscopia de campo escuro (figura 1.2), em que os raios de luz não difratados são rejeitados. O campo escuro é obtido bloqueando-se a parte central do feixe de luz da fonte luminosa, o que pode ser feito tanto com o uso de condensadores apropriados quanto pela iluminação do espécime em ângulos oblíquos. Essa técnica é bastante sensível e costuma ser empregada na observação de espécimes extremamente pequenos, que causam difração significativa. Isso ocorre porque, quando o tamanho do espécime é da mesma ordem de grandeza do comprimento de onda da luz, a difração se torna mais intensa, resultando em borrões na imagem observada [4].

Existem dois tipos básicos de objetos comuns presentes na microscopia. O primeiro é denominado objeto de amplitude, onde se observa a variação da amplitude luminosa devido à diminuição da transmissão de certos comprimentos de onda. O segundo, denominado objeto de fase, não é percebido diretamente pelo olho humano, e é gerado devido à difração da luz, que introduz uma diferença de fase entre os raios difratados e não difratados. Outra técnica que surge para o aumento do contraste das imagens formadas é a de contraste de fase (figura 1.2), em que se transforma objetos de fase em objetos de amplitude. Outra técnica capaz de transformar objetos de fase em objetos de amplitude é a de contraste interferencial. Nesse método, um feixe de luz é direcionado a um prisma de Wollaston, onde é separado em duas componentes. Se houver uma diferença entre os caminhos ópticos que cada uma das componentes percorre, ao ser recombinado, o feixe gera um contraste devido à diferença de fase entre as componentes. [4].

Dentre as técnicas empregadas para a melhoria do contraste da imagem, destacam-se a microscopia de polarização e a de fluorescência. É importante ressaltar que tais técnicas possibi-

litam a extração de informações adicionais, que vão além das contidas nas imagens produzidas. A microscopia de polarização é viável devido à interação da luz polarizada com determinadas ligações em moléculas ordenadas. Para a realização desse método de microscopia, é necessário adicionar a um microscópio composto um polarizador entre a fonte de luz e o espécime, bem como um analisador. A metodologia empregada na técnica envolve a polarização do analisador em uma posição perpendicular à polarização do polarizador da fonte, resultando na extinção completa da luz emitida pela fonte. Em seguida, utilizando-se rotações do espécime, as propriedades da mesma são analisadas [4]. Das aplicações da microscopia de polarização decorre o estudo da dinâmica de estruturas celulares [4], como também a determinação de propriedades de materiais cristalinos e não-cristalinos, tais quais: índice de refração, temperatura de transição de fase e ponto de fusão [1].

A microscopia de fluorescência (figura 1.2), por sua vez, utiliza da luz emitida por fluoróforos presentes, derivados ou introduzidos no espécime. Essa metodologia consiste em usar uma fonte de excitação na região de absorção do fluoróforo, utilizar filtros para que a luz da fonte não componha a imagem formada e, por fim, então observar a luz emitida pelos fluoróforos. A microscopia de fluorescência é amplamente utilizada em pesquisas biomédicas, especialmente devido à sua alta especificidade. Suas principais aplicações compõem: imunofluorescência, identificação e análise de dinâmica de antígenos, distribuição e densidade de substâncias intracelulares (como metabólitos e íons) e dinâmica de proteínas [4]. É importante observar que, diferentemente das outras técnicas apresentadas até agora, a microscopia de fluorescência não pode ser vista diretamente a olho nu. Torna-se imperativo o emprego de dispositivos especializados, tais como detectores CCD[†], para a obtenção da imagem do espécime.

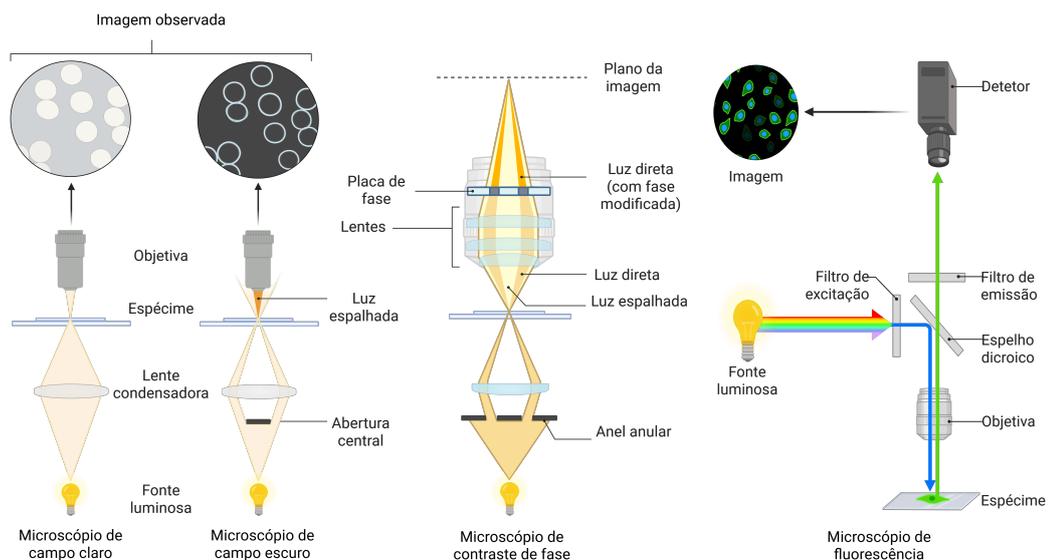


Figura 1.2: Diagrama do caminho percorrido pela luz em diferentes técnicas de microscopia. Criado com **Biorender**.

[†]Da língua inglesa, *Charge-coupled device*.

As técnicas apresentadas até o momento são denominadas como de campo amplo, ou seja, todo (ou quase todo) o espécime é iluminado simultaneamente. Em técnicas de microscopia de campo amplo é difícil aproveitar-se a capacidade máxima de contraste da técnica. Além da ocorrência de artefatos na imagem formada, tais problemas decorrem da participação da luz proveniente de fora do plano focal na formação da imagem. É possível contornar esses problemas adotando-se uma fonte de iluminação aproximadamente pontual, como *laser*[†], e posicionando um orifício, como um *pinhole*, conjugado com o plano focal (isto é, no plano da imagem) para obstruir a luz proveniente de fora do plano focal. Como a luz oriunda de fora do plano focal forma discos difusos no plano da imagem, o orifício fará com que a maior porção dessa luz não contribua na formação da imagem. Esses são os princípios por trás da microscopia confocal, que é mais comumente aplicada justamente com a microscopia de fluorescência, sendo a imagem neste caso obtida por varredura em tandem[‡]. Adicionalmente, algoritmos de deconvolução podem ser utilizados para aprimorar ainda mais o contraste e a nitidez da imagem obtida [4].

Além dos problemas tratados pela microscopia confocal, outros fenômenos, como o espalhamento de Mie, são os principais limitadores das técnicas baseadas em fluorescência. O espalhamento de Mie[§], por sua vez, pode ocorrer tanto na luz de excitação, causando a excitação de apenas uma fração dos fluoróforos, quanto na luz emitida, resultando em aberrações luminosas na imagem obtida. A aplicação de uma fonte de excitação pulsada no infravermelho próximo permite contornar, ainda que parcialmente, o problema em questão, por meio da geração do efeito de absorção de dois fótons. O infravermelho próximo é ideal, pois os tecidos biológicos permanecem transparentes e o espalhamento Mie deixa de ocorrer. Dessa forma, aprimora-se tanto o contraste como a resolução da imagem gerada, onde distâncias da ordem de sub-mícron podem ser resolvidas. Apesar de a absorção de dois fótons ser um efeito não linear bem localizado, ainda assim um número maior de fluoróforos excitados é produzido, como também um efeito semelhante ao utilizado na microscopia confocal é proporcionado. Além disso, a taxa de degradação do espécime é diminuída [4].

1.1.2 Técnicas de aprimoramento de resolução

Todas as técnicas apresentadas na seção anterior servem para aprimorar-se a qualidade da imagem obtida do espécime. Elas possuem resolução na ordem da dezena de microns – com exceção da microscopia de fluorescência por excitação de dois fótons, que atinge resoluções da ordem de sub-mícron. Teoricamente, a resolução lateral (no plano do espécime) de um micros-

[†]Da língua inglesa, *Light amplification by stimulated emission of radiation*.

[‡]Varredura em tandem se refere ao fato de haver duas ou mais partes trabalhando em conjunto, podendo ser de forma paralela ou sequencial, de forma que se faça uma varredura em duas dimensões.

[§]O espalhamento de Mie, é a descrição do espalhamento de uma onda eletromagnética plana por uma esfera homogênea, sendo também válida para descrição do espalhamento causado por um cilindro infinito.

cópia é limitada pela equação de Abbe (ou limite de difração) [6]:

$$d = \frac{\lambda}{2 \text{ N.A.}}, \quad (1.1)$$

em que d é a menor distância possível de ser resolvida utilizando-se uma lente com abertura numérica N.A. quando ilumina-se o espécime por uma luz de comprimento de onda λ . A resolução axial, que se dá na direção perpendicular ao espécime, é mais de duas vezes inferior. Isso significa que, se um sistema apresenta resolução lateral de 200 nm, sua resolução axial não excede 400 nm.

Além disso, é possível obter resoluções inferiores ao limite de difração. Ao empregar a microscopia de fluorescência, cada fluoróforo dentro do volume excitado emitirá luz de forma simultânea. Portanto, a imagem formada a partir do volume excitado é um borrão de luz, sendo esse borrão a convolução da luz de cada fluoróforo, que se apresenta como um disco de Airy. Técnicas como a microscopia de localização fotoativada (PALM[†]) e a microscopia de reconstrução óptica estocástica (STORM[‡], figura 1.3) empregam algoritmos para reconstruir uma imagem com base na posição central dos discos de Airy de cada fluoróforo, alcançando resoluções de dezenas de nanômetros. O PALM/STORM baseia-se nos fenômenos de transições de fluorescência óptica saturável reversível (RESOLFT[§]), que consistem na troca do estado de fluorescência do fluoróforo pela luz. Dessa forma, é possível escolher qual fluoróforo irá fluorescer ao iluminar a região que será imageada antes de empregar-se a luz de excitação [4].

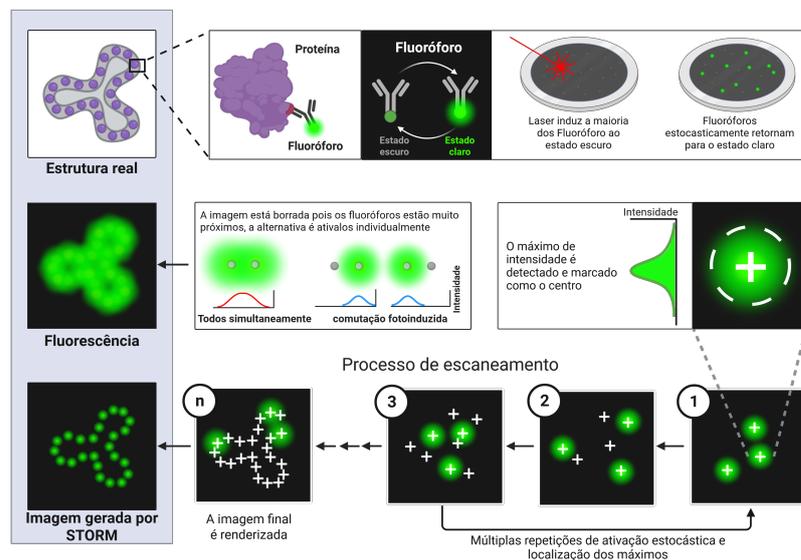


Figura 1.3: Diagrama de como são produzidas imagens através da técnica *STORM*. Criado com [Biorender](#).

Outra técnica de super-resolução utilizada em conjunto com as técnicas de microscopia de

[†]Da língua inglesa, *Photoactivated localization microscopy*.

[‡]Da língua inglesa, *Stochastic optical reconstruction microscopy*.

[§]Da língua inglesa, *Reversible saturable optical fluorescence transitions*.

campo amplo é a de iluminação estruturada (SIM[†]). Nela, uma iluminação altamente estruturada é empregada para codificar informações, fazendo com que detalhes que anteriormente não eram perceptíveis em razão do limite de difração sejam agora convoluídos com um padrão sobreposto da iluminação – como os padrões de Moiré observados devido à sobreposição de dois padrões. Por meio de algoritmos computacionais, é possível realizar-se a deconvolução dos detalhes e reconstruir uma imagem real com detalhes que estão além do limite de difração [4].

A técnica de esgotamento de emissão estimulada (STED[‡]), consiste em iluminar fluoróforos por pulsos de dois feixes de *lasers* temporalmente separados e muito próximos. O primeiro feixe, no modo TEM₀₀[§], serve para excitar os fluoróforos, enquanto o segundo, no modo TEM_{01*}, tem a função de esgotar, ou seja, impedir que os fluoróforos fora da região central de excitação de luminescer. No modo TEM_{01*}, o feixe apresenta uma distribuição espacial no plano de propagação em formato anelar ou de *donut*. Os fluoróforos iluminados por esse segundo feixe transitam para um estado no qual deixam de fluorescer, passando apenas por meios de relaxamento não-radiativos [7]. Dessa forma, um disco de Airy de menor magnitude é formado, uma vez que apenas os fluoróforos que não foram depletados irão luminescer. É importante notar que todas as técnicas de aprimoramento de resolução apresentadas dependem de uma varredura ao longo do espécime. No entanto, a técnica STED não requer processamento adicional dos dados adquiridos para gerar uma imagem [4].

1.2 Microscopia não-óptica

Técnicas alternativas de microscopia não óptica (ou seja, que utilizam fenômenos distintos da interação luz-matéria para produzir imagens) foram desenvolvidas como uma alternativa às técnicas de microscopia óptica, visando a obter resoluções superiores.

O primeiro método de microscopia não-óptica desenvolvido foi o microscópio eletrônico de transmissão (TEM[¶], figura 1.4), que consiste na utilização de um feixe de elétrons para produzir uma imagem. Dada a natureza subatômica do elétron, de tamanho inferior ao de um átomo, é viável alcançar resoluções dessa magnitude. Tal resolução apresenta uma melhoria de mais de 2.000 vezes em relação ao melhor microscópio óptico limitado por difração. A viabilidade da TEM somente foi alcançada em virtude dos avanços tecnológicos no campo da óptica eletrônica. Tal campo é caracterizado pela existência de instrumentos capazes de atuar sob um feixe de elétrons, assim como lentes e espelhos atuam sob um feixe luminoso [1].

A imagem obtida por meio de um microscópio eletrônico pode ser formada a partir de uma das muitas interações que o elétron acelerado apresenta com a matéria, cada uma dessas interações disponibilizando um conjunto diferente de informações. Quando um elétron em movimento

[†]Da língua inglesa, *Structured illumination microscopy*.

[‡]Da língua inglesa, *Stimulated emission depletion*.

[§]Da língua inglesa, *Transverse electromagnetic*.

[¶]Da língua inglesa, *Transmission electron microscope*.

acelerado atinge a matéria, ele pode ser retroespalhado, espalhado elástica ou inelasticamente, ou ainda fazer com que o material emita luz visível, raios X ou elétrons. No caso do TEM, os elétrons transmitidos são os principais participantes na formação da imagem [1]. A técnica de TEM pode ser considerada de campo amplo. Para a sua realização, faz-se necessário produzir amostras finas. Como alternativa, pode-se utilizar a técnica de microscopia eletrônica de varredura (SEM[†], figura 1.4), na qual um feixe mais focado é usado para fazer uma varredura da superfície de amostras mais volumosas, produzindo imagens a partir dos elétrons espalhados [8].

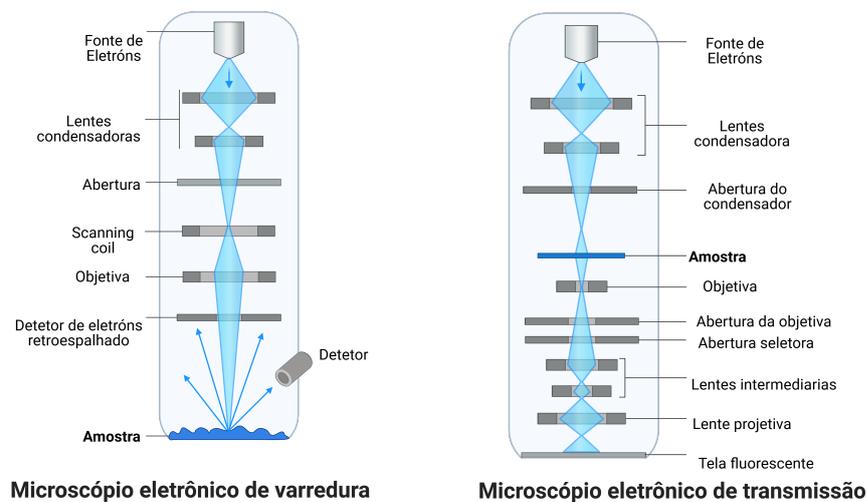


Figura 1.4: Diagrama do aparato dos microscópios eletrônicos de varredura e de transmissão. Criado com [Bio-render](#).

Tais técnicas fundamentadas em espalhamento de elétrons podem alcançar resoluções laterais sub-nanométricas e axiais entre unidades e dezenas de nanômetros. No entanto, tais metodologias podem apresentar alguns desafios. A geração de elétrons acelerados demanda a utilização de um canhão de elétrons, que geralmente consiste em um filamento de tungstênio aquecido a 2700 K. A vida útil do filamento é de cerca de 100 horas. Além disso, é necessária a criação de um alto vácuo – em caso contrário, os elétrons seriam espalhados por todos os átomos em seu caminho e, adicionalmente, o funcionamento do filamento de tungstênio seria limitado. Ademais, as amostras biológicas devem ser preparadas em uma lâmina metálica, de modo a facilitar a dissipação do calor gerado [1, 8]. Dentre as aplicações contemporâneas mais notáveis, destaca-se o emprego de controle de qualidade de microchips produzidos por fotolitografia, nos quais os componentes estruturais do chip apresentam dimensões inferiores a centenas de nanômetros [1].

Outro conjunto de técnicas desenvolvidas é composto por aquelas baseadas em varredura por sonda, fundamentadas na técnica de microscopia de emissão de campo (FEM[‡]), técnica de-

[†]Da língua inglesa, *Scanning electron microscope*.

