

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE FÍSICA “GLEB WATAGHIN”

Ferramenta Biofotônica Integrada
para Manipulações e Microscopias
Confocais

Dissertação de Mestrado

André Alexandre de Thomaz

Orientador: Prof. Dr. Carlos Lenz Cesar

Banca Examinadora

Prof. Dra. Lorena Pozzo – IFGW/Unicamp

Prof. Dr. Konradin Metze – FCM/Unicamp

Este exemplar corresponde a redação final da dissertação de mestrado defendida pelo aluno André Alexandre de Thomaz e aprovada pela comissão julgadora.



Prof. Dr. Carlos Lenz Cesar

Campinas, dezembro de 2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO IFGW - UNICAMP**

Thomaz, Andre Alexandre de

T368f

Ferramenta biofotônica integrada para manipulações e microscopias confocais / Andre Alexandre de Thomaz.-- Campinas, SP : [s.n.], 2007.

Orientador: Carlos Lenz Cesar.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Física "Gleb Wataghin".

1. Microscopia confocal. 2. Microscopia confocal multifóton. 3. Microscopia de geração de segundo harmônico. 4. Pinças óticas. 5. Imagens óticas. I. Cesar, Carlos Lenz. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Física "Gleb Wataghin". III. Título.

(vsv/ifgw)

- **Título em inglês:** Integrated biophotonic tool for manipulations and confocal microscopies
- **Palavras-chave em inglês (Keywords):**
 1. Confocal microscopy
 2. Multiphoton confocal microscopy
 3. Second harmonic generation microscopy
 4. Optical tweezers
 5. Optical images
- **Área de concentração:** Física
- **Titulação:** Mestre em Física
- **Banca examinadora:**
Prof. Carlos Lenz Cesar

Prof^a Lorena Pozzo

Prof. Konradin Metze
- **Data da defesa:** 21.12.2007
- **Programa de Pós-Graduação em:** Física



MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE MESTRADO DE ANDRÉ ALEXANDRE DE THOMAZ – RA 001337 APRESENTADA E APROVADA AO INSTITUTO DE FÍSICA “GLEB WATAGHIN”, DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, EM 21 / 12 / 2007.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. Carlos Lenz César (Orientador do Candidato) –
DEQ/IFGW/UNICAMP

Prof. Dr. Konradin Metze – FCM/UNICAMP

Profa. Dra. Lorena Pozzo – DEA/IFGW/UNICAMP

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos que me ajudaram nesse caminho esperando não cometer nenhuma injustiça esquecendo de alguém. Agradeço ao meu orientador por ter me guiado até a finalização desse trabalho. Agradeço aos companheiros de laboratório, Adriana, Wendel, Antonio, Diogo, Wágner pelas troca de idéias e ajuda nas medidas. Agradeço ao Prof. Konradin Metze da Faculdade de Medicina da Unicamp. por fornecer as lâminas utilizadas na microscopia confocal de 1 fóton. Agradeço ao Prof. Hernandes Faustino de Carvalho, do Instituto de Biologia da Unicamp, por fornecer as lâminas utilizadas na microscopia confocal de 2 fótons e microscopia SHG. As Profs. Denise Feder, da Universidade Federal Fluminense, e Suzete Gomes, da FioCruz do Rio de Janeiro, por fornecerem os parasitas para utilização na pinça óptica. A Heloise e a Profa. Malu Barjas-Castro, do Hemocentro da Unicamp, por fornecerem as hemácias para as imagens de pinça+confocal. Por último gostaria de agradecer a CAPES pelo apoio financeiro.

Resumo

A pesquisa em fotônica biomédica está claramente tomando a direção do entendimento de processos biológicos a nível celular. A resolução necessária para atingir esse objetivo requer praticamente ferramentas fotônicas. Contudo, uma integração de diferentes ferramentas fotônicas e uma aproximação funcional serão necessárias para acessar os processos biomecânicos e bioquímicos celulares. Deste modo nós podemos observar eventos bioquímicos disparados mecanicamente ou eventos mecânicos disparados bioquimicamente, ou até mesmo observar simultaneamente eventos biomecânicos e bioquímicos disparados por outros meios, entre outros, eletricamente. Uma das grandes vantagens das ferramentas fotônicas é a sua facilidade de integração. Nós desenvolvemos uma ferramenta integrada incorporando pinça óptica simples com Microscopia Confocal “Single-photon” e Multifóton. O sistema consegue realizar microscopias de fluorescência excitada pela absorção de dois fótons e geração de segundo harmônico em conjunto com manipulações ópticas. Medidas de força, elasticidade e viscosidade de membranes esticadas podem ser monitoradas em tempo real pelas microscopias confocais, bem como protozoários capturados opticamente, como, por exemplo, *Trypanosoma cruzi*. Nós mostraremos vários exemplos do uso de tal ferramenta integrada e seu potencial para observar processos mecânicos e bioquímicos a nível celular.

Abstract

The research in biomedical photonics is clearly evolving in the direction of the understanding of biological processes at the cell level. The spatial resolution to accomplish this task practically requires photonics tools. However, an integration of different photonic tools and a multimodal and functional approach will be necessary to access the mechanical and biochemical cell processes. This way we can observe mechanically triggered biochemical events or biochemically triggered mechanical events, or even observe simultaneously mechanical and biochemical events triggered by other means, e.g. electrically. One great advantage of the photonic tools is its easiness for integration. Therefore, we developed such integrated tool by incorporating single Optical Tweezers with Confocal Single and Multiphoton Microscopies. This system can perform 2-photon excited fluorescence and Second Harmonic Generation microscopies together with optical manipulations. Force, elasticity and viscosity measurements of stretched membranes can be followed by real time confocal microscopies. Also optically trapped living protozoas, such as *Trypanosoma cruzi*. Integration with CARS microscopy is under way. We will show several examples of the use of such integrated instrument and its potential to observe mechanical and biochemical processes at cell level.

Índice

Capítulo 1	Introdução	1
Capítulo 2	Aspectos Teóricos.....	8
2.1	Pinça Óptica	12
2.1.1	Princípio de Funcionamento da Pinça Óptica.....	12
2.1.2	Ordem de Grandeza da Força da Pinça Óptica.....	15
2.1.3	Abertura Numérica	17
2.2	Microscopia Confocal.....	18
2.2.1	Microscopia Confocal no Formalismo da Óptica Geométrica: Explicação Intuitiva.....	20
2.2.2	Resolução Microscopia Confocal: Tratamento Rigoroso	32
2.2.3	Comparação dos Resultados.....	57
2.3	Luminescência.....	59
2.4	Óptica Não-Linear	62
2.4.1	Fluorescência Excitada por Absorção de dois fótons	63
2.4.2	Geração de Segundo Harmônico.....	72
Capítulo 3	Sistema Experimental	81
3.1	Laser para a Pinça Óptica.....	83
3.2	Microscópios: Óptica Simples e Óptica Infinita	85
3.3	Alinhamento da Pinça Óptica	88
3.4	O Microscópio Confocal	92
3.5	Alinhamento do Laser de Argônio.....	95
3.6	Laser de Ti:Safira	97

3.7	Alinhamento do Laser de Ti:Safira para Microscopia “Multifóton” e SHG	100
Capítulo 4	Resultados	102
4.1	Microscopia Confocal “Single-Photon”	102
4.2	Microscopia Confocal Multifóton	115
4.3	Resultados da Microscopia SHG	120
4.4	Resultados com a Pinça Óptica	124
4.5	Resultados da Pinça Óptica + Microscopias Confocais	128
Capítulo 5	Conclusões e Perspectivas	133

Capítulo 1

Introdução

Um dos principais objetivos em biociências no momento é obter um profundo entendimento dos processos celulares, pois a célula é a unidade básica da vida. A ironia da história foi que a humanidade aprendeu a destruir o mundo onde vive antes de entender os processos celulares mais simples da vida. Mesmo a estrutura do DNA só foi descoberta depois da bomba atômica. Ainda que a vida seja um fenômeno complexo, não parece que o esforço para entender os processos celulares seja mais difícil do que o esforço para entender os processos nucleares. Como qualquer cientista de materiais sabe, a grande dificuldade de copiar processos é a necessidade de seguir toda uma seqüência de eventos no tempo. Não basta que alguém conheça todos os componentes de uma amostra para ser capaz de reproduzi-la. Companhias usam espões, ou contratam empregados de companhias concorrentes, para aprender os processos dos competidores. Contudo, não existe ninguém para se perguntar sobre os processos da vida além da própria natureza.

Esse fato impõe restrições sobre as ferramentas necessárias para a realização dessa tarefa. Primeiro, precisamos de ferramentas para observar continuamente

os processos no tempo de uma maneira não destrutiva, isto é, ferramentas funcionais. Estudos de células fixadas estão, portanto, descartados. A observação tem que ser remota, sem contato e sem contaminação. É necessário também que seja capaz de disparar processos, ou mudar seu curso, para poder chegar à exata relação de causa-efeito. As informações relevantes para os processos da vida são bioquímicas e biomecânicas com, pelo menos, resolução espacial sub-celular. A resolução espacial ideal seria a resolução capaz de discriminar a co-localização de proteínas, significando resolução da ordem de poucos nm, abaixo do limiar de difração das microscopias ópticas. Nós acreditamos que as ferramentas fotônicas serão, praticamente, as únicas capazes de realizar essa tarefa. A resolução de nm é atingida hoje apenas com microscópios eletrônicos, de força atômica ou de tunelamento. Apesar da resolução espacial óptica ser da ordem de 200 nm, ainda abaixo do ideal, está na faixa certa de energia porque os níveis moleculares eletrônicos e vibracionais caem na região do UV-VIS-IR. A resolução espacial pobre para os níveis vibracionais na região do infravermelho, pode ser melhorada através da espectroscopia Raman que traz a informação vibracional para o visível. Técnicas baseadas em elétrons e raios-x, tais como Espectroscopia Dispersiva de Raios-X (EDS ou EDX), Espectroscopia Fotoelétrica de Raios-X (XPS) usadas em Microscopia de Eletrônica de Varredura ou Transmissão (SEM ou TEM) provêm informações sobre os elementos químicos, porém requerem vácuo, incompatível com a vida. Além disso, a penetração do feixe de elétron é muito baixa para observar uma célula de 10-20 μm , e são muito mais destrutivos do que feixes de luz. Apesar de microscopias de força atômica e tunelamento apresentarem resolução atômica e não precisarem de vácuo, elas são técnicas de contato, incapazes de observar um evento dentro de uma célula sem destruí-la. Nós acreditamos que técnicas ópticas livres de contato fornecerão as melhores ferramentas para observar processos celulares.

As duas maiores dificuldades das técnicas fotônicas são o limite da difração para resolução e a pouca penetração. O limite da difração é uma lei da óptica linear e tem sido quebrado através de observações baseadas na óptica não-linear. O

recorde hoje é uma resolução de 16 nm¹. A penetração pequena se deve ao fato de que a probabilidade para o espalhamento de Rayleigh depende de $1/\lambda^4$ o que torna complicado evitá-lo. Para o estudo de processos celulares em um conjunto pequeno de células vivas no microscópio penetração de 100 μm da óptica é suficiente. Para estudos in-vivo de animais a observação não destrutiva de processos celulares se complica. Por outro, a luz do UV-IR é a única radiação que pode ser transportada por fibras ópticas com espessura de 100 μm, o que permitiria o acesso aos órgãos internos com procedimentos minimamente invasivos.

A óptica também abriu caminho para a observação de processos biomecânicos após o trabalho pioneiro de Ashkin² na década de 80. A importância da bioquímica para os processos celulares se inicia pelo combustível da vida, essencialmente bioquímico. Além disso, o reconhecimento de microorganismos invasores é bioquímico, a quebra das moléculas dos alimentos é feita através de enzimas que atuam no nível bioquímico. Os eventos biomecânicos também têm papel muito importante. O primeiro passo para a infecção é o movimento em direção a célula e a adesão a sua parede. Forças, torques, elasticidades, viscosidades, permeabilidades e deformações são variáveis importantes que precisam ser medidas. Forças na escala micrométrica são da ordem, ou menor que, centenas de pico-Newtons. Técnicas muito sensíveis são necessárias para medir tais forças. Forças ópticas estão na faixa correta, de 200 pN até dezenas de femto-Newtons. O desenvolvimento da pinça óptica abriu a possibilidade de observar eventos biomecânicos no mundo da microscopia nunca antes possível nos 400 anos da microscopia óptica. Contudo, uma integração de diferentes ferramentas fotônicas será necessária para a observação simultânea dos processos celulares biomecânicos e bioquímicos. Uma das grandes vantagens das ferramentas fotônicas é sua facilidade de integração.

¹ S. W. Hell, M. Dyba e S. Jakobs, *Curr. Op., Neurobio.* **14**, 599 (2004); S. W. Hell e J. Wichmann, *Opt. Lett.* **19**, 780 (1994); T. A. Klar, S. W. Hell, *Opt. Lett.* **24**, 954 (1999); T. A. Klar, E. Engel e S. W. Hell, *Phys. Rev. E.* **64**, 066613 (2001); T. A. Klar, M. Dyba e S. W. Hell, *Appl. Phys. Lett.* **78**, 393 (2001).

² Ashkin, J. Dziedzic, J. Bjorkholm, S. Chu: “*Observation of a Single-Beam Gradient Force Optical Trap for Dielectric Particles*”. *Optics Lett.* **11**, pg. 288, 1986.

O desenvolvimento de lasers de femto-segundos na década de 90 possibilitou o uso de técnicas ópticas não-lineares nas ciências da vida. A princípio com a técnica da Fluorescência Excitada pela Absorção de Dois Fótons (TPEF = “Two Photon Excited Fluorescence”) da Microscopia Multifóton³. Menor foto-degradação e maior penetração são vantagens da microscopia multifóton. Técnicas baseadas em tempo de vida da fluorescência como Imagem por Tempo de Vida da Fluorescência (FLIM = “Fluorescence Lifetime Imaging”), Fluorescência por Transferência Ressonante de Energia (FRET = “Fluorescence Resonant Energy Transfer”) e Espectroscopia de Correlação de Fluorescência (FCS = “Fluorescence Correlation Spectroscopy”)^{4,5,6,7,8,9}, que existiam antes da microscopia multifóton, foram melhoradas com processos multifóton. No final da década de 90 a microscopia de Geração de Segundo Harmônico (SHG = Second Harmonic Generation)¹⁰ permitiu a observação de moléculas sem simetria de inversão, especialmente as estruturas de colágeno e as interfaces. A Espectroscopia Raman tem duas dificuldades principais para fazer a aquisição de imagens de amostras biológicas. Uma é a presença da fluorescência que mascara completamente o sinal de Raman, forçando os pesquisadores a utilizarem excitação na região do infravermelho em que o sinal Raman e a resolução espacial são mais pobres e os detectores menos eficientes. A outra é o tempo necessário para adquirir imagens com boa resolução, que pode ser da ordem de várias horas. Essas duas dificuldades foram solucionadas pelo aumento do sinal de Raman com a microscopia de Espalhamento Coerente de Raman Anti-Stokes (CARS = “Coherent AntiStokes Raman Scattering”)¹¹.

A integração dessas técnicas biofotônicas em um único sistema permitiria a observação simultânea de eventos mecânicos e químicos necessários para

³ W. Denk, J. H. Strickler, and W. W. Webb, *Science* **248**, **73** (1990)

⁴ T. Minami and S. Hirayama, *J. Photochem. Photobiol. A – Chem.* **53** (1): 11 (1990)

⁵ J. R. Lakowicz and K. W. Berndt, *Rev. Scientific Instrum.* **62** (7), 1727 (1991)

⁶ W. Becker et al., *Microscopy Res. Technique* **63** (1), 58 (2004)

⁷ T. Ha et al., *PNAS* **93** (13), 6264 (1996)

⁸ G. W. Gordon et al., *Biophysical J.* **74** (5), 2702 (1998)

⁹ G. Szavo et al., *Biophysical J.* **61** (3), 661 (1992)

¹⁰ P. G. Campagnola et al., *Biophysical J.* **77** (6), 3341 (1999)

¹¹ J. X. Cheng JX and X. S. Xie, *J. Physical Chem. B* **108** (3): 827 (2004)

acompanhar processos celulares. Apesar da grande vantagem dessa integração, há muito poucas contribuições na literatura mostrando pinça óptica em paralelo com fluorescência multifóton ou microscopia confocal¹². A ferramenta biofotônica ideal conteria:

1. Pinças ópticas simples e múltiplas;
2. Microscopias confocais de fluorescência excitada por absorção de um fóton [Single-photon];
3. Microscopias confocais de fluorescência excitada por absorção de dois ou mais fótons [Multifóton];
4. Microscopias MW [multiwavelength - com 16 canais simultâneos em diferentes comprimentos de ondas] baseadas no tempo de vida da fluorescência como FLIM, FRET e FCS;
5. Microscopias SHG/THG [Second and Third Harmonic Generation];
6. Microscopia SFG [Sum Frequency Generation];
7. Microscopia CARS;
8. Micro-espectroscopias de fluorescência e espalhamentos Rayleigh, Raman, Hiper Rayleigh e Hiper Raman;
9. Micro-espectroscopia de força óptica.

O trabalho desenvolvido nesta tese inclui os itens: 1, pinças ópticas; 2, microscopia confocal “single-photon”; 3, microscopia confocal “multiphoton”; e 5, microscopia SHG. O item 4, microscopias FLIM-FRET-FCS está sendo adquirido nesse momento, só devendo estar disponível em 2008. Os itens 6, microscopia SFG e 7, microscopia CARS, dependem do bom funcionamento de dois lasers de pulso curto sincronizados no tempo. Embora esses lasers já estejam instalados no laboratório vieram com a óptica errada e o tempo gasto na burocracia alfandegária para correção do erro inicial inviabilizou sua utilização no prazo do trabalho dessa

¹² M. Goksör, J. Enger and D. Hanstorp, *Optical manipulation in combination with multiphoton microscopy for single-cell studies*, Applied Optics, **43** (25) 4831 (2004)

tese. As micro-espectroscopias, itens 8 e 9, já foram demonstrados anteriormente pelo grupo em outro microscópio¹³. Entretanto, sua readaptação no novo microscópio invertido da Olympus, a base atual para todas as demais técnicas, ainda requer a fabricação de algumas partes mecânicas, atualmente em andamento.

No capítulo 2 apresentamos as descrições teóricas de cada técnica utilizada. Pretendemos apresentar nesse capítulo tanto uma explicação intuitiva quanto uma explicação rigorosa dos fenômenos envolvidos, devido o caráter multidisciplinar dessa tese. A explicação intuitiva se dirige aos leitores das áreas das ciências da vida. Procuramos evitar ao máximo a utilização da física e matemática mais rigorosa necessária para uma descrição mais completa dos fenômenos. Segue-se à apresentação intuitiva uma descrição mais rigorosa dos fenômenos. Acreditamos que, mesmo o leitor da área de ciências da vida, possa aproveitar as fórmulas finais dessa descrição mais rigorosa sem a necessidade de acompanhar as deduções das mesmas. Neste capítulo descrevemos as técnicas de pinças ópticas, microscopias confocais e os fenômenos de absorção de dois fótons e SHG. Mostraremos como é possível para a pinça óptica capturar partículas em 3 dimensões, qual a ordem de grandeza das forças ópticas e qual o papel da objetiva para seu funcionamento. Na parte sobre microscopias confocais apresentamos uma explicação intuitiva utilizando a óptica geométrica. Segue-se uma explicação rigorosa utilizando a difração da óptica ondulatória. Nesta seção obtemos os limites para a resolução dessas microscopias e o papel do pinhole nas mesmas. Discutimos sobre a absorção de dois fótons a partir da eletrodinâmica, da mecânica quântica e sobre a conexão entre os dois formalismos. Mostramos que a probabilidade de absorção de dois fótons depende da intensidade do laser ao quadrado, tornando assim desnecessário o uso do pinhole como filtro espacial. Logo a seguir apresentamos a geração de segundo harmônico através de um formalismo clássico da análise de um oscilador não harmônico, salientando as semelhanças com a TPEF. Dessa análise mostramos quais os tipos de moléculas

¹³ Adriana Fontes, "*Sistema de Micromanipulação e Microanálise com Pinças Ópticas*", tese de doutorado orientada por Carlos Lenz César, defendida em abril de 2004.

podem ser observadas com essa técnica e discutimos porque colágenos são especialmente bons para geração de segundo harmônico. Discussão apenas dos aspectos mais básicos da fluorescência, visto que se trata de um assunto corrente tanto na física quanto nas ciências da vida.

O capítulo 3 é voltado à descrição do sistema experimental desenvolvido nessa tese. Apresentamos cada etapa do alinhamento do sistema separadamente, facilitando assim o entendimento dos procedimentos essenciais para a realização de cada técnica. O ponto mais importante desse capítulo é mostrar o que é necessário para integrar experimentalmente todas as técnicas discutidas no capítulo 2.

Finalmente, os resultados obtidos com o sistema integrado que desenvolvemos serão mostrados no capítulo 4, o qual contém inúmeras imagens que demonstram o bom funcionamento do sistema, tanto com cada técnica funcionando isoladamente quanto a operação em conjunto de todas. Esse capítulo termina com uma seqüência de imagens que falam por si, seguindo o ditado de que uma imagem vale mil palavras. Essas imagens mostram todo o poder de manipulação e análise que esse sistema oferece. Em muitos casos obtivemos filmes que não podem, obviamente, ser apresentados em papel. Nessas situações procuramos apresentar uma seqüência de imagens que ilustram o comportamento dinâmico. O exemplo de maior impacto foi de um filme praticamente em tempo real de um parasita, *Trypanosoma cruzi*, fixado no intestino de um inseto, barbeiro, juntamente com as imagens de fluorescência. No capítulo 5 apresentamos as conclusões e perspectivas.

Capítulo 2

Aspectos Teóricos

O objetivo desse capítulo é apresentar os aspectos teóricos das técnicas utilizadas nessa tese, ou seja: Pinças Ópticas; Microscopia Confocal “single-photon” e “multi-photon” e microscopia SHG. Principalmente aqueles aspectos mais importantes para o entendimento ou do procedimento experimental ou para a interpretação dos resultados obtidos.

A maior tradição do nosso grupo é na área de pinças ópticas, na qual o grupo desenvolveu trabalho pioneiro no Brasil, iniciado em 1990, e que já gerou três teses de doutorado, três de mestrado, mais de uma dúzia de publicações em revistas internacionais e um sem número de trabalhos em conferências nacionais e internacionais. O desenvolvimento teórico envolvendo expansão do feixe incidente altamente focalizado em ondas parciais para entendimento das forças ópticas foi descrito com detalhes na tese de Antônio Neves¹⁴ sem qualquer aproximação e na Aproximação da Integral Localizada na tese de doutorado de Adriana Fontes¹³. Explicações mais intuitivas foram apresentadas nas teses de

¹⁴ Antônio Álvaro Ranha Neves, “*Forças Ópticas em Pinças Ópticas: Estudo Teórico e Experimental*”, tese de doutorado orientada por Carlos Lenz Cesar, defendida em março de 2006.

mestrado de Adriana Fontes, de Gustavo Pires e de Liliana Pozzo¹⁵. A tese de doutorado de Marcelo Brandão, defendida pela Faculdade de Medicina, inclui uma descrição do funcionamento da pinça óptica voltada para profissionais da área de ciências da vida e demonstra suas aplicações na caracterização de elasticidades de hemácias¹⁶.

Dada a existência de um grande número de teses antecedentes e o objetivo do trabalho dessa tese de integração das diversas ferramentas, não faz sentido uma descrição rigorosa da teoria das forças ópticas, a qual pode ser facilmente encontrada nas teses citadas, disponíveis publicamente após preenchimento de um cadastro no site <http://www.ifi.unicamp.br/> seguindo os links: biblioteca (BIF); teses digitais; biblioteca digital IFGW.