[‡]Da língua inglesa, *Field-emission microscopy*.

desenvolvida por Irwin Müller em 1937. A FEM apresentava o potencial de alcançar ampliações superiores a um milhão de vezes. Contudo, sua aplicação se restringia ao uso com materiais que pudessem ser moldados em formato de uma ponta afiada e que pudessem tolerar altos campos eletrostáticos. Portanto, metais refratários com altas temperaturas de fusão, como o tungstênio, são empregados. A técnica em questão envolvia a montagem de uma ponta afiada de tamanho microscópico em um tubo de raios catódicos. Em seguida, a aplicação de um alto campo elétrico provocava a ejeção dos elétrons para uma tela, na qual a imagem era formada. Posteriormente, Müller desenvolveu a técnica de microscopia de campo de íon (FIM[†]), muito similar à FEM. Entretanto, em vez de elétrons do material da ponta afiada serem ejetados, eram íons dos átomos do gás que eram formados devido ao campo elétrico presente na ponta. A FIM alcança ampliações de até dez milhões de vezes, onde o gás utilizado consistia em uma atmosfera de $1 \cdot 10^{-4} \text{ Torr}^{\ddagger}$ de Hélio [1].

O Topografiner, equipamento baseado no princípio do FEM e criado por um dos alunos de Müller, Russel D. Young, foi um marco importante para o desenvolvimento do *scanning tunneling microscope* (STM[§]), o primeiro microscópio de varredura por sonda. Em contraste com o FEM, o Topografiner produzia uma imagem ao medir a corrente do elétron emitido da ponta afiada para o material a ser analisado. Já o método de imageamento, utilizado pelo STM, é fundamentado no princípio quântico de tunelamento. Nesse método, uma ponta de prova é posicionada a alguns décimos de nanômetro de distância do material a ser imageado. Dessa forma, a eletrosfera dos átomos da ponta de prova e a eletrosfera dos átomos da superfície da amostra são superpostas. Portanto, com a aplicação de um potencial elétrico, os elétrons da superfície do material podem tunelar para a ponta de prova, ocasionando uma corrente. Dada a forte dependência da corrente de tunelamento causada pelos elétrons com a distância entre a ponta de prova e a superfície do material, é possível formar uma imagem da superfície ao se registrar a corrente em cada ponto da superfície da amostra. O STM alcança resolução axial da ordem de décimos de nanômetros [1].

Em virtude do STM, diversas outras técnicas de microscopia foram desenvolvidas. Dentre elas, destacamos o microscópio de força atômica (AFM[¶], figura 1.5), que foi o primeiro a ser desenvolvido. Em virtude da metodologia empregada pelo STM, somente materiais condutores elétricos eram passíveis de análise. O AFM opera de maneira análoga ao STM, com a diferença de que, em vez de medir uma corrente, a extremidade afiada é posicionada na extremidade livre de um cantiléver longo e de baixa rigidez. A aplicação de uma força constante na extremidade do equipamento é essencial para garantir a ação constante sobre o material, por meio de uma pequena deflexão constante na cantiléver. A magnitude da força em questão está na ordem da força interatômica em sólidos, daí o nome “força atômica”. O movimento da extremidade é monitorado por uma alavanca óptica, isto é, um feixe de *laser* é refletido na parte traseira da

[†]Da língua inglesa, *Field ion microscopy*.

[‡]Equivalente a $1.333 \cdot 10^{-2} \text{ Pa}$.

[§]Da língua inglesa, *Scanning tunneling microscope*.

[¶]Da língua inglesa, *Atomic force microscope*.

extremidade livre da cantiléver para um detector fotodiodo. Embora o TEM consiga resolver distâncias menores, o STM e o AFM apresentam vantagens significativas por não demandarem operação em alto vácuo. Além disso, o AFM pode operar em meios líquidos, possibilitando a realização de imageamento de amostras *ex vivo* em fluidos biológicos. Ao empregar a mesma configuração de um AFM, porém com a modificação da força a ser medida, é possível obter as demais técnicas derivadas do STM. A partir dessa consideração, medindo forças como: de van der Waals, de fricção, elétricas, magnéticas, eletroquímicas, entre muitas outras propriedades físico-químicas (como a capacitância e a distribuição superficial de temperatura), se obtém as diversas formas diferentes de microscopia [1].

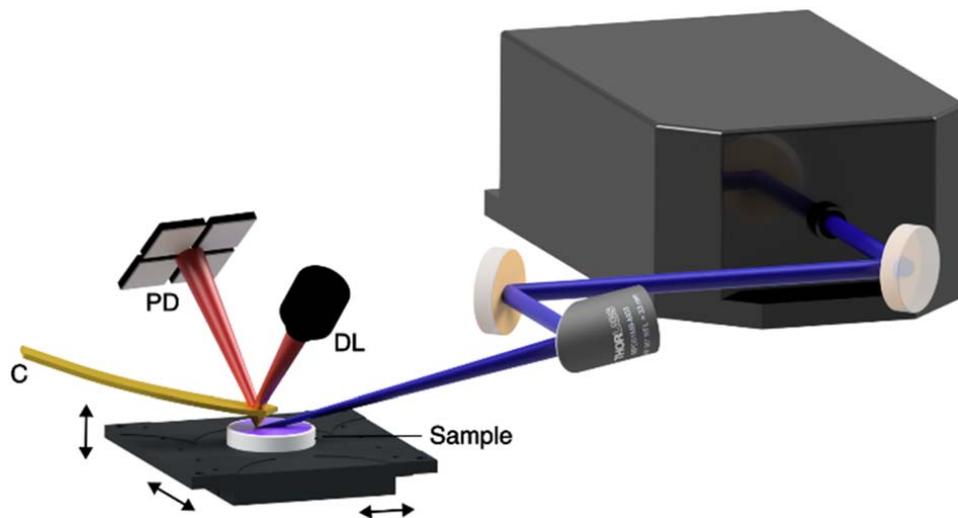


Figura 1.5: Diagrama esquemático de um *AFM*. Sendo o feixe azul é um feixe de excitação proveniente de um *laser* de cascata quântica de cavidade externa pulsado e sintonizável. Em que *Sample* é a amostra, *C* é a cantiléver, *DL* é o feixe de *laser* defletido pela cantiléver e *PD* é um fotodiodo com quatro quadrantes que registra a deflexão do feixe causada pela cantiléver. Adaptado de Yilmaz et al. [9].

Além das técnicas de microscopia não óptica previamente apresentadas, há também as microscopias de raio X, de nêutrons e fototérmica. A microscopia fototérmica, por sua vez, engloba um conjunto extenso de técnicas que empregam fenômenos fototérmicos para a produção de imagens microscópicas. Nesta dissertação, será apresentada uma instrumentação para microscopia de lente térmica. A apresentação dos conceitos básicos sobre lente térmica, bem como dos avanços já obtidos na técnica, será realizada. Além disso, será apresentada e discutida uma montagem básica, assim como alguns resultados obtidos.

CAPÍTULO 2

FENÔMENOS FOTOTÉRMICOS

A interação entre a luz e a matéria desencadeia uma ampla gama de fenômenos físicos, muitos dos quais são fundamentais para a compreensão do mundo natural e para o desenvolvimento tecnológico em diversas áreas do conhecimento. O avanço no entendimento dos fenômenos físicos e o desenvolvimento de novas tecnologias apresentam uma relação mútua e indissociável, em que cada um impulsiona o progresso do outro. Dentre esses efeitos, os fenômenos fototérmicos ocupam papel central, por envolverem a conversão direta da energia luminosa em energia térmica a partir da absorção da radiação eletromagnética por um meio material. Essa conversão gera variações locais de temperatura que, por sua vez, induzem alterações nas propriedades físicas e termodinâmicas do sistema, tais como expansão térmica, mudança de índice de refração, ou geração de ondas acústicas [10, 11].

Embora o entendimento teórico e experimental dos fenômenos fototérmicos seja relativamente recente, sua percepção empírica remonta à antiguidade. A sensação de aquecimento da pele sob exposição solar é uma experiência cotidiana que ilustra de maneira simples a manifestação desses efeitos. De forma mais elaborada, relatos históricos atribuem a Arquimedes o uso de espelhos para concentrar a luz solar e incendiar embarcações inimigas durante o cerco de Siracusa — uma narrativa lendária, mas que ilustra o potencial prático desses fenômenos e antecipa conceitos explorados hoje em tecnologias como fornos solares [12].

No contexto científico, o marco inicial da investigação sistemática dos efeitos fototérmicos remonta ao trabalho de Alexander Graham Bell, que, ao desenvolver o fofone, observou a produção de som induzida por variações térmicas geradas pela luz incidente [13]. Posteriormente, o uso analítico dos fenômenos fototérmicos iniciou com os experimentos de Viengerov, que os aplicou para determinar concentrações em misturas gasosas [14]. Desde então, o estudo e a aplicação desses efeitos têm evoluído consideravelmente, desempenhando papel crucial em técnicas de espectroscopia, sensoriamento não destrutivo e caracterização de materiais.

2.1 Técnicas fototérmicas

As técnicas fototérmicas baseiam-se nos chamados fenômenos fototérmicos. Elas correspondem a um conjunto de métodos espectroscópicos de alta sensibilidade, utilizadas no estudo de propriedades ópticas e termodinâmicas dos materiais. Tais métodos são fundamentados na mudança foto induzida do estado térmico do material, isto é, uma mudança nos parâmetros termodinâmicos do material, que, por sua vez, induzem uma mudança nas propriedades ópticas do material [10].

Uma mudança foto-induzida no estado do material ocorre quando há a interação luz-matéria. Em particular, para os métodos fototérmicos, o principal mecanismo de interação entre luz-matéria é o de absorção da radiação eletromagnética pelas espécies opticamente ativas no material, induzindo a ocupação dos estados excitados do material. Na figura 2.1 são ilustrados os caminhos pelos quais a interação óptica leva à mudança dos parâmetros termodinâmicos de um material, sendo o principal caminho indicado pela flecha contínua e as contribuições secundárias indicadas pelas flechas pontilhadas [10, 15].

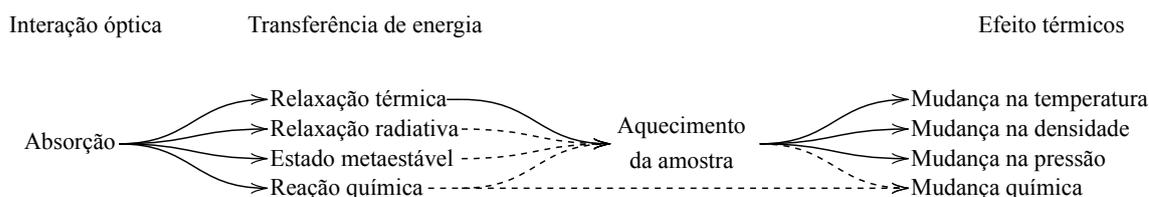


Figura 2.1: Mecanismos pelos quais ocorrem a relaxação de um estado excitado. No caso dos fenômenos fototérmicos o principal mecanismo é a relaxação térmica. Contribuições secundárias podem ocorrer devido aos mecanismos indicados pelas setas pontilhadas. Fonte: Adaptado de Bialkowski et al. [10].

É importante notar que esses mecanismos ditam como o calor é produzido. Por exemplo, como relatado por Pedreira et al. [16], a fotodegradação do composto estudado leva a uma redução na geração de calor. Todos esses processos de desexcitação podem produzir excesso de energia na forma de calor, induzindo um aumento na energia interna, que por sua vez induz a mudança nos parâmetros termodinâmicos. Em particular, se a mudança de temperatura ocorre em um tempo menor do que o tempo necessário para o material sofrer uma deformação, leva a energia será dissipada na forma de ondas de pressão [10].

Os métodos fototérmicos são de grande interesse já que oferecem diversos fatores de amplificação [17]. O chamado fator de amplificação é a razão entre o sinal da espectroscopia fototérmica e a espectroscopia convencional. Ele está relacionado aos parâmetros ópticos e térmicos do material, como também aos parâmetros geométricos da montagem experimental e propriedades da fonte de luz. Como os parâmetros geométricos e as propriedades da fonte de luz são altamente variáveis, é possível obter-se uma amplificação tão grande quanto seja desejado [10].

Além disso, a disponibilidade de *lasers* para uso como fonte luminosa tem uma grande si-

nergia com o fator de amplificação e o caráter indireto das técnicas, o que as torna ainda mais atraentes. Acerca das aplicações, encontram-se na literatura relatos de medições de velocidades acústicas, coeficientes de difusão térmica [18, 19], temperatura, taxa de fluxo de massa [20], coeficientes de expansão volumétrica [21], além de outras aplicações [22–24].

Após a absorção óptica acontecer e os estados excitados do material encontrarem-se populados, o material tenderá a voltar ao estado fundamental através dos mecanismos de relaxamento (figura 2.1). Todos os mecanismos de desexcitação irão contribuir para o aumento da energia interna do material. A energia interna então se dissipa na forma de calor, o que leva ao aumento da temperatura e, conseqüentemente, à variação dos parâmetros termodinâmicos, como pressão e densidade. A variação dos parâmetros termodinâmicos faz então com que os parâmetros ópticos do material também mudem, e a espectroscopia fototérmica mede justamente essa variação dos parâmetros ópticos [10].

É importante notar que as técnicas fototérmicas podem medir diretamente a variação dos parâmetros termodinâmicos. No entanto, quando se trata especificamente da espectroscopia fototérmica, refere-se às técnicas que medem a mudança dos parâmetros ópticos. É exatamente este fator que configura o caráter indireto destes métodos, pois dos fenômenos fototérmicos decorrem ainda métodos como a espectroscopia fotoacústica [10].

No geral, os principais componentes para realizar um experimento de espectroscopia fototérmica são: (i) fonte luminosa de excitação; (ii) fonte luminosa de prova; (iii) amostra; (iv) equipamento de processamento de sinal; (v) e elementos ópticos entre outros aparatos para modificar o ambiente do experimento [10].

Dentre a espectroscopia fototérmica, as técnicas mais conhecidas e mais estudadas são: (i) Lente fototérmica, ou simplesmente lente térmica; (ii) Interferometria fototérmica; (iii) Deflexão fototérmica; (iv) Difração fototérmica; (v) Refração fototérmica; (vi) Espelho fototérmico; (vii) Radiometria fototérmica [10].

Para este trabalho, as técnicas de espectroscopia e microscopia de lente térmica são as mais relevantes e serão discutidas de forma mais abrangente na próxima seção.

2.2 Espectroscopia de lente térmica

2.2.1 Retrospectiva histórica

Em 1965, Gordon et al. reportaram pela primeira vez o efeito de lente térmica enquanto era feito o estudo do espectro Raman de líquidos polares e não-polares no interior de uma cavidade de *laser* He-Ne. A montagem utilizada é representada na figura 2.2 [25].

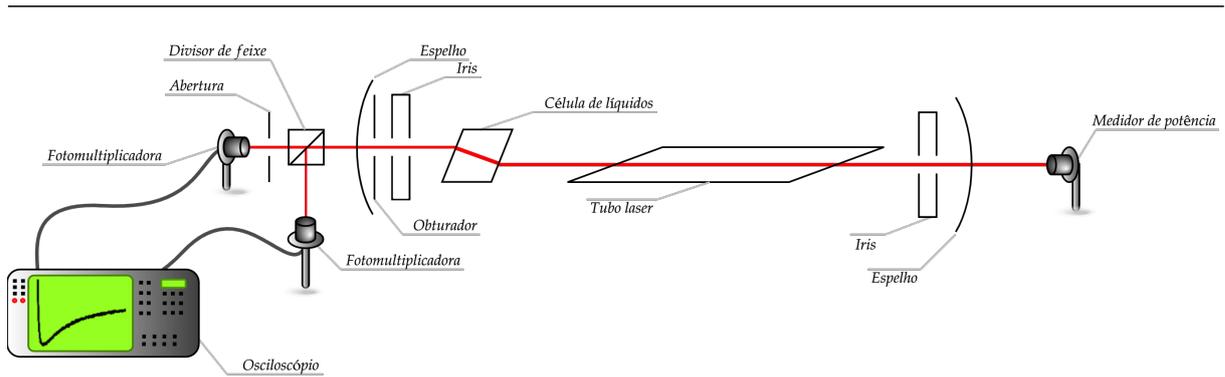


Figura 2.2: Representação da montagem utilizada, por Gordon et al. onde fora observada pela primeira vez o efeito de lente térmica. Fonte: Adaptado de Gordon et al. [25].

Gordon et al. sugeriram inicialmente um modelo em que se considera a formação de uma lente delgada[†]. A distribuição de temperatura é assumida ter atingido seu estado estacionário, aproximada por uma distribuição parabólica. Assim, Gordon et al. apresentaram um modelo que calcula a distância focal e o índice de refração da lente formada. Porém, é sugerido que para um modelo mais completo sejam considerados os efeitos aberrantes da luz (figura 2.3) e uma distribuição de temperatura gaussiana [25]. No ano seguinte, Rieckhoff demonstrou que o efeito pode ser observado extra cavidade, além de discutir os fatores que impactam na amplitude do sinal, a serem: quantidade de calor depositado, condutividade térmica e condições de contorno [28].

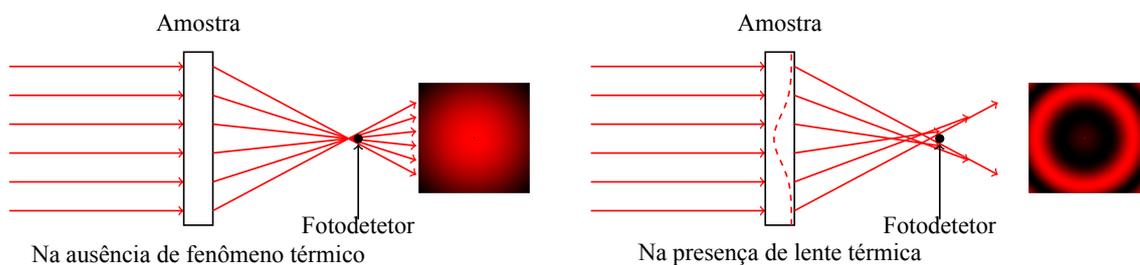


Figura 2.3: Aberrações luminosas ou ópticas são uma propriedade dos sistemas ópticos que causam a perda de fidelidade da imagem formada após a passagem dos raios luminosos por um elemento óptico. Essas aberrações são classificadas de diversas formas; no fenômeno da lente térmica, a aberração dominante é a aberração esférica. Os diagramas representam os caminhos dos raios luminosos, tal como previsto pela óptica geométrica. No entanto, no caso aberrante, a óptica geométrica não consegue realizar um tratamento adequado do caminho dos raios. Sendo que no caso não aberrante se observa somente a convergência natural do feixe de *laser*. A imagem à direita de cada diagrama é a projeção de um feixe gaussiano para cada caso. A linha em vermelho tracejada é a representação da distribuição de índice de refração formada devido à presença do efeito de lente térmica. Fonte: Adaptado de Commons [29].

Em 1972, Grabiner et al. foram os primeiros a medir o efeito de lente térmica extra cavidade utilizando dois feixes [30]. Hu e Whinnery em 1973 demonstram um ganho de sensibilidade na

[†]Uma lente delgada, ou fina, é aquela em que, no contexto da óptica geométrica, o raio incidente numa determinada superfície atinge a outra superfície na mesma altura [26], ou ainda, uma lente onde a sua espessura é insignificante em relação à sua distância focal (ou raio de curvatura) [27].

técnica ao usar uma lente focalizadora e ao posicionar a amostra na distância confocal do feixe. Hu e Whinnery ainda discutem sobre os limites do modelo de Gordon et al. devido à aproximação parabólica e demonstram que para não haver aberrações na luz transmitida é necessário que se limite a potência, diminuindo assim a quantidade de calor gerado pelo *laser*. Também fora demonstrada a condição para evitar a convecção na amostra, mas tal condição já é satisfeita pela condição para se evitar aberrações ópticas [31]. Long et al. demonstraram ganho de sensibilidade no uso de dois feixes e no uso do feixe de excitação modulado com detecção síncrona [32]. Com dois feixes é possível tanto usar um feixe de prova na região espectral na qual os sensores utilizados tem melhor resposta e posicionar a amostra para além de sua distância confocal, como demonstrado por Hu e Whinnery ser a melhor posição. Também é possível tanto ter um feixe de excitação na região espectral que a amostra mais absorve e ter a amostra posicionada no foco do feixe. Essa é a condição ideal visto que a energia absorvida é proporcionalmente inversa à área irradiada. Por fim, a detecção síncrona também aumenta a razão de sinal para ruído [10].

Em 1982, Sheldon et al. introduziram um modelo alternativo ao de Gordon et al., considerando agora a aberração óptica (figura 2.3) causada pela formação da lente e que também comportava o tratamento do estado transiente. Esse modelo, porém, acomodava somente o tratamento de dados de experimentos de feixe único ou feixe duplo no modo casado. Sheldon et al. utilizam a difração de Fresnel para tratar da aberração como uma fase adicionada à frente de onda do campo elétrico da luz propagada [33]. Já em 1992, Shen et al. propuseram um modelo mais completo que agora também comportava o tratamento de dados de experimentos de lente térmica com feixe duplo. Shen et al. demonstrou ainda que configurações experimentais como a representada na figura 2.4 são as configurações de maior sensibilidade [34].

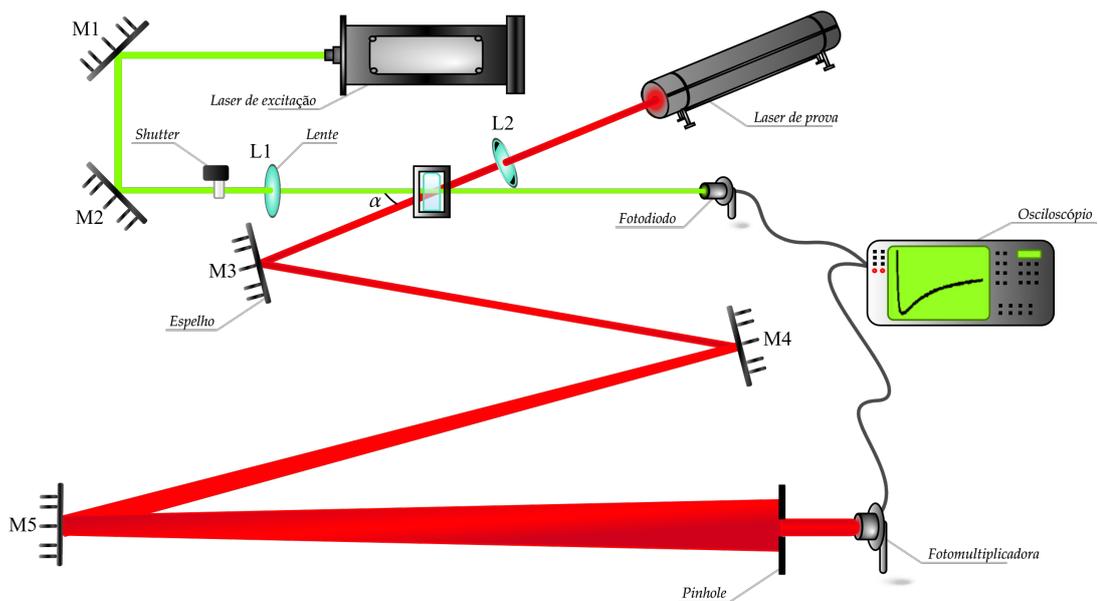


Figura 2.4: Representação da montagem experimental utilizada por Shen et al. Fonte: Adaptado de Shen et al. [34].

Modelos mais recentes, como o de Malacarne et al., consideram o efeito Soret e reações

químicas [35], processos fotofísicos [36] e o efeito termoelástico, essencial para uma descrição mais completa em sólidos, pois os modelos teóricos anteriores foram derivados para líquidos [37–39]. Além disso, modelos usando *laser* pulsados como fonte de excitação foram desenvolvidos [40–43].

2.2.2 Modelo quantitativo para a lente térmica

Nesta seção serão apresentadas as considerações e aproximações a serem tomadas para obtermos o modelo semi-infinito utilizado para a análise quantitativa de dados obtido de um experimento de lente térmica. Partindo dos fenômenos fundamentais que regem o efeito fototérmico, começa-se pela equação de transporte de calor (na forma conservativa):

$$\frac{\partial Q}{\partial t} = - \iint_{\partial\Omega} \vec{q} \cdot \hat{n} dS, \quad (2.1)$$

em que Q é o calor; \vec{q} é o fluxo de calor; \hat{n} é o vetor que define a orientação da superfície que contém Ω ; e Ω é o volume para (de) onde o calor flui. Da lei de condução de calor de Fourier [44, 45]:

$$\vec{q} = -\kappa \vec{\nabla}T, \quad (2.2)$$

onde κ é a condutividade térmica; e $\vec{\nabla}T$ é um gradiente de temperatura. Da primeira lei da Termodinâmica (para processos isobáricos) [46]:

$$dU = dQ - p dV, \quad (2.3)$$

em que dU é a variação da energia interna $U \equiv U(T, p)$ do sistema; dQ é a variação do calor $Q \equiv Q(T)$ no sistema; e $-p dV$ é o trabalho realizado pelos arredores do sistema sob o sistema devido à mudança no volume $V \equiv V(T, p)$. É possível ainda reescrever equação (2.3) utilizando que [46]:

$$\begin{aligned} dU &= \left(\frac{\partial U}{\partial T}\right)_p dT + \left(\frac{\partial U}{\partial p}\right)_T dp = \left(\frac{\partial U}{\partial T}\right)_p dT; \\ dV &= \left(\frac{\partial V}{\partial T}\right)_p dT + \left(\frac{\partial V}{\partial p}\right)_T dp = \left(\frac{\partial V}{\partial T}\right)_p dT; \\ C_p &= \left(\frac{\partial U}{\partial T}\right)_p dT + p \left(\frac{\partial V}{\partial T}\right)_p dT, \end{aligned} \quad (2.4)$$

sendo C_p a capacidade térmica a pressão constante e lembrando-se que se trata de um processo isobárico, e, portanto, $dp = 0$. Logo, utilizando da equação (2.4) juntamente da equação (2.3) temos que:

$$dQ = C_p dT = c_p m dT, \quad (2.5)$$

em que c_p é o calor específico a pressão constante e m é a massa. É importante notar que os procedimentos considerados até aqui foram realizados considerando um meio homogêneo e iso-

Tabela 2.1: Transformadas integrais [51] utilizadas para resolver a equação de difusão de calor.

	Transformada integral	Transformada inversa
Hankel	$\mathcal{H}_n[f(r)] = \int_0^\infty f(r)r\mathcal{J}_n(\alpha r)dr$	$\mathcal{H}_n^{-1}[\tilde{f}_n(\alpha)] = \int_0^\infty \tilde{f}_n(\alpha)\alpha\mathcal{J}_n(\alpha r)d\alpha$
Fourier cosseno	$\mathcal{F}_c[f(z)] = \sqrt{\frac{2}{\pi}} \int_0^\infty f(z) \cos(kz)dz$	$\mathcal{F}_c^{-1}[\tilde{f}(k)] = \sqrt{\frac{2}{\pi}} \int_0^\infty \tilde{f}(k) \cos(kz)dk$
Laplace	$\mathcal{L}[f(t)] = \int_0^\infty f(t)e^{-st}dt$	$\mathcal{L}^{-1}[\tilde{f}(s)] = \frac{1}{i2\pi} \int_{c-i\infty}^{c+i\infty} \tilde{f}(s)e^{st}ds$

trópico, isto é, as propriedades não dependem da posição e nem de fatores como a temperatura – ou seja, propriedades como κ ; ρ_V ; e c_p são constantes e uniformes [44, 45, 47].

Sem nos estendermos mais, usando equação (2.1) juntamente da equação (2.2) e equação (2.5) resultará na equação diferencial de difusão de calor [15, 47, 48]:

$$\nabla^2 \Delta T(r, z, t) - \frac{1}{\mathcal{D}} \frac{\partial \Delta T(r, z, t)}{\partial t} = -\frac{1}{\kappa} Q(r, z, t), \quad (2.6)$$

em que Q é a fonte de calor; ΔT é a distribuição de temperatura; e \mathcal{D} é a difusividade térmica dada por

$$\mathcal{D} = \frac{\kappa}{c_p \rho_V}, \quad (2.7)$$

sendo ρ_V a densidade volumétrica de massa. A equação (2.6) já foi escrita considerando um sistema de coordenadas cilíndrico e com simetria azimutal, pois estamos considerando feixes gaussianos no modo eletromagnético transversal fundamental TEM_{00}^\dagger , que apresenta naturalmente simetria azimutal [49, 50].

Em particular, aqui aplicaremos transformadas integrais para transformar a equação diferencial equação (2.6) em uma equação linear. Para definir as propriedades das transformas integrais usaremos \tilde{f} para denotar a transformada de uma equação f qualquer da variável a ser transformada. As transformadas que vamos utilizar estão expostas na tabela 2.1.

Sendo \mathcal{J}_n a função Bessel de primeira espécie de n -ésima ordem, a transformada de Hankel \mathcal{H}_n gera a transformação da coordenada radial r para a coordenada α do espaço de Hankel. A escolha de utilizar a transformada de Hankel se dá pela sua propriedade de linearizar o termo radial do laplaciano em coordenada cilíndricas [51]:

$$\mathcal{H}_n \left[\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial f(r)}{\partial r} \right) - \frac{n^2}{r^2} f(r) \right] = -\alpha^2 \tilde{f}_n(\alpha). \quad (2.8)$$

A transformada de Fourier-cosseno \mathcal{F}_c transforma da coordenada longitudinal z para a coordenada k do espaço Fourier-cosseno. Ela é escolhida devido à sua propriedade de linearizar a

[†]*TEM*, do inglês, *Tranverse eletromagnetic*.

segunda derivada [51]:

$$\mathcal{F}_c \left[\frac{\partial^2 f(z)}{\partial z^2} \right] = -k^2 \tilde{f}(k) - \sqrt{\frac{2}{\pi}} f'(0). \quad (2.9)$$

Essa propriedade é interessante por ser compatível com condições de contorno homogêneas para a variação da temperatura. Assim, se tomarmos a origem do sistema em um dos seus contornos teremos que $f'(0) = 0$.

A transformada de Laplace transforma a coordenada temporal t para a coordenada s do espaço de Laplace, onde utilizaremos a propriedade de linearizar a primeira derivada como [51]:

$$\mathcal{L} \left[\frac{\partial f(t)}{\partial t} \right] = -s \tilde{f}(s) - f(0). \quad (2.10)$$

Essa transformada também é escolhida por ser compatível com a condição inicial homogênea para a temperatura, a ser $f(0) = 0$.

Determinadas as propriedades das transformadas integrais, ao aplicá-las a equação (2.6) obtemos que (com $n = 0$ na equação (2.8)):

$$\left(-\alpha^2 - k^2 - \frac{s}{\mathcal{D}} \right) \Delta T_0(\alpha, k, s) = -\frac{1}{\kappa} Q_0(\alpha, k, s), \quad (2.11)$$

sendo que aqui foram consideradas condições iniciais e de contorno homogêneas, isto é,

$$\Delta T(r, z, t = 0) = 0, \text{ e } \left. \frac{\partial \Delta T(r, z, t)}{\partial z} \right|_{z=0} = 0,$$

e denominado $Q_0(\alpha, k, s)$ como a fonte de calor transformada para o espaço de Hankel-Fourier-cosseno-Laplace. Assim, resta-nos que a distribuição de temperatura fica determinada por:

$$\Delta T(r, z, t) = \frac{1}{c_p \rho_V} \mathcal{H}_0^{-1} \left[\mathcal{F}_c^{-1} \left[\mathcal{L}^{-1} \left[\frac{Q_0(\alpha, k, s)}{(\alpha^2 + k^2) \mathcal{D} + s} \right] \right] \right]. \quad (2.12)$$

O caso aqui tratado leva em conta apenas que há a formação de um distribuição de temperatura causada pela deposição de calor por um *laser*. Poderia se considerar diversos fenômenos que também causam geração de calor como discutido previamente [36]. Além disso, para uma descrição mais completa em sólidos seria necessário levar em considerações o fenômeno termo-elástico [38, 39]. O calor gerado pela absorção de um *laser* será [15, 52, 53]:

$$Q(r, z, t) = I(r, z) \beta \exp(-\beta z) \mathcal{Q}(t), \quad (2.13)$$

sendo β o coeficiente de absorção óptica do material; $\mathcal{Q}(t)$ é a distribuição temporal de intensidade do feixe, (em particular vamos nos ater a $\mathcal{Q}(t) = 1$ que é a distribuição temporal para o

feixe contínuo); e $I(r, z)$ a distribuição de intensidade luminosa [49, 50, 53]:

$$I(r, z) = \frac{2 P_e \phi (1 - R)}{\pi \omega(z)^2} \exp\left(-\frac{2r^2}{\omega(z)^2}\right), \quad (2.14)$$

em que P_e é a potência média do *laser* de excitação; ϕ é o coeficiente de eficiência térmica; R é a refletância; e $\omega(z)$ é a distribuição espacial do feixe ao longo da coordenada longitudinal.

As primeiras aproximações a serem consideradas já são tomadas aqui, em que se considera que a amostra seja de baixa absorção [†], isto é, $e^{-\beta z} \approx 1$. A outra aproximação considerada é que a espessura da amostra é muito menor que z_c , a distância confocal do feixe, que é a distância em que o feixe viaja antes de aumentar por um fator de $\sqrt{2}$ [50]. Portanto, usa-se que $\omega(z) = \omega_{0e}$. Essa última é a aproximação mais importante para se obter um modelo analítico. Dadas essas condições, ficamos com uma fonte de calor dada por:

$$\begin{aligned} Q(r, z, t) &= \frac{2 P_e \phi (1 - R)}{\pi \omega(z)^2} \exp\left(-\frac{2r^2}{\omega(z)^2}\right) \beta \exp(-\beta z) Q(t) \\ &\approx \frac{2 P_e \phi (1 - R) \beta}{\pi \omega_{0e}^2} \exp\left(-\frac{2r^2}{\omega_{0e}^2}\right). \end{aligned} \quad (2.15)$$

A mudança na temperatura então induz uma mudança no índice de refração, que fica quantificada por [25, 33, 34]:

$$n(r, z, t) = n_0 + \frac{dn}{dT} \Delta T(r, z, t), \quad (2.16)$$

sendo n_0 o índice de refração em temperatura ambiente e dn/dT a taxa com o que o índice de refração varia com a temperatura. No modelo de Gordon, aproxima-se que a mudança no índice de refração seja parabólica devido ao efeito térmico e é determinado por:

$$n(r) = n_0 + \delta \frac{n_0 r^2}{\omega_0^2}. \quad (2.17)$$

Comparando essa equação com equação (2.16) encontra-se que a variação fracionária do índice de refração é:

$$\delta = \frac{\omega_0^2}{n_0 r^2} \frac{dn}{dT} \Delta T, \quad (2.18)$$

que forma uma lente de distância focal F [25]:

$$F = -\frac{1}{2\delta} \frac{\omega_0^2}{l}, \quad (2.19)$$

em que l é a espessura da amostra e ω_0 nesse caso é o raio do feixe na amostra.

Sheldon e Shen tomam uma abordagem diferente da de Gordon. Eles tratam do efeito de lente devido ao efeito térmico como uma aberração cromática. A aberração cromática causa

[†]Os modelos que usam essa aproximação são classificados como LAM, do inglês, *Low absorption model*.

uma mudança no índice de refração, que vai adicionar uma fase Φ ao campo elétrico da onda luminosa do feixe de prova. Tal fase é determinada por [33, 34]:

$$\Phi(r, t) = \frac{2\pi}{\lambda_p} \int_0^L (n(r, z, t) - n(0, z, t)) dz, \quad (2.20)$$

sendo λ_p o comprimento de onda do feixe de prova. Convém notar que a consideração mais geral a se fazer é que a fase é gerada por uma variação no caminho óptico. Essa variação no caminho óptico seria causada por gradientes espaciais de índice de refração, como nesse caso, e por outros efeitos como o termoelástico [38, 39].

Substituindo equação (2.16) em equação (2.20) ficamos com:

$$\Phi(r, t) = \frac{2\pi}{\lambda_p} \frac{dn}{dT} \int_0^L (\Delta T(r, z, t) - \Delta T(0, z, t)) dz. \quad (2.21)$$

Para uma fonte de calor como equação (2.15) vemos que a distribuição de calor ao longo do eixo longitudinal é uniforme, – logo, a temperatura também será e assim conclui-se que a fase é:

$$\Phi(r, t) = \frac{2\pi L}{\lambda_p} \frac{dn}{dT} (\Delta T(r, t) - \Delta T(0, t)), \quad (2.22)$$

em que L é o comprimento do caminho em que ocorre absorção óptica do feixe excitação dentro da amostra.

Por fim, a intensidade luminosa do feixe de prova que será detectada no plano detector pode ser encontrada utilizando a teoria de difração de Fresnel, calculando-se a integral de propagação da posição da amostra até o plano detector, e é dada por [34]:

$$I(t) = \left| \int_0^\infty \exp(-(1 + jV)g - j\Phi(g, t)) dg \right|^2, \quad (2.23)$$

na qual, V é um parâmetro geométrico da montagem definido pela equação (2.26), $j = \sqrt{-1}$ e $g = r^2/\omega_{1p}^2$ onde ω_{1p} é o raio do feixe de prova na posição da amostra.