Entretanto, para deixar esse capítulo auto-suficiente, sem obrigar o leitor a procurar outras referências, e deixar claro quais são os parâmetros importantes da pinça óptica, a necessidade e o papel dos componentes ópticos utilizados e o procedimento de alinhamento experimental, incluímos uma descrição qualitativa ao nível da óptica geométrica do princípio de funcionamento da pinça óptica. Essa descrição contempla todos os aspectos importantes de uma pinça óptica podendo, inclusive, servir de guia para quem se proponha a reproduzir nosso sistema experimental. Uma mudança importante do trabalho dessa tese em comparação com o trabalho das teses anteriores foi o uso de um microscópio de óptica infinita. Os procedimentos de alinhamento nesse caso são diferentes.

Já o trabalho com microscopia confocal do grupo se inicia em novembro de 2006 com a instalação do microscópio da Olympus. Como se trata de um trabalho recente não existem teses anteriores descrevendo os princípios de funcionamento

¹⁵ Adriana Fontes, "*Uso de Lasers para Manipulação e Medidas de Células Vivas*", tese de mestrado orientada por Carlos Lenz Cesar, defendida em agosto de 1999; Gustavo Pires Marques, "*Análise do Potencial de Calibração da Força Óptica através de Dispositivos de Microscopia de Força Atômica*", tese de mestrado orientada por Carlos Lenz Cesar, defendida em dezembro de 2005; Liliana de Ysasa Pozzo, "*Desenvolvimento de Metodologia de Medida Vetorial de Forças em Tempo Real de Microorganismos Utilizando Pinças Ópticas para Estudos de Quimiotaxia e Osmotaxia de Parasitas*", tese de mestrado orientada por Carlos Lenz Cesar, defendida em julho de 2006.

¹⁶ Marcelo Mendes Brandão, "*Análise e caracterização da deformidade de eritrócitos em membranopatias*", tese de doutorado orientada por Sara T. O. Saad e Carlos Lenz Cesar, defendida em maio de 2003 pela Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

do mesmo, e é objetivo dessa tese preencher essa lacuna. Em particular pretendemos mostrar claramente que a grande vantagem da microscopia confocal em relação à microscopia de fluorescência convencional (“wide field”) é, basicamente, a resolução axial, na direção z do eixo do microscópio, que permite reconstruir imagens em 3 dimensões a partir das “fatias ópticas” da amostra observada. Nosso objetivo na descrição intuitiva foi explicar o funcionamento do microscópio confocal utilizando apenas a óptica geométrica. Essa explicação permite entender o papel do “pinhole” tanto na espessura da “fatia óptica” quanto na resolução lateral. Entretanto, o modelo de óptica geométrica é incapaz de explicar quantitativamente as resoluções obtidas com a microscopia confocal, pois nem sequer considera a difração e sua dependência com o comprimento de onda. É comum se considerar a difração em modelos que utilizam a aproximação paraxial, em que os ângulos dos feixes de luz com o eixo óptico são pequenos. Muitas expressões analíticas comumente utilizadas se baseiam nessa aproximação. Embora sejam úteis para apontar tendências de dependências de parâmetros, como o comprimento de onda, por exemplo, totalmente excluído de modelos da óptica geométrica, essas aproximações deixam de ser válidas para o caso dos microscópios confocais modernos que utilizam objetivas de grande abertura numérica. Para o caso mais realista de grandes aberturas numéricas o resultado é dado em termos de integrais sem expressão analítica. Apesar da ausência de uma expressão analítica, o fato é que hoje pacotes como o Mathematica permitem a utilização de funções definidas através de integrais, calculando seus valores e obtendo gráficos, inclusive em três dimensões, em pouco tempo. A seção 2.2 descreve todos esses aspectos, do modelo de óptica geométrica até os resultados das aproximações paraxiais e o resultado quantitativo rigoroso.

Uma boa parte das aplicações de biofotônica envolve fluorescência. Na maioria das aplicações se utilizam marcadores fluorescentes exógenos, funcionalizados para se ligarem quimicamente a proteínas específicas. Esses corantes são comercializados e é possível trabalhar com os mesmos após encontrar em tabelas as bandas de excitação e emissão. Mesmo a auto-fluorescência, gerada pelas

moléculas fluorescentes endógenas, já foi muito estudada e as bandas de excitação e emissão da maioria dos fluoróforos endógenos já foram descritas e tabeladas. Fluorescência é uma área da física e da química muito estudada com a existência de milhares de livros e referências sobre o assunto. Nosso objetivo em relação aos aspectos teóricos da fluorescência nesse capítulo será apenas de apresentar o vocabulário básico e as idéias intuitivas que apontam tendências gerais sobre o comprimento de onda das bandas de fluorescência.

A continuidade desse trabalho envolve a utilização da óptica não linear. São dois os fenômenos básicos: a absorção de dois fótons e a geração de segundo harmônico. A geração de segundo harmônico pode ser explicada de forma intuitiva classicamente no modelo do oscilador não harmônico. Com esse modelo se podem extrair várias conseqüências sobre a simetria das moléculas capazes de gerar SHG. Essas idéias intuitivas são importantes para se perceber que tipos de moléculas são mais eficientes na geração do SHG. Com isso se pode mostrar a importância do colágeno na geração do SHG. Já na absorção de dois fótons o tratamento intuitivo é mais complicado envolvendo um grau maior de utilização da matemática. Uma descrição intuitiva baseada apenas na probabilidade de ocorrência do efeito permite a extração das principais conclusões sobre as vantagens da microscopia confocal multifóton, e sua dependência com a duração do pulso de luz, com a distância ao foco do laser e a intensidade do feixe incidente. Diagrama intuitivo de processos de dois fótons também permite extrair a conclusão de que o processo depende da intensidade do feixe ao quadrado. Entretanto nenhuma conclusão se pode extrair sobre as propriedades das moléculas que apresentam alta absorção de dois fótons e regras de seleção do processo. Para isso necessitaremos de uma descrição quântica, que será desenvolvida de forma mais aprofundada nesse capítulo. Outro aspecto que merece destaque em relação à óptica não linear é a dualidade de tratamento do fenômeno, ora em termos da eletrodinâmica, ora em termos da mecânica quântica. Ambos os tratamentos exigem alto nível de utilização da física e matemática, e a descrição com que trabalhamos nessa tese visa apresentar um quadro mais unificado entre os dois formalismos. No tratamento de eletrodinâmica

clássica a preocupação é com os aspectos macroscópicos do fenômeno através de uma expansão em série de Taylor nos campos eletromagnéticos em termos de susceptibilidades de várias ordens, primeira, segunda, terceira, etc. Mas os valores das susceptibilidades só podem ser extraídos através da mecânica quântica ao nível microscópico com teoria de perturbação. Mostraremos como essa conexão é feita e como as regras de seleção e leis de comportamento são extraídas com os diferentes formalismos.

Com essas descrições teóricas formamos um conjunto teórico completo capaz de explicar nossos resultados e procedimentos e que permitem prever o comportamento de diferentes moléculas em relação às diversas técnicas.

2.1 Pinça Óptica

2.1.1 Princípio de Funcionamento da Pinça Óptica

A captura óptica pode ser explicada através da dualidade onda-partícula dos fótons proposta por Einstein ao explicar o efeito fotoelétrico. O entendimento intuitivo de como a transferência de momento do fóton dá origem a uma armadilha óptica em três dimensões pode ser obtido através da óptica geométrica. A óptica geométrica permite inclusive a obtenção de resultados quantitativos razoáveis quando o tamanho da partícula é bem maior do que o comprimento de onda do feixe incidente. Ela falha quando as duas dimensões são comparáveis e quando ressonâncias de Mie entram em jogo. Nesse caso apenas um formalismo eletromagnético vetorial completo, como o desenvolvido na tese do Antônio Neves¹⁴, será capaz de chegar a resultados quantitativos precisos.

Para entender como a óptica geométrica pode explicar a armadilha óptica, considere a partícula esférica com índice de refração maior do que o meio à sua volta da Figura 1. Como ondas os raios de luz sofrem refração, como partículas transferem momento. Pela refração, o raio incidente se aproxima da normal ao penetrar na esfera e se afasta da mesma na saída. Com isso o raio muda de

direção e, correspondentemente, de momento. Como o momento é conservado a esfera percebe um impulso na direção da bissetriz do ângulo entre os raios incidente e espalhado. Com isso podemos entender o aprisionamento em três dimensões.

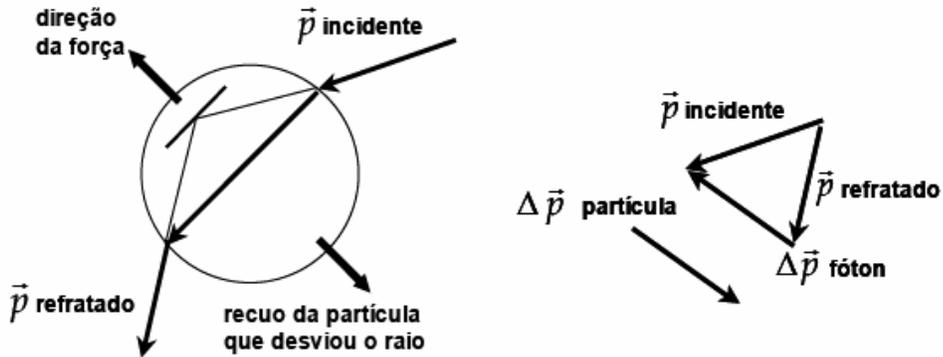
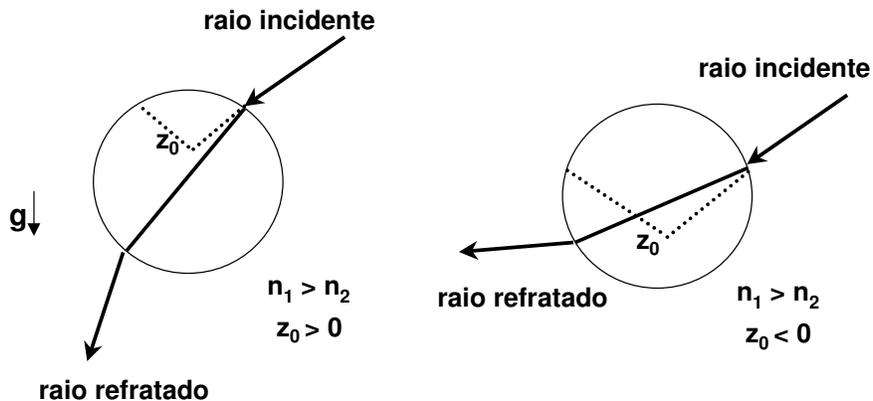


Figura 1 Refração e choque com o centro espalhador

A Figura 2 mostra as trajetórias dos raios de luz em quatro diferentes situações: (1) quando o índice de refração n_1 da partícula é maior do que n_2 do meio exterior e quando o raio não desviado encontraria o eixo vertical da esfera acima do centro; (2) quando o raio não desviado encontraria o eixo abaixo do centro. Nos dois outros casos o índice de refração da partícula é menor do que o do meio exterior.



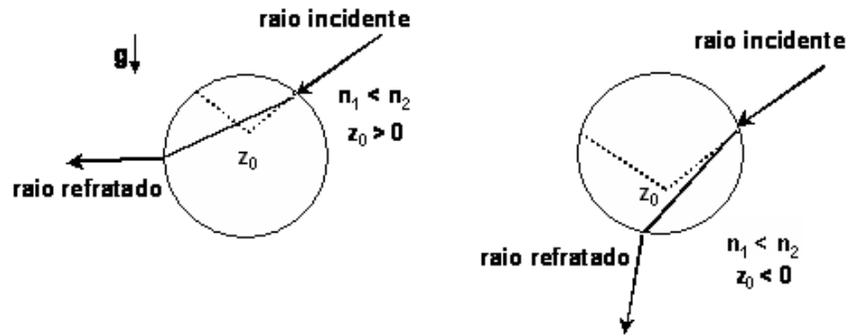


Figura 2 Trajetória dos raios para os casos de $n_1 > n_2$ e $n_1 < n_2$

Agora considere dois raios que se encontrariam no ponto z_0 se a esfera não estivesse no caminho. A Figura 3 mostra que a transferência de momento de dois raios simétricos a e b, no caso $n_1 > n_2$, geram uma força que tende a levar o centro da esfera para o foco do laser z_0 .

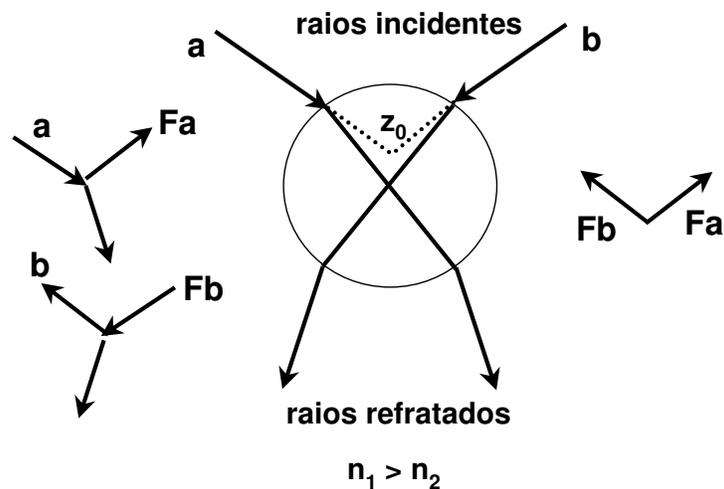


Figura 3 Transferência de momento dos raios simétricos para $n_1 > n_2$

As componentes horizontais das forças F_a e F_b se anulam, porém suas componentes verticais se adicionam gerando assim uma força restauradora que traz o centro da partícula para o foco do laser. Ocorrendo o inverso quando $n_1 < n_2$, surge uma força que afasta a partícula do foco do laser, como mostra a Figura 4.

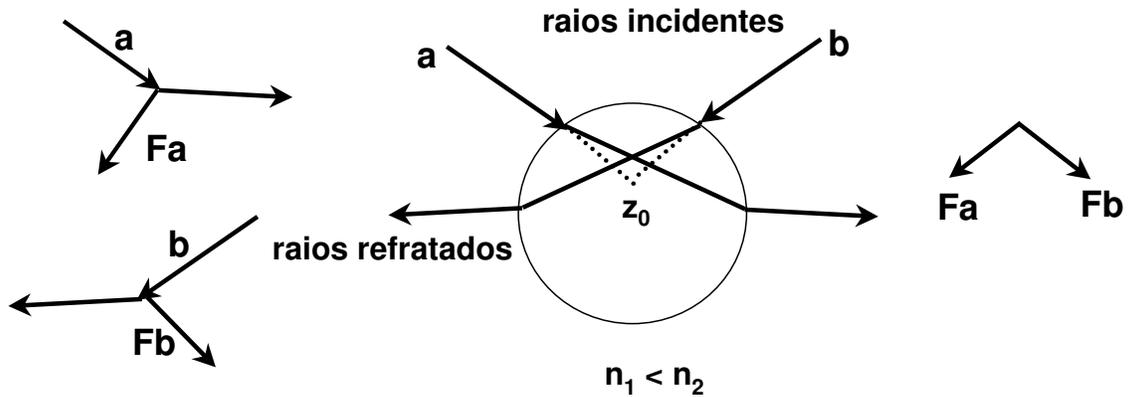


Figura 4 Transferência de momento dos raios simétricos para $n_1 < n_2$

A Figura 5 ilustra os raios e a direção da força para o foco do laser em diferentes posições no caso $n_1 > n_2$. Delas, se compreende que, se $n_1 > n_2$, a força é restauradora tendendo sempre a trazer o centro da partícula para o foco do laser, e se $n_1 < n_2$ a tendência é expulsar a esfera do foco do laser. Esse quadro simples da óptica geométrica mostra intuitivamente como se pode construir uma pinça óptica.

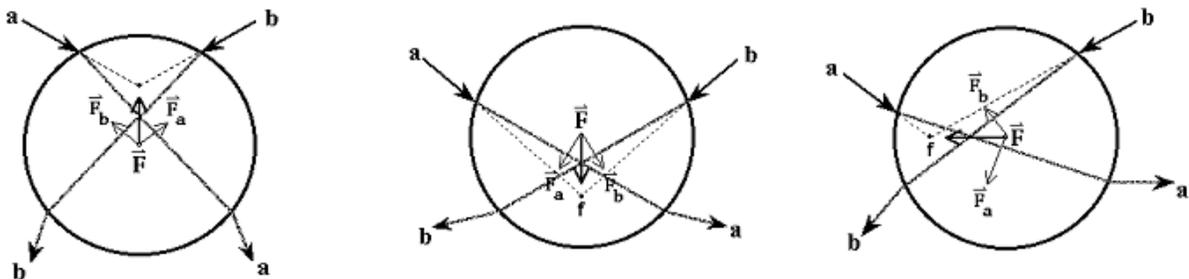


Figura 5 Força resultante para dois raios em diferentes posições de foco para $n_1 > n_2$

2.1.2 Ordem de Grandeza da Força da Pinça Óptica

Podemos fazer uma estimativa da ordem de grandeza da força da pinça óptica supondo que um feixe de laser com 1 W de potência seja completamente absorvido pelo objeto. Neste caso a força será dada por

$$F = \frac{dp}{dt} = \frac{n^\circ \text{ fótons}}{\text{tempo}} \times p_{\text{fóton}} = \frac{\text{potência}}{h\nu} \times \frac{h\nu}{c} = \frac{\text{potencia}}{c} \quad (2.1)$$

Portando a força da pinça será

$$F = \frac{1 \text{ W}}{3 \cdot 10^8 \text{ m/s}} = 3 \cdot 10^{-9} \text{ N} \quad (2.2)$$

Na prática, apenas 100 a 200 mW do feixe de laser incide na partícula e os fótons são apenas desviados, em lugar de completamente absorvidos, de modo que as forças ópticas são bem menores do que nN. Forças máximas da pinça óptica são da ordem de 100 pN. Para obter uma idéia do que a força da pinça pode manipular suponha que o objeto capturado seja um cubo de 1µm de aresta e densidade igual a da água. Sua massa será

$$m = \text{densidade} \times \text{volume} = 10^3 \text{ kg/m}^3 \times (10^{-3})^3 \text{ m}^3 = 10^{-15} \text{ kg} \quad (2.3)$$

A aceleração nesse cubo devido à força da pinça será

$$a = \frac{F}{m} = \frac{3 \cdot 10^{-9} \text{ N}}{10^{-15} \text{ kg}} = 3 \cdot 10^6 \text{ m/s}^2 = 3 \cdot 10^5 \text{ g} \quad (2.4)$$

onde g é a aceleração da gravidade. Acelerações dessa ordem de grandeza permitem manipulação total das partículas capturadas. Agora se considerarmos um cubo com 1mm de aresta teremos uma aceleração de $3 \cdot 10^{-2} \text{ g}$, que torna-se desprezível frente a outras interações microscópicas. Podemos ver, portanto, que pela ordem de grandeza, que a pinça óptica pode movimentar partículas da ordem de até 50µm, que é da mesma ordem do tamanho da grande maioria de células e microorganismos. No limite inferior partículas com até 40 a 50 nm podem ser capturadas. A força óptica cai com a dimensão da partícula capturada e deixar de capturar as partículas quando ultrapassada pelas forças impulsivas do movimento Browniano.

2.1.3 Abertura Numérica

Uma característica muito importante das objetivas, de grande influência para o bom funcionamento de uma pinça óptica é a abertura numérica [NA = numerical aperture]. A abertura numérica é definida como o ângulo do cone de luz na saída da objetiva, conforme mostra a Figura 6.

$$NA = \frac{r}{f} \quad (2.5)$$

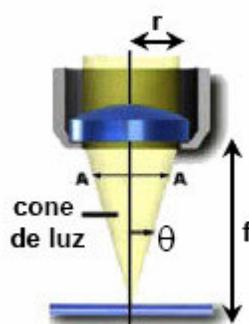


Figura 6 Definição da abertura numérica

Pela lei do seno de Abbe, $r/f = \text{sen}\theta$, portanto a abertura numérica de uma objetiva é dada por

$$NA = n \text{sen}\theta \quad (2.6)$$

onde n é o índice de refração do meio onde a objetiva está inserida.

A capacidade da pinça óptica de capturar partículas nas três dimensões só ocorre se os raios de luz possuem componentes nas 3 direções. Para aumentar a força na direção z deve-se aumentar a inclinação dos raios de luz. Quanto maior a inclinação do raio, maior vai ser a componente vertical da força. Portanto quanto maior a abertura numérica maior vai ser a força na direção vertical, como mostra a Figura 7. Na prática, armadilhas ópticas em 3 dimensões são obtidas com objetivas com magnificação maior que 60x e abertura numérica da ordem de 1.

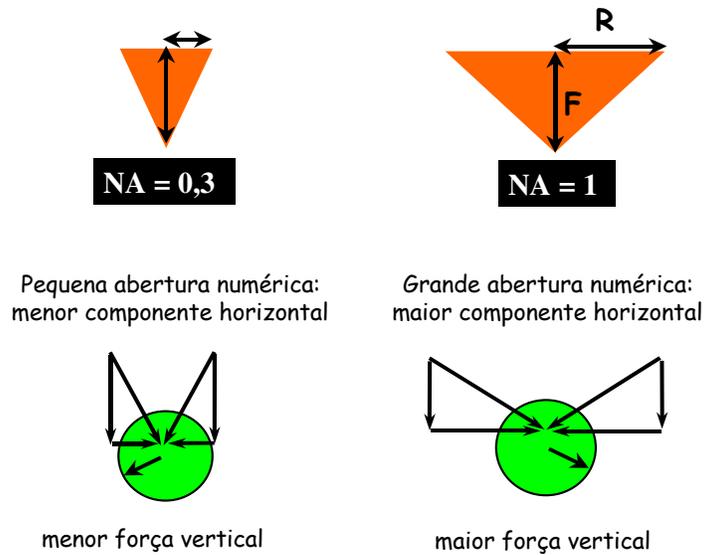


Figura 7 Papel da abertura numérica na força vertical

Maiores detalhes do alinhamento e procedimento experimental para a montagem de uma pinça óptica serão apresentados no capítulo 3.

2.2 Microscopia Confocal

Na microscopia de fluorescência convencional o sinal é gerado em todo o cone de iluminação da amostra. Esse fato diminui a resolução no plano focal da objetiva, pois o sinal coletado contém informação de todos os outros planos diferentes do plano focal da objetiva. Para a reconstrução 3D é preciso rejeitar as informações advindas dos planos indesejados. Essa discriminação é obtida através da utilização de um filtro espacial, que impede que sinais gerados fora do foco da objetiva cheguem ao detector. A Figura 8 mostra um esquema simplificado do Microscópio Confocal de Varredura a Laser (“Laser Scanning Confocal Microscope”, LSCM).