Nesse modelo a última consideração a se fazer seria que, devido à complexidade de se calcular integrações de funções do tipo $\exp(\Phi(g, t))$, seria possível aproximar a exponencial para fases pequenas, efetivamente trocando-a pela sua expansão de Taylor. Isso leva a:

$$I(t) \approx \left| \int_0^\infty \exp(-(1 + jV)g)(1 - j\Phi(g, t)) dg \right|^2. \quad (2.24)$$

Shen demonstra que desde que a condição de $\Phi \ll 1$ se mantenha, a aproximação com apenas a primeira ordem da expansão se manterá válida para uma grande variedade de configurações experimentais [34].

A compreensão da montagem básica moderna de lente térmica é fundamental em conjunto

com o modelo quantitativo para um melhor entendimento do fenômeno e da técnica. A figura 2.5 ilustra o diagrama de uma montagem moderna padrão para a realização da técnica de espectrometria de lente térmica de dois feixes descasados, sendo o descasamento quantificado pelo parâmetro geométrico m , definido como o quadrado da razão do raio do feixe de prova pelo raio do feixe de excitação, ambos na posição da amostra, segundo a equação (2.25). Segundo o modelo quantitativo proposto por Shen et al. [34],

$$m = \left(\frac{\omega_{p1}}{\omega_{e0}} \right)^2, \quad (2.25)$$

os feixes de excitação e de prova são colineares na região da amostra. É importante notar que a irradiância do feixe de excitação (equação (2.14)) é inversamente proporcional ao quadrado do raio – portanto, sempre é desejado posicionar-se a amostra na região do menor raio do feixe de excitação, isto é, em seu foco. Além disso, o feixe de prova tem sua cintura deslocada por uma distância z_1 , de modo que maior seja o ω_{p1} , pois quanto maior m for, maior é a sensibilidade do experimento realizado [34]. Outro parâmetro geométrico relevante da técnica é o parâmetro V , definido por:

$$V = \frac{z_1}{z_{cp}} + \frac{z_{cp}}{z_2} \left(1 + \left(\frac{z_1}{z_{cp}} \right)^2 \right). \quad (2.26)$$

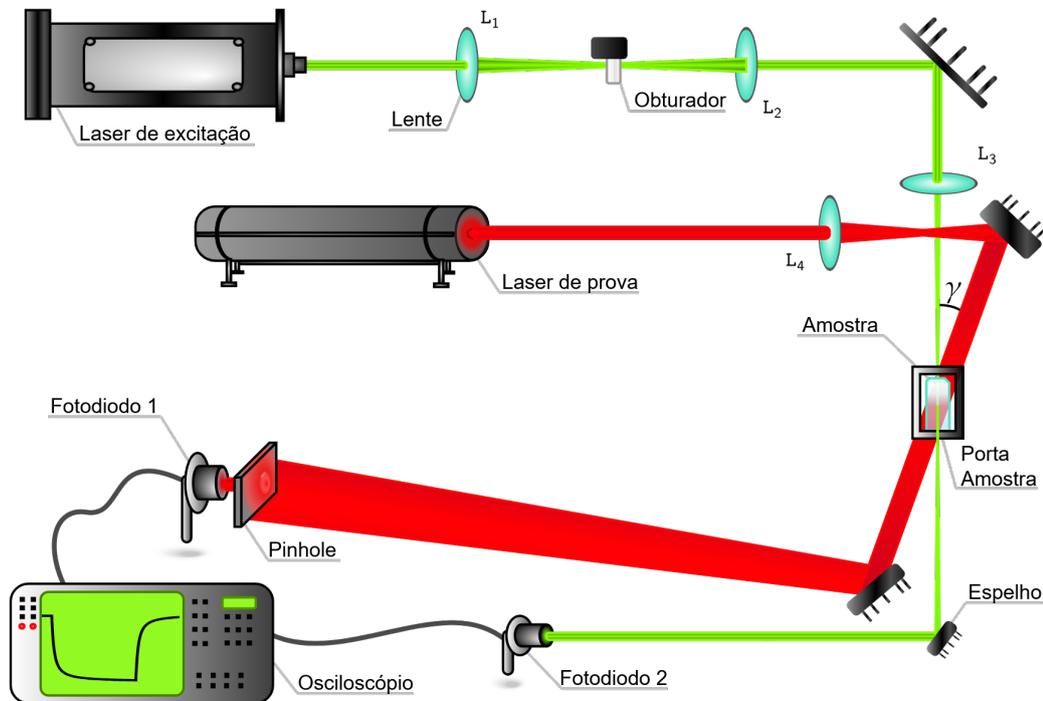


Figura 2.5: Montagem moderna genérica de espectrometria lente térmica. Adaptado de Willian Berrar et al. [54].

O parâmetro V indica a qualidade da detecção, sendo z_1 a distância entre as cinturas dos feixes de prova e de excitação, z_2 a distância da amostra ao detector e z_{cp} o parâmetro de Rayleigh

do feixe de prova. A disposição espacial desses parâmetros geométricos é como mostrado na figura 2.6. Em virtude da dificuldade em se produzir uma montagem realmente colinear, Shen et al. [34] demonstram que é possível obter bons resultados ao utilizar um ângulo α pequeno entre os feixes.

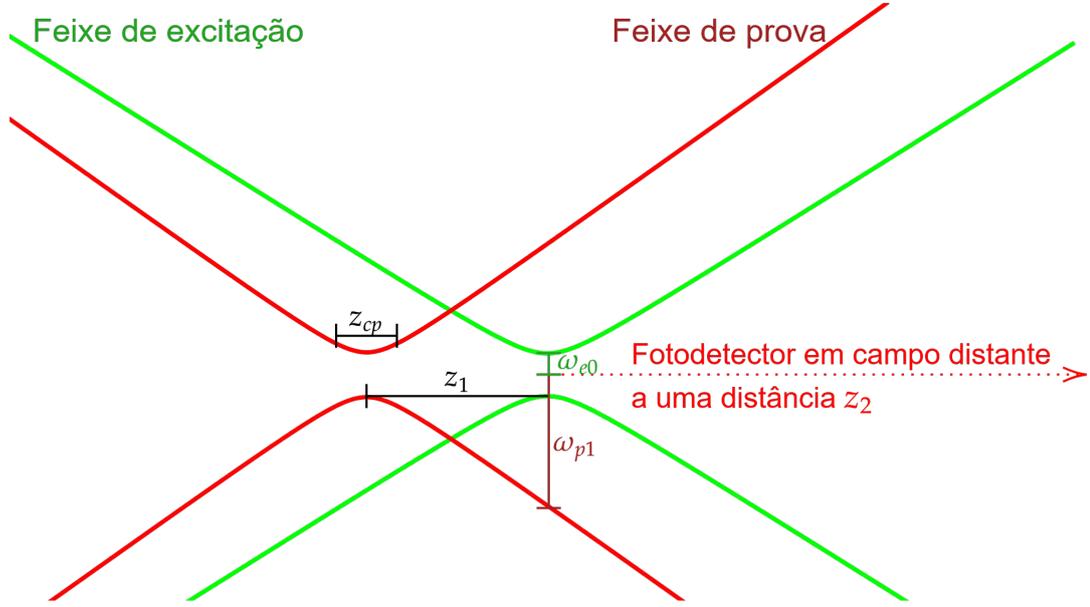


Figura 2.6: Disposição espacial dos parâmetros geométricos em um experimento de lente térmica usual.

A composição regular de uma montagem abrangerá diversos elementos ópticos, tais como lentes, espelhos e filtros, dentre outros. Ademais, há uma fonte de feixe de *laser* para o feixe de prova e outra para o de excitação. Além disso, há um dispositivo para gerar modulação do feixe de excitação (na figura 2.5 denominado obturador), como um *chopper* ou *shutter* óptico. Dessa forma, é possível controlar temporalmente os períodos em que o efeito de lente térmica está ou não sendo produzido na amostra. Isso permite o uso de coleta de dados síncrona, com osciloscópios ou amplificadores *Lock-in*. Desse modo, há consequentemente o aprimoramento do SNR^\dagger . Por fim, se usa fotosensores para monitorar a intensidade luminosa de ambos feixes, em que através do monitoramento do feixe de prova se detecta o efeito e pelo monitoramento do feixe de excitação se faz a sincronização dos equipamentos de modulação e coleta de dados.

Agora, realiza-se a integração de equação (2.24) utilizando a fase dada por equação (2.22), com a variação de temperatura determinada por equação (2.12), sendo a fonte de calor dada pelo último termo de equação (2.15). Após as simplificações necessárias encontra-se a intensidade luminosa como determinado por Shen et al. [34]:

$$I(t) = \left| 1 - \frac{\theta}{2} \arctan \left(\frac{2mV}{\frac{t_c}{2t}((1+2m)^2 + V^2) + 1 + 2m + V^2} \right) \right|^2, \quad (2.27)$$

[†]Da língua inglesa, *Signal-to-noise ratio*.

em que θ é associado à amplitude do sinal, e definido por

$$\theta = -\frac{P_e \phi (1 - R) \beta L}{\kappa \lambda_p} \frac{dn}{dT}, \quad (2.28)$$

sendo κ é a condutividade térmica do material. Devido a aproximação usada na equação (2.24) é necessário que θ seja pequeno (idealmente se espera que $\theta < 0,15$) para obter-se um bom ajuste dos dados coletados, e t_c é o tempo característico de formação do efeito para o material estudado sendo determinado por

$$t_c = \frac{\omega_{e0}^2}{4D}, \quad (2.29)$$

sendo D o coeficiente de difusividade térmica. Importante destacar que a intensidade luminosa depende fortemente dos parâmetros m e V , que por sua vez dependem de z_1 . Dessa forma, z_1 é potencialmente o parâmetro mais relevante quando se pretende otimizar uma montagem. Conforme demonstrado na figura 2.5, as lentes L_3 e L_4 desempenharão um papel crucial na otimização do sistema, uma vez que determinarão a posição do foco de cada feixe, e, conseqüentemente, z_1 . Ademais, é importante salientar que o primeiro par de lentes (lentes L_1 e L_2) utilizadas para otimizar o tempo de abertura do modulador também podem atuar como um expensor de feixe. Deste modo, é concedida liberdade na escolha do raio do feixe de excitação que chegará a L_3 , e, conseqüentemente, ao raio do foco do feixe de excitação. É imperativo que o tempo que o modulador consome entre obstruir totalmente o feixe e liberar totalmente o feixe seja significativamente inferior ao tempo característico t_c , pois no modelo se considera que o feixe passa a iluminar a amostra de forma instantanea e, portanto, é necessário que a transição entre o estado aberto e fechado do modulador do feixe de prova seja o mais rápido possível.

2.3 Microscopia de lente térmica

A sensibilidade das técnicas fototérmicas está diretamente relacionada com a quantidade de calor gerada, que, por sua vez, é diretamente proporcional à irradiância. Esta, por sua vez, é inversamente proporcional à área irradiada e, portanto, sempre é desejável minimizar o raio da cintura do feixe de excitação. Por esses motivos começou-se a investigação de maneiras de como aplicar as espectroscopias fototérmicas no ramo de técnicas microspectroscópicas, já que, como mencionado anteriormente, são técnicas de alta sensibilidade e que oferecem diversas vantagens e, que, portanto, poderiam permitir a obtenção de dados melhores e superar os limites das demais técnicas microspectroscópicas.

Inicialmente ocorreu a aplicação da espectroscopia de lente térmica em análises químicas como em cromatografia líquida para volumes pequenos, da ordem de microlitros [55, 56]. O termo “microscopia de lente térmica” passou a ser empregado quando na técnica se utilizava uma objetiva de microscópio para focar os feixes de excitação e prova [57].

O primeiro protótipo de lente térmica microscópica foi demonstrado por Burgi et al. [57],

que implementaram o uso de objetivas de microscópio para produzir feixes extremamente focados. A montagem realizada seria semelhante à montagem habitual de lente térmica, porém com a amostra montada num posicionador tridimensional motorizado para que se pudesse realizar o mapeamento da amostra. Os feixes seriam utilizados de forma transversal em vez da forma coaxial, de modo a reduzir o volume detectado e contornar o problema de seletividade relacionado com as técnicas fototérmicas. Burgi e Dovichi [58] modificaram a montagem anterior, utilizando apenas uma objetiva de microscópio para ambos os feixes em modo simultâneo, mas com a restrição de os feixes não passarem pelo centro da lente, de modo a ficarem cruzados na posição de foco da lente. A proposta de Burgi et al., Burgi e Dovichi seria de fazer o mapeamento das amostras gravando um transiente para cada ponto da amostra e obter uma distribuição espacial de coeficiente de absorção óptica obtida da amplitude do sinal gravado e uma distribuição de difusividade térmica obtida da fase do sinal gravada.

O problema da seletividade ocorre devido a fato de que toda espécie absorvedora no caminho óptico do feixe de excitação irá gerar calor e a integração do calor gerado por cada parte gerará o efeito detectado – assim, não há como distinguir entre o calor gerado por cada espécie. Outro motivo para se desejar uma configuração que aumente a seletividade dos objetos detectados é devido ao fato que na microscopia convencional as amostras necessitam ter espessuras da ordem de micron, pois objetos fora do plano de foco do microscópio podem causar artefatos na imagem observada. Assim, com uma seletividade maior, poderiam ser usadas amostras de espessura maior e, portanto, poderiam ser usados métodos de preparo de amostras mais eficientes [57, 58]. O resultado relatado por Burgi et al. [57] e Burgi e Dovichi [58] foi o de sucesso no mapeamento de uma amostra de epiderme humana e na identificação de *M. tuberculosis*, bactéria que causa a tuberculose, presente no tecido e que havia sido tingida.

Harada et al. [59–61] demonstram o primeiro protótipo de lente térmica microscópica coaxial. Além do aparato usual utilizado na lente térmica, é utilizado um corpo de microscópio pelo qual os feixes são irradiados e então focalizados pela lente objetiva do microscópio. Em particular ainda é utilizada uma lente condensadora após a amostra para coletar os feixes e diminuir a sua divergência. Tal lente pode ser também uma lente objetiva. Nessa montagem, a amostra pode ser fixada na platina do próprio microscópio ou em um posicionador tridimensional. A proposta de Harada et al. seria de apresentar uma técnica microspectroscópica alternativa aos métodos que usam elétrons ou íons para aplicações em amostras biológicas, *in vitro* e *in vivo*, e como na detecção de ultra traço *in situ*. Porém, métodos que usam elétrons necessitam de um alto vácuo para operar, o que torna inviável o uso *in vivo*, além de usualmente causar danos às amostras. Além disso, correspondem geralmente a aparatos muito complexos, sendo inconvenientes para detecções *in situ*. Desse modo, os métodos fototérmicos revelam-se a escolha adequada, uma vez que podem ser aplicados nos cenários desejados. A proposta de Harada et al. seria de usar a técnica de deflexão fototérmica sob o microscópio, pois seria a mais sensível. Contudo, a distância focal das objetivas é extremamente curta, não sendo viável então realizar a deflexão fototérmica, motivo pelo qual optou-se por fazer a lente térmica coaxial sob um microscópio.

Juntamente com Harada et al., Tokeshi et al. [62], Sato et al. [63, 64], Uchiyama et al. [65] e Tamaki et al. [66] fizeram uso do mesmo aparato de microscópio de lente térmica. Eles obtiveram resultados na detecção de ultra traço até a ordem de sub-zeptomoles, como também realizaram o imageamento de amostras histológicas. Um dos fatores que contribuíram para o avanço da técnica de microscopia de lente térmica foi o desenvolvimento em conjunto com a microfluídica [63, 64, 67, 68]. A microfluídica consiste no uso de sistemas miniaturizados para fazer o transporte de reagentes; mistura; reação; separação dos produtos; e detecção, isso é, realizar o processo de análise química em um microcanal [64]. Essa redução no volume proporciona uma otimização das reações químicas, pois reduz o tempo de reação, além de diminuir o volume de reagentes consumidos e de resíduos produzidos.

Já a primeira imagem feita com o protótipo de Harada et al. foi apresentada por Uchiyama et al. [65], na qual foi feito um mapeamento bidimensional de um mastócito de um pólipo nasal. A imagem obtida representa uma distribuição dos coeficientes de absorção óptica da molécula de histamina. Além disso, Uchiyama et al. discute alguns dos problemas que surgem por se usar objetivas. A objetiva é um aparato óptico que pode ser composto por uma ou diversas lentes, que servem para coletar a luz (refletida/transmitida/emitida) de um objeto e focalizá-la para produzir uma imagem real. É importante notar que, o microscópio utilizado por Uchiyama et al. só foi adequado para o uso junto da técnica de lente térmica, pois suas objetivas não tinham as aberrações cromáticas compensadas.

Aberrações ópticas e cromáticas podem acontecer quando a luz passa por um dos elementos ópticos. Aberrações acontecem devido a própria natureza ondulatória da luz e comprometem a fidelidade da imagem com o objeto [69]. Devido a isso, objetivas modernas tem suas aberrações compensadas e, portanto, não seria possível produzir um aparato como o utilizado por Harada et al., pois em uma objetiva que tenha a sua aberração cromática compensada os feixes de prova e excitação teriam o mesmo tamanho e mesma posição espacial em suas cinturas e o efeito fototérmico não poderia ser detectado. Uma alternativa seria adicionar aparatos ópticos que mudassem a propagação de um ou ambos os feixes, como os expansores de feixes empregados por Dudko et al. [67] e Liu et al. [70].

Uchiyama et al. [65] também discute quanto as limitações da técnica. Foi verificado que a resolução do microscópio ficaria limitada apenas pelo raio do feixe de excitação, pois, como dito anteriormente, a lente térmica em si possui uma baixa seletividade e não é possível distinguir dentre o calor gerado por diferentes espécies absorvedoras. Cabe ressaltar que a distância de difusão térmica teria pouca ou nenhuma influência para feixes modulados em frequências abaixo de unidade de kHz, pois nessa região a distância de difusão térmica é maior que o raio dos feixes na amostra e, portanto, a lente térmica microscópica teria uma resolução maior do que técnicas de imageamento térmico, que se baseiam na emissão de infravermelho e na propagação de onda térmica.

Uchiyama et al. [65] demonstram tal resultado por meio do mapeamento de uma lâmina de calibração de microscópio, a qual consiste em uma lâmina de vidro com marcações em escala

micrométrica feitas em carbono com $3 \mu\text{m}$ de espessura e separadas por $10 \mu\text{m}$. É importante notar que a resolução é limitada à capacidade da técnica de distinguir dois pontos distintos dentro do feixe de excitação. De fato, Uchiyama et al. também demonstram a capacidade do microscópio de identificar uma única partícula menor que o diâmetro do feixe. No caso em questão, foi detectada uma partícula de poliestireno de 1903 nm de diâmetro sob um feixe de excitação de $1,5 \mu\text{m}$ de diâmetro.

Tamaki et al. [66] apresentam o uso de uma célula microfluidica que permite cultura e análise pelo microscópio de lente térmica de células vivas, assim diminuindo o trabalho de pipetagem. Além disso, como a célula microfluidica tem um volume menor, reações são induzidas pela pressão do fluido injetado o que permite o estudo de estímulos rápidos. Tamaki et al. obtém como resultado a imagem a partir da distribuição de citocromo C durante o processo de apoptose de uma célula híbrida de neuroblastoma-glioma, que são ambos tipos de neoplasia maligna que ocorrem no sistema nervoso. O processo de liberação de citocromo C um processo chave para o citosol pelas mitocôndrias durante o processo de apoptose. Assim, o uso em conjunto da característica de estímulos rápidos com a possibilidade de monitorar a distribuição de citocromo C seriam pontos chaves para tornar estudos de novas drogas mais ágeis.

Moreau e Loriette [71, 72] apresentam o desenvolvimento de um aparato e de teoria para microscopia de lente térmica confocal. Um microscópio confocal serviria para aumentar a resolução axial, isto é, aumentar a resolução de profundidade do microscópio. Isto é importante pois um microscópio de lente térmica não confocal tem sua resolução axial máxima mais de duas vezes maior que o parâmetro de Rayleigh do feixe de excitação – fato que acontece devido ao sinal de lente térmica possuir dois extremos ao longo da propagação do feixe, como também a amplitude desses extremos depender fortemente com a distância entre as cinturas dos feixes de excitação e prova. Porém, o microscópio confocal terá apenas um extremo e sua amplitude será independente de parâmetros geométricos do experimento. A resolução axial obtida pelo esquema confocal passar a ser igual ao parâmetro de Rayleigh do feixe de excitação. O esquema de detecção confocal é obtido ao posicionar o pinhole conjugado a um plano a uma distância confocal à frente do plano da cintura do feixe de prova, isto é, é necessário satisfazer

$$z_L + \frac{z_P}{1 - \frac{z_P}{f}} = z_R,$$

sendo z_L a distância entre a amostra e a lente condensadora; z_P a distância entre a lente condensadora e o pinhole; f a distância focal da lente condensadora; e z_R o parâmetro de Rayleigh do feixe de prova. Isso ocorre pois a lente condensadora leva o feixe a ser focado novamente. A teoria apresentada por Moreau e Loriette foi feita considerando uma lente astigmática e é relatado que a discrepância entre modelo desenvolvido e dados coletados é menor que o nível do ruído.

Liu et al. [73] apresentam um modelo para lente térmica no microespaço para uma seleção específica de casos, sendo eles: fluido com fluxo perpendicular a feixes colineares; para parede

lateral, como em um duto; para um sistema de três camadas; e para um sistema de caminho óptico maior que a distância confocal do *laser* de excitação. São apresentadas as condições iniciais e de contorno para cada caso, ainda levando em consideração condução de calor e cada caso é resolvido considerando fontes de calor coerentes, como um feixe de *laser* gaussiano; e não coerente, como uma lampada de arco de xenônio. Nesse artigo, a lente térmica é tratada por meio da abordagem de difração de Fresnel. Liu et al. se concentram em discutir a otimização dos parâmetros geométricos da montagem experimental partindo de simulações numéricas, enfatizando a discussão em torno dos fatores que podem degradar o sinal de lente térmica – em particular no caso de fluxo perpendicular aos feixes em que ocorre uma degradação do perfil espacial da distribuição de temperatura para velocidades maiores que 1 cm/s, o que consequentemente diminui a intensidade do sinal de lente térmica. Nesse caso, é necessário para obtenção de máximo de sinal adicionar uma compensação que se traduz como uma separação entre os centros dos feixes de prova e excitação, isto é, os feixes deixam de ser colineares e passam a ser paralelos.

Dada et al. [74] demonstram que as imagens geradas da amplitude do sinal de lente térmica, coletadas por um amplificador lock-in, são equivalentes às geradas por microscópios de transmissão, porém com maior contraste. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que a amplitude do sinal é diretamente proporcional à absorvância do material. Dada et al. utilizaram a técnica para a observação de amostras de tecido hepático bovino com diferentes densidades de vesículas liposomas e seção transversal de tecido ósseo compacto, utilizando-se um microscópio de lente térmica invertida.

Nedosekin et al. [75] investigam o conceito de microscopia fototérmica de super-resolução, na qual são explorados efeitos não lineares para produzir resoluções além do limite de difração. Nedosekin et al. propõem que efeitos não lineares, tais como a geração de segundo e terceiro harmônicos e a absorção multifotônica, entre outros, podem ser explorados para amplificar o sinal fototérmico e, por conseguinte, aumentar a capacidade de resolver distâncias cada vez menores. Em particular, foi explorado o efeito de nano bolhas, esse efeito é ocasionado pelo aquecimento extremamente rápido de nanopartículas, decorrente de um feixe de *laser* pulsado, quando a nanopartícula se encontra em um substrato gasoso de modo que o gás em torno da nanopartícula é aquecido juntamente e causa um efeito que proporciona uma ampliação no sinal detectado, análogo ao efeito de cavitação, o qual decorre do aquecimento extremamente rápido de um material inserido em um substrato líquido. Fenômenos não lineares ocorrem em função das características intrínsecas de cada material. No entanto, ao se realizar análises espectroscópicas, é preciso ter cuidado para evitar a geração desses efeitos não lineares, em consideração à dificuldade de se tratar desses fenômenos de forma quantitativa. Em particular, Nedosekin et al. observa que, apesar do uso de altas fluências para tornar perceptíveis os efeitos não lineares, as fluências necessárias para se obter um bom sinal ainda se encontram em torno de uma ordem de grandeza menor do que a fluência necessária para causar danos às amostras analisadas.

De acordo com Nedosekin et al., os efeitos não lineares discutidos não se limitam a atingir

maiores resoluções, servindo também para aprimorar a nitidez e o contraste das imagens geradas. Conforme demonstrado, essa observação pode ser evidenciada ao comparar as imagens obtidas por microscopia convencional, de varredura eletrônica e fototérmico de super-resolução não linear. Conforme os autores, foi possível observar a presença de heterogeneidades na imagem obtida pelo microscópio fototérmico de super-resolução, não observadas nos demais microscópios. Nedosekin et al. analisaram diferentes nanoestruturas de ouro em diferentes substratos e compararam os resultados obtidos para o microscópio fototérmico na ausência e na presença de nano bolhas. Foi observado um ganho de resolução substancial, visto que o efeito de nano bolha é extremamente localizado, tornando a técnica altamente seletiva. Dessa forma, foi possível resolver a distância entre nanopartículas de ouro dentro de aglomerados ou quando distribuídas em um substrato altamente absorvedor.

He et al. [76] empregaram um microscópio fototérmico com esquemas de detecção tanto confocal como não confocal para demonstrar o ganho de sensibilidade e resolução do esquema confocal. Contudo, o trabalho tem um enfoque na aplicação da microscopia fototérmica na determinação de diagnósticos, em particular, na distinção entre neoplasia maligna e benigna. He et al. realizaram o mapeamento tridimensional de neoplasias epiteliais, benignas e malignas, recorrendo à distribuição de melanina como marcador para efeitos de comparação. A proliferação desregulada e a modificação metabólica de melanócitos, células responsáveis pela produção de melanina, são características dos melanomas, um tipo de neoplasia maligna. A distribuição de melanina no tecido permite estimar a proliferação ou a alteração do metabolismo dos melanócitos. He et al. observam que tanto a densidade como a dimensão fractal dos neoplasmas malignos apresentam valores superiores quando comparados com os neoplasmas benignos. Contudo, é necessário um estudo com um maior conjunto de dados para assegurar a eficácia desses parâmetros como critério de diagnóstico.

Zhang et al. [77] empregaram um esquema de detecção de campo escuro para maximizar a modulação do feixe de prova. Zhang et al. optam pelo emprego de um feixe de excitação na região do infravermelho médio. Dessa forma, além do imageamento fototérmico, é possível realizar em conjunto a espectroscopia vibracional para caracterização das amostras. Além disso, optou-se por utilizar um feixe de prova no visível, visto que, em virtude do comprimento de onda menor, mesmo que ainda limitado pelo limite de difração, o microscópio poderia alcançar uma resolução sub micrométrica.

Shimizu et al. [78] apresenta uma revisão da literatura acerca das diversas aplicações da microscopia fototérmica. No âmbito da ciência de separação, o emprego conjunto com células de microfluídica possibilita a realização de análises cromatográficas mais eficientes e rápidas. No campo da análise de partículas, a técnica foi empregada na detecção, contagem e caracterização de nanopartículas de ouro com tamanho ao menos 5 nm e de nanopartículas plasmônicas. A técnica em biomedicina possibilita o estudo da distribuição de diferentes compostos que apresentam alto potencial clínico para diagnóstico ou para a compreensão dos mecanismos celulares e de medicamentos, como o citocromo C em mitocôndrias [66], a hemoglobina em eritrócitos [75] e

a melanina em células de melanoma [78], entre outros. No âmbito das ciências ambientais e de energia, a microscopia é empregada na detecção de traços de isótopos radioativos em sistemas de refrigeração de reatores nucleares. Em perspectivas, há a expectativa de avanços no estudo de propriedades como viscosidade, constante dielétrica, potencial zeta, condutividade, pH, entre outras, de outros fluidos no nano espaço, bem como o avanço de *lasers* e de detecção em fibra óptica e de microcomponentes ópticos, visando promover mais avanços na miniaturização dos sistemas experimentais.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E METODOLOGIA

3.1 Materiais

Conforme evidenciado no capítulo anterior, a microscopia de lente térmica é uma técnica passível de aplicação em diversos contextos. Neste estudo, investigou-se a capacidade de imageamento da técnica em amostras histológicas e vítreas.

As amostras histológicas foram fornecidas pela professora doutora Luzmarina Hernandez, do Departamento de Ciências Morfológicas da Universidade Estadual de Maringá. As amostras foram preparadas conforme o protocolo padrão para processamento histológico. O órgão foi fixado em solução de paraformaldeído a 4% por 24 horas, sendo em seguida seccionado para remoção das extremidades, para delimitar a região central. Posteriormente, as amostras foram processadas para inclusão em parafina. Foram realizados cortes semi-seriados com espessura de $7\ \mu\text{m}$, os quais foram corados com hematoxilina-eosina.

A amostra vítrea utilizada neste estudo é um vidro de CaBAI co-dopado com 2,5% de Európio e 3,0% de Prata, submetido a tratamento térmico a $500\ ^\circ\text{C}$ por 9 horas. A amostra foi fornecida pelo professor doutor Marcelo Sandrini, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) — campus Pato Branco. O detalhamento da preparação do vidro CaBAI co-dopado pode ser encontrado em sua tese de doutorado [79]. Além disso, foram obtidos transientes para água ultrapura Milli-Q[®] em cubetas de quartzo de alto desempenho, onde as cubetas foram previamente limpas com acetona e então ambientadas com a água ultrapura.

3.2 Metodologia

A figura 3.1 ilustra o microscópio de lente térmica montado. A montagem foi realizada com base em uma configuração padrão de lente térmica, conforme representado na figura 2.5. As lentes L_1 , L_2 e L_3 são biconvexas, fabricadas em sílica fundida, todas da marca *Thorlabs*,

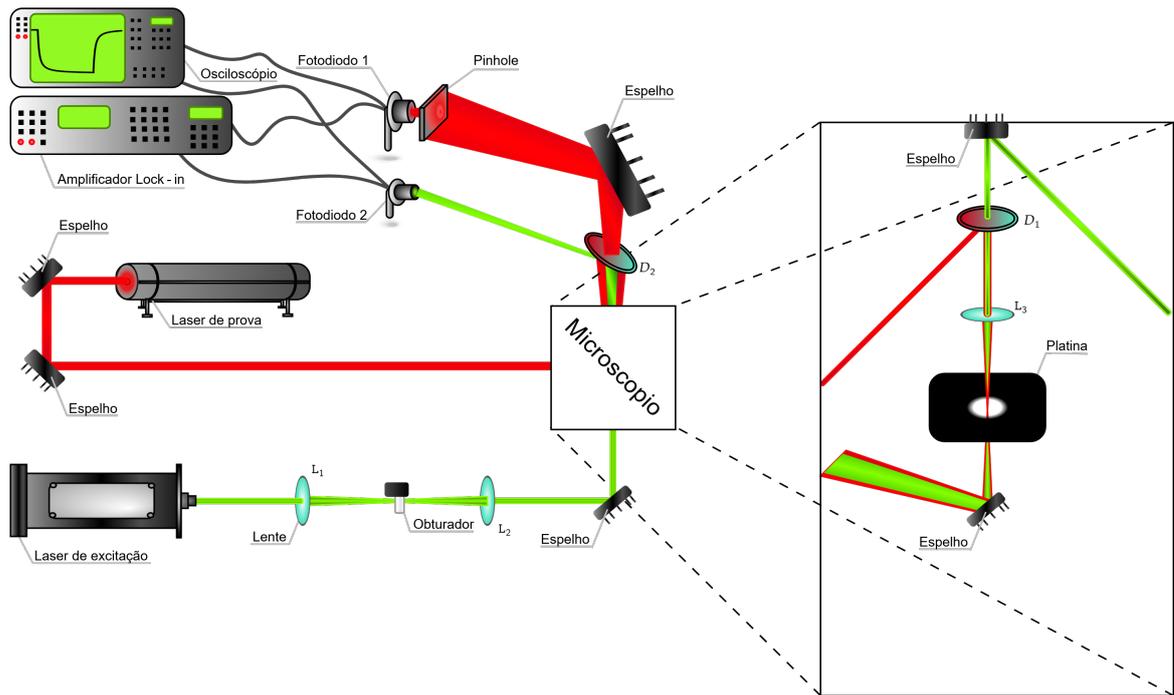


Figura 3.1: Representação da montagem do microscópio de lente térmica utilizada. Optou-se por incidir os feixes de excitação e de prova na amostra de cima para baixo. O feixe de prova (vermelho) entra no microscópio pela frente, enquanto o feixe de excitação (verde) incide pela direita. Após atravessarem a amostra, os feixes são coletados por baixo e direcionados para a esquerda, onde são encaminhados aos sensores.

modelos LB4330, LB4265 e LB4096, respectivamente. O obturador é um *shutter laser* da marca *Stanford Research Systems*, modelo SR475, utilizado em conjunto com o controlador *Stanford Research Systems*, modelo SR470.

O feixe de excitação é gerado por um *laser* semiconductor de baixo ruído no modo TEM_{00} e cw^\dagger da marca *Coherent*, modelo Verdi G7. O Verdi G7 tem potência variável e emissão no comprimento de onda de $532,0\text{ nm}$, portanto, optou-se pelo uso de espelhos dos modelos NB1-K12 e NB1-K13 da *Thorlabs* na formação do caminho óptico para o feixe de excitação. O feixe de prova é provido por um *laser* Hélio-Neônio da marca *Uniphase*, modelo 1135P. O *laser* Hélio-Neônio tem emissão no comprimento de onda de $632,8\text{ nm}$ e potência de 20 mW . Para o caminho óptico do feixe de prova foram utilizados espelhos de prata. Além disso, os espelhos dicroicos utilizados são das linhas DMLP da *Thorlabs*, utilizado para unir (dicroico D_1) os feixes de prova e excitação, e DMSP da *Thorlabs*, utilizado para separar (dicroico D_2) os feixes. Os parâmetros dessa montagem estão expostos na tabela 3.1.

Tabela 3.1: Parâmetros geométricos da montagem de microscópio de lente térmica utilizada.

z_1	z_2	z_{cp}	ω_{e0}	ω_{p1}	m	V
0,58 mm	1,08 m	1,57 mm	$10,26\ \mu\text{m}$	$18,92\ \mu\text{m}$	2,38	1,48

[†]Da língua inglês, *Continuous wave*.

Além disso, fora utilizado um sensor fotodiodo *Femto* modelo OE-300-SI-10 para monitorar a intensidade luminosa do feixe prova (fotodiodo 1) e um sensor fotodiodo *Thorlabs* modelo PDA36A2 como gatilho (fotodiodo 2) para a detecção síncrona. Para detecção síncrona foram utilizados um amplificador *Lock-in* da *Stanford Research Systems* modelo SR830 e um osciloscópio da marca *Tektronix*, modelo DPO4102B ou modelo TDS2022C, que foram utilizados para alcançar a maximização do sinal.

A amostra a ser imageada foi posicionada em uma platina de microscópio montada sobre dois motores de passo motorizados da marca *Thorlabs*. Um deles é o modelo LNR50SEK1, controlado por uma controladora BSC101; o outro pertence à série MTS50. O controle de posição de ambos os posicionadores, assim como o registro dos dados coletados pelo amplificador *lock-in*, foi automatizado por meio de um *software* dedicado. Para a produção das imagens, realizou-se o mapeamento da amostra: inicialmente, o sinal era maximizado com o auxílio de um osciloscópio, e, em seguida, os dados eram adquiridos automaticamente por uma rotina desenvolvida no *software* de automação.

Em complemento às imagens obtidas, foram adquiridos transientes para água ultrapura em cubeta de quartzo para diferentes caminhos ópticos e potências de excitação. Os transientes obtidos foram ajustados por meio de *software* dedicado. O ajuste foi feito para a intensidade luminosa derivada por Shen et al. [34]. A intensidade luminosa derivada é expressa pela equação (2.27). Devido à disposição espacial dos elementos ópticos, não foi possível realizar o perfilamento espacial dos feixes. Para obter o raio dos feixes nas respectivas cinturas e avaliar o alinhamento de ambos, foi utilizado um perfilador de feixe *Thorlabs* BP104-UV. Com os raios da cintura de cada feixe determinado, foi então possível utilizar o ajuste da intensidade luminosa para obter os parâmetros geométricos da montagem. Para isso, foi criada uma rotina que faz o ajuste dos parâmetros z_1 , t_c e θ . É possível ajustar os três parâmetros simultaneamente ao substituir os parâmetros m e V por suas definições na equação (2.27) de modo que a intensidade se torne uma função explícita de z_1 . Com z_1 , é possível calcular os parâmetros m e V através das equações equações (2.25) e (2.26), respectivamente; com t_c , caracterizar as propriedades térmicas do material; e com θ , caracterizar as propriedades ópticas do material. Os ajustes foram realizados em tempos curtos, de modo a contornar os efeitos transientes aditivos, tais como a convecção, que possuem um tempo característico maior. Em conjunto, foram feitas medidas em uma montagem convencional de lente térmica, os parâmetros dessa montagem estão expostos na tabela 3.2.