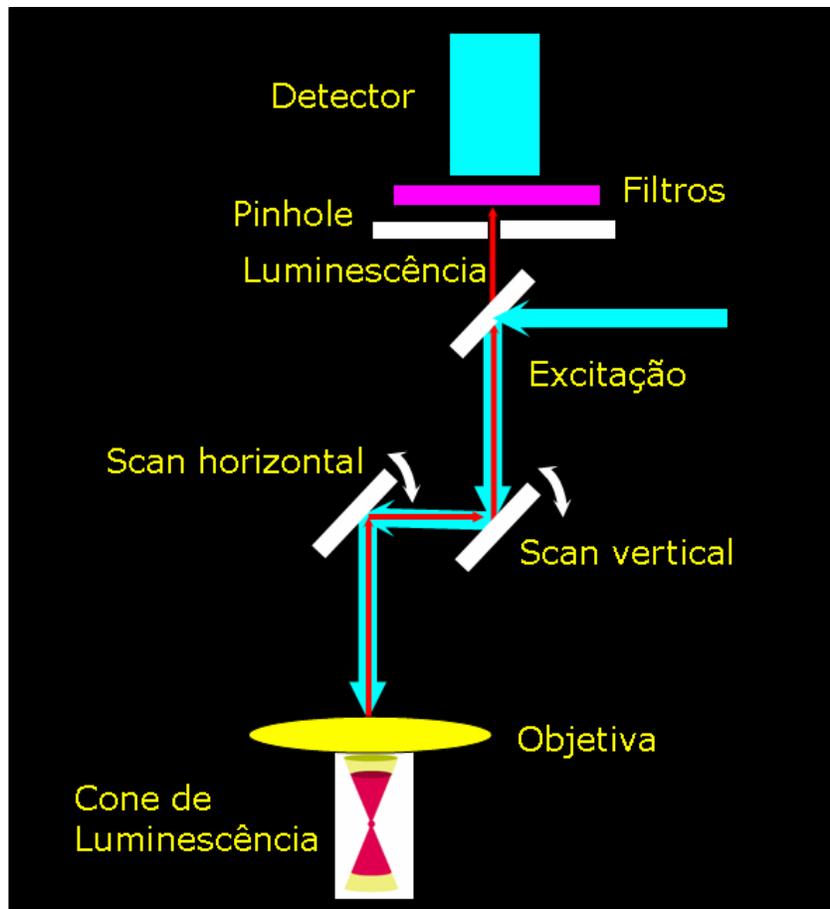


Figura 8 Esquema simplificado de um Microscópio Confocal

No LSCM um laser incide sobre um espelho dicróico (que reflete o laser mas é transparente para os outros comprimentos de onda da luz) e é refletido para uma objetiva. A objetiva focaliza o laser na amostra onde será gerada a fluorescência. A mesma objetiva é responsável por coletar o sinal de fluorescência, que é transmitido pelo espelho dicróico e focalizado no “pinhole” posicionado antes do detector. O “pinhole” está em um plano conjugado com o plano focal da objetiva, de modo que apenas a luz coletada no plano focal da objetiva passa pelo mesmo sem perdas. A obtenção da imagem poderia ser realizada através do movimento da amostra ou do feixe de laser. A primeira demonstração de um microscópio confocal por Marvin Minsky utilizou o movimento da amostra. Entretanto, os microscópios modernos utilizam a varredura do laser, muito mais rápida do que a movimentação da amostra, pois utilizam espelhos pequenos montados em

galvanômetros. Isso dá a possibilidade de escolher a área de excitação da amostra. A imagem final é formada pela detecção da intensidade da fluorescência de cada ponto da varredura do laser na amostra.

A Figura 9 mostra como o “pinhole” atua para eliminar o sinal fora do plano focal, pois a imagem de uma fonte pontual de luz posicionada fora do plano focal gera uma imagem fora do plano do “pinhole”, que barra a maior parte dos raios que atingiriam o detector. Percebe-se, portanto, que a capacidade do “pinhole” para atenuar a fluorescência dos planos afastados do plano focal depende da sua abertura. A resolução vertical aumenta com a diminuição da abertura do “pinhole”. Na realidade, existe uma abertura ótima, abaixo da qual a resolução axial muda muito pouco mas a intensidade do sinal coletado diminui drasticamente.

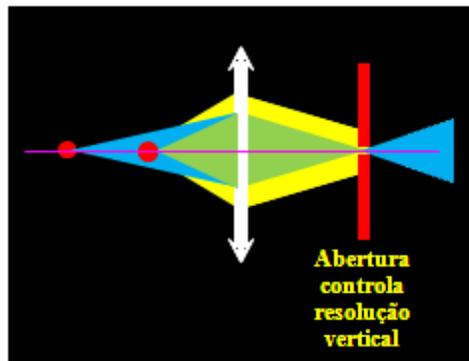


Figura 9 Papel da abertura na resolução vertical da LSCM

2.2.1 Microscopia Confocal no Formalismo da Óptica Geométrica: Explicação Intuitiva

Apesar da óptica geométrica ser incapaz de explicar todo o fenômeno físico, já que não considera a difração, desenvolveremos um modelo utilizando apenas a óptica geométrica para explicar o papel do “pinhole” para o aumento das resoluções lateral e axial. Esse formalismo permite obter uma idéia intuitiva do papel do “pinhole” na formação da imagem no plano do detector e explicar a capacidade de efetuar um seccionamento óptico da Microscopia Confocal.

A Figura 10 será utilizada para definição dos eixos e denominações que utilizaremos. O eixo de simetria de um sistema óptico, neste caso na direção horizontal, é chamado de eixo óptico. Esse eixo será colocado na direção z ou direção axial, sendo sua origem o ponto onde está a lente. Deslocamentos no eixo x , perpendicular ao eixo óptico, serão chamados de deslocamentos laterais, com sua origem no próprio eixo óptico. A posição do objeto é definida pela distância z_0 na direção axial e a posição da imagem definida por z'_0 . A distância focal da lente é f .

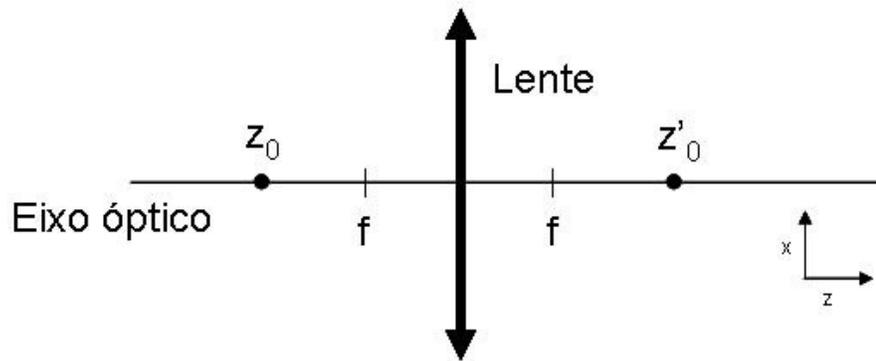


Figura 10 Definição dos eixos em relação a lente

Resolução Lateral de um Objeto Pontual

Definiremos a resolução lateral como a distância máxima que um objeto pontual pode se afastar do eixo óptico na direção lateral e ainda passar pelo “pinhole”, ou seja, sem perder sinal detectado. O objeto está posicionado inicialmente no ponto z_0 e será afastado do eixo óptico na direção lateral de uma distância x como mostra a Figura 11.

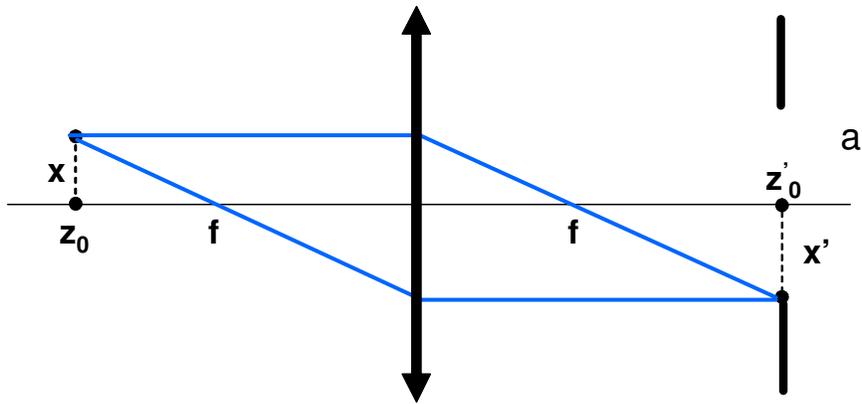


Figura 11 Posições do objeto e sua respectiva imagem para o cálculo da resolução lateral

A imagem de um objeto fora do eixo óptico também se localiza fora do eixo, como mostra a Figura 11. O máximo afastamento x do objeto no plano focal sem perda de sinal após o “pinhole” é aquele em que sua imagem cai na borda do “pinhole” em $x' = a$. Utilizando a semelhança dos triângulos temos que

$$\frac{x}{z_0 - f} = \frac{x'}{f} \quad (2.7)$$

Isolando x na equação (2.7) obtemos a posição máxima em que se pode afastar o objeto do eixo óptico na direção lateral

$$x = \frac{z_0 - f}{f} x' \quad (2.8)$$

Como x' não pode ser maior que a , a resolução lateral será dada por:

$$\Delta x = \frac{z_0 - f}{f} a \quad (2.9)$$

Na realidade os fabricantes de objetivas só fornecem as especificações da magnificação, da abertura numérica e da distância de trabalho das objetivas, e não da distância focal ou do raio da abertura. Assim podemos expressar a

equação (2.9) em termos da magnificação através de:

$$\frac{x}{z_0 - f} = \frac{x'}{f} \Rightarrow \frac{x'}{x} = \frac{f}{z_0 - f} \Rightarrow m = \frac{1}{\frac{z_0}{f} - 1} \quad (2.10)$$

$$\Delta x = \frac{a}{m} \quad (2.11)$$

Para uma objetiva de 100X de aumento, portanto, um “pinhole” com 100 μm levaria à uma resolução lateral de 1 μm , enquanto um “pinhole” com 20 μm implicaria em uma resolução lateral de 200 nm.

Profundidade de Campo

A distância que um objeto pode caminhar sobre o eixo óptico sem prejuízo da qualidade da imagem é conhecida como profundidade de campo (“depth of field”, DOF). Para calcular a DOF utilizaremos o mesmo procedimento anterior, deslocando, agora, o objeto na direção axial sobre o eixo óptico como mostra a Figura 12.

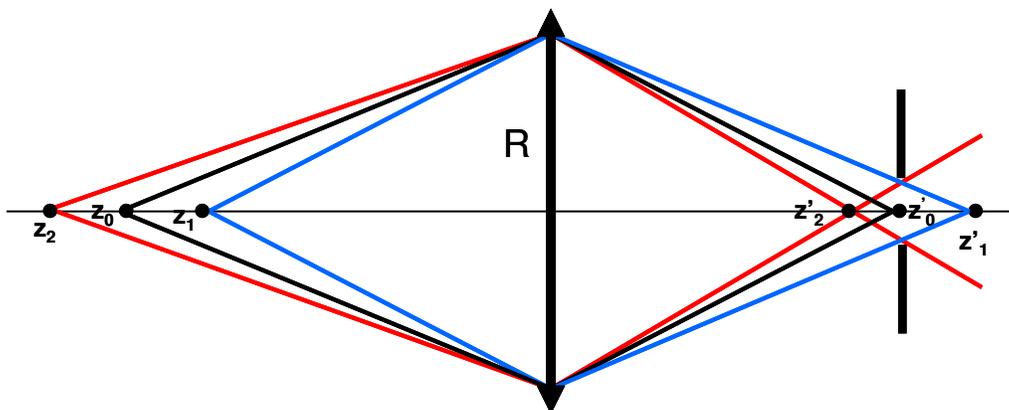


Figura 12 Posições do objeto para cálculo do DOF

A posição inicial do objeto é z_0 e sua imagem está em z'_0 . Os índices 1 e 2 indicam as novas posições do objeto e os índices ' as suas respectivas imagens. R é o

raio da lente. Na figura a posição z_1 indica uma aproximação do objeto em relação à lente, a qual afasta sua imagem da posição z_0' inicial. A posição z_2 indica o contrário, um afastamento do objeto em relação à lente e, conseqüentemente, uma aproximação da imagem da mesma. Essas duas posições são as posições limites que o objeto pode ocupar para que os raios formadores de suas imagens possam passar pelo “pinhole” e chegar ao detector. Os raios da imagem de um objeto em uma posição mais próxima à lente do que z_1 serão focalizados depois de z_1' e, dessa forma, barrados pelo pinhole. Da mesma forma, qualquer dos raios da imagem de um objeto em uma posição mais afastada da lente do que z_2 serão focalizados antes de z_2' e, também, serão barrados pelo “pinhole”. A distância entre essas duas posições é a DOF. A DOF pode ser calculado por geometria simples utilizando semelhança de triângulos. Considerando a posição z_1 temos:

$$\frac{R}{z_1'} = \frac{a}{z_1' - z_0'} \quad (2.12)$$

Isolando z_1' temos

$$\frac{1}{z_1'} = \frac{R - a}{R} \frac{1}{z_0'} = \left(1 - \frac{a}{R}\right) \frac{1}{z_0'} \quad (2.13)$$

A equação das lentes delgadas se aplica a todas posições dos objetos e de suas respectivas imagens:

$$\frac{1}{z_n'} + \frac{1}{z_n} = \frac{1}{f} \quad (2.14)$$

Utilizando a equação das lentes delgadas para a posição 1, já substituindo o valor de z_1' de (2.13)

$$\frac{R - a}{R} \frac{1}{z_0'} + \frac{1}{z_1} = \frac{1}{f} \quad (2.15)$$

$$\frac{1}{z_1} = \frac{1}{f} - \frac{R-a}{R} \frac{1}{z_0'} \quad (2.16)$$

Aplicando a equação das lentes delgadas para a posição z_0 podemos substituir o valor de z_0'

$$\begin{aligned} \frac{1}{z_1} &= \frac{1}{f} - \left(1 - \frac{a}{R}\right) \left(\frac{1}{f} - \frac{1}{z_0}\right) = \frac{1}{f} - \frac{1}{f} + \frac{1}{z_0} + \frac{a}{R} \left(\frac{1}{f} - \frac{1}{z_0}\right) = \frac{1}{z_0} + \frac{a}{Rf} - \frac{a}{Rz_0} = \\ &= \frac{Rf + a(z_0 - f)}{Rfz_0} = \frac{1 + \frac{a}{R} \left(\frac{z_0}{f} - 1\right)}{z_0} \end{aligned} \quad (2.17)$$

$$z_1 = \frac{1}{1 + \frac{a}{R} \left(\frac{z_0}{f} - 1\right)} z_0 \quad (2.18)$$

Concluimos assim que podemos aproximar o objeto da lente até uma distância máxima z_1 dada pela equação (2.18) anterior. O “pinhole” barra os raios formadores da imagem de qualquer objeto em distâncias mais próximas do que essa.

Para a distância máxima z_2 devemos repetir os mesmos passos anteriores, porém com cuidado para evitar distâncias negativas. Por semelhança de triângulos temos

$$\frac{R}{z_2'} = \frac{a}{z_0' - z_2'} \quad (2.19)$$

O que resulta em

$$z_2 = \frac{1}{1 - \frac{a}{R} \left(\frac{z_0}{f} - 1 \right)} z_0 \quad (2.20)$$

Obtemos uma equação muito semelhante ao do caso de z_1 , envolvendo apenas um sinal diferente no denominador que advém do fato de que a distância z_2' é menor que z_1' . Tomando a diferença entre as distâncias dadas pelas equações (2.18) e (2.20) temos a DOF

$$\Delta z = z_1 - z_2 = \frac{z_0}{1 - \frac{a}{R} \left(\frac{z_0}{f} - 1 \right)} - \frac{z_0}{1 + \frac{a}{R} \left(\frac{z_0}{f} - 1 \right)} \quad (2.21)$$

$$\Delta z = \frac{2 \frac{a}{R} \left(\frac{z_0}{f} - 1 \right)}{1 - \frac{a^2}{R^2} \left(\frac{z_0}{f} - 1 \right)^2} z_0 \quad (2.22)$$

Substituindo m da equação (2.10) na equação de Δz

$$\Delta z = \frac{2 \frac{a}{Rm}}{1 - \left(\frac{a}{mR} \right)^2} z_0 \quad (2.23)$$

Se levarmos em conta que valores típicos do tamanho do “pinhole” estão na faixa de micrômetros, valores típicos da magnificação estão entre 10x a 100x e valores típicos de R estão na faixa de milímetros, podemos desprezar o termo $\left(\frac{a}{mR} \right)^2$ no

denominador, uma vez que $a \ll mR$, obtendo a expressão:

$$\Delta z = \pm \frac{a}{mR} z_0 = \pm \frac{a}{m} \frac{R}{f} \quad (2.24)$$

$$m = \frac{1}{\frac{z_0}{f} - 1} \Rightarrow \frac{z_0}{f} = \frac{1}{m} + 1 = \frac{m+1}{m} \quad (2.25)$$

Lembrando que a abertura numérica é definida por

$$N.A. = n \operatorname{sen} \theta \quad (2.26)$$

Portanto

$$\operatorname{sen} \theta = \frac{NA}{n} \Rightarrow \tan \theta = \frac{\frac{NA}{n}}{\sqrt{1 - \frac{NA^2}{n^2}}} = \frac{NA}{\sqrt{n^2 - NA^2}} \quad (2.27)$$

Dessa forma

$$\tan \theta = \frac{R}{f} = \frac{NA}{\sqrt{n^2 - NA^2}} \quad (2.28)$$

A equação (2.24) pode, então, ser expressa em termos dos parâmetros da objetiva como:

$$\Delta z = \pm \frac{(m+1)\sqrt{n^2 - NA^2}}{m^2 NA} a \quad (2.29)$$

Seccionamento Óptico de Objetos não pontuais.

Nos casos anteriores consideramos um objeto pontual e a capacidade de discriminação da sua posição nas direções lateral e axial, baseada no DOF. Entretanto, na microscopia confocal, o objeto não é pontual, pois a excitação da amostra se dá em todo o cone de focalização do laser. Esse fato está exemplificado pela Figura 13.

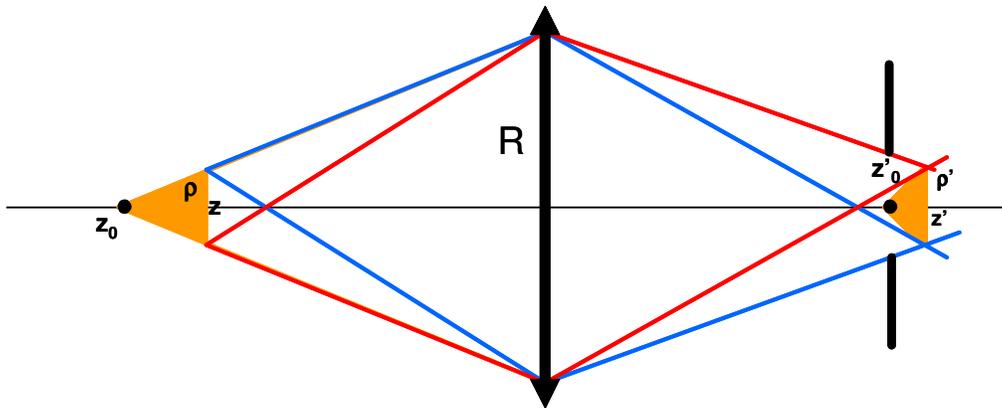


Figura 13 Formação da imagem levando em conta o cone de excitação

A área pintada de laranja representa o cone excitação na amostra. Os raios azuis mostram onde a imagem do ponto (ρ, z) estará e os raios vermelhos mostram onde a imagem do ponto $(-\rho, z)$ estará. O ponto z_0 é o objeto em foco e z'_0 a posição de sua imagem conjugada. O ponto z representa o último plano do cone de excitação em que seus raios mais externos na posição ρ ainda conseguem passar pelo “pinhole”. As posições z' e ρ' representam suas respectivas imagens. Para qualquer plano do cone em uma distância maior do que z os raios mais externos serão barrados pelo “pinhole”. A variação na intensidade do detector, portanto, é capaz de discriminar imagens de objetos advindos de diferentes posições. Vale a pena ressaltar que não há como o detector discriminar qualquer ponto interior ao cone, não importando sua posição z e ρ , pois todos os raios advindos desses pontos chegam ao detector. A única diferença entre eles é que a intensidade de luz de cada plano está distribuída em uma área maior ou menor.

A Figura 13 mostra de onde vem o poder de seccionamento óptico da Microscopia Confocal. A idéia agora é calcular o valor de z em que teremos essa condição limite. A semelhança de triângulos da Figura 13 fornece:

$$\frac{R}{z_0} = \frac{\rho}{z_0 - z} \Rightarrow \rho = \frac{z_0 - z}{z_0} R \quad (2.30)$$

$$\frac{\rho}{z - f} = \frac{\rho'}{f} \Rightarrow \rho' = \frac{f}{z - f} \rho \quad (2.31)$$

F é a distância focal da lente na equação 2.31. A posição ρ' pode ser escrita em termos de R , z_0 , z , z' e z_0' conforme mostra a Figura 14 a seguir. Na posição da lente, para $z = 0$, a reta tem altura R , e tem altura ρ' para $z = z'$. Precisamos da altura na posição $z = z_0'$.

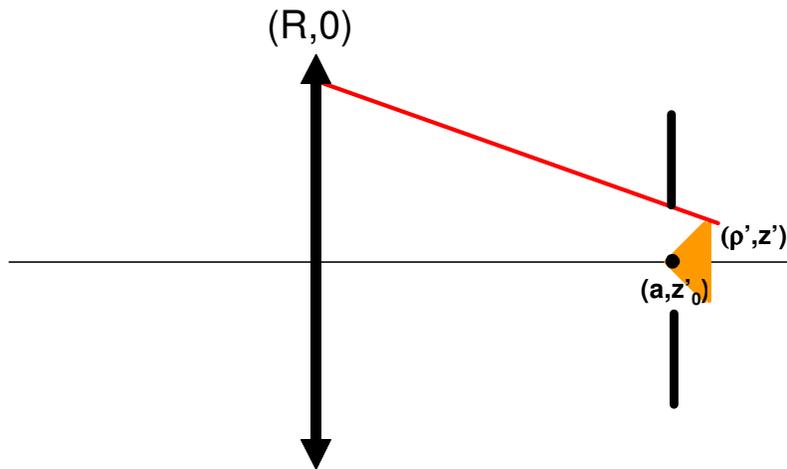


Figura 14 Posição de ρ'

A reta em vermelho pode ser descrita a partir da seguinte equação

$$(\rho', z') = (R, 0) + \lambda(a - R, z_0') \quad (2.32)$$

Onde temos que achar o valor de λ . Separando o termo de ρ

$$\rho' = R + \lambda(a - R) = (1 - \lambda)R + \lambda a \quad (2.33)$$

No ponto da imagem fora de foco $z = z_0'$ então

$$z_0' = \lambda z_0' \Rightarrow \lambda = \frac{z_0'}{z_0'} \quad (2.34)$$

Com isso temos uma equação descrevendo qualquer ponto ρ' da reta vermelha na Figura 14:

$$\rho' = \left(1 - \frac{z_0'}{z_0'}\right)R + \frac{z_0'}{z_0'} a \quad (2.35)$$

Substituindo o valor de ρ' da equação (2.35) na equação (2.31) obtemos

$$\frac{f}{z-f} \rho = \left(1 - \frac{z'}{z_0}\right) R + \frac{z'}{z_0} a \quad (2.36)$$

Podemos também substituir o valor de ρ utilizando o valor da equação (2.30)

$$\frac{f}{z-f} \frac{z_0 - z}{z_0} R = \left(1 - \frac{z'}{z_0}\right) R + \frac{z'}{z_0} a \quad (2.37)$$

Utilizando novamente a equação das lentes delgadas para z e z_0

$$\frac{1}{z'} = \frac{1}{f} - \frac{1}{z} \Rightarrow \frac{1}{z'} = \frac{z-f}{zf} \quad (2.38)$$

$$\frac{1}{z'_0} = \frac{1}{f} - \frac{1}{z_0} \Rightarrow \frac{1}{z'_0} = \frac{z_0 - f}{fz_0} \quad (2.39)$$

Portanto a razão z'/z'_0 será

$$\frac{z'}{z'_0} = \frac{zf}{z-f} \frac{z_0 - f}{fz_0} = \frac{z(z_0 - f)}{z_0(z-f)} \quad (2.40)$$

Substituindo o valor de z'/z'_0 na equação (2.37)

$$\frac{f}{z-f} \frac{z_0 - z}{z_0} R = R - (R-a) \frac{z(z_0 - f)}{z_0(z-f)} \quad (2.41)$$

$$f(z_0 - z)R = z_0(z-f)R - (R-a)z(z_0 - f) \quad (2.42)$$

$$z[2fR + a(z_0 - f)] = 2fRz_0 \quad (2.43)$$

$$z = \frac{2fR}{2fR - a(z_0 - f)} z_0 \quad (2.44)$$

$$z = \frac{1}{1 + \frac{1}{2} \frac{a}{R} \left(\frac{z_0}{f} - 1\right)} z_0 \quad (2.45)$$

A equação (2.45) dá o valor máximo de z para que os raios ainda sejam detectados na situação da Figura 13. A posição máxima de z foi calculada na

situação em que $z < z_0$, devemos considerar também o caso em que $z > z_0$ mostrado na Figura 15.