Tabela 3.2: Parâmetros geométricos da montagem usual de lente térmica utilizada.

z_1	z_2	z_{cp}	ω_{e0}	ω_{p1}	m	V
8,96 cm	6,10 m	1,56 cm	53,50 μm	326,70 μm	37,29	5,82

A figura 4.1 mostra os transientes para água ultrapura coletados no microscópio de lente térmica e ajustados para tempo curto, para cubeta de 10 mm com potência de excitação de 2,0 W e 3,0 W, e para cubeta de 2 mm com potência de excitação de 3,0 W. É possível notar que mesmo para tempos curtos ocorre uma descaracterização dos transientes coletados. Isso ocorre devido à alta irradiância, já que os valores obtidos para ω_{e0} e ω_{p0} são de 10,25 μm e 8,88 μm , respectivamente. Tal descaracterização é evidente, uma vez que as condições experimentais do microscópio montado não são previstas pelos modelos teóricos existentes para a descrição do experimento de lente térmica. Isso se deve, principalmente, ao fato de o feixe de excitação ser extremamente focado, o que provoca um acúmulo significativo de calor na região excitada. Como consequência, o acoplamento térmico — especialmente em cubetas com menor caminho óptico — torna-se muito mais intenso. Além disso, por ser altamente focado, o feixe diverge mais rapidamente, invalidando a suposição de raio constante comumente adotada nos modelos teóricos. Em particular, se observa o efeito de acoplamento térmico fortemente no transiente da subfigura (c) na figura 4.1.

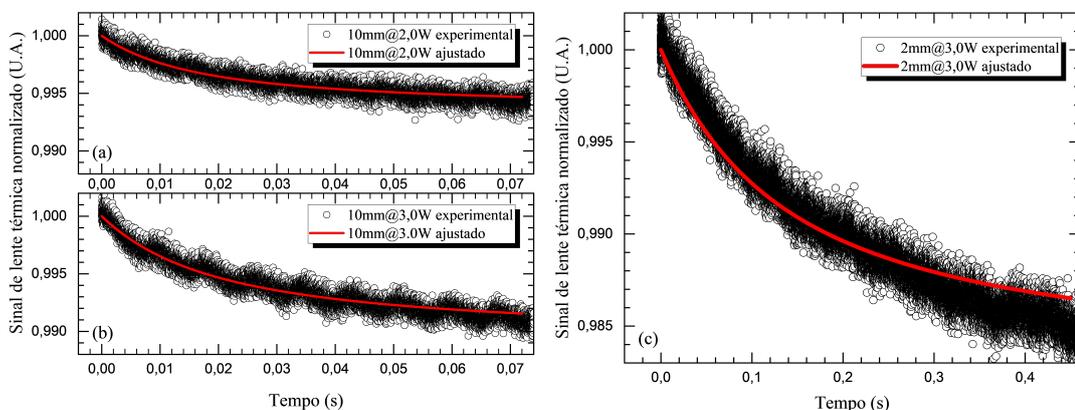


Figura 4.1: Transientes de lente térmica em tempos curtos para água ultrapura. (a) Medida realizada com cubeta de quartzo de 10 mm e potência de excitação de 2,0 W. (b) Medida realizada com cubeta de quartzo de 10 mm e potência de excitação de 3,0 W. (c) Medida realizada com cubeta de quartzo de 2 mm e potência de excitação de 3,0 W. Pontos pretos: dados experimentais; linha vermelha: ajuste teórico.

Fenômenos térmicos como convecção e difusão de calor se tornam mais relevantes quanto maior for a diferença de temperatura entre duas regiões da amostra ou entre a amostra e o meio que a circunda. Além disso, as teorias físicas utilizadas em muito dos casos são válidas para determinados regimes onde os fenômenos presentes respondem linearmente às mudanças nos parâmetros utilizados como, por exemplo, para a lei de Fourier para condução de calor – que em escalas espaciais sub-milimétricas ou para processos rápidos deixa de ser apropriada [44]. É possível notar as diferenças entre os transientes da figura 4.1 em relação à figura 4.2. Os transientes foram ajustados para os valores de θ e t_c da equação (2.27), a intensidade luminosa derivada por Shen et al. [34]. Com o valor de t_c podemos calcular o coeficiente de difusividade térmica pela equação (2.29). O valor médio das difusividades calculadas a partir do ajuste é de $(1,579 \pm 0,075) \cdot 10^{-7} m^2/s$, representando um desvio percentual de 9,4% do valor teórico da difusividade, calculada pela equação (2.7), sendo de $1,443 \cdot 10^{-7} m^2/s$.

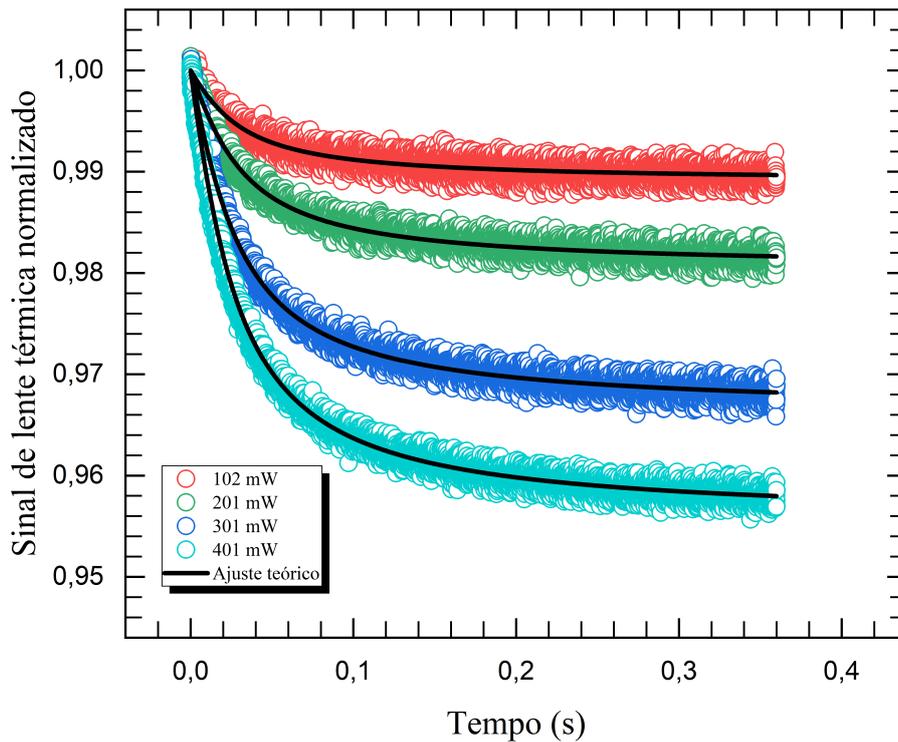


Figura 4.2: Transientes de lente térmica para água ultrapura em uma montagem convencional.

Adicionalmente, na tabela 4.1 estão os valores resultantes dos ajustes. Estima-se que z_1 seja da ordem de meio milímetro, pois como na montagem de microscopia de lente térmica utilizada ambos os feixes eram focados na amostra pela mesma lente, L_3 , a distância que separa os focos será somente devido à aberração cromática da própria lente. Desse modo, pode-se considerar que os valores encontrados para z_1 sejam adequados. Através da amplitude dos dados coletados estima-se que θ seja da ordem de 1% e, portanto, pode-se considerar que os valores encontrados pelos ajustes para θ também são adequados. O valor de t_c para água, calculado pela

equação (2.29), para a montagem utilizada é de $1,83 \times 10^{-4}$ s, o que comparado com os valores obtidos através dos ajustes é de duas ordens de magnitude diferente. Tomando os valores médios para t_c dos ajustes da tabela 4.1, encontra-se uma difusividade de $(7,588 \pm 6,408) \cdot 10^{-10}$ m^2/s , que representa um desvio percentual de 99,5%. O que se reflete nos gráficos da figura 4.1 como um ajuste inadequado, especialmente na subfigura (c) onde o transiente ajustado apresenta um comportamento limítrofe, particularmente no início e no fim da curva. Para os valores obtidos de z_1 obtidos pelo ajuste dos transientes da figura 4.1, pelas equações (2.25) e (2.26) se calcula que $m = 2,38$ e $V = 1,48$ para a montagem de microscopia realizada.

Tabela 4.1: Valores obtidos pelos ajustes dos transientes para água ultrapura.

medida	z_1 [$\times 10^{-4}$] m	t_c [$\times 10^{-2}$] s	θ
10 mm @ 2,0 W	5,934	0,999	0,009
10 mm @ 3,0 W	5,934	1,192	0,015
2 mm @ 3,0 W	5,937	8,195	0,024

A figura 4.3a apresenta o mapeamento de um vidro de CaBAI co-dopado com Európio e Prata, sendo o dado coletado através de um amplificador *Lock-in* e a parte estacionária do fenômeno observado. A Prata é escolhida como um dos co-dopantes, devido a sua capacidade de aprimoramento das propriedades de luminescência e absorção de metais terra-raras [80]. O aprimoramento ocorre devido a efeitos como a ressonância plasmônica de superfície causada por nanopartículas de Prata (AgNPs). Em particular, na amostra utilizada as AgNPs foram formadas pela nucleação da Prata pelo procedimento especificado por Sandrini [79].

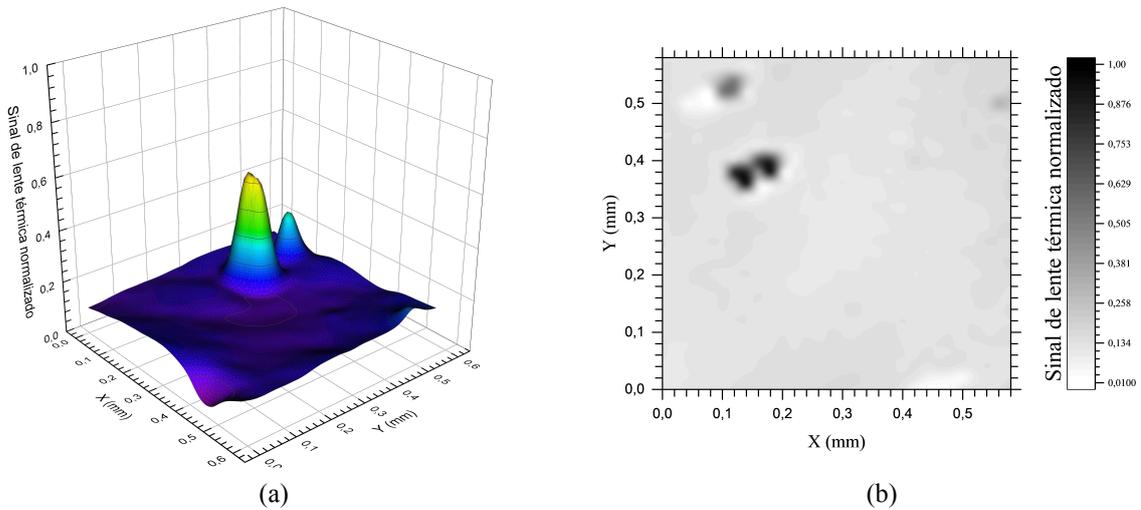


Figura 4.3: Mapeamento realizado em vidro CaBAI co-dopado com 2,5% de Európio e 3,0% de Prata. (a) Mapa tridimensional em que o eixo z representa a intensidade normalizada do sinal de lente térmica. (b) Mapa bidimensional da intensidade do sinal de lente térmica em escala de cinza.

Na figura 4.4 têm-se os transientes para o vidro de CaBAI co-dopado com Európio e Prata

em uma montagem convencional. Assim como no mapeamento, na presença das espécies opticamente ativas o sinal é crescente. Isto é uma característica inerente ao material em que o calor é gerado pela espécie absorvedora, que neste caso são os íons de Európio e as AgNPs confinadas na matriz vítrea. O calor então gerado pelas espécies absorvedoras causará o efeito de lente térmica na matriz. Portanto, o máximo observado em torno de $(0, 15; 0, 35)$ mm ocorre possivelmente devido a uma maior densidade de espécie absorvedoras na região. Porém, como a amplitude do sinal é muito maior na figura 4.3a do que na figura 4.4, sendo essa diferença possivelmente explicada devido à presença de um aglomerado de AgNPs.

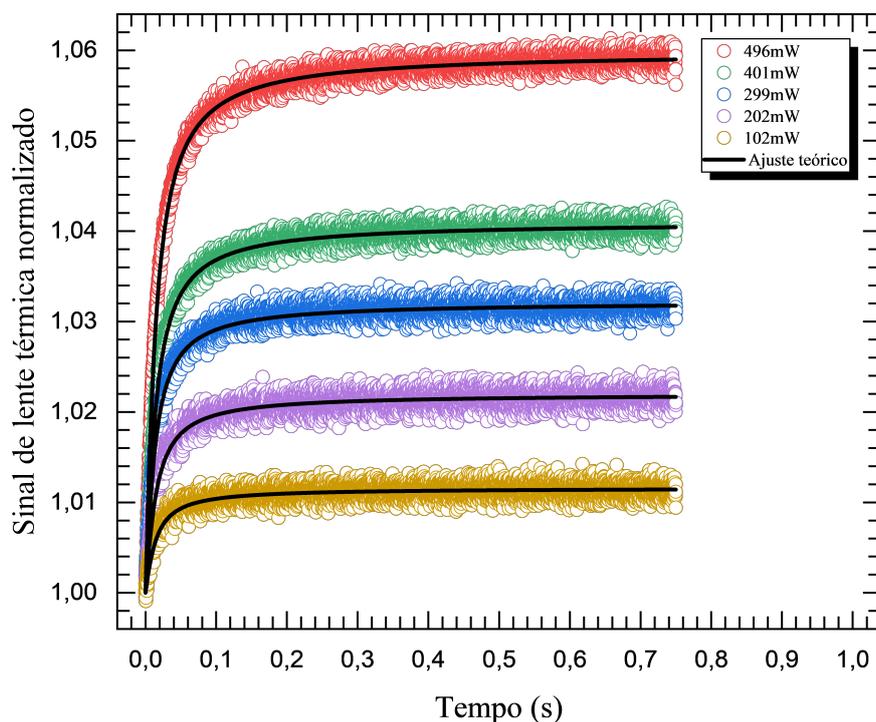


Figura 4.4: Transientes de lente térmica para o vidro de CaBAI co-dopado com Európio e Prata em uma montagem convencional.

A figura 4.6a apresenta o mapeamento de uma amostra histológica com preparação para uso em microscópio óptico, sendo o dado coletado através de um amplificador *Lock-in* e a parte estacionária do fenômeno observado. A amostra consiste em uma seção de tecido hepático bovino tingido com os corantes hematoxilina-eosina. Nessa amostra, os corantes agem como as espécies opticamente ativas na absorção do feixe de excitação e na produção de calor. Devido à homogeneidade do corante no tecido e do baixo poder de resolução do equipamento utilizado, nenhum detalhe relevante sobre a amostra foi destacado. O que se pode notar da figura 4.6a, na figura 4.5 se tem uma imagem óptica da amostra histológica utilizada, é a distinção entre as regiões populadas e não populadas por espécies opticamente ativas. Como o efeito total gerado na amostra gera um decréscimo na intensidade luminosa do feixe de prova, as regiões com a menor intensidade de sinal então indicam a presença das espécies opticamente ativas.

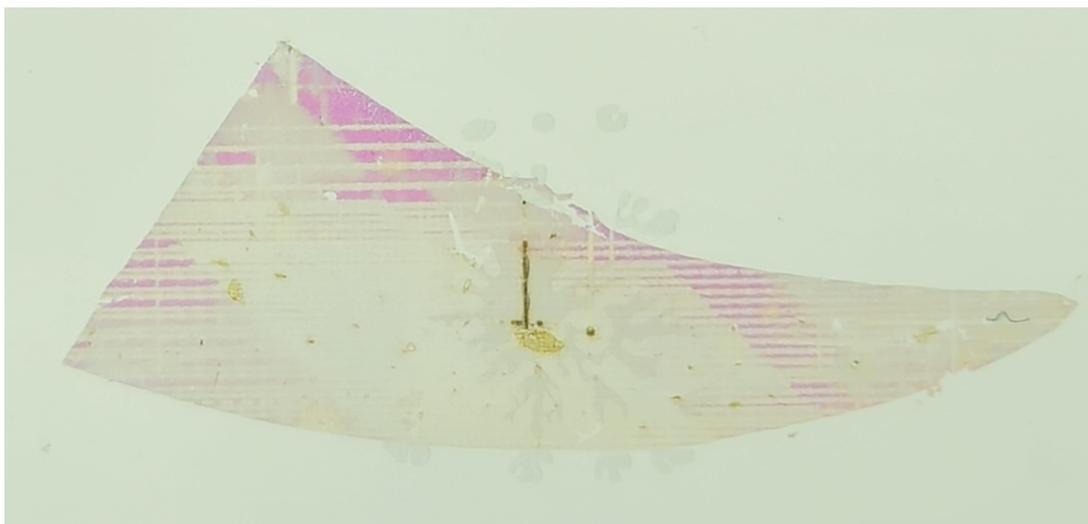


Figura 4.5: Fotografia da amostra de tecido hepático bovino utilizado. O tecido horizontalmente tem um comprimento de cerca de 1 *cm* e verticalmente tem um comprimento que chega até cerca de 5 *mm*. Fotografia tomada após as medidas realizadas.

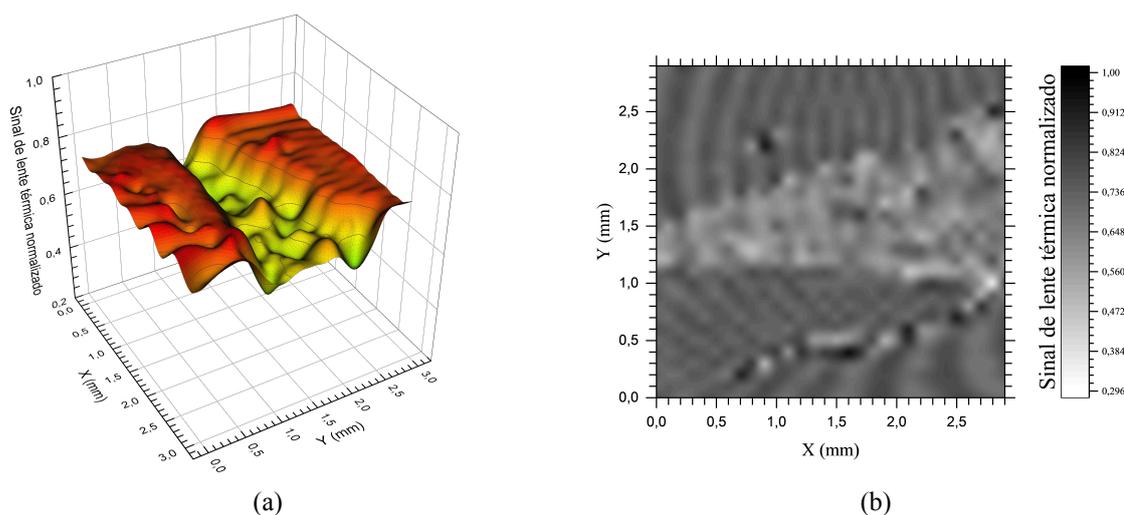


Figura 4.6: Mapeamento realizado em lâmina de microscopia preparada com tecido hepático bovino. (a) Mapa tridimensional em que o eixo z representa a intensidade normalizada do sinal de lente térmica. (b) Mapa bidimensional da intensidade do sinal de lente térmica em escala de cinza.

Complementarmente, tem-se a figura 4.7, em que estão expostos os transientes para a amostra histológica de tecido hepático bovino. Diferentemente da água e do CaBAI co-dopado, não foi realizado o ajuste teórico para essa amostra. Isso se deve ao fato de que, por causa do tingimento do tecido, podem surgir efeitos como fotoreações, que poderiam ser investigadas por meio da variação do comprimento de onda da excitação. Outro fator complicador é a espessura micrométrica do tecido, que pode causar acoplamento térmico com o substrato — o calor gerado na amostra flui para o vidro da lâmina onde o tecido está posicionado, contribuindo assim para o sinal detectado. Além disso, devido à disposição do substrato (composto pela lâmina e lamínula de microscopia), pode ocorrer o fenômeno de interferência óptica, sendo que quanto mais paralelas forem a lâmina e a lamínula, mais intenso será esse efeito.

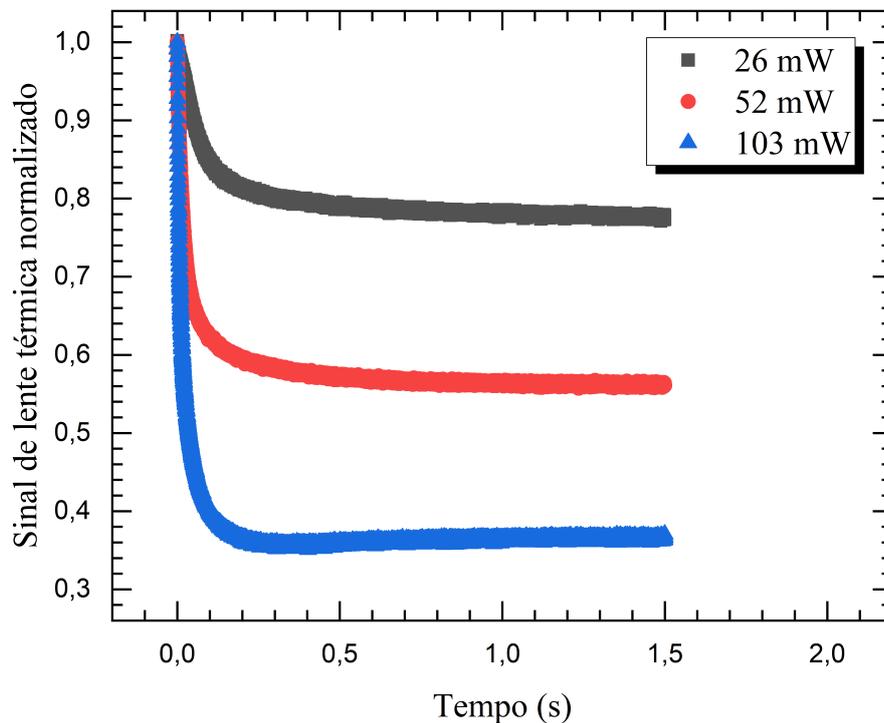


Figura 4.7: Transientes de lente térmica para o tecido hepático bovino tingido com hematoxilina-eosina em uma montagem convencional.

Foi observado que, em virtude das dimensões reduzidas dos feixes, o procedimento de maximização apresentava elevada complexidade e lentidão, o que constituía uma limitação significativa no caso de amostras fotossensíveis. Adicionalmente, o alinhamento dos elementos ópticos mostrou-se sensível a pequenos desvios, os quais podem comprometer a confiabilidade dos resultados. Nesse procedimento, uma única correção de alinhamento era realizada antes do início do mapeamento, com o objetivo de sobrepor os centros dos feixes de excitação e de prova. A figura 4.8 apresenta uma ilustração comparativa entre a disposição espacial dos feixes utilizada nesta montagem (caso inferior) e aquela encontrada na literatura (caso superior). Em particular, destaca-se que, na montagem utilizada, os feixes se interceptam em uma posição fora do centro, o que contribuiu para o aumento da complexidade do procedimento de maximização. Por outro lado, na configuração descrita na literatura, os feixes se mantêm sempre na mesma posição, restando apenas a distância entre a amostra e a lente como grau de liberdade para a maximização.

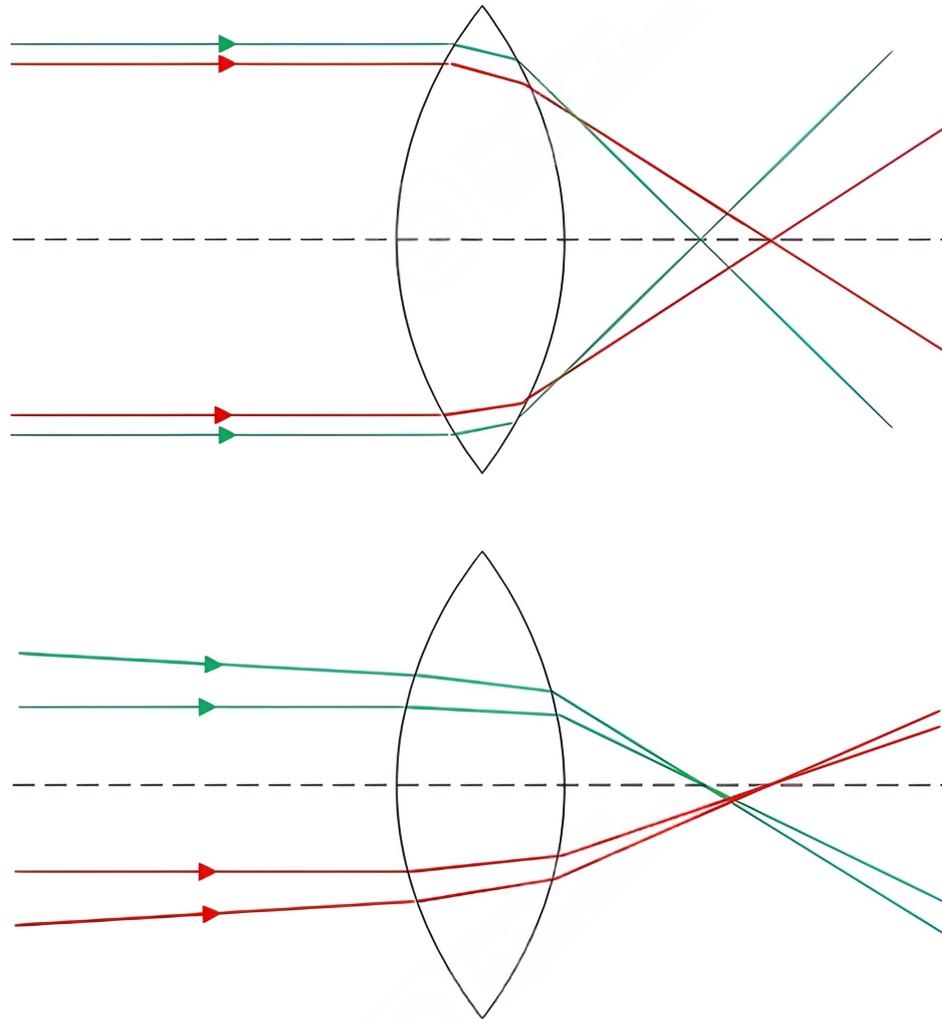


Figura 4.8: Ilustração do comportamento dos feixes de excitação e de prova ao atravessarem uma lente. Na ilustração superior, os feixes chegam à lente com tamanho equivalente ao da lente. Na ilustração inferior, os feixes chegam menores que a lente e não estão perfeitamente alinhados com ela. A ilustração não está em escala real, e certos efeitos foram intencionalmente amplificados para facilitar a visualização.

O presente estudo teve como objetivo principal a instrumentação da técnica de microscopia de lente térmica, abordando desde os fundamentos teóricos até sua implementação experimental. A técnica em questão consiste na integração entre os princípios da lente térmica e os da microscopia, aproveitando os benefícios de ambas as áreas. A utilização de raios reduzidos, viabilizada pelo uso de objetivas de microscópio, intensifica os efeitos térmicos, resultando em maior sensibilidade e capacidade de detecção até o nível de molécula única. Além disso, o volume reduzido de amostra submetido à análise possibilita uma realização experimental mais eficiente e econômica em termos de reagentes. No entanto, é necessário ter cautela, pois o uso de feixes de raios reduzidos também pode favorecer a manifestação de efeitos térmicos indesejados. Por fim, a técnica permite o mapeamento espacial de amostras, possibilitando a obtenção de imagens associadas à difusividade térmica, análogas às imagens de transmissão em microscopia óptica.

Foram realizadas medidas em água ultrapura, vidro CaBAI co-dopado com Európio e Prata, e tecido hepático bovino corado com hematoxilina-eosina. Os transientes térmicos foram obtidos por meio do microscópio de lente térmica e de uma montagem convencional da técnica, além do mapeamento da difusividade térmica das amostras por meio do microscópio. Apesar das limitações impostas pelo arranjo experimental adotado, os resultados obtidos demonstraram consistência com os relatos da literatura. Além disso, destaca-se que a microscopia de lente térmica requer a presença de espécies opticamente ativas no material para efetiva absorção da luz de excitação, sendo, portanto, mais adequada para o estudo de amostras que contenham moléculas ou átomos que sirvam de alvo para a análise de suas características He et al. [76]. Em síntese, a instrumentação desenvolvida constitui uma base robusta para a exploração da microscopia de lente térmica em aplicações multidisciplinares e como alternativa as técnicas de microscopia disponíveis na atualidade.

Como perspectiva para a continuidade deste trabalho, propõe-se a reestruturação da confi-

guração experimental, visando contornar as limitações identificadas nas medições realizadas. Entre as melhorias sugeridas com base na literatura, destacam-se: a incidência dos feixes por baixo da amostra; a utilização de uma segunda objetiva, com a função de coletar os feixes e reduzir sua divergência até o sensor; e o preenchimento completo da entrada da primeira objetiva pelos feixes, contribuindo para minimizar a dificuldade no processo de maximização do sinal. Além disso, a substituição do *laser* de excitação por um *laser* sintonizável permitirá a realização de medidas espectroscópicas, ampliando as possibilidades analíticas para além das espectrométricas já utilizadas. A padronização do protocolo de medição e a otimização da rotina de aquisição de dados também são consideradas fundamentais para garantir maior reprodutibilidade e eficiência nos experimentos. Por fim, destaca-se a relevância do estudo do acoplamento da técnica com outras metodologias de análise química, com ênfase especial na microfluídica, visando ampliar as aplicações e o controle sobre as condições experimentais.

BIBLIOGRAFIA

- [1] William J. Croft. *Under the Microscope: A Brief History of Microscopy*. Vol. 5. Series in Popular Science. World Scientific Publishing Company, 2006. ISBN: 9789810237813. DOI: [10.1142/4034](https://doi.org/10.1142/4034).
- [2] Center for Non-Destructive Evaluation, Iowa State University. *Nondestructive Evaluation Techniques: Penetrant – Visual Acuity*. 2021. URL: <https://www.nde-ed.org/NDETechniques/PenetrantTest/Introduction/visualacuity.xhtml> (acesso em 08/07/2025).
- [3] David Bardell. “The Invention of the Microscope”. Em: *Bios* 75.2 (2004), pp. 78–84. ISSN: 00053155. URL: <http://www.jstor.org/stable/4608700>.
- [4] Douglas B. Murphy e Michael W. Davidson. *Fundamentals Of Light Microscopy And Electronic Imaging*. 2nd. Wiley-Blackwell, 2013. ISBN: 978-0-471-69214-0. DOI: [10.1002/9781118382905](https://doi.org/10.1002/9781118382905).
- [5] Wikimedia Commons. *File:Leeuwenhoek Microscope.png* — *Wikimedia Commons, the free media repository*. [Online; acessado 12-Maio-2025]. 2022. URL: https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Leeuwenhoek_Microscope.png.
- [6] Abbe Hon. “The Relation of Aperture and Power in the Microscope (continued).” Em: *Journal of the Royal Microscopical Society* 2.4 (1882), pp. 460–473. DOI: [10.1111/j.1365-2818.1882.tb04805.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1882.tb04805.x).
- [7] Stefan W Hell e Jan Wichmann. “Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy”. Em: *Optics letters* 19.11 (1994), pp. 780–782. DOI: [10.1364/OL.19.000780](https://doi.org/10.1364/OL.19.000780).
- [8] Weilie Zhou, Robert Apkarian, Zhong Lin Wang e David Joy. “Fundamentals of Scanning Electron Microscopy (SEM)”. Em: *Scanning Microscopy for Nanotechnology: Techniques and Applications*. Ed. por Weilie Zhou e Zhong Lin Wang. New York, NY: Springer New York, 2007, pp. 1–40. ISBN: 978-0-387-39620-0. DOI: [10.1007/978-0-387-39620-0_1](https://doi.org/10.1007/978-0-387-39620-0_1).
- [9] Ufuk Yilmaz, Gustavo V. B. Lukasiewicz, Elizandra Sehn, Yide Zhang, Nelson G. C. Astrath, Georg Ramer e Bernhard Lendl. “Novel insights into nanoscale surface displacement detection in polystyrene thin films using photothermal mirror- and atomic force microscopy-mid-IR spectroscopy”. Em: *RSC Adv*. 15 (12 2025), pp. 9243–9253. DOI: [10.1039/D5RA00555H](https://doi.org/10.1039/D5RA00555H).
- [10] Stephen E. Bialkowski, Nelson G. C. Astrath e Mikhail A. Proskurnin. *Photothermal Spectroscopy Methods*. John Wiley & Sons, Inc., 2019. DOI: [10.1002/9781119279105](https://doi.org/10.1002/9781119279105).
- [11] A. Mandelis. *Principles and Perspectives of Photothermal and Photoacoustic Phenomena*. Elsevier Series in Practical Aspects of Criminal and Forensi. Elsevier, 1992.
- [12] Muhammad Asif Hanif, Farwa Nadeem, Rida Tariq e Umer Rashid. “Chapter 4 - Solar thermal energy and photovoltaic systems”. Em: *Renewable and Alternative Energy Resources*. Ed. por Muhammad Asif Hanif, Farwa Nadeem, Rida Tariq e Umer Rashid. Academic Press, 2022, pp. 171–261. ISBN: 978-0-12-818150-8. DOI: [10.1016/B978-0-12-818150-8.00007-1](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818150-8.00007-1).
- [13] A. G. Bell. “On the production and reproduction of sound by light”. Em: *American Journal of Science* s3-20.118 (out. de 1880), pp. 305–324. DOI: [10.2475/ajs.s3-20.118.305](https://doi.org/10.2475/ajs.s3-20.118.305).
- [14] ML Viengerov. “New method of gas analysis based on tyndall-roentgen optoacoustic effect”. Em: *Doklady Akademii Nauk SSSR* 19.687 (1938), p. 8.
- [15] Jhonatan W. Berrar. “Investigação das propriedades ópticas, térmicas e fotoativas de corantes dpp por meio da espectroscopia de lente térmica resolvida no tempo”. Diss. de maestr. Universidade Estadual de Maringá, 2022.
- [16] Paulo R B Pedreira et al. “Observation Of Laser Induced Photochemical Reaction Of Cr(VI) Species In Water During Thermal Lens Measurements”. Em: *Chemical Physics Letters* 396 (2004), pp. 221–225. DOI: [10.1016/J.CPLETT.2004.07.085](https://doi.org/10.1016/J.CPLETT.2004.07.085).