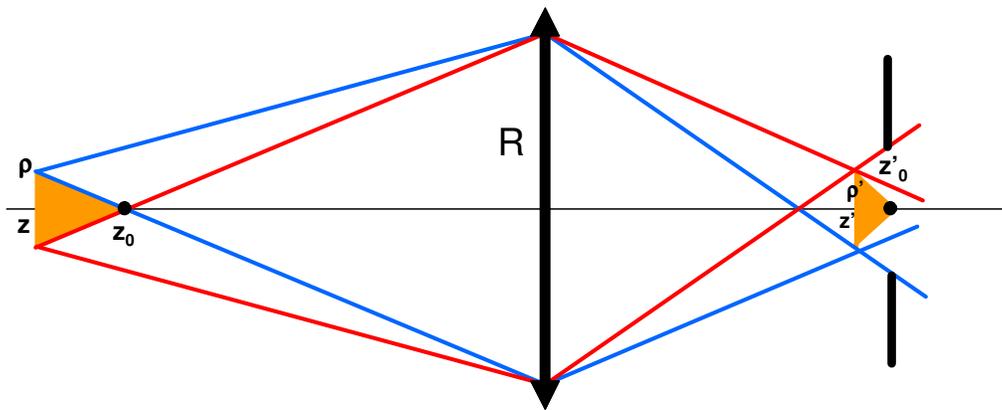


Figura 15 Formação da imagem levando em conta o cone de excitação para o caso em que $z > z_0$

A idéia nesse caso é a mesma, calcular a posição z máxima em que o plano do cone de fluorescência formará a imagem. Por semelhança de triângulos:

$$\frac{R}{z_0} = \frac{\rho}{z - z_0} \Rightarrow \rho = \frac{z - z_0}{z_0} R \quad (2.46)$$

$$\frac{\rho}{z - f} = \frac{-\rho'}{f} \Rightarrow \rho' = \frac{f}{f - z} \rho \quad (2.47)$$

Utilizando os mesmos passos chegamos a uma equação semelhante à equação (2.45) só que com um sinal trocado, como no caso do DOF:

$$z = \frac{1}{1 - \frac{1}{2} \frac{a}{R} \left(\frac{z_0}{f} - 1 \right)} z_0 \quad (2.48)$$

A diferença entre as duas distâncias máximas calculadas pelas equações (2.45) e (2.48) nos fornece a distância entre os planos excitados pelo cone de fluorescência que formarão a imagem:

$$\Delta z = \frac{\frac{a}{R} \left(\frac{z_0}{f} - 1 \right)}{1 - \frac{1}{4} \frac{a^2}{R^2} \left(\frac{z_0}{f} - 1 \right)^2} z_0 \quad (2.49)$$

Substituindo a magnificação m e fazendo as mesmas aproximações para $a \ll mR$:

$$\Delta z = \pm \frac{1}{2} \frac{a}{mR} z_0 \quad (2.50)$$

Podemos ver pela equação (2.50) que a presença do “pinhole” melhora a resolução em z , já que quanto menor o “pinhole” menor será a distância entre os planos de excitação que chegarão ao detector. A resolução dada pela equação (2.50) tem a metade do valor da resolução dada pela equação (2.24). A Tabela 1 mostra alguns valores de Δz calculados a partir das equações (2.29) e (2.50) em função do valor de a , a abertura do “pinhole”, para $m = 100x$, $NA = 1,4$ e $n = 1,5$.

a (μm)	DOF (nm) (Eq. 2.24)	Δz (nm) (Eq. 2.50)
200	777	389
150	583	292
100	389	195
50	194	97
40	155	78
30	117	59
20	78	39
10	39	20

Tabela 1 Valores de DOF e da resolução axial em função da dimensão da abertura a do “pinhole”

2.2.2 Resolução em Microscopia Confocal: Tratamento Rigoroso

Para sistemas sem aberrações a imagem de uma fonte pontual pela óptica geométrica é também um ponto. Entretanto, efeitos de difração da óptica ondulatória fazem com que essa imagem não seja mais um ponto para esta

abordagem. A intensidade de luz da imagem será distribuída nas três dimensões. Define-se a “Point Spread Function”, PSF, como a distribuição da intensidade da luz no plano imagem de um objeto pontual. O cálculo da formação da imagem na Microscopia Confocal envolve três passos:

1. Cálculo do campo de excitação no plano objeto → PSF da excitação
2. Cálculo de interações da radiação com a matéria
3. Cálculo da resposta no plano imagem → PSF de detecção

Nessa seção vamos desenvolver um cálculo rigoroso, levando em conta a óptica ondulatória, dos três passos anteriores, e, então chegar aos limites de resolução da Microscopia Confocal.

2.2.2.1 Cálculo da PSF de Excitação

A amplitude do PSF de um microscópio está relacionada com a intensidade do campo eletromagnético (EM) no plano da imagem quando observamos uma fonte pontual de luz (Born and Wolf, 1999, pp. 484-499)¹⁷. Não é possível detectar flutuações nas amplitudes diretamente, mas pode-se detectar o módulo quadrado da PSF, denominado de intensidade da PSF, que é a intensidade da imagem formada pelo objeto pontual no detector do microscópio. Claro que objetos reais não são pontuais, porém podemos considerar objetos reais como uma superposição de objetos pontuais. Portanto a PSF de um objeto real é a soma de todas as PSFs de cada objeto pontual.

Para calcular a PSF partiremos de uma representação conhecida como Representação do Espectro Angular (REA). A Representação do Espectro Angular (REA) foi introduzida por Weyl¹⁸ e consiste em uma forma de representar os campos eletromagnéticos em um meio homogêneo. Nesta representação os campos EM são descritos como uma superposição de ondas que são soluções

¹⁷ M. Born and E. Wolf; “*Principles of Optics*”, 7th Expanded Ed. Cambridge: Cambridge University Press

¹⁸ H. Weyl; “*Ausbreitung elektromagnetischer Wellen über einem ebenen Leiter*” Ann. Phys. (Leipzig), 60:481-500, 1919.

das equações de Maxwell. Mandel¹⁹, Richards e Wolf^{20,21} e Novotny²² fazem uso desta técnica para descrever os campos focalizados. A teoria desenvolvida nessa seção está baseada nesses trabalhos.

Consideraremos um campo elétrico $\vec{E}(\vec{r})$ em qualquer ponto do espaço e um eixo z . No plano $z = \text{constante}$ extraímos a transformada de Fourier dos campos em duas dimensões, x e y dada por:

$$\vec{e}(k_x, k_y; z) = \frac{1}{4\pi^2} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \vec{E}(x, y, z) e^{-i[k_x x + k_y y]} dx dy \quad (2.51)$$

E sua transformada inversa dada por:

$$\vec{E}(x, y, z) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \vec{e}(k_x, k_y; z) e^{i[k_x x + k_y y]} dk_x dk_y \quad (2.52)$$

onde k_x e k_y são as freqüências espaciais correspondentes as coordenadas x e y . O campo $\vec{E}(\vec{r})$ com dependência harmônica em ω em um meio homogêneo, isotrópico e livre de fontes satisfaz a equação de Helmholtz:

$$(\nabla^2 + k^2)\vec{E}(\vec{r}) = 0 \quad (2.53)$$

onde $k = n\omega/c$ e $n = \sqrt{\mu\epsilon}$. Definindo $k_z \equiv \sqrt{k^2 - k_x^2 - k_y^2}$ com $\text{Im}(k_z) \geq 0$ podemos inserir a representação de Fourier do campo (2.52) na equação de Helmholtz da qual obtemos:

$$\vec{e}(k_x, k_y; z) = \vec{e}(k_x, k_y; 0) e^{\pm i k_z z} \quad (2.54)$$

¹⁹ L. Mandel; E. Wolf, “*Optical Coherence and Quantum Optics*”, Cambridge University Press, New York, 1995.

²⁰ E. Wolf, “*Electromagnetic Diffraction in Optical Systems. 1. An Integral Representation of the Image Field.*” Proc R Soc Lond Ser-A, 253(1274):349-357, 1959

²¹ B. Richards, E. Wolf; “*Electromagnetic Diffraction in Optical Systems. 2. Structure of the Image Field in an Aplanatic System.*” Proc R Soc Lon Ser-A, 253(1274):258-279, 1959.

²² L. Novotny, B. Hecht; “*Principles of Nano-Optics*”, Cambridge University Press, New York, 2006.

A equação (2.54) nos mostra que podemos calcular o espectro de Fourier do campo elétrico no plano imagem ($z = 0$) multiplicando o espectro do plano objeto por um propagador $e^{\pm ik_z z}$. A definição de k_z com a parte imaginária positiva nos dá uma solução finita para todo o espaço z . Podemos substituir o valor de $\bar{e}(k_x, k_y; z)$ na equação (2.52)

$$\bar{E}(x, y, z) = \int_{-\infty-\infty}^{\infty} \int_{-\infty-\infty}^{\infty} \bar{e}(k_x, k_y; 0) e^{i[k_x x + k_y y \pm k_z z]} dk_x dk_y \quad (2.55)$$

A equação (2.55) é a equação conhecida como REA. Teremos uma equação semelhante para o campo magnético H. Para que a equação (2.55) obedeça as equações de Maxwell ainda é preciso impor a restrição $\nabla \cdot \bar{E} = 0$. Essa restrição implica em $\vec{k} \cdot \bar{E} = 0$, fazendo com que o vetor \vec{k} tenha direções perpendiculares aos campos. Considerando o caso de um dielétrico sem absorção seu índice de refração é uma grandeza real e positiva e o número de onda k uma grandeza real. Dependendo dos valores de k_x e k_y , o k_z dado por $k_z \equiv \sqrt{k^2 - k_x^2 - k_y^2}$ pode ser real, e o termo $e^{\pm ik_z z}$ oscilatório, ou imaginário, que dá origem a campos evanescentes. Essas duas soluções características são dadas por:

$$\begin{aligned} e^{i[k_x x + k_y y]} e^{\pm i|k_z|z} & \quad k_x^2 + k_y^2 \leq k^2 \\ e^{i[k_x x + k_y y]} e^{-|k_z||z|} & \quad k_x^2 + k_y^2 > k^2 \end{aligned} \quad (2.56)$$

A primeira equação em (2.56) é uma solução tipo onda plana enquanto a segunda apresenta solução típica de ondas evanescentes. O REA é uma superposição dessas soluções. Porém como estamos analisando o plano imagem em uma distância grande em relação ao plano objeto, a contribuição das ondas evanescentes será nula e a integral do campo se reduzirá a região $k_x^2 + k_y^2 \leq k^2$.

O feixe paraxial

Quando os campos se propagam ao longo de uma direção z (\vec{k} quase paralelo ao eixo- z) e divergem pouco na direção transversal (k_x e k_y muito pequenos

quando comparados a k), como na propagação de um feixe de laser, podemos fazer a aproximação paraxial. Expandindo k_z em série:

$$k_z = k\sqrt{1 - \frac{(k_x^2 + k_y^2)}{k^2}} \approx k - \frac{(k_x^2 + k_y^2)}{2k} \quad (2.57)$$

Esta aproximação simplifica bastante a integração e representa o caso de feixe com focalização fraca.

Campos para Regiões Distantes

Estamos interessados nos campos em regiões distantes \vec{r}_∞ do plano objeto. Para isso vamos introduzir um vetor unitário adimensional \hat{s} na direção de \vec{r}_∞ dado por:

$$\hat{s} = (s_x, s_y, s_z > 0) = \left(\frac{x}{r}, \frac{y}{r}, \frac{z}{r} > 0 \right) \quad (2.58)$$

onde $r^2 = x^2 + y^2 + z^2$ é a distância de \vec{r}_∞ até a origem. Para determinar o campo distante \vec{E}_∞ vamos fazer $r \rightarrow \infty$ e reescrever (2.55) como:

$$\vec{E}_\infty(s_x, s_y, s_z) = \lim_{kr \rightarrow \infty} \iint_{(k_x^2 + k_y^2) \leq k^2} \vec{e}(k_x, k_y; 0) e^{ikr \left[\frac{k_x}{k} s_x + \frac{k_y}{k} s_y + \frac{k_z}{k} s_z \right]} dk_x dk_y \quad (2.59)$$

A integral dupla é avaliada através do método de fase estacionária (Mandel¹⁹, Born²³). Conforme $kr \rightarrow \infty$ a integral irá oscilar rapidamente levando assim a uma tendência de cancelamento dos termos positivos e negativos. Contudo existem pontos no intervalo de integração onde a fase é estacionária, isto é, pontos k_{x_0} e k_{y_0} onde:

$$\nabla \Phi(k_x, k_y) = 0 \quad (2.60)$$

Sendo $\Phi(k_x, k_y) = \frac{k_x}{k} s_x + \frac{k_y}{k} s_y + \frac{k_z}{k} s_z$ e $k_z = \sqrt{k^2 - (k_x^2 + k_y^2)}$. Com isso o comportamento assintótico da integral (2.59) será determinado pelo

²³ Born, M.; Wolf, E. *Principles of Optics* (Pergamon, UK, 1970).

comportamento do integrando nesses pontos estacionários. Podemos expandir a função $\Phi(k_x, k_y)$ em série de Taylor em torno desses pontos

$$\begin{aligned}\Phi(k_x, k_y) &\cong \Phi(k_{x_0}, k_{y_0}) + \frac{1}{2}(\Phi_{xx}(k_x - k_{x_0})^2 + 2\Phi_{xy}(k_x - k_{x_0})(k_y - k_{y_0}) + \Phi_{yy}(k_y - k_{y_0})^2) \\ &= \Phi(k_{x_0}, k_{y_0}) + \frac{1}{2}(\Phi_{xx}\xi^2 + 2\Phi_{xy}\xi\eta + \Phi_{yy}\eta^2)\end{aligned}\quad (2.61)$$

onde $\xi = k_x - k_{x_0}$ e $\eta = k_y - k_{y_0}$. A integral torna-se então

$$\vec{E}_\infty(s_x, s_y, s_z) = \vec{e}(k_{x_0}, k_{y_0}; 0) e^{ikr \left[\frac{k_{x_0}}{k} s_x + \frac{k_{y_0}}{k} s_y + \frac{k_{z_0}}{k} s_z \right]} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} e^{i \frac{kr}{2} (\Phi_{xx}\xi^2 + 2\Phi_{xy}\xi\eta + \Phi_{yy}\eta^2)} d\xi d\eta \quad (2.62)$$

Completando o quadrado:

$$\begin{aligned}\Phi_{xx}\xi^2 + 2\Phi_{xy}\xi\eta + \Phi_{yy}\eta^2 &= \Phi_{xx} \left[\xi^2 + 2\frac{\Phi_{xy}}{\Phi_{xx}}\xi\eta + \frac{\Phi_{xy}^2}{\Phi_{xx}^2}\eta^2 - \frac{\Phi_{xy}^2}{\Phi_{xx}^2}\eta^2 \right] + \Phi_{yy}\eta^2 \\ &= \Phi_{xx} \left[\xi + \frac{\Phi_{xy}}{\Phi_{xx}}\eta \right]^2 + \frac{\Phi_{xx}\Phi_{yy} - \Phi_{xy}^2}{\Phi_{xx}}\eta^2\end{aligned}\quad (2.63)$$

Chamando $\nu = \xi + \frac{\Phi_{xy}}{\Phi_{xx}}\eta$ chegamos a

$$\begin{aligned}\vec{E}_\infty(s_x, s_y, s_z) &= \vec{e}(k_{x_0}, k_{y_0}; 0) e^{ikr \left[\frac{k_{x_0}}{k} s_x + \frac{k_{y_0}}{k} s_y + \frac{k_{z_0}}{k} s_z \right]} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} e^{i \frac{kr}{2} \Phi_{xx} \nu^2} e^{i \frac{kr}{2} \frac{\Phi_{xx}\Phi_{yy} - \Phi_{xy}^2}{\Phi_{xx}} \eta^2} d\nu d\eta \\ &= 4\vec{e}(k_{x_0}, k_{y_0}; 0) e^{ikr \left[\frac{k_{x_0}}{k} s_x + \frac{k_{y_0}}{k} s_y + \frac{k_{z_0}}{k} s_z \right]} \int_0^\infty e^{i \frac{kr}{2} \Phi_{xx} \nu^2} d\nu \int_0^\infty e^{i \frac{kr}{2} \frac{\Phi_{xx}\Phi_{yy} - \Phi_{xy}^2}{\Phi_{xx}} \eta^2} d\eta\end{aligned}\quad (2.64)$$

Estas integrais são as integrais de Fresnel e valem

$$\int_0^\infty e^{iau^2} du = \frac{1}{2} \sqrt{\frac{\pi}{|a|}} e^{\pm i\pi/4} \quad (2.65)$$

Para prosseguir precisamos determinar quais são os pontos estacionários

$$\Phi_x \Big|_{k_{x_0}} = \frac{1}{k} \left(s_x + s_z \frac{\partial}{\partial k_x} k_z \right) \Big|_{k_{x_0}} = \frac{1}{k} \left(s_x - s_z \frac{k_{x_0}}{k_{z_0}} \right) = 0 \quad (2.66)$$

$$\Phi_y|_{k_{y0}} = \frac{1}{k} \left(s_y + s_z \frac{\partial}{\partial k_y} k_z \right) \Big|_{k_{y0}} = \frac{1}{k} \left(s_y - s_z \frac{k_{y0}}{k_{z0}} \right) = 0 \quad (2.67)$$

Sendo assim

$$k_{z0} = \sqrt{k^2 - (k_{x0}^2 + k_{y0}^2)} = \sqrt{k^2 - k_{z0}^2 (s_{x0}^2 + s_{y0}^2) / s_z^2} \quad (2.68)$$

$$\therefore k_{z0} = s_z k$$

Portanto o ponto de fase estacionária é em $P_1(s_x k, s_y k, s_z k)$. Neste ponto temos

$$\Phi_{xx}|_{P_1} = \frac{1}{k} \frac{\partial}{\partial k_x} \left(s_x - s_z \frac{k_x}{k_z} \right) \Big|_{P_1} = \frac{-s_z}{k k_z} \left(1 + \frac{k_x^2}{k_z^2} \right) \Big|_{P_1} = \frac{-1}{k^2} \left[1 + \left(\frac{s_x}{s_z} \right)^2 \right] < 0 \quad (2.69)$$

$$\Phi_{yy}|_{P_1} = \frac{1}{k} \frac{\partial}{\partial k_y} \left(s_y - s_z \frac{k_y}{k_z} \right) \Big|_{P_1} = \frac{-s_z}{k k_z} \left(1 + \frac{k_y^2}{k_z^2} \right) \Big|_{P_1} = \frac{-1}{k^2} \left[1 + \left(\frac{s_y}{s_z} \right)^2 \right] < 0 \quad (2.70)$$

$$\Phi_{xy}|_{P_1} = \frac{1}{k} \frac{\partial}{\partial k_y} \left(s_x - s_z \frac{k_x}{k_z} \right) \Big|_{P_1} = \frac{-s_z k_x k_y}{k k_z^3} \Big|_{P_1} = \frac{-1}{k^2} \frac{s_x s_y}{s_z^2} \quad (2.71)$$

O termo da segunda integral de Fresnel vale:

$$(\Phi_{xx} \Phi_{yy} - \Phi_{xy}^2) / \Phi_{xx} = \frac{-1}{k^2 (s_z^2 + s_x^2)} \quad (2.72)$$

O resultado de 2.59 pode, então, ser expresso como:

$$\begin{aligned} \vec{E}_\infty(s_x, s_y, s_z) &= \vec{e}(s_x k, s_y k; 0) e^{ikr} \left(\frac{\sqrt{2\pi k s_z^2}}{\sqrt{r(s_z^2 + s_x^2)}} e^{-i\pi/4} \right) \left(\frac{\sqrt{2\pi k (s_z^2 + s_x^2)}}{r} e^{-i\pi/4} \right) \\ &= -2\pi i k s_z \vec{e}(s_x k, s_y k; 0) \frac{e^{ikr}}{r} \end{aligned} \quad (2.73)$$

A equação (2.73) nos mostra que o campo longínquo no plano imagem pode ser expresso apenas em termos do espectro de Fourier $\vec{e}(k s_x, k s_y; 0)$, no plano objeto,

trocando $k_x \rightarrow ks_x$ e $k_y \rightarrow ks_y$. Isto implica que o vetor unitário satisfaz

$$\hat{s} = (s_x, s_y, s_z) = \left(\frac{k_x}{k}, \frac{k_y}{k}, \frac{k_z}{k} \right) \quad (2.74)$$

o que significa que somente as ondas planas com vetor de onda $\vec{k} = (k_x, k_y, k_z)$ do espectro angular em $z = 0$ contribuem para o campo longínquo no ponto localizado na direção do vetor unitário \hat{s} . O efeito de todas as outras ondas planas é cancelado por uma interferência destrutiva. A partir da equação (2.73) junto com (2.74) podemos escrever o espectro de Fourier como

$$\vec{e}(k_x, k_y; 0) = \frac{ire^{-ikr}}{2\pi k_z} \vec{E}_\infty(k_x, k_y) \quad (2.75)$$

Então o REA pode ser escrito como

$$\vec{E}(x, y, z) = \frac{ire^{-ikr}}{2\pi} \iint_{(k_x^2 + k_y^2) \leq k^2} \vec{E}_\infty(k_x, k_y) e^{i[k_x x + k_y y \pm k_z z]} \frac{dk_x dk_y}{k_z} \quad (2.76)$$

No nosso sistema o laser passa por uma objetiva de grande abertura numérica com campos altamente focalizados. Os campos de um laser focalizados são determinados pelas condições de contorno do elemento de focalização e do campo óptico incidente.

Campos Focalizados

Os campos na vizinhança de uma lente podem ser obtidos a partir da óptica geométrica. Nesse caso o comprimento de onda finito é desprezado ($k \rightarrow \infty$) e a energia é transportada ao longo do raio. A lente é um sistema óptico aplanático¹⁴, Figura 16, portanto satisfaz a condição seno de Abbe

$$h = f \operatorname{sen} \theta \quad (2.77)$$

assim como a condição da conservação da energia, conhecida como apodização:

$$|\vec{E}_1| = |\vec{E}_0| \sqrt{\frac{n_0}{n_1} \cos \theta} \quad (2.78)$$

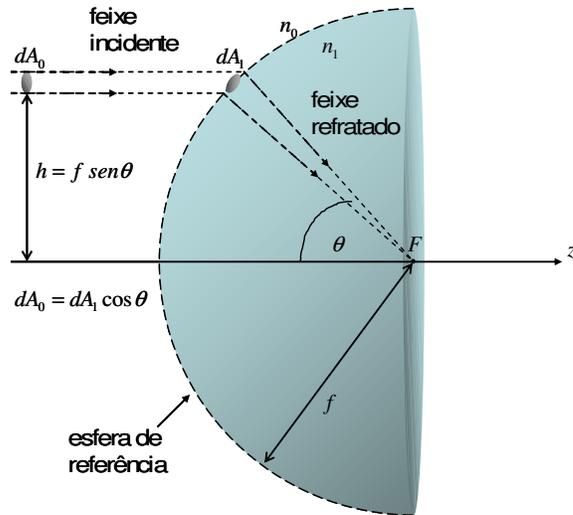


Figura 16 Detalhes da condição seno de Abbe e leis de intensidade da óptica geométrica

Onde h é a distância do feixe ao eixo óptico, f é a distância focal da lente e θ é o ângulo de divergência. Portanto através da condição seno o nosso sistema óptico pode ser representado como mostra a Figura 17.

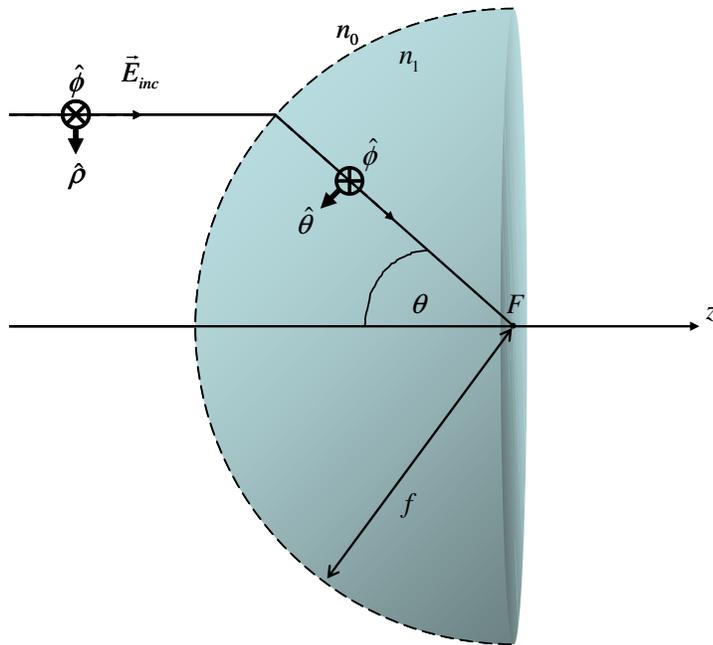


Figura 17 Representação geométrica de um sistema aplanático e coordenadas utilizadas

Os feixes incidentes são refratados pela esfera de referência de raio f . Neste caso, todos os caminhos até o foco F têm o mesmo atraso de fase, tornando assim possível ignorar o atraso de fase entre feixes diferentes. Denota-se um ponto arbitrário nesta esfera de referência por $(x_\infty, y_\infty, z_\infty)$ e o campo arbitrário perto do foco por (x, y, z) . Estes pontos também podem ser representados em coordenadas esféricas por (f, θ, ϕ) e (r, ϑ, φ) respectivamente.

Utilizaremos a seguinte notação para vetores: \vec{V} para um vetor qualquer e $\hat{V} = \frac{\vec{V}}{\|\vec{V}\|}$

para o vetor unitário na direção de \vec{V} . Para descrever os feixes refratados pela esfera de referência, definiremos os vetores unitários $\hat{\rho}, \hat{\phi}, \hat{\theta}$. Os vetores $\hat{\rho}$ e $\hat{\phi}$ (fora da esfera de referência) pertencem ao sistema de coordenadas cilíndricas do feixe incidente, enquanto os vetores $\hat{\theta}$ e $\hat{\phi}$ (dentro da esfera de referência) pertencem ao sistema de coordenadas esféricas do feixe focalizado.

A refração dos feixes na esfera de referência será calculada dividindo o campo incidente em duas componentes: $\vec{E}_{inc}^{(s)}$ e $\vec{E}_{inc}^{(p)}$, onde os índices p e s representam as polarizações s e p respectivamente. Com isso podemos escrever o campo em termos dos vetores $\hat{\rho}$ e $\hat{\phi}$

$$\vec{E}_{inc}^{(s)} = [\vec{E}_{inc} \cdot \hat{\phi}] \hat{\phi} \quad \vec{E}_{inc}^{(p)} = [\vec{E}_{inc} \cdot \hat{\rho}] \hat{\theta} \quad (2.79)$$

A duas componentes do campo (2.79) são refratadas de forma diferentes pela esfera de referência. A componente $\hat{\phi}$ permanece inalterada. Porém a componente $\hat{\rho}$ se altera com $\hat{\theta}$. Então o campo elétrico refratado \vec{E}_∞ é

$$\vec{E}_\infty = [t^s [\vec{E}_{inc} \cdot \hat{\phi}] \hat{\phi} + t^p [\vec{E}_{inc} \cdot \hat{\rho}] \hat{\theta}] \sqrt{\frac{n_0}{n_1} \cos \theta} \quad (2.80)$$

O termo da raiz na equação (2.80) vem da conservação da energia. Os coeficientes t^s e t^p são os coeficientes de transmissão.

Podemos representar também os vetores unitários $\hat{\rho}, \hat{\phi}, \hat{\theta}$ em termos das coordenadas cartesianas $\hat{x}, \hat{y}, \hat{z}$ da seguinte forma

$$\begin{aligned}\hat{\rho} &= \cos \phi \hat{x} + \text{sen} \phi \hat{y} \\ \hat{\phi} &= -\text{sen} \phi \hat{x} + \cos \phi \hat{y} \\ \hat{\theta} &= \cos \theta \cos \phi \hat{x} + \cos \theta \text{sen} \phi \hat{y} - \text{sen} \theta \hat{z}\end{aligned}\quad (2.81)$$

Usando a representação na equação (2.80) do campo refratado

$$\begin{aligned}\vec{E}_{\infty}(\theta, \phi) &= t^s(\theta) \left[\vec{E}_{inc}(\theta, \phi) \cdot \begin{pmatrix} -\text{sen} \phi \\ \cos \phi \\ 0 \end{pmatrix} \right] \begin{pmatrix} -\text{sen} \phi \\ \cos \phi \\ 0 \end{pmatrix} \sqrt{\frac{n_0 \cos \theta}{n_1}} \\ &+ t^p(\theta) \left[\vec{E}_{inc}(\theta, \phi) \cdot \begin{pmatrix} \cos \phi \\ \text{sen} \phi \\ 0 \end{pmatrix} \right] \begin{pmatrix} \cos \phi \cos \theta \\ \text{sen} \phi \cos \theta \\ -\text{sen} \theta \end{pmatrix} \sqrt{\frac{n_0 \cos \theta}{n_1}}\end{aligned}\quad (2.82)$$

A equação (2.82) nos dá o campo logo após a refração na esfera de referência.

Levando em conta a simetria do nosso sistema convém trabalhar com a equação do REA em termos dos ângulos θ e ϕ em lugar das freqüências espaciais k_x e k_y . Isso pode ser feito através das relações

$$k_x = k \text{sen} \theta \cos \phi \quad k_y = k \text{sen} \theta \text{sen} \phi \quad k_z = k \cos \theta \quad (2.83)$$

As diferenciais devem ser alteradas da seguinte forma

$$\frac{dk_x dk_y}{k_z} = k \text{sen} \theta d\theta d\phi \quad (2.84)$$

As coordenadas transversais podem ser expressas como $x = \rho \cos \phi$ e $y = \rho \text{sen} \phi$. Com essa mudança de variáveis podemos representar o REA da seguinte maneira:

$$\vec{E}(\rho, \phi, z) = \frac{ikfe^{-ikf}}{2\pi} \int_0^{\theta_{\max}} \int_0^{2\pi} \vec{E}_{\infty}(\theta, \phi) e^{ikz \cos \theta} e^{ik\rho \text{sen} \theta \cos(\phi - \varphi)} \text{sen} \theta d\phi d\theta \quad (2.85)$$

O limite da integração em θ se deve a extensão finita da objetiva, obtido da equação da abertura numérica (2.6). Além do mais, como todos os campos se propagam na direção z positiva, somente o sinal positivo foi mantido.

O feixe de laser incidente polarizado na direção x na objetiva pode ser tratado com alta precisão como um feixe Gaussiano:

$$\vec{E}_{inc}(\theta, \phi) = E_0 e^{-(x_\infty^2 + y_\infty^2)/\omega_a^2} \hat{x} \quad (2.86)$$

Além do mais, vamos supor que a objetiva tem uma boa película anti-refletora tal que podemos desprezar os coeficientes de transmissão de Fresnel ($t^s(\theta) = t^p(\theta) = 1$). Portanto podemos escrever o campo distante como

$$\begin{aligned} \vec{E}_\infty(\theta, \phi) &= E_{inc}(\theta, \phi) \left[\cos\phi \hat{\theta} - \sin\phi \hat{\phi} \right] \sqrt{\frac{n_0}{n_1} \cos\theta} \\ &= \frac{E_{inc}(\theta, \phi)}{2} \begin{bmatrix} (1 + \cos\theta) - (1 - \cos\theta) \cos 2\phi \\ -(1 - \cos\theta) \sin 2\phi \\ -2 \cos\phi \sin\theta \end{bmatrix} \sqrt{\frac{n_0}{n_1} \cos\theta} \end{aligned} \quad (2.87)$$

onde este último está em coordenadas cartesianas. Resta agora especificar o perfil da amplitude do feixe incidente E_{inc} . Escrevendo as coordenadas $(x_\infty, y_\infty, z_\infty)$ da Figura 17 por (f, θ, ϕ) temos

$$E_{inc}(\theta, \phi) = E_0 e^{-(x_\infty^2 + y_\infty^2)/\omega_a^2} = E_0 e^{-f^2 \sin^2\theta / \omega_a^2} \quad (2.88)$$

Este feixe tem simetria azimutal no modo TEM (0,0). Note que aqui a largura do feixe ω_a é na entrada da objetiva. O campo elétrico no foco irá depender de quanto o feixe incidente foi expandido em relação ao tamanho da lente. Como o raio de abertura da lente vale $f \sin\theta_{\max}$ define-se o fator de preenchimento como

$$f_0 = \frac{\omega_a}{f \sin\theta_{\max}} \quad (2.89)$$

Isto permite redefinir a função exponencial do campo incidente como

$$f_{\omega}(\theta) = e^{-\frac{\text{sen}^2 \theta}{f_0^2 \text{sen}^2 \theta_{\max}}} \quad (2.90)$$

Podemos fazer então a integral do REA (2.85) de um campo focalizado integrando primeiramente em ϕ utilizando a relação

$$\int_0^{2\pi} \begin{Bmatrix} \cos n\phi \\ \text{sen } n\phi \end{Bmatrix} e^{ix \cos(\phi - \varphi)} d\phi = 2\pi(i)^n J_n(x) \begin{Bmatrix} \cos n\varphi \\ \text{sen } n\varphi \end{Bmatrix} \quad (2.91)$$

Obtendo então as expressões dos campos como

$$\vec{E}^{(x)}(\rho, \varphi, z) = \frac{ikf}{2} \sqrt{\frac{n_0}{n_1}} e^{-ikf} \begin{bmatrix} I_0(\rho, z) + I_2(\rho, z) \cos 2\varphi \\ I_2(\rho, z) \text{sen } 2\varphi \\ -2iI_1(\rho, z) \cos \varphi \end{bmatrix} \quad (2.92)$$

onde as integrais em θ foram abreviadas como

$$I_0(\rho, z) = \int_0^{\theta_{\max}} f_{\omega}(\theta) \sqrt{\cos \theta} \text{sen } \theta (1 + \cos \theta) J_0(k\rho \text{sen } \theta) e^{ikz \cos \theta} d\theta \quad (2.93)$$

$$I_1(\rho, z) = \int_0^{\theta_{\max}} f_{\omega}(\theta) \sqrt{\cos \theta} \text{sen}^2 \theta J_1(k\rho \text{sen } \theta) e^{ikz \cos \theta} d\theta \quad (2.94)$$

$$I_2(\rho, z) = \int_0^{\theta_{\max}} f_{\omega}(\theta) \sqrt{\cos \theta} \text{sen } \theta (1 - \cos \theta) J_2(k\rho \text{sen } \theta) e^{ikz \cos \theta} d\theta \quad (2.95)$$

A PSF é proporcional ao módulo ao quadrado do campo elétrico.

Resolução na Aproximação Paraxial

Para um sistema de baixa NA, θ_{\max} é suficientemente pequeno ($\theta_{\max} \ll \pi/2$) para aproximarmos $\cos \theta \approx 1$ e $\text{sen } \theta \approx \theta$. Vamos considerar uma onda plana incidente na objetiva de modo que $f_{\omega}(\theta) = 1$. Isso corresponde a um feixe Gaussiano com o fator sobre-preenchimento f_0 tendendo a infinito. No plano imagem, em $z = 0$, os

termos exponenciais nas integrais são iguais a 1 e a função de Bessel J_2 vai para zero. A única integral que sobra é a I_0 que se transforma em

$$I_0(\rho, z) = 2 \int_0^{\theta_{\max}} J_0(k\rho\theta) \theta d\theta = \frac{2}{(k\rho)^2} \int_0^{k\rho\theta_{\max}} J_0(x) x dx \quad (2.96)$$

Utilizando a relação de recorrência da função de Bessel

$$\frac{d}{dx} [x^n J_n(x)] = x^n J_{n-1}(x) \quad (2.97)$$

$$I_0(\rho, z) = \frac{2}{(k\rho)^2} k\rho\theta_{\max} J_1[k\rho\theta_{\max}] = \theta_{\max}^2 \left[2 \frac{J_1[k\rho\theta_{\max}]}{k\rho\theta_{\max}} \right] \quad (2.98)$$

O termo entre colchetes é conhecido como função de Airy. O gráfico da Figura 18 mostra o comportamento da função de Airy em termos da variável adimensional

$k\rho\theta_{\max}$. Para $\rho \rightarrow 0$ ela vale 1 pois $J_n(x) \rightarrow \frac{x^n}{2^n n!}$ quando $x \rightarrow 0$. Ela se anula na

primeira raiz da J_1 que vale 3,8317. A PSF será a função de Airy ao quadrado que se anula sempre que $k\rho\theta_{\max}$ seja uma raiz da função J_1 , formando os anéis de

Airy. A Figura 19 mostra as posições dos anéis de Airy com mais detalhe. A Figura 20 mostra um gráfico tridimensional dos anéis de difração de Airy.

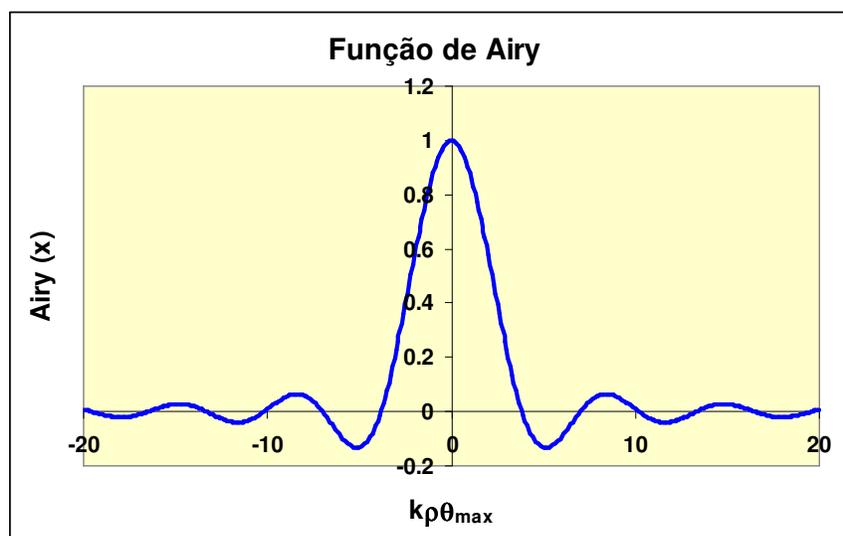


Figura 18 Gráfico da função de Airy

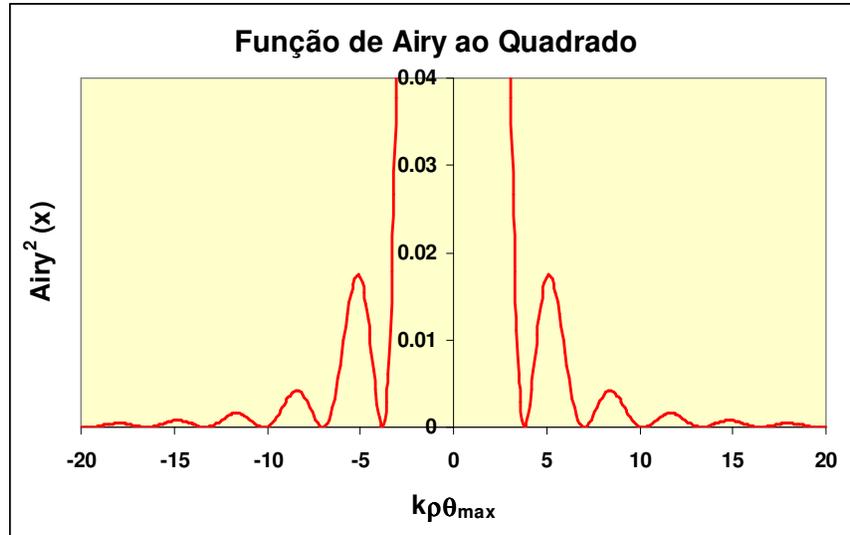
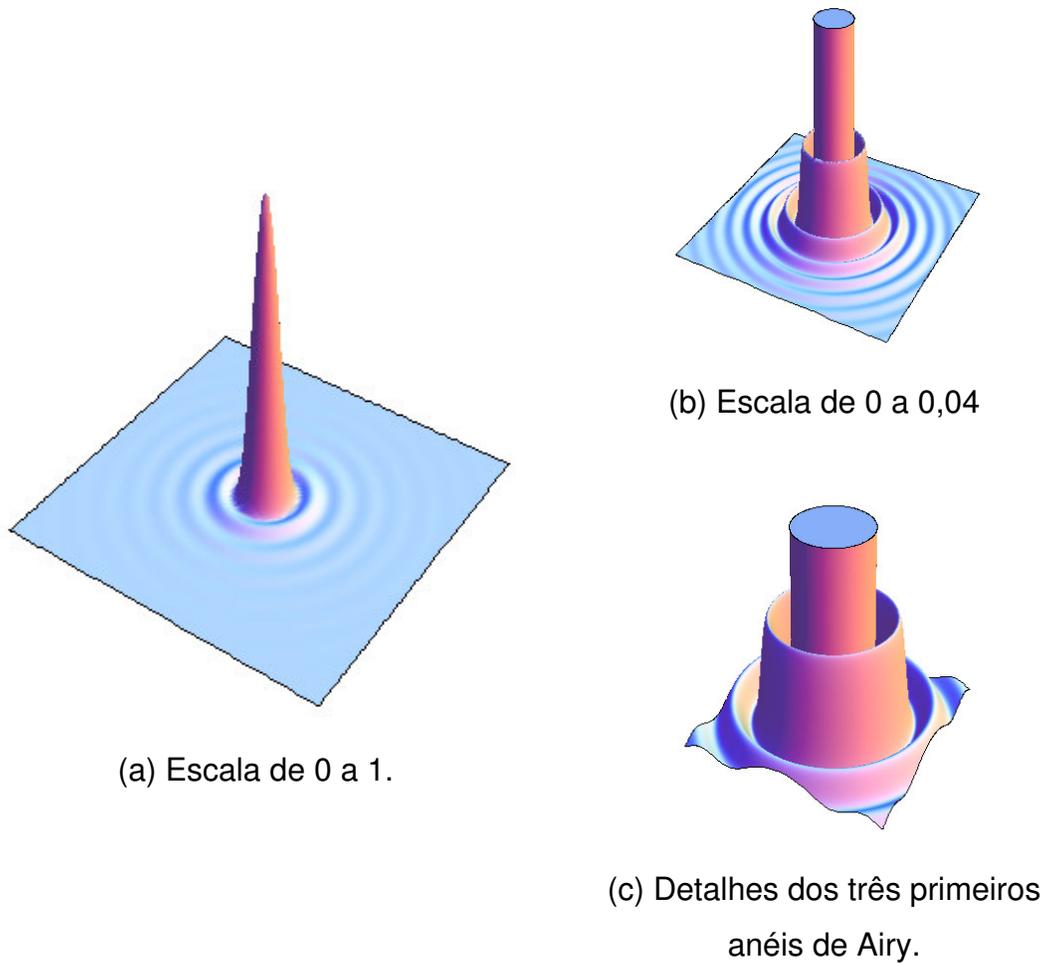


Figura 19 Gráfico da função de Airy elevada ao quadrado



(a) Escala de 0 a 1.

(b) Escala de 0 a 0,04

(c) Detalhes dos três primeiros anéis de Airy.

Figura 20 Gráfico tridimensional mostrando os anéis de Airy de difração

Considerando a resolução ρ como o raio do primeiro anel de Airy, i.e., $k \rho \theta_{\max} = 3,8317$, usando $NA = n \theta_{\max}$, obtemos

$$\rho = 0.609 \frac{\lambda}{NA} \quad (2.99)$$

Para a resolução axial na aproximação paraxial devemos fazer agora $\rho = 0$ e examinar I_0 em função de z . Nesse caso vamos considerar a aproximação do

coosseno até segunda ordem $\cos \theta = 1 - \frac{\theta^2}{2}$.

$$\begin{aligned} I_0(0, z) &= 2 \int_0^{\theta_{\max}} e^{ikz \cos \theta} \text{sen} \theta d\theta = \frac{2e^{ikz}}{kz} \int_0^{\theta_{\max}} e^{-ikz \frac{\theta^2}{2}} kz \theta d\theta = \frac{2e^{ikz}}{kz} \int_0^{\frac{kz \theta_{\max}^2}{2}} e^{-iu} du = \\ &= \frac{2e^{ikz}}{kz} \frac{1 - e^{-\frac{kz \theta_{\max}^2}{2}}}{i} = \frac{4e^{ikz}}{kz} \frac{e^{-\frac{kz \theta_{\max}^2}{4}} e^{\frac{kz \theta_{\max}^2}{4}} - e^{-\frac{kz \theta_{\max}^2}{4}}}{2i} = \theta_{\max}^2 e^{ikz(1 - \frac{\theta_{\max}^2}{4})} \frac{\text{sen}(\frac{kz \theta_{\max}^2}{4})}{(\frac{kz \theta_{\max}^2}{4})} \end{aligned} \quad (2.100)$$

$$I_0(0, z) = \theta_{\max}^2 e^{ikz(1 - \frac{\theta_{\max}^2}{4})} \frac{\text{sen}(\frac{kz \theta_{\max}^2}{4})}{(\frac{kz \theta_{\max}^2}{4})} \quad (2.101)$$

Desconsiderando a fase multiplicativa que percebe-se que caímos na função

$\text{sen} c(x) = \frac{\text{sen} x}{x}$, cujo primeira raiz ocorrem para $x = \pi$. A resolução axial z , dada

pela condição $\frac{kz \theta_{\max}^2}{4} = \pi$, vale:

$$z = \frac{2 n \lambda}{NA^2} \quad (2.102)$$

A resolução axial $z = \frac{3,28 n}{NA} 0,609 \frac{\lambda}{NA} = \frac{3,28 n}{NA} \rho$ é sempre maior do que a resolução lateral pelo menos por um fator de 3.28, uma vez que NA é obrigatoriamente menor do que n para evitar reflexão interna total. Note que ela depende de NA^2 em lugar de NA .

Cálculo da PSF de Detecção

Até agora consideramos apenas a focalização do laser de excitação, mas não a coleta do sinal de fluorescência. Em um sistema confocal moderno o laser de excitação é focalizado no foco da objetiva e uma segunda lente, de distância focal bem maior, refocaliza a imagem no “pinhole” como mostra a Figura 21. Trata-se de um microscópio de óptica infinita que será discutido no capítulo 3. Nesse caso

a magnificação lateral é dada por $M_{lat} = \frac{f'}{f}$ e a magnificação axial é dada por

$M_{axial} = \frac{n}{n'} \frac{f}{f'}$. Como M é da ordem 100 a 1000 percebe-se que $f \ll f'$. Dessa

forma, utilizaremos a situação descrita na Figura 21 para o cálculo da PSF, com um momento de dipolo $\vec{\mu}$ arbitrariamente orientado como fonte pontual de radiação. A radiação do dipolo é coletada com uma objetiva aplanática com alta abertura numérica com foco f e focalizada por uma segunda lente de foco f' no plano imagem, em $z = 0$. O índice de refração no meio do objeto é n e o índice de refração no meio da imagem é n'.

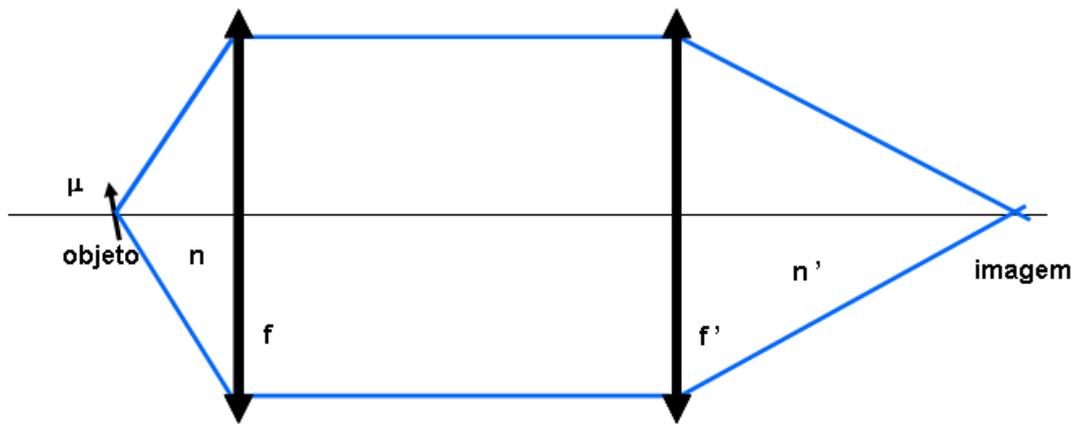


Figura 21 Configuração utilizada para o cálculo da PSF de detecção

O campo de um dipolo oscilante $\vec{\mu}$ na zona de radiação é dado por²⁴ :

$$\vec{E}(\vec{r}) = -\frac{\omega^2}{4\pi\epsilon_0 c^2} \frac{e^{ikr}}{r^3} \vec{r} \times (\vec{r} \times \vec{\mu}) = -\frac{\omega^2}{4\pi\epsilon_0 c^2} \frac{e^{ikr}}{r^3} [\vec{r}(\vec{r} \cdot \vec{\mu}) - \vec{\mu}]$$

Podemos escrever o termo $[\vec{r}(\vec{r} \cdot \vec{\mu}) - \vec{\mu}]$ como:

$$[\vec{r}(\vec{r} \cdot \vec{\mu}) - \vec{\mu}] = \begin{bmatrix} -(y^2 + z^2) & xy & xz \\ xy & -(x^2 + z^2) & yz \\ xz & yz & -(x^2 + y^2) \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mu_x \\ \mu_y \\ \mu_z \end{bmatrix}$$

Dessa forma, o campo elétrico num ponto \vec{r} de um dipolo elétrico localizado no ponto \vec{r}_o arbitrariamente orientado com momento de dipolo $\vec{\mu}$ é definido pela função de Green diádica $\vec{G}(\vec{r}, \vec{r}_o)$ como:

$$\vec{E}(\vec{r}) = \frac{\omega^2}{\epsilon_0 c^2} \vec{G}(\vec{r}, \vec{r}_o) \cdot \vec{\mu} \quad (2.103)$$

onde $G = \frac{1}{4\pi} \{(\vec{r} - \vec{r}_o)[(\vec{r} - \vec{r}_o) \cdot \vec{\mu}] - \vec{\mu}\}$. Escolhendo o dipolo para estar na posição $\vec{r}_o = 0$ e imerso um meio homogêneo de índice de refração n , podemos usar a forma dos campos para regiões distantes de \vec{G}^{22} , expressa em coordenadas esféricas (r, θ, ϕ)

$$\vec{G}_\infty(\vec{r}, 0) = \frac{e^{ikr}}{4\pi r} \begin{bmatrix} (1 - \cos^2 \phi \sin^2 \theta) & -\sin \phi \cos \phi \sin^2 \theta & -\cos \phi \sin \theta \cos \theta \\ -\sin \phi \cos \phi \sin^2 \theta & (1 - \sin^2 \phi \sin^2 \theta) & -\sin \phi \sin \theta \cos \theta \\ -\cos \phi \sin \theta \cos \theta & -\sin \phi \sin \theta \cos \theta & \sin^2 \theta \end{bmatrix} \quad (2.104)$$

Para descrever a refração na esfera de referência f , como feito anteriormente, temos que projetar o vetor campo elétrico sobre os vetores \hat{n}_θ e \hat{n}_ϕ . Após a primeira refração o campo propaga como um feixe colimado até a segunda lente f' sendo refratado de novo. Para um dipolo alinhado na direção x , $\vec{\mu} = \mu_x \vec{n}_x$, o campo

²⁴ Equação 9.19 do Jackson, J. D., "Classical Electrodynamics", Third Edition, John Wiley & Sons 1999.

elétrico após a segunda lente será dado por:

$$E_{\infty}^{(x)}(\theta, \phi) = -\frac{\omega^2 \mu_x}{\epsilon_0 c^2} \frac{e^{ikr}}{8\pi f} \begin{bmatrix} (1 + \cos \theta \cos \theta') - 1(-1 \cos \theta \cos \theta') \cos 2\phi \\ - (1 - \cos \theta \cos \theta') \text{sen} 2\phi \\ 2 \cos \theta \text{sen} \theta' \cos \phi \end{bmatrix} \sqrt{\frac{n \cos \theta'}{n' \cos \theta}} \quad (2.105)$$

Onde

$$\text{sen} \theta' = \frac{f}{f'} \text{sen} \theta \quad \cos \theta' = \sqrt{1 - (f/f')^2 \text{sen}^2 \theta} \quad (2.106)$$

No limite $f \ll f'$ a contribuição de $\cos \theta'$ pode ser aproximada por $\cos \theta' \cong 1 - \frac{1}{2} \left(\frac{f}{f'}\right)^2 \text{sen}^2 \theta$, mas não a contribuição de $\cos \theta$, já que estamos tratando de um sistema com alta abertura numérica. Os campos para dipolos orientados na direção y e z podem ser obtidos de maneira semelhante. Para um dipolo arbitrariamente orientado, o campo total é obtido pela superposição dos campos na direção x, y e z

$$\vec{E}_{\infty}(\theta, \phi) = \vec{E}_{\infty}^{(x)} + \vec{E}_{\infty}^{(y)} + \vec{E}_{\infty}^{(z)} \quad (2.107)$$

Para obter o campo perto do foco da segunda lente, substituímos o campo \vec{E}_{∞} na equação (2.85). A integração com a respeito a ϕ pode ser feita analiticamente e o resultado pode ser expresso como:

$$\vec{E}(\rho, \varphi, z) = \frac{\omega^2}{\epsilon_0 c^2} \vec{G}_{PSF}(\rho, \varphi, z) \cdot \vec{\mu} \quad (2.108)$$

Onde a PSF diádica é dada por

$$\vec{G}_{PSF} = \frac{k'}{8\pi} \frac{f}{f'} e^{i(kf - k'f')} \begin{bmatrix} (\tilde{I}_{00} + \tilde{I}_{02} \cos 2\varphi) & \tilde{I}_{02} \text{sen} 2\varphi & -2i\tilde{I}_{01} \cos \varphi \\ \tilde{I}_{02} \text{sen} 2\varphi & (\tilde{I}_{00} - \tilde{I}_{02} \cos 2\varphi) & -2i\tilde{I}_{01} \text{sen} \varphi \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad (2.109)$$

As integrais $\tilde{I}_{00} - \tilde{I}_{02}$ são definidas como

$$\tilde{I}_{00}(\rho, z) = \int_0^{\theta_{\max}} \sqrt{\cos\theta} \operatorname{sen}\theta (1 + \cos\theta) J_0(k' \rho \operatorname{sen}\theta f / f') e^{ik'z[1-1/2(f/f')^2 \operatorname{sen}^2\theta]} d\theta \quad (2.110)$$

$$\tilde{I}_{01}(\rho, z) = \int_0^{\theta_{\max}} \sqrt{\cos\theta} \operatorname{sen}^2\theta J_1(k' \rho \operatorname{sen}\theta f / f') e^{ik'z[1-1/2(f/f')^2 \operatorname{sen}^2\theta]} d\theta \quad (2.111)$$

$$\tilde{I}_{02}(\rho, z) = \int_0^{\theta_{\max}} \sqrt{\cos\theta} \operatorname{sen}\theta (1 - \cos\theta) J_2(k' \rho \operatorname{sen}\theta f / f') e^{ik'z[1-1/2(f/f')^2 \operatorname{sen}^2\theta]} d\theta \quad (2.112)$$

A primeira coluna de \tilde{G}_{PSF} é referente ao campo do dipolo μ_x , a segunda coluna o campo do dipolo μ_y e a terceira coluna o campo do dipolo μ_z . Essas integrais (2.110) a (2.112) são similares às integrais (2.93) a (2.95). As principais diferenças são os argumentos da função de Bessel e da função exponencial. O campo longitudinal E_z é zero porque assumimos que $f \ll f'$. As equações (2.110) a (2.112) descrevem os campos de um dipolo elétrico orientado arbitrariamente da origem até sua imagem. O resultado depende da abertura numérica por θ_{\max} e da magnificação M definida por:

$$M = \frac{n}{n'} \frac{f}{f'} \quad (2.113)$$

A partir de agora utilizaremos $|E|^2$ para calcular a PSF. Sem perda de generalidade, nós podemos definir o eixo x paralelo ao eixo do dipolo.

Resultados na Aproximação Paraxial

Novamente, para um sistema de baixa NA, $\cos\theta \approx 1$ e $\operatorname{sen}\theta \approx \theta$ e só a integral \tilde{I}_{00} sobrevive. Para $z = 0$, obtém-se:

$$\tilde{I}_{00}(\rho, z) \approx \int_0^{\theta_{\max}} J_0(k' \rho \theta f / f') \theta d\theta \quad (2.114)$$

A PSF paraxial no plano imagem de um dipolo orientado ao longo do eixo x é dada por:

$$\lim_{\theta_{\max} \ll \pi/2} |E(x, y, z = 0)|^2 = \frac{\pi^4}{\epsilon_0^2 n n'} \frac{\mu_x^2}{\lambda^6} \frac{NA^4}{M^2} \left[2 \frac{J_1(2\pi\tilde{\rho})}{(2\pi\tilde{\rho})} \right]^2, \quad \tilde{\rho} = \frac{NA\rho}{M\lambda} \quad (2.115)$$

Já para $\rho = 0$, \tilde{I}_{00} é dada por:

$$\tilde{I}_{00}(\rho, z) \approx \int_0^{\theta_{\max}} e^{ik'z[1-1/2(f/f')^2\theta^2]} \theta d\theta \quad (2.116)$$

Cujo resultado é dada por:

$$\lim_{\theta_{\max} \ll \pi/2} |E(x = 0, y = 0, z)|^2 = \frac{\pi^4}{\epsilon_0^2 n n'} \frac{\mu_x^2}{\lambda^6} \frac{NA^4}{M^2} \left[\frac{\text{sen}(\pi \tilde{z})}{(\pi \tilde{z})} \right]^2, \quad \tilde{z} = \frac{NA^2 z}{2n' M^2 \lambda} \quad (2.117)$$

A distância z em que a PSF axial se torna zero é quando o seno se anula

$$\frac{\pi NA^2 z}{2n' M^2 \lambda} = \pi \Rightarrow z = 2n' \frac{M^2 \lambda}{NA^2} \quad (2.118)$$

também conhecida como profundidade de foco. Percebe-se que no plano imagem as resoluções laterais são multiplicadas por M e a axial por $n' M^2$. Fazendo uma comparação em números, para um comprimento de onda de 500 nm, $NA = 1.4$, $M = 60$ x o primeiro anel de Airy no plano imagem se estende por 13 μm , e a profundidade de foco se estende até 1,8 mm. Isso mostra que o diâmetro do “pinhole” deve ser da ordem de 10 a 100 μm .

Cálculo da Interação [geração da Fluorescência]

O dipolo emissor da seção anterior é criado pela excitação da fluorescência. Como já afirmamos, a formação da imagem na Microscopia Confocal envolve três passos:

1. Cálculo do campo de excitação no plano objeto → PSF da excitação
2. Cálculo das interações
3. Cálculo da resposta no plano imagem → PSF de detecção

O primeiro passo foi calcular a PSF de excitação \vec{E}_{exc} . O terceiro passo foi o cálculo da PSF de detecção. Só falta agora calcular a interação. Para a interação entre o campo de excitação e a partícula dipolar assumimos uma relação linear do tipo

$$\vec{\mu}_n(\omega) = \vec{\alpha} \vec{E}_{exc}(\vec{r}_n, \omega) \quad (2.119)$$

A resposta do dipolo no plano imagem é determinada por (2.108)

$$\vec{E}(\vec{r}) = \frac{\omega^2}{\epsilon_0 c^2} \vec{G}_{PSF} \cdot \vec{\mu}_n \quad (2.120)$$

Essas duas equações permitem eliminar $\vec{\mu}_n$ e então calcular o campo elétrico no plano imagem. Nós vimos anteriormente que um dipolo $\vec{\mu}_n$ na origem ($\vec{r}_n = 0$) gera um campo $\vec{E}(x, y, z)$ no espaço da imagem de acordo com as equações (2.108) a (2.112). Se trasladarmos o dipolo de sua origem para uma posição arbitrária $\vec{r}_n = 0$ no espaço do objeto, o campo no espaço da imagem se transformará como:

$$E(x, y, z) \rightarrow E(x - x_n M, y - y_n M, z - z_n M^2 n'/n) \quad (2.121)$$

Nesse ponto existem dois limites para o tamanho do pinhole, quando seu diâmetro tende a zero e quando seu diâmetro tende a infinito. O aumento da resolução axial será máximo no limite da área do pinhole tendendo a zero. Nesse caso a intensidade detectada será simplesmente o campo em $\vec{r} = 0$ multiplicado pela área infinitesimal do detector dA

$$s_2(x_n, y_n, z_n) = \left| E(x_n M, y_n M, z_n M^2 n'/n) \right|^2 dA \quad (2.122)$$

O campo $E(x_n M, y_n M, z_n M^2 n'/n)$ é obtido das equações (2.108) a (2.112) usando a substituição $\rho \rightarrow \rho_n M$, $z \rightarrow z_n M^2 n'/n$ e $\varphi \rightarrow \varphi_n M$, então, em termos dessas novas variáveis, o sinal do detector fica

$$s_2(x_n, y_n, z_n) = \omega^4 \mu_0^2 \left| \vec{G}_{PSF}(\rho_n, \varphi_n, z_n) \cdot \vec{\mu}_n \right|^2 dA \quad (2.123)$$

Com

$$\tilde{G}_{PSF}(\rho_n, \varphi_n, z_n) \propto \frac{k}{8\pi} \frac{1}{M} \begin{bmatrix} (\tilde{I}_{00} + \tilde{I}_{02} \cos 2\varphi_n) & \tilde{I}_{02} \text{sen} 2\varphi_n & -2i\tilde{I}_{01} \cos \varphi_n \\ \tilde{I}_{02} \text{sen} 2\varphi_n & (\tilde{I}_{00} - \tilde{I}_{02} \cos 2\varphi_n) & -2i\tilde{I}_{01} \text{sen} \varphi_n \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad (2.124)$$

Onde as integrais $\tilde{I}_{00} - \tilde{I}_{02}$ são definidas como

$$\tilde{I}_{00}(\rho_n, z_n) = e^{ikz_n(f/f')^2} \int_0^{\theta_{\max}} \sqrt{\cos \theta} \text{sen} \theta (1 + \cos \theta) J_0(k\rho_n \text{sen} \theta) e^{-\frac{i}{2}kz_n \text{sen}^2 \theta} d\theta \quad (2.125)$$

$$\tilde{I}_{01}(\rho_n, z_n) = e^{ikz_n(f/f')^2} \int_0^{\theta_{\max}} \sqrt{\cos \theta} \text{sen}^2 \theta J_1(k\rho_n \text{sen} \theta) e^{-\frac{i}{2}kz_n \text{sen}^2 \theta} d\theta \quad (2.126)$$

$$\tilde{I}_{02}(\rho_n, z_n) = e^{ikz_n(f/f')^2} \int_0^{\theta_{\max}} \sqrt{\cos \theta} \text{sen} \theta (1 - \cos \theta) J_2(k\rho_n \text{sen} \theta) e^{-\frac{i}{2}kz_n \text{sen}^2 \theta} d\theta \quad (2.127)$$

Além da relação linear do dipolo com o campo incidente nós também assumimos que o dipolo absorve e emite na mesma direção. Isto permite escrever a polarizabilidade $\tilde{\alpha}$ como uma matriz diagonal 3x3. O campo de excitação é o feixe gaussiano calculado na seção do campo focalizado. De acordo com (2.92) e (2.119) o momento de dipolo pode ser escrito como

$$\mu_n(\omega) = ikfE_0 e^{-ikf} \frac{1}{2} \begin{bmatrix} \alpha_{xx}(I_{00} + I_{02} \cos 2\varphi_n) \\ \alpha_{yy}(I_{02} \text{sen} 2\varphi_n) \\ \alpha_{zz}(-2iI_{01} \cos \varphi_n) \sqrt{n'/n} \end{bmatrix} \quad (2.128)$$

Onde α_{ii} são os elementos diagonais da polarizabilidade e E_0 é a amplitude do campo Gaussiano paraxial incidente. As integrais $I_{00} - I_{02}$ são as mesmas das equações (2.93) a (2.95). Assumindo onda plana $f(\theta) = 1$ e que as diferenças nos expoentes das integrais são marginais os dois conjuntos de equações integrais se tornam iguais. Considerando ainda que o dipolo está alinhado na direção da polarização, isto é, $\alpha_{yy} = \alpha_{zz} = 0$ e desconsiderando a contribuição de I_{02} em

relação a I_{00} o sinal detectado resultante

$$s_2(x_n, y_n, z_n : \omega) \propto |\alpha_{xx} I_{00}^2|^2 dA \quad (2.129)$$

No limite de uma área infinita do pinhole, ou seja, sem pinhole, o sinal detectado é dado por²²

$$s_1(x_n, y_n, z_n : \omega) \propto |\alpha_{xx} I_{00}|^2 dA \quad (2.130)$$

Considera-se CONFOCAL uma microscopia em que o sinal detectado é proporcional ao quadrado da intensidade da PSF de excitação. Na microscopia confocal de um fóton o quadrado é obtido através da multiplicação da PSF_{exc} pela PSF_{det} . Por outro lado no caso da microscopia confocal de dois fótons, a excitação da fluorescência já é proporcional ao quadrado da intensidade do feixe de excitação, o que a torna intrinsecamente confocal, independente da presença do pinhole. Entretanto, na excitação por dois fótons o comprimento de onda é o dobro do comprimento de onda da excitação de um fóton. A Figura 22 mostra essas PSFs na aproximação paraxial.

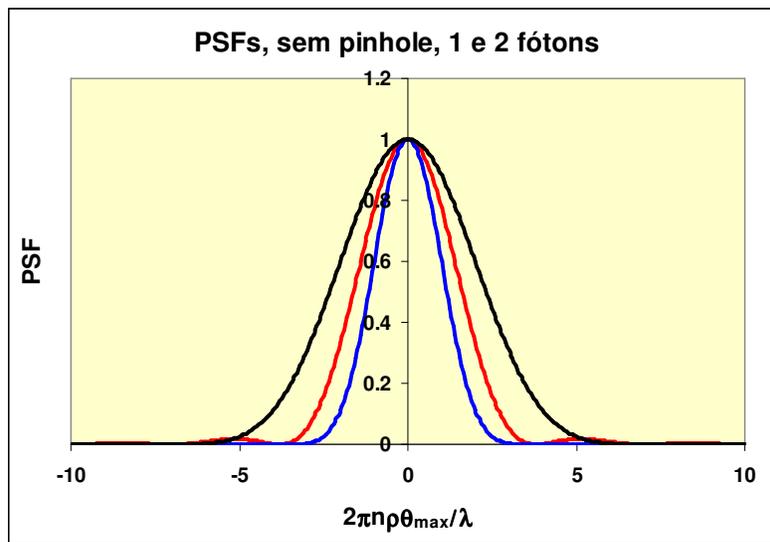


Figura 22 PSFs na aproximação paraxial para excitação via 1 fóton com pinhole [azul], sem pinhole [vermelho], e para excitação via dois fótons [preto]

No caso de altas aberturas numéricas é necessário calcular as integrais definidas acima. A Figura 23 mostra gráficos de curvas de níveis para as diferentes PSFs.

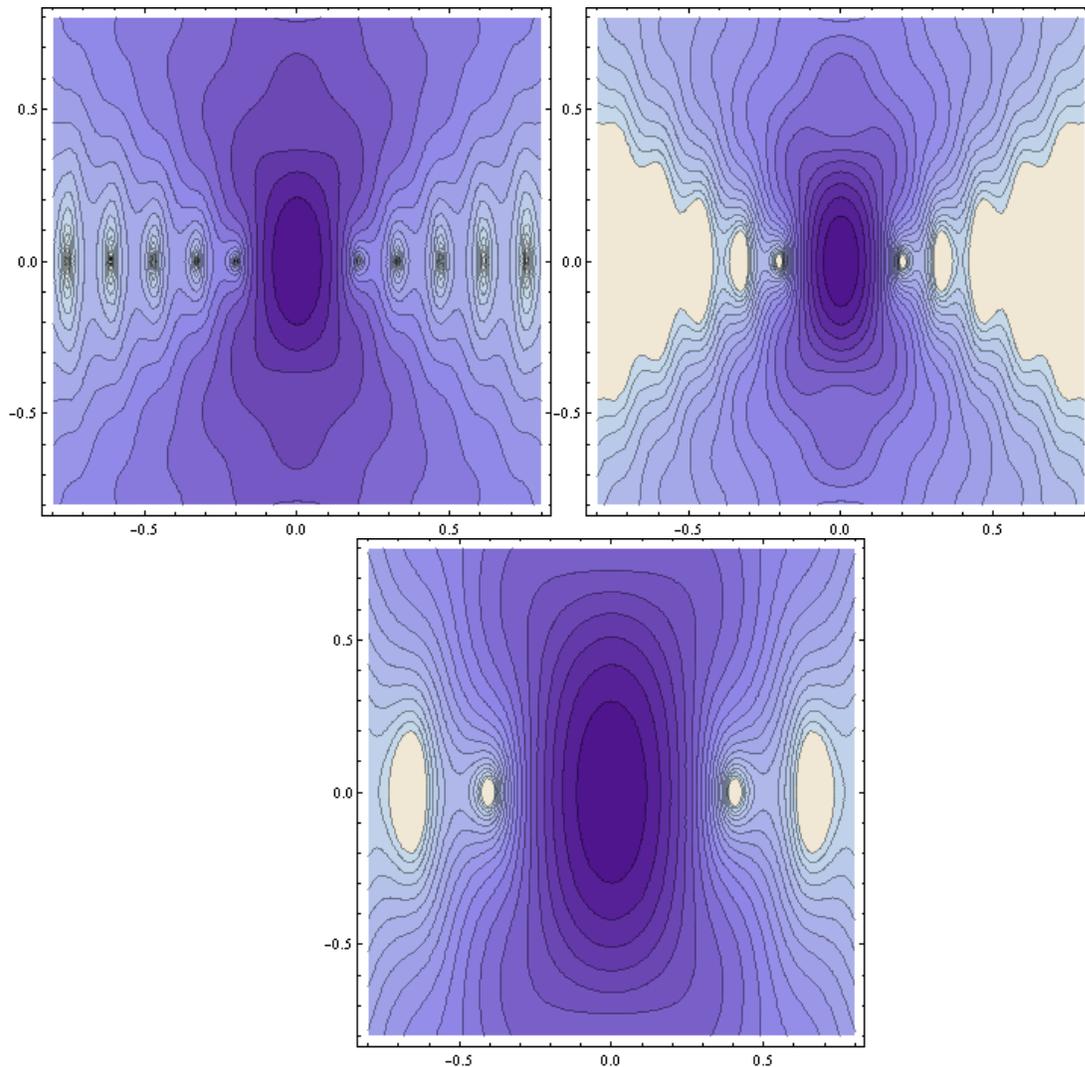


Figura 23 Gráfico de contorno do logaritmo da PSF na base 2 sem aproximação paraxial. Cada contorno tem a metade do contorno anterior. Eixo horizontal = x; vertical = z; escala em μm . Esquerda: sem pinhole; Direita: com pinhole. Embaixo: dois fótons

O papel da abertura do pinhole é mais complicado e só pode ser calculado numericamente. Obviamente deve variar entre os limites do raio tendendo a zero até o raio tendendo a infinito. Higdon et al²⁵ calcularam as resoluções lateral e

²⁵ P. D. Higdon, P. Török and T. Wilson, “*Imaging properties of high aperture multiphoton fluorescence scanning optical microscopes*”, J. of Microsc. 193, Pt 2, 127 (1999)

axial em função do raio do pinhole para processos de 1, 2 e 3 fótons. A Figura 24 mostra seus resultados.

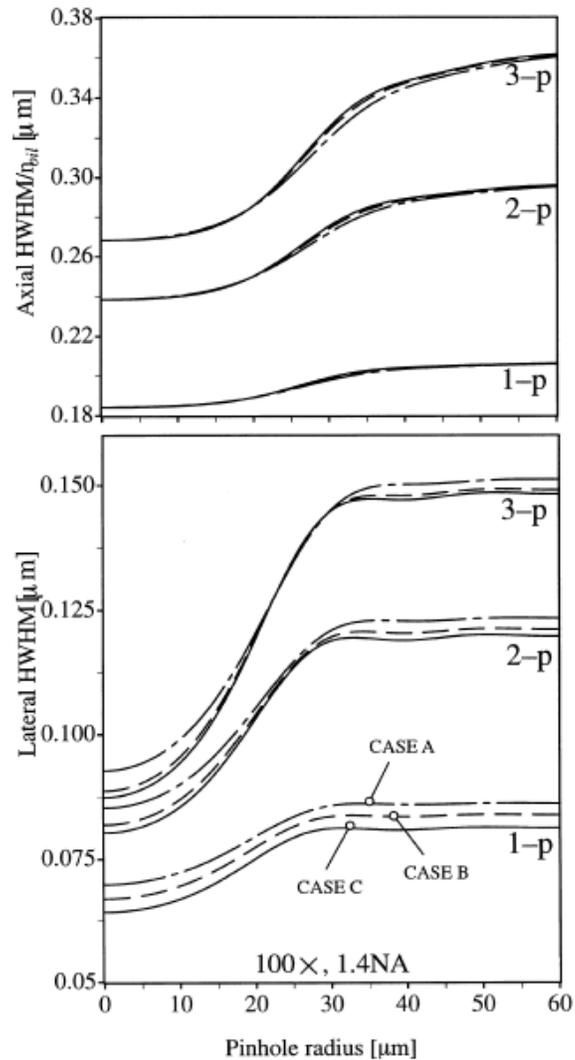


Figura 24 Resoluções lateral e axial para excitação através de processos de 1 [$\lambda=283$ nm], 2 [$\lambda=586$ nm] e 3 [$\lambda=850$ nm] fótons em função do diâmetro do pinhole

2.2.3 Comparação dos Resultados

Nesta parte vamos comparar os resultados obtidos usando os dois tipos de tratamento, óptica geométrica e a óptica ondulatória. Vamos começar mostrando um resumo do que foi obtido nos dois casos. A resolução lateral foi obtida nas equações (2.11) para óptica geométrica e (2.99) para a óptica ondulatória

$$\Delta x = \frac{a}{m} \quad \rho = 0.609 \frac{\lambda}{NA}$$

O que podemos perceber logo de início é que a óptica ondulatória leva em consideração o comprimento de onda da luz, portanto quanto maior o comprimento do laser utilizado para excitação menor vai ser a resolução lateral. Outra diferença é a presença da abertura numérica na resolução da equação (2.99), quanto maior a abertura numérica maior vai ser a resolução. Vale a pena ressaltar que, no caso da óptica ondulatória não aparece o tamanho do pinhole. Isso acontece porque essa fórmula para resolução leva em conta apenas a excitação, não levanto em conta que o sinal passa por um pinhole. Apesar disso podemos ter uma boa intuição entre a diferença dos dois tratamentos. Fazendo uma comparação em números, para um comprimento de onda de 500 nm, NA=1.4, m=60x e a=100 μm temos para óptica geométrica uma resolução de 1,6 μm. Já utilizando um pinhole com raio idêntico ao primeiro anel de Airy de 13 μm, já calculado, a óptica geométrica fornece a resolução de 22 nm, dez vezes menor do que a resolução obtida com a óptica ondulatória, de aproximadamente 217 nm. O fato de que a óptica ondulatória impede a formação de imagens pontuais explica essa diminuição da resolução.

Comparando agora os valores da resolução axial temos metade da equação (2.29) para óptica geométrica e (2.102) para a óptica ondulatória

$$\Delta z = \pm \frac{1}{2} \frac{(m+1)\sqrt{n^2 - NA^2}}{m^2 NA} a \quad z = \frac{2n\lambda}{NA^2}$$

Aqui as mesmas explicações para a resolução lateral podem ser utilizadas para explicar a diferença entre os dois enfoques. Em termos de valores, utilizando os mesmos parâmetros anteriores e n = 1,5 temos 195 nm para a óptica geométrica e aproximadamente 765nm para a óptica ondulatória, um fator de quase 4 vezes maior para a óptica ondulatória. As expressões da óptica ondulatória aqui se referem à aproximação paraxial. O cálculo completo para altas aberturas numéricas melhora em aproximadamente 30% as resoluções lateral e axial, diminuindo a desvantagem da óptica ondulatória frente à óptica geométrica.

2.3 Luminescência

O objetivo dessa seção é o de apresentar uma explicação intuitiva dos fenômenos da Fluorescência centradas nos aspectos importantes experimentalmente para a aquisição de boas imagens. A Figura 25 Excitação da molécula por 1 e 2 fótons mostra o processo de excitação de um elétron do seu estado fundamental para um estado excitado de energia mais alta. O processo pode ocorrer tanto por absorção de um fóton quanto de dois fótons

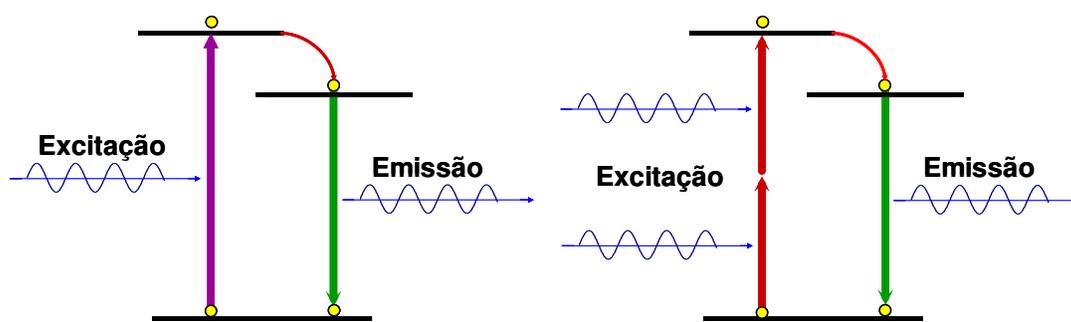


Figura 25 Excitação da molécula por 1 e 2 fótons

O elétron excitado pode decair para o estado fundamental emitindo um fóton. Na ausência de interação spin-órbita a regra de seleção para a transição óptica exige que os estados inicial e final tenham o mesmo spin. Transições entre estados de spins diferentes são, portanto, proibidas e o processo de decaimento é lento. Esse processo é chamado de fosforescência. Já os processos permitidos por spin são rápidos e chamados de fluorescência. A diferença entre a fluorescência excitada por um fóton ou dois fótons está na apenas na excitação, a fluorescência emitida é a mesma²⁶. O processo geral de emissão de fótons pelo decaimento de elétrons entre dois níveis é chamado de luminescência. Dependendo da forma como o elétron subiu ao nível de energia mais alto a luminescência pode ser chamada de termoluminescência, se a excitação foi térmica, eletroluminescência, se foi

²⁶ C. Xu, W. Zipfel, J. B. Shear, R. M. Williams, W. W. Webb: “*Multiphoton fluorescence excitation: New spectral windows for biological nonlinear microscopy*”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, pg. 10763, 1996.

elétrica, quimioluminescência, se química, e fotoluminescência, se óptica. Percebe-se, portanto, que a microscopia confocal lida com a fotoluminescência em geral, e fluorescência em particular.

Os conceitos importantes que devemos levar em conta quando estamos tratando de fluorescência de moléculas são a banda de absorção, ou excitação, a banda de emissão e o “stokes-shift”.

Para entender o Stokes shift e a forma das bandas de excitação e emissão vamos considerar os níveis de energia de uma molécula representados na Figura 26. O equilíbrio entre os núcleos da molécula acontece no mínimo da energia em função da separação inter-nuclear. Os núcleos estão mais fortemente ligados quando o elétron que os une se encontra no estado fundamental do que quando ele se encontra no estado excitado. O potencial de energia mais baixo representa o potencial para o elétron no nível de energia fundamental, enquanto o de cima representa o potencial do nível de energia excitado. Note que o equilíbrio do nível de energia excitado está um pouco mais afastado do que o do nível de energia fundamental. A molécula pode vibrar, de modo que, para cada um dos potenciais, temos os níveis de energia vibracionais, também quantizados.

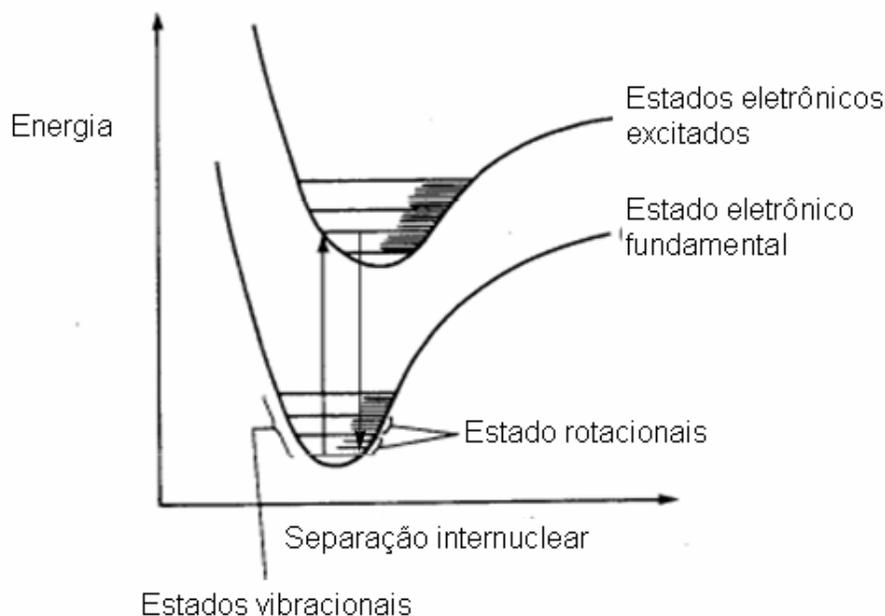


Figura 26 Distância internuclear na excitação do elétron

As transições que promovem o elétron do estado fundamental para o estado excitado, a excitação, podem acontecer entre o nível vibracional de energia mais baixo e os níveis vibracionais do estado excitado. Uma vez excitado o elétron decai rapidamente para o nível de vibração mais baixo do estado excitado, e retorna ao estado fundamental através da emissão de fótons entre esse nível e os níveis vibracionais do estado fundamental. Isso explica a forma da fluorescência mostrada na Figura 27.

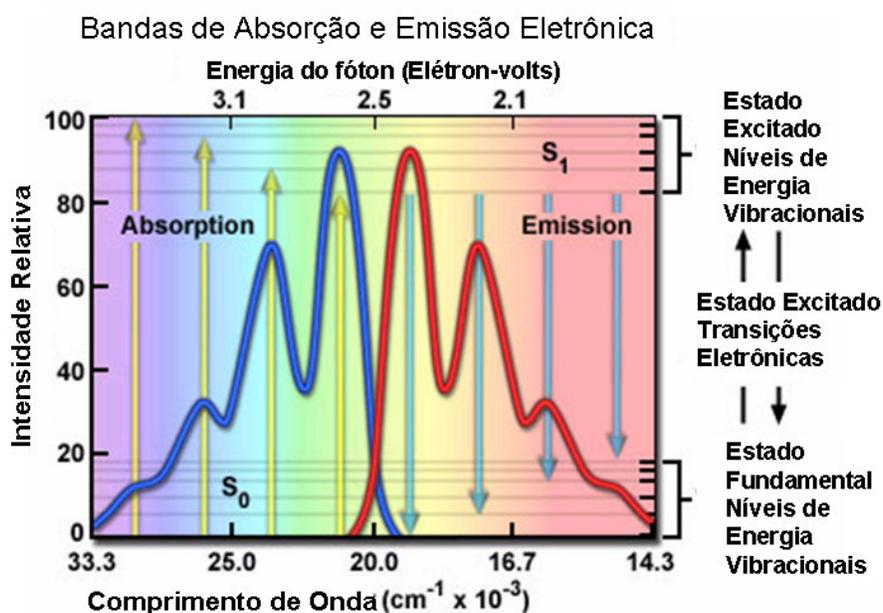


Figura 27 Bandas de Absorção e Emissão

A banda em azul é a banda de absorção da molécula. É a banda de energia que os fótons do laser devem ter para excitar o elétron do estado fundamental para o estado excitado. Ela é larga e possui alguns picos, representados pelas setas amarelas, devido aos estados vibracionais. A banda em vermelho é a banda de emissão. A banda de emissão é a banda de energia em que estarão os fótons emitidos pelo decaimento do elétron do estado excitado para o estado fundamental. Ela também é larga e possui alguns picos, representados pelas setas azuis, também devidos aos estados vibracionais. O “stokes-shift” é o

deslocamento da banda de emissão para menores energias, ou maiores comprimentos de onda, relativa à banda de excitação. Isso quer dizer que sempre que escolhermos um corante, sua fluorescência sempre estará deslocada para o vermelho em relação a sua excitação. É o Stokes shift que nos permite isolar a fluorescência da excitação utilizando um filtro que bloqueia feixes de luz no comprimento de onda de excitação e deixa passar comprimentos de onda maiores, na banda de emissão. Portanto nossa escolha de filtros e detectores tem que levar em conta esse deslocamento para o vermelho. Usualmente a fluorescência é gerada por marcadores exógenos, a maioria comercial, com bandas de excitação e emissão bem conhecidas. Conhecendo essas bandas é possível escolher os filtros para bloquear a excitação e coletar a fluorescência. Quando a fluorescência é gerada por moléculas endógenas é chamada de autofluorescência. Entretanto, mesmo nesses casos as moléculas fluorescentes, assim como suas bandas de excitação e emissão, já são bem conhecidas. Do ponto de vista instrumental, portanto, tudo o que é necessário se conhecer sobre a fluorescência são as bandas de excitação e emissão do fluoróforos, quer sejam endógenos ou exógenos.

2.4 Óptica Não-Linear

Essa seção é dedicada ao tratamento da óptica não-linear. Como mencionado na introdução deste capítulo a explicação intuitiva dos fenômenos da óptica não-linear é mais difícil, já que a matemática e a física envolvidas são um pouco mais sofisticadas. Mesmo assim é possível explicar intuitivamente as características principais de cada fenômeno para um leitor da área de ciências da vida. Basicamente descreveremos os fenômenos da absorção de dois fótons e da geração de segundo harmônico. Estamos buscando apresentar uma explicação macroscópica sobre o fenômeno, uma explicação quântica e uma ligação entre as duas.

2.4.1 Fluorescência Excitada por Absorção de dois fótons

2.4.1.1 Explicação Intuitiva

O processo de absorção de dois fótons é do tipo $1 \text{ fóton} + 1 \text{ fóton} = 1$ elétron excitado. Dessa forma, portanto, é proporcional à intensidade do feixe incidente ao quadrado e não diretamente proporcional à intensidade como na absorção de 1 fóton. Em outras palavras, a probabilidade de que esse processo venha a ocorrer aumenta quando os fótons se superpõem no tempo e no espaço. Quando se usa um laser pulsado em lugar de um laser contínuo (cw) os fótons que estavam distribuídos no tempo passam a coincidir no tempo, aumentando enormemente a probabilidade do evento absorção de dois fótons. Por outro lado a superposição espacial desses fótons é maior no foco do laser conforme mostra o esquema da Figura 28. Isso significa que se pode ajustar a potência do laser para garantir que a fluorescência gerada seja apreciável apenas em uma pequena região em torno do foco do laser. Enquanto o processo de excitação via 1 fóton excita a fluorescência em todo o cone de luz incidente o processo de excitação por dois fótons excita a fluorescência apenas em torno do foco do laser. Por outro lado o comprimento de onda dos fótons na excitação de dois fótons é o dobro do comprimento de onda para excitação via 1 fóton.

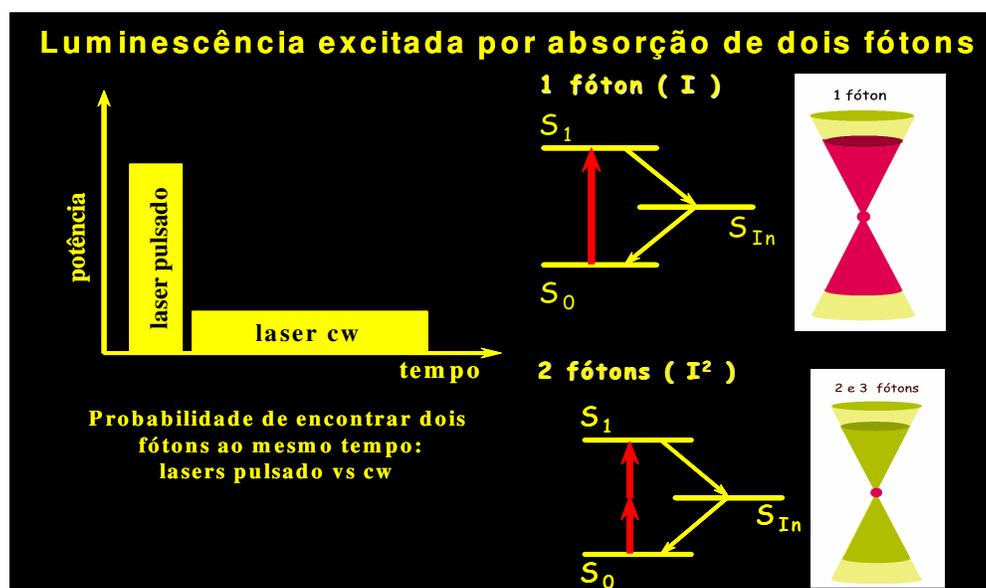


Figura 28. Diferença entre excitações por um fóton e dois ou mais fótons.

2.4.1.2 Microscopia Confocal “Single-photon” x Multifóton

A absorção de dois fótons é proporcional à intensidade ao quadrado do laser de excitação. Isso significa que a Microscopia Confocal Multifóton tem todas as propriedades das Microscopias Confocais “Single-photon”, com a vantagem de não necessitar da presença do “pinhole” na frente do detector. Se a fluorescência só é gerada em uma posição, no foco, toda a parafernália para garantir a resolução vertical torna-se desnecessária e pode-se coletar toda a luz gerada com o detector em qualquer posição. Em outras palavras, enquanto na microscopia confocal de um fóton é necessário se fazer um “scanning” para excitação e um “descanning” para a coleta do sinal, na microscopia confocal multifóton apenas o scanning é necessário. Além das vantagens da maior resolução vertical e melhor relação sinal ruído, a microscopia confocal multifóton ainda tem outras vantagens advindas do fato de que o espalhamento de luz é proporcional ao inverso da quarta potência do comprimento de onda, ou seja, $I_{\text{espalhado}} \propto \lambda^{-4}$. Isso significa que um laser no dobro do comprimento de onda é 16 vezes menos espalhado, penetrando 16 vezes mais em amostras não absorvedoras. Junto com o fato que, de um modo geral, amostras biológicas absorvem mais no visível do que no infravermelho, a penetração do feixe de excitação se torna ainda maior. Isso possibilita a observação de estruturas internas que não seriam possíveis com a LSCM de 1 fóton.

A presença do “pinhole” apesar de melhorar a resolução na LSCM “Single-photon” acaba por rejeitar muita fluorescência. Como a fluorescência é gerada no visível ela acaba sendo muito espalhada pela própria amostra. O “pinhole” então acaba rejeitando sinal que estaria sendo gerado no foco do laser. No caso da LSCM Multifóton como não precisamos do “pinhole” toda a fluorescência gerada é coletada como mostra a **Figura 29**.

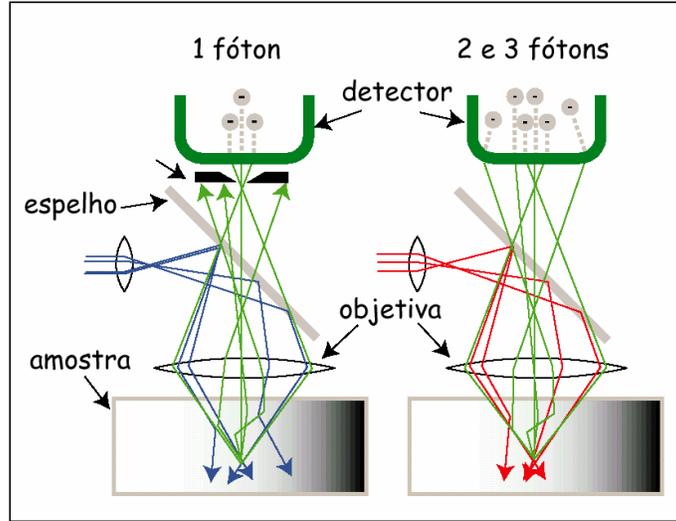


Figura 29 Coleta do sinal na Microscopia Confocal de 1 fóton e Multifóton

2.4.1.3 Absorção de Dois Fótons: Explicação Macroscópica

A expressão mais geral para a taxa de absorção de energia pela matéria na presença de campos magnéticos é dada por

$$\left\langle \frac{d}{dt} \left(\frac{\text{energia absorvida}}{\text{volume}} \right) \right\rangle_{\text{tempo}} = \langle \vec{j} \cdot \vec{E} \rangle \quad (2.131)$$

Sendo que a corrente induzida \vec{j} no meio pelo campo eletromagnético pode ser expandida na forma

$$\vec{j} = \frac{\partial \vec{P}}{\partial t} + c(\nabla \times \vec{M}) - \frac{\partial}{\partial t}(\nabla \cdot \vec{Q}) + \dots \quad (2.132)$$

Aqui \vec{j} contém termos do dipolo elétrico, dipolo magnético e quadrupolo elétrico respectivamente. Cada polarização induzida pode ser expandida em série de potência do campo incidente

$$\vec{P} = \vec{P}_L + \vec{P}_{NL} = \chi_L \cdot \vec{E} + \chi_{NL}^{(2)} : \vec{E}\vec{E} + \chi_{NL}^{(3)} : \vec{E}\vec{E}\vec{E} \quad (2.133)$$

$$\vec{M} = \vec{M}_L + \vec{M}_{NL} = \chi_m \cdot \vec{H} + \chi_M^{(2)} : \vec{H}\vec{H} + \dots \quad (2.134)$$

$$\vec{Q} = \vec{Q}_L + \vec{Q}_{NL} \quad (2.135)$$

Os χ 's são as susceptibilidade linear, de segunda ordem e terceira ordem não lineares, elétricas e magnéticas respectivamente. A constante de absorção é definida por

$$\alpha = \left\langle \frac{d}{dt} \left(\frac{\text{energia absorvida}}{\text{volume}} \right) \right\rangle / \text{fluxo de energia} \quad (2.136)$$

Pode ser expandida como

$$\alpha = \alpha^{(1)} + \alpha^{(2)} I + \alpha^{(3)} I^2 + \dots \quad (2.137)$$

A seguir vamos calcular quais são as contribuições da polarização do dipolo elétrico para α .

Susceptibilidade Dipolar Linear

A polarização e sua derivada temporal são dadas por

$$P e^{-i\omega t} = \chi_L(\omega) E e^{-i\omega t} \quad (2.138)$$

$$\frac{\partial P}{\partial t} = -i\omega_L \chi_L E e^{-i\omega t} \quad (2.139)$$

Substituindo a derivada temporal na equação (2.131)

$$\left\langle \frac{d}{dt} \left(\frac{\text{energia absorvida}}{\text{volume}} \right) \right\rangle = \left\langle \frac{1}{2} \Re[\tilde{j} \tilde{E}^*] \right\rangle = \frac{1}{2} \Re[-i\omega \chi_L E E^*] \quad (2.140)$$

Com $\chi_L = \chi' + i\chi''$ obtemos a constante de absorção α utilizando a equação (2.140)

$$\alpha = \alpha_L^{(1)} = (4\pi \omega/c) \chi_L'' \quad (2.141)$$

Susceptibilidade Elétrica Dipolar de Segunda Ordem

A polarização de segunda ordem é

$$P e^{-i\omega t} = \chi_{NL}^{(2)}(\omega_1 \omega_2) E_1 e^{-i\omega_1 t} E_2 e^{-i\omega_2 t} \quad (2.142)$$

Não há contribuição direta da Susceptibilidade Elétrica Dipolar de Segunda Ordem para absorção. Lembrando que $j = \partial P / \partial t$ é proporcional a $E_1 E_2 e^{-i(\omega_1 + \omega_2)t}$, temos

$\langle \tilde{j} \tilde{E}^* \rangle = \langle cte E_1 E_2 E_1^* e^{-i(\omega_1 + \omega_2)t} e^{i\omega_1 t} \rangle = cte \langle e^{-i\alpha} \rangle = 0$. Aqui $\langle \rangle$ denota uma média no tempo.

Susceptibilidade Elétrica Dipolar de Terceira Ordem

A polarização de terceira ordem é dada por

$$P e^{-i\omega t} = \chi_{NL}^{(3)} (\omega_1 \omega_2 - \omega_2) E_1 e^{-i\omega_1 t} E_2 e^{-i\omega_2 t} E_1^* e^{i\omega_1 t} \quad (2.143)$$

Sua derivada temporal é

$$j = \partial P / \partial t = -i\omega \chi_{NL}^{(3)} (\omega_1 \omega_2 - \omega_2) E_1 E_2 E_2^* e^{-i\omega t} \quad (2.144)$$

A energia absorvida tem a forma

$$\left\langle \frac{d}{dt} \left(\frac{\text{energia absorvida}}{\text{volume}} \right) \right\rangle = \frac{1}{2} \Re [-i\omega \chi_{NL}^{(3)} E_1 E_1^* E_2 E_2^*] \quad (2.145)$$

Com $\chi_{NL}^{(3)} = \chi' + i\chi''$ obtemos a constante de absorção α utilizando a equação (2.136)²⁷

$$\alpha(\omega_1) = \alpha^{(2)} I_2 = (4\pi \omega_1 / c) \chi_{NL}^{(3)} (\omega_1 \omega_2 - \omega_2) |E_2|^2 \quad (2.146)$$

Ou

$$\alpha^{(2)}(\omega_1) = \left(\frac{32\pi^2 \omega_1}{c^2} \right) \chi_{NL}^{(3)} (\omega_1 \omega_2 - \omega_2) \quad (2.147)$$

A constante de absorção de dois fótons está relacionada com a parte imaginária da Susceptibilidade Elétrica Dipolar de Terceira Ordem, onde I é a intensidade da luz : $I = (c/8\pi) |E|^2$.

2.4.1.4 Aproximação Microscópica

Antes de tratarmos o problema com o formalismo quântico vamos fazer uma conexão entre as duas aproximações. A taxa de absorção de energia por volume

²⁷ V. I. Bredikhin e V. N. Genkin Sov Phys. Solid-State 11, 1871 (1970)

de um material, é dada pela taxa Γ_{gf} em que uma única transição de $g \rightarrow f$ acontece com a absorção de um quantum $\hbar\omega$ vezes a densidade n_0 de estados

$$\left\langle \frac{d}{dt} \left(\frac{\text{energia absorvida}}{\text{volume}} \right) \right\rangle = \Gamma_{gf} \hbar\omega n_0 \quad (2.148)$$

Para absorção linear podemos calcular α utilizando a equação (2.136)

$$\alpha = \Gamma_{gf} \hbar\omega n_0 / I \quad (2.149)$$

Comparando com a equação (2.141) vemos que a taxa de transição Γ_{gf} para uma transição elétrica dipolar está relacionada com a parte imaginária de χ_L

$$n_0 \Gamma_{gf} = (4\pi I / c\hbar) \chi_L'' \quad (2.150)$$

Para absorção de dois fótons ($\hbar\omega = \hbar\omega_1 + \hbar\omega_2$) de uma transição elétrica dipolar temos, comparando com a equação (2.147)

$$n_0 \Gamma_{gf} = (32\pi^2 / c^2\hbar) I_1 I_2 \chi_{NL}^{(3)} = (1/2\hbar) |E_1|^2 |E_2|^2 \chi_{NL}^{(3)} \quad (2.151)$$

Esta relação foi dada por Bredikhin e Genkin²⁷.

Para podermos entender como funciona o processo de excitação multifotônica utilizaremos a teoria de perturbação dependente do tempo da Mecânica Quântica. O Hamiltoniano de um sistema perturbado é dado por

$$H = H_0 + \lambda H'(t) \quad (2.152)$$

onde H_0 é o Hamiltoniano do sistema não perturbado cujos autoestados formam uma base completa são

$$H_0 |n\rangle = E_n |n\rangle \quad (2.153)$$

$H'(t) = V e^{-i\alpha t}$ é a perturbação e λ um parâmetro de controle que “liga” e “desliga” a perturbação. Podemos expandir qualquer estado $|\alpha\rangle$ nos auto-estados de H_0 em

qualquer tempo t da seguinte forma

$$|\alpha\rangle = \sum_n c_n(t) e^{\frac{-iE_n t}{\hbar}} |n\rangle \quad (2.154)$$

O termo $e^{\frac{-iE_n t}{\hbar}}$ estará presente na evolução temporal de (2.154) mesmo que a perturbação não esteja presente, portanto a evolução dos coeficientes $c_n(t)$ se dá somente pela ação de $H'(t)$. Utilizando a expansão de (2.154) na solução $\Psi(t)$ da equação de Schrödinger $\frac{\partial \Psi}{\partial t} = -\frac{i}{\hbar} H \Psi$ obtemos

$$\sum_n \left[c_n \left(\frac{-iE_n}{\hbar} \right) e^{\frac{-iE_n t}{\hbar}} + \dot{c}_n e^{\frac{-iE_n t}{\hbar}} \right] |n\rangle = -\frac{i}{\hbar} \sum_n c_n (H + H') e^{\frac{-iE_n t}{\hbar}} |n\rangle \quad (2.155)$$

Multiplicando (2.155) por $\langle k|$, sendo $\langle k|$ auto-estado de H, temos

$$\dot{c}_k(t) = -\frac{i}{\hbar} \sum_n c_n(t) \lambda V_{kn} e^{i(\omega_{kn} - \omega)t} \quad (2.156)$$

Onde $\omega_{kn} = \frac{E_k - E_n}{\hbar}$ e $V_{kn} = \langle k|V|n\rangle$. Agora expandimos os coeficientes $c_n(t)$ em ordens de λ , da forma $c_n(t) = \sum_s \lambda^s c_n^{(s)}$

$$\dot{c}_k^{(0)} + \lambda \dot{c}_k^{(1)} + \lambda^2 \dot{c}_k^{(2)} + \dots = -\frac{i}{\hbar} \sum_n (\dot{c}_k^{(0)} + \lambda \dot{c}_k^{(1)} + \lambda^2 \dot{c}_k^{(2)} + \dots) \lambda V_{kn} e^{i(\omega_{kn} - \omega)t} \quad (2.157)$$

Coletamos os termos de mesma ordem em λ para obter as equações dos coeficientes $c_n(t)$

$$\dot{c}_k^{(0)} = 0 \quad (2.158)$$

$$\dot{c}_k^{(s)} = -\frac{i}{\hbar} \sum_n c_n^{(s-1)} V_{kn} e^{i(\omega_{kn} - \omega)t} \quad (2.159)$$

Queremos que, quando $t = 0$, o sistema esteja em $|i\rangle$, portanto $\dot{c}_k^{(0)} = \delta_{ki}$. Assim

podemos encontrar a equação para o coeficiente de primeira ordem em (2.159)

$$\dot{c}_k^{(1)} = -\frac{i}{\hbar} V_{ki} e^{i(\omega_k - \omega)t} \quad (2.160)$$

Que é facilmente integrável em t, resultando em

$$c_f^{(1)} = -\frac{i}{\hbar} V_{fi} \frac{e^{i(\omega_{fi} - \omega)t} - 1}{i(\omega_{fi} - \omega)t} \quad (2.161)$$

A partir de (2.161) podemos agora calcular o coeficiente de segunda ordem.

$$\dot{c}_f^{(2)} = \frac{1}{\hbar^2} \sum_n V_{ni} \frac{e^{i(\omega_{ni} - \omega)t} - 1}{i(\omega_{ni} - \omega)t} V_{fn} e^{i(\omega_{fn} - \omega)t} \quad (2.162)$$

Nesse caso estamos interessados apenas na excitação multifotônica, então consideraremos termos que contêm 2ω que contém a multiplicação das duas exponenciais

$$c_f^{(2)} = -\frac{1}{\hbar^2} \sum_n \frac{V_{fn} V_{ni}}{i(\omega_{ni} - \omega)} \int_0^t e^{i(\omega_{ni} + \omega_{fn} - 2\omega)t'} dt' \quad (2.163)$$

Temos que $\omega_{ni} + \omega_{fn} = \frac{E_n - E_i + E_f - E_n}{\hbar} = \omega_{fi}$, assim, já resolvendo a integral

$$c_f^{(2)} = -\frac{1}{\hbar^2} \sum_n \frac{V_{fn} V_{ni}}{i(\omega_{ni} - \omega)} \frac{e^{i(\omega_{fi} - 2\omega)t} - 1}{i(\omega_{fi} - 2\omega)} \quad (2.164)$$

Como temos que

$$\frac{e^{ixt} - 1}{x} = \frac{e^{\frac{ixt}{2}} (e^{\frac{ixt}{2}} - e^{-\frac{ixt}{2}})}{2ix/2} = \frac{e^{\frac{ixt}{2}} \text{sen}[xt/2]}{x/2} \quad (2.165)$$

Lembrando que

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \frac{\text{Sen}^2[xt/2]}{(x/2)^2} = 2\pi t \delta(x) \quad (2.166)$$

Podemos reescrever (2.161) e (2.164) da seguinte forma, tomando o módulo quadrado, que é conhecido por probabilidade de transição

$$|c_f^{(1)}|^2 = -\frac{2\pi}{\hbar^2} t |V_{fi}|^2 \delta(\omega_{fi} - \omega) \quad (2.167)$$

$$|c_f^{(2)}|^2 = -\frac{2\pi}{\hbar^2} t \left| \sum_n \frac{V_{fn} V_{ni}}{E_n - (E_f + E_i)/2} \right|^2 \delta(E_f - E_i - 2\hbar\omega) \quad (2.168)$$

Considerando um potencial perturbativo do tipo dipolo elétrico $V = q\vec{r} \cdot \vec{e}E_0$, onde \vec{e} é o vetor unitário da polarização do campo elétrico, e o fato do coeficiente de absorção ser proporcional a $d|c_f|^2/dt$, podemos ver que o primeiro coeficiente da transição de probabilidade diferente de zero será $c^{(1)}$. Para que isso ocorra ω tem que ser igual a ω_{fi} . Isso quer dizer que para que ocorra a absorção de 1 fóton a energia do fóton incidente tem que ser igual a diferença de energia entre o estado inicial i e o estado final f e a força do oscilador vai ser proporcional a $\langle i|\vec{e} \cdot \vec{r}|f\rangle E_0^2$. Com isso transições podem apenas ocorrer entre estados de paridade diferente, pois o operador $\vec{e} \cdot \vec{r}$ é ímpar e a absorção de 1 fóton é proporcional a I .

O primeiro coeficiente da transição de probabilidade que contribui para absorção de dois fótons é o $c^{(2)}$. Para que ele seja diferente de zero ω_{fi} tem que ser igual a 2ω . Isso quer dizer que tem que haver 2 fótons incidentes com energia ω para poder excitar o elétron. A força do oscilador nesse caso vai ser proporcional a

$$\left| \sum_n \frac{\langle i|\vec{e} \cdot \vec{r}|n\rangle \langle n|\vec{e} \cdot \vec{r}|f\rangle}{E_n - (E_f + E_i)/2} \right|^2 E_0^4 \quad (2.169)$$

A absorção de dois fótons será proporcional a I^2 e conecta apenas estados de paridades diferentes, pois n precisa ter paridade oposta a i e f . Apesar das diferenças das regras de seleção os espectros de absorção de 1 e 2 fótons têm mostrado apenas pequenas diferenças para uma boa variedade de corantes sugerindo que estados fluorescentes geralmente degenerados são alcançados

tanto com uma excitação linear como não linear²⁷. Além disso, campos eletromagnéticos em volta da molécula quebram a simetria local e a paridade dos estados, permitindo todas as transições. Nenhuma diferença foi observada nos espectros de emissão, como era de se esperar.

2.4.2 Geração de Segundo Harmônico

Para se descrever um meio óptico linear usa-se o modelo de um oscilador linear clássico amortecido, obedecendo a seguinte equação de movimento

$$\frac{d^2x}{dt^2} + \gamma \frac{dx}{dt} + \omega_0^2 x = 0 \quad (2.170)$$

Assumindo que $\gamma \ll \omega_0$ a solução será

$$x = x_0 e^{-(\gamma/2)t} e^{i\omega_0 t} \quad (2.171)$$

Se incidir no meio uma luz com frequência ω , devemos adicionar uma força motriz a equação de movimento

$$\frac{d^2x}{dt^2} + \gamma \frac{dx}{dt} + \omega_0^2 x = -\frac{e}{m} E \quad (2.172)$$

Para simplificar a notação vamos escrever a equação diferencial utilizando um operador linear L

$$L = \frac{d^2}{dt^2} + \gamma \frac{d}{dt} + \omega_0^2 \quad (2.173)$$

Portando a equação diferencial assume a forma

$$Lx = -\frac{e}{m} E \quad (2.174)$$

Considerando a resposta do oscilador como linear à força externa $E = E_0 e^{i\omega t}$, a solução será

$$x = X_0 \frac{e}{m} \frac{E_0}{(\omega_0^2 - \omega + i\gamma\omega)} \quad (2.175)$$

Agora nós desenvolveremos um modelo de um meio óptico não linear. Para isso o modelo linear é primeiramente generalizado para descrever os efeitos de uma onda de luz arbitrária atuando como força motriz. Então a teoria linear é expandida para incluir respostas não lineares à força motriz.

Para descrever o comportamento de materiais em resposta a uma força motriz arbitrária, a função harmônica simples (2.174) é substituída por uma função periódica generalizada escrita como uma série de Fourier. O campo elétrico real pode ser escrito da seguinte forma

$$E = \frac{1}{2} [E_1 e^{[i(\omega_1 t - k_1 x)]} + E_1^* e^{[-i(\omega_1 t - k_1 x)]} + \dots + E_n e^{[i(\omega_n t - k_n x)]} + E_n^* e^{[-i(\omega_n t - k_n x)]}] \quad (2.176)$$

A notação pode ser simplificada usando a identidade

$$E(\omega_{-n}) \equiv E(-\omega_n) = E^*(\omega_n) = \frac{1}{2} E_0^* e^{ik_n x} \quad (2.177)$$

A força motriz generalizada pode ser escrita agora de forma compacta

$$F(t) = \frac{e}{m} \sum_{n=-\infty}^{\infty} E(\omega_n) e^{i\omega_n t} \quad (2.178)$$

Com a força motriz generalizada, a solução estacionária da equação de movimento que descreve o movimento do oscilador é uma série de Fourier, sendo cada termo idêntico a solução obtida para uma força motriz periódica simples

$$x = \sum_{n=-\infty}^{\infty} X_n e^{i\omega_n t} = \sum_{n=-\infty}^{\infty} \frac{(e/m)E(\omega_n)}{\omega_n^2 - \omega_0^2 + i\gamma\omega_n} e^{i\omega_n t} = \sum_n \frac{e}{m} \frac{E(\omega_n)}{D_n} e^{i\omega_n t} \quad (2.179)$$

Onde $D_{\omega_n} = \omega_n^2 - \omega_0^2 + i\gamma\omega_n$

Há uma diferença de fase entre a força motriz e a n-ésima componente da série

de Fourier descrevendo o deslocamento, dada por

$$\phi_n = \text{tg}^{-1} \frac{\gamma \omega_n}{\omega_n^2 - \omega_0^2} \quad (2.180)$$

O modelo de um sistema linear pode ser modificado para explicar o comportamento não linear substituindo o potencial do oscilador harmônico por um potencial com uma série de potência

$$V(x) = V_0 + \frac{1}{2} \left(\frac{d^2V}{dx^2} \right) x^2 + \frac{1}{6} \left(\frac{d^3V}{dx^3} \right) x^3 + \frac{1}{24} \left(\frac{d^4V}{dx^4} \right) x^4 + \dots$$

$$V(x) = \frac{m\omega_0^2}{2} x^2 + \frac{ma_2}{3} x^3 + \dots \quad (2.181)$$

As potências de x que devem ser levadas em conta no potencial podem ser determinadas pela simetria do material. Por exemplo, para um material com simetria de inversão o potencial deve ser uma função par, portanto só os termos com potências pares de x constituem o potencial.

Os elétrons de uma molécula ou um sólido respondem mais rapidamente a perturbações do que os núcleos. Isso significa que a ressonância dos elétrons está em frequência muito mais alta do que as ressonâncias dos núcleos. Para um material transparente a frequência da luz incidente está abaixo da ressonância eletrônica e acima das ressonâncias vibracionais dos núcleos, como se percebe do gráfico da Figura 30.

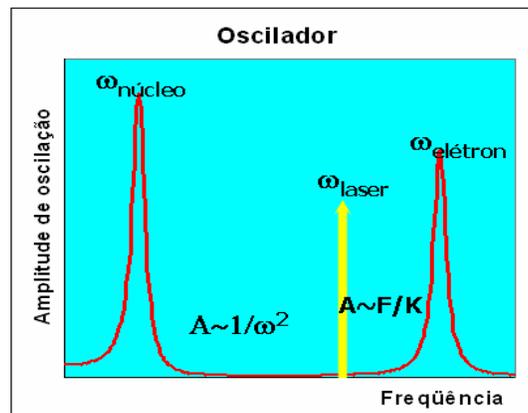


Figura 30 Resposta da amplitude de oscilação

Para frequências muito acima da frequência de ressonância o oscilador amortecido forçado responde com $1/\omega^2$, mas para frequências inferiores a de ressonância o oscilador responde como o caso estático, $F = kx$, na mesma frequência da luz incidente. Isso significa que a frequência da luz incidente é alta demais para forçar as vibrações dos núcleos mas é capaz de colocar os elétrons em oscilação. Entretanto é a oscilação do dipolo núcleo + elétron que irradia ondas eletromagnéticas e a vibração natural do núcleo modula a de um dipolo que, com o núcleo parado, vibraria na frequência do elétron, igual à do fóton incidente. A equação de movimento que temos que considerar será, já levando em conta o potencial não linear

$$Lx + a_2x^2 = -\frac{e}{m}E \quad (2.182)$$

Para resolver a equação (2.182) utilizaremos o método de perturbação. Nesse método, primeiro desconsideramos os termos não lineares e resolvemos a equação diferencial. A solução que obtemos é chamada de solução de ordem zero. O próximo passo é substituir a solução de ordem zero na equação diferencial e obter a solução de primeira ordem.

A solução de ordem zero $x^{(0)}$ da equação (2.182) é a mesma encontrada anteriormente

$$x^{(0)} = \sum_n \frac{e}{m} \frac{E(\omega_n)}{D_{\omega_n}} e^{i\omega_n t} \quad (2.183)$$

Agora usamos essa solução de ordem zero para reescrever a equação (2.183) substituindo o termo não linear

$$Lx = -\frac{e}{m} \sum_n E(\omega_n) e^{i\omega_n t} - \frac{a_2 e^2}{m^2} \sum_n \sum_m \frac{E(\omega_n) E(\omega_m)}{D_{\omega_n} D_{\omega_m}} e^{i(\omega_n + \omega_m)t} \quad (2.184)$$

A solução proposta é do tipo

$$x^{(1)} = \sum_k X_k e^{i\omega_k t} \quad (2.185)$$

Substituindo a solução na equação diferencial

$$\mathcal{L}\left[\sum_k X_k e^{i\omega_k t}\right] = -\frac{e}{m} \sum_n E(\omega_n) e^{i\omega_n t} - \frac{a_2 e^2}{m^2} \sum_n \sum_m \frac{E(\omega_n) E(\omega_m)}{D_{\omega_n} D_{\omega_m}} e^{i(\omega_n + \omega_m) t} \quad (2.186)$$

A parte linear da equação já está resolvida para a solução de ordem zero. Resta então resolver a equação para a parte não linear que surge a partir do termo com o coeficiente a_2

$$\mathcal{L}\left[\sum_k X_k e^{i\omega_k t}\right] = -\frac{a_2 e^2}{m^2} \sum_n \sum_m \frac{E(\omega_n) E(\omega_m)}{D_{\omega_n} D_{\omega_m}} e^{i(\omega_n + \omega_m) t} \quad (2.187)$$

$$\sum_k D_{\omega_k} X_k e^{i\omega_k t} = -\frac{a_2 e^2}{m^2} \sum_n \sum_m \frac{E(\omega_n) E(\omega_m)}{D_{\omega_n} D_{\omega_m}} e^{i(\omega_n + \omega_m) t} \quad (2.188)$$

Quando $\omega_k = \omega_n + \omega_m$ o coeficiente do harmônico $n+m$ será

$$X_{n+m} = \frac{(e^2 a_2 / m^2) E(\omega_n) E(\omega_m)}{D_{\omega_n} D_{\omega_m} D_{\omega_{n+m}}} \quad (2.189)$$

A solução envolve três frequências ω_n , ω_m e $\omega_n + \omega_m$ e os coeficientes dados acima. Ela descreve o comportamento de um oscilador não linear para qualquer par das componentes de Fourier de uma onda arbitrária.

Para obter um melhor entendimento sobre o resultado anterior vamos considerar um caso mais específico onde temos apenas duas componentes na força motriz ω_1 e ω_2 . Para isso temos que considerar todos os coeficientes possíveis que satisfaçam a relação $\omega_k = \omega_n + \omega_m$.

A partir da equação (2.189), para $\omega_k = \omega_1 + \omega_2$

$$D_{\omega_1 + \omega_2} X_{\omega_1 + \omega_2} = -\frac{a_2 e^2}{m^2} \left[\frac{E(\omega_1) E(\omega_2)}{D_{\omega_1} D_{\omega_2}} + \frac{E(\omega_2) E(\omega_1)}{D_{\omega_2} D_{\omega_1}} \right] = -\frac{2a_2 e^2}{m^2} \frac{E(\omega_1) E(\omega_2)}{D_{\omega_1} D_{\omega_2}} \quad (2.190)$$

$$X_{\omega_1 + \omega_2} = -\frac{a_2 e^2}{m^2} \frac{E(\omega_1) E(\omega_2)}{D_{\omega_1} D_{\omega_2} D_{\omega_1 + \omega_2}} \quad (2.191)$$

Esse termo é conhecido como soma de freqüência. Considerando agora $\omega_k = \omega_1 - \omega_2$

$$D_{\omega_1 - \omega_2} X_{\omega_1 - \omega_2} = -\frac{a_2 e^2}{m^2} \left[\frac{E(\omega_1)E(\omega_{-2})}{D_{\omega_1} D_{-\omega_2}} + \frac{E(\omega_{-2})E(\omega_1)}{D_{-\omega_2} D_{\omega_1}} \right] = -\frac{2a_2 e^2}{m^2} \frac{E(\omega_1)E(\omega_{-2})}{D_{\omega_1} D_{-\omega_2}} \quad (2.192)$$

Pela definição de D_{ω_n} temos $D_{-\omega_n} = \