-
- [17] N. J. Dovichi e J. M. Harris. “Laser induced thermal lens effect for calorimetric trace analysis”. Em: *Analytical Chemistry* 51.6 (mai. de 1979), pp. 728–731. DOI: [10.1021/ac50042a034](https://doi.org/10.1021/ac50042a034).
- [18] N. G. C. Astrath et al. “A 3-dimensional time-resolved photothermal deflection “Mirage” method”. Em: *Applied Physics Letters* 100.9 (mar. de 2012), p. 091908. DOI: [10.1063/1.3691253](https://doi.org/10.1063/1.3691253).
- [19] R R Pezarini et al. “On the use of photothermal techniques to study NiTi phase transitions”. Em: *Materials Research Express* 1.2 (mai. de 2014), p. 026502. DOI: [10.1088/2053-1591/1/2/026502](https://doi.org/10.1088/2053-1591/1/2/026502).
- [20] Zhibin Wang, Shuzhe Li, Rong Chen, Xun Zhu e Qiang Liao. “Simulation on the dynamic flow and heat and mass transfer of a liquid column induced by the IR laser photothermal effect actuated evaporation in a microchannel”. Em: *International Journal of Heat and Mass Transfer* 113 (2017), pp. 975–983. DOI: [10.1016/j.ijheatmasstransfer.2017.05.123](https://doi.org/10.1016/j.ijheatmasstransfer.2017.05.123).
- [21] J H Rohling, A N Medina, A C Bento, J R D Pereira, A F Rubira, M L Baesso e L C M Miranda. “Differential thermal lens temperature scanning approach to glass transition analysis in polymers: application to polycarbonate”. Em: *Journal of Physics D: Applied Physics* 34.3 (fev. de 2001), p. 407. DOI: [10.1088/0022-3727/34/3/326](https://doi.org/10.1088/0022-3727/34/3/326).
- [22] G. A. S. Flizikowski et al. “Laser induced thermoelastic surface displacement in solids detected simultaneously by photothermal mirror and interferometry”. Em: *Opt. Express* 28.5 (mar. de 2020), pp. 7116–7124. DOI: [10.1364/OE.386344](https://doi.org/10.1364/OE.386344).
- [23] H. Vargas e L.C.M. Miranda. “Photoacoustic and related photothermal techniques”. Em: *Physics Reports* 161.2 (1988), pp. 43–101. DOI: [10.1016/0370-1573\(88\)90100-7](https://doi.org/10.1016/0370-1573(88)90100-7).
- [24] Jianjun Zhou, Shen Xu e Jing Liu. “Review of Photothermal Technique for Thermal Measurement of Micro-/Nanomaterials”. Em: *Nanomaterials* 12.11 (2022). DOI: [10.3390/nano12111884](https://doi.org/10.3390/nano12111884).
- [25] J. P. Gordon, R. C. C. Leite, R. S. Moore, S. P. S. Porto e J. R. Whinnery. “Long-transient Effects In Lasers With Inserted Liquid Samples”. Em: *Journal of Applied Physics* 36.1 (jan. de 1965), pp. 3–8. DOI: [10.1063/1.1713919](https://doi.org/10.1063/1.1713919).
- [26] Ajoy K. Ghatak e K. Thyagarajan. “Paraxial Ray Optics”. Em: *Contemporary Optics*. Boston, MA: Springer US, 1978, pp. 1–29. ISBN: 978-1-4684-2358-7. DOI: [10.1007/978-1-4684-2358-7_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-2358-7_1).
- [27] Norbert Lindlein e Gerd Leuchs. “Geometrical Optics”. Em: *Springer Handbook of Lasers and Optics*. Ed. por Frank Träger. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012, pp. 35–87. ISBN: 978-3-642-19409-2. DOI: [10.1007/978-3-642-19409-2_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-19409-2_2).
- [28] Klaus E. Rieckhoff. “Self-induced Divergence Of CW Laser Beams In Liquids-a New Nonlinear Effect In The Propagation Of Light”. Em: *Applied Physics Letters* 9 (1966), pp. 87–88. DOI: [10.1063/1.1754655](https://doi.org/10.1063/1.1754655).
- [29] Wikimedia Commons. *File:Spherical aberration 2.svg* — *Wikimedia Commons, the free media repository*. [Online; acessado 2-Abril-2025]. 2021. URL: https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Spherical_aberration_2.svg.
- [30] Frederick R Grabiner, Donald R Siebert e George W Flynn. “Laser induced time-dependent thermal lensing studies of vibrational relaxation: translational cooling in CH₃F”. Em: *Chemical Physics Letters* 17.2 (1972), pp. 189–194. DOI: [10.1016/0009-2614\(72\)87051-9](https://doi.org/10.1016/0009-2614(72)87051-9).
- [31] Chenming Hu e J. R. Whinnery. “New Thermo-optical Measurement Method And A Comparison With Other Methods”. Em: *Appl. Opt.* 12.1 (jan. de 1973), pp. 72–79. DOI: [10.1364/AO.12.000072](https://doi.org/10.1364/AO.12.000072).
- [32] Michael E. Long, Robert L. Swofford e Andreas C. Albrecht. “Thermal Lens Technique: A New Method Of Absorption Spectroscopy.” Em: *Science* 191 4223 (1976), pp. 183–5. DOI: [10.1126/SCIENCE.1246605](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1246605).
- [33] S. J. Sheldon, Larry V. Knight e James Michael Thorne. “Laser-induced Thermal Lens Effect: A New Theoretical Model.” Em: *Applied optics* 21 9 (1982), pp. 1663–9. DOI: [10.1364/AO.21.001663](https://doi.org/10.1364/AO.21.001663).
- [34] Jun Shen, Roger D. Lowe e Richard D. Snook. “A Model For CW Laser Induced Mode-mismatched Dual-beam Thermal Lens Spectrometry”. Em: *Chemical Physics* 165 (1992), pp. 385–396. DOI: [10.1016/0301-0104\(92\)987053-C](https://doi.org/10.1016/0301-0104(92)987053-C).
- [35] Luis Carlos Malacarne et al. “Soret Effect And Photochemical Reaction In Liquids With Laser-induced Local Heating.” Em: *Optics express* 19 5 (2011), pp. 4047–58. DOI: [10.1364/OE.19.004047](https://doi.org/10.1364/OE.19.004047).
- [36] Luis Carlos Malacarne, E. L. Savi, Mauro Luciano Baesso, Ervin K. Lenzi e Nelson Guilherme Castelli Astrath. “Role Of Photophysics Processes In Thermal Lens Spectroscopy Of Fluids: A Theoretical Study.” Em: *The journal of physical chemistry. A* 118 31 (2014), pp. 5983–8. DOI: [10.1021/jp505255a](https://doi.org/10.1021/jp505255a).
- [37] Luis C. Malacarne, Nelson G. C. Astrath, Gustavo V. B. Lukasiewicz, Ervin K. Lenzi, Mauro L. Baesso e Stephen E. Bialkowski. “Time-resolved Thermal Lens And Thermal Mirror Spectroscopy With Sample-fluid Heat Coupling: A Complete Model For Material Characterization”. Em: *Appl. Spectrosc.* 65.1 (jan. de 2011), pp. 99–104. DOI: [10.1366/10-06096](https://doi.org/10.1366/10-06096).
- [38] Luis C. Malacarne, Nelson G. C. Astrath e Mauro L. Baesso. “Unified theoretical model for calculating laser-induced wavefront distortion in optical materials”. Em: *J. Opt. Soc. Am. B* 29.7 (jun. de 2012), pp. 1772–1777. DOI: [10.1364/JOSAB.29.001772](https://doi.org/10.1364/JOSAB.29.001772).
-

-
- [39] Luis Carlos Malacarne, Nelson Guilherme Castelli Astrath e Leandro S. Herculano. “Laser-induced Wavefront Distortion In Optical Materials: A General Model”. Em: *Journal of The Optical Society of America B-optical Physics* 29 (2012), pp. 3355–3359. DOI: [10.1364/JOSAB.29.003355](https://doi.org/10.1364/JOSAB.29.003355).
- [40] A.J. Twarowski e D.S. Kliger. “Multiphoton absorption spectra using thermal blooming: II. Two-photon spectrum of benzene”. Em: *Chemical Physics* 20.2 (1977), pp. 259–264. DOI: [10.1016/0301-0104\(77\)85030-1](https://doi.org/10.1016/0301-0104(77)85030-1).
- [41] John R. Barker e Tuvia Rothem. “Theory of the time-dependent-thermal-lensing (TDTL) technique as used in energy-transfer experiments”. Em: *Chemical Physics* 68.3 (1982), pp. 331–339. DOI: [10.1016/0301-0104\(82\)87040-7](https://doi.org/10.1016/0301-0104(82)87040-7).
- [42] J. F. Power. “Pulsed Mode Thermal Lens Effect Detection In The Near Field Via Thermally Induced Probe Beam Spatial Phase Modulation: A Theory”. Em: *Appl. Opt.* 29.1 (jan. de 1990), pp. 52–63. DOI: [10.1364/AO.29.000052](https://doi.org/10.1364/AO.29.000052).
- [43] Nelson G. C. Astrath, Luis C. Malacarne, Gustavo V. B. Lukasiewicz, Marcos P. Belancon, Mauro L. Baesso, Prakash R. Joshi e Stephen E. Bialkowski. “Pulsed-laser Excited Thermal Lens Spectroscopy With Sample-fluid Heat Coupling”. Em: *Journal of Applied Physics* 107.8 (abr. de 2010), p. 083512. DOI: [10.1063/1.3372726](https://doi.org/10.1063/1.3372726).
- [44] Aleksandr Igorevich Zhmakin. “Heat conduction beyond the Fourier law”. Em: *Technical Physics* 66 (2021), pp. 1–22. DOI: [10.1134/S1063784221010242](https://doi.org/10.1134/S1063784221010242).
- [45] G. Lebon, H. Machrafi, M. Grmela e Ch. Dubois. “An extended thermodynamic model of transient heat conduction at sub-continuum scales”. Em: *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 467.2135 (2011), pp. 3241–3256. DOI: [10.1098/rspa.2011.0087](https://doi.org/10.1098/rspa.2011.0087).
- [46] E. Fermi. *Thermodynamics*. Dover books in physics and mathematical physics. Dover Publications, 1956. ISBN: 9780486603612.
- [47] H. S. Carslaw e J. C. Jaeger. *Conduction Heat In Solids*. Oxford University Press, 1959.
- [48] J.R. Cannon. *The One-Dimensional Heat Equation*. Encyclopedia of Mathematics and its Applications. Cambridge University Press, 1984. ISBN: 9780521302432. DOI: [10.1017/CB09781139086967](https://doi.org/10.1017/CB09781139086967).
- [49] Anthony Edward Siegman. *An introduction to lasers and masers*. McGraw-Hill, 1978.
- [50] Anthony E. Siegman. *Lasers*. Univ. Sci. Bks., 1990. ISBN: 9780198557135.
- [51] L. Debnath e D. Bhatta. *Integral Transforms and Their Applications, Third Edition*. Taylor & Francis, 2014. ISBN: 9781482223576. DOI: [10.1201/b17670](https://doi.org/10.1201/b17670).
- [52] Vitor S. Zanuto. “Efeito de amostra finita na espectroscopia de espelho térmico”. Diss. de mestr. Universidade Estadual de Maringá, 2012.
- [53] Paulo R. B. Pedreira. “Desenvolvimento de um protótipo de lente térmica resolvida no tempo para estudos de líquidos em condições transitórias em tempo real”. Tese de dout. Universidade Estadual de Maringá, 2005.
- [54] Jhonatan Willian Berrar et al. “Diketopyrrolopyrrole-based organic dyes and their laser-induced photoactive response”. Em: *Journal of Molecular Liquids* 398 (2024), p. 124208. DOI: [10.1016/j.molliq.2024.124208](https://doi.org/10.1016/j.molliq.2024.124208).
- [55] Clifford E Buffett e Michael D Morris. “Microcell thermal lens detector for liquid chromatography”. Em: *Analytical Chemistry* 55.2 (1983), pp. 376–378. DOI: [10.1021/ac00253a045](https://doi.org/10.1021/ac00253a045).
- [56] Michael J Sepaniak, John D Vargo, Charles N Kettler e Michael P Maskarinec. “Open tubular liquid chromatography with thermal lens detection”. Em: *Analytical Chemistry* 56.8 (1984), pp. 1252–1257. DOI: [10.1021/ac00272a014](https://doi.org/10.1021/ac00272a014).
- [57] D. S. Burgi, W. A. Weimer, T. G. Nolan e N. J. Dovichi. “Crossed-beam thermal lens microscope”. Em: *AIP Conference Proceedings* 146 (1986), pp. 664–667. DOI: [10.1063/1.35820](https://doi.org/10.1063/1.35820).
- [58] D S Burgi e Norman J Dovichi. “Submicrometer resolution images of absorbance and thermal diffusivity with the photothermal microscope”. Em: *Applied optics* 26.21 (1987), pp. 4665–4669. DOI: [10.1364/AO.26.004665](https://doi.org/10.1364/AO.26.004665).
- [59] Masaaki Harada, Kouji Iwamoto, Takehiko Kitamori e Tsuguo Sawada. “Photothermal microscopy with excitation and probe beams coaxial under the microscope and its application to microparticle analysis”. Em: *Analytical Chemistry* 65.20 (1993), pp. 2938–2940. DOI: [10.1021/ac00068a037](https://doi.org/10.1021/ac00068a037).
- [60] Masaaki Harada, Masashi Shibata, Takehiko Kitamori e Tsuguo Sawada. “Application of coaxial beam photothermal microscopy to the analysis of a single biological cell in water”. Em: *Analytica chimica acta* 299.3 (1995), pp. 343–347. DOI: [10.1016/0003-2670\(94\)00314-C](https://doi.org/10.1016/0003-2670(94)00314-C).
- [61] Masaaki Harada, Masashi Shibata, Takehiko Kitamori e Tsuguo Sawada. “Sub-Attomole Molecule Detection in a Single Biological Cell in-vitro by Thermal Lens Microscopy”. Em: *Analytical Sciences* 15.7 (1999), pp. 647–650. DOI: [10.2116/analsci.15.647](https://doi.org/10.2116/analsci.15.647).
- [62] Manabu Tokeshi, Marika Uchida, Kenji Uchiyama, Tsuguo Sawada e Takehiko Kitamori. “Single- and countable-molecule detection of non-fluorescent molecules in liquid phase”. Em: *Journal of Luminescence* 83–84 (set. de 1999), pp. 261–264. DOI: [10.1016/s0022-2313\(99\)00109-x](https://doi.org/10.1016/s0022-2313(99)00109-x).
-

-
- [63] Kiyoshi Sato, Hiroaki Kawanishi, Manabu Tokeshi, Takehiko Kitamori e Tsuguo Sawada. “Sub-zeptomole detection in a microfabricated glass channel by thermal-lens microscopy”. Em: *Analytical Sciences* 15.6 (jun. de 1999), pp. 525–529. DOI: [10.2116/analsci.15.525](https://doi.org/10.2116/analsci.15.525).
- [64] Kiyoshi Sato, Manabu Tokeshi, Takehiko Kitamori e Tsuguo Sawada. “Integration of flow injection analysis and Zeptomole-level detection of the fe(ii)-o-phenanthroline complex”. Em: *Analytical Sciences* 15.7 (jul. de 1999), pp. 641–645. DOI: [10.2116/analsci.15.641](https://doi.org/10.2116/analsci.15.641).
- [65] Kenji Uchiyama, Akihito Hibara, Hiroko Kimura, Tsuguo Sawada e Takehiko Kitamori. “Thermal Lens Microscope”. Em: *Japanese Journal of Applied Physics* 39.9R (jul. de 2000), p. 5316. DOI: [10.1143/JJAP.39.5316](https://doi.org/10.1143/JJAP.39.5316).
- [66] Eiichiro Tamaki, Kiichi Sato, Manabu Tokeshi, Kae Sato, Makoto Aihara e Takehiko Kitamori. “Single-Cell Analysis by a Scanning Thermal Lens Microscope with a Microchip: Direct Monitoring of Cytochrome c Distribution during Apoptosis Process”. Em: *Analytical Chemistry* 74.7 (2002), pp. 1560–1564. DOI: [10.1021/ac011092t](https://doi.org/10.1021/ac011092t).
- [67] V. S. Dudko, A. P. Smirnova, M. A. Proskurnin, A. Hibara e T. Kitamori. “Thermal lens detection in microfluidic chips”. Em: *Russian Journal of General Chemistry* 82.12 (2012), pp. 2146–2153. DOI: [10.1134/S1070363212120341](https://doi.org/10.1134/S1070363212120341).
- [68] Mingqiang Liu e Mladen Franko. “Progress in Thermal Lens Spectrometry and Its Applications in Microscale Analytical Devices”. Em: *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 44.4 (2014), pp. 328–353. DOI: [10.1080/10408347.2013.869171](https://doi.org/10.1080/10408347.2013.869171).
- [69] Robert D. Guenther. “Appendix 5-B: Aberrations”. Em: *Modern Optics*. John Wiley & Sons, 1990, pp. 191–212. ISBN: 978-0-471-51288-2.
- [70] Mingqiang Liu, Uroš Novak, Igor Plazl e Mladen Franko. “Optimization of a thermal lens microscope for detection in a microfluidic chip”. Em: *International Journal of Thermophysics* 35 (2014), pp. 2011–2022. DOI: [10.1007/s10765-013-1515-y](https://doi.org/10.1007/s10765-013-1515-y).
- [71] Julien Moreau e Vincent Loriette. “Confocal thermal-lens microscope”. Em: *Opt. Lett.* 29.13 (jun. de 2004), pp. 1488–1490. DOI: [10.1364/OL.29.001488](https://doi.org/10.1364/OL.29.001488).
- [72] Julien Moreau e Vincent Loriette. “Confocal Dual-Beam Thermal-Lens Microscope: Model and Experimental Results”. Em: *Japanese Journal of Applied Physics* 45.9R (set. de 2006), p. 7141. DOI: [10.1143/JJAP.45.7141](https://doi.org/10.1143/JJAP.45.7141).
- [73] Mingqiang Liu, Dorota Korte e Mladen Franko. “Theoretical Description Of Thermal Lens Spectrometry In Micro Space”. Em: *Journal of Applied Physics* 111.3 (fev. de 2012), p. 033109. DOI: [10.1063/1.3682481](https://doi.org/10.1063/1.3682481).
- [74] Oluwatosin O. Dada, Peter E. Feist e Norman J. Dovichi. “Thermal diffusivity imaging with the thermal lens microscope”. Em: *Appl. Opt.* 50.34 (dez. de 2011), pp. 6336–6342. DOI: [10.1364/AO.50.006336](https://doi.org/10.1364/AO.50.006336).
- [75] Dmitry A. Nedosekin, Ekaterina I. Galanzha, Enkeleda Dervishi, Alexandru S. Biris e Vladimir P. Zharov. “Super-Resolution Nonlinear Photothermal Microscopy”. Em: *Small* 10.1 (2014), pp. 135–142. DOI: [10.1002/smll.201300024](https://doi.org/10.1002/smll.201300024).
- [76] Jinping He, Nan Wang, Hiromichi Tsurui, Masashi Kato, Machiko Iida e Takayoshi Kobayashi. “Noninvasive, label-free, three-dimensional imaging of melanoma with confocal photothermal microscopy: Differentiate malignant melanoma from benign tumor tissue”. Em: *Scientific Reports* 6.1 (2016). DOI: [10.1038/srep30209](https://doi.org/10.1038/srep30209).
- [77] Delong Zhang, Chen Li, Chi Zhang, Mikhail N. Slipchenko, Gregory Eakins e Ji-Xin Cheng. “Depth-resolved mid-infrared photothermal imaging of living cells and organisms with submicrometer spatial resolution”. Em: *Science Advances* 2.9 (2016), e1600521. DOI: [10.1126/sciadv.1600521](https://doi.org/10.1126/sciadv.1600521).
- [78] Hisashi Shimizu, Chihchen Chen, Yoshiyuki Tsuyama, Takehiko Tsukahara e Takehiko Kitamori. “Photothermal spectroscopy and micro/nanofluidics”. Em: *Journal of Applied Physics* 132.6 (ago. de 2022), p. 060902. DOI: [10.1063/5.0097665](https://doi.org/10.1063/5.0097665).
- [79] Marcelo Sandrini. “Estudo de efeitos de nanopartículas de prata sobre as propriedades espectroscópicas de vidros cálcio boroaluminato dopados com európio”. Tese de dout. Universidade Estadual de Maringá, 2016.
- [80] Marcelo Sandrini et al. “Enhanced and tunable white light emission from Ag nanoclusters and Eu³⁺-co-doped CaBAI glasses”. Em: *RSC Adv.* 8 (61 2018), pp. 35263–35270. DOI: [10.1039/C8RA07114D](https://doi.org/10.1039/C8RA07114D).
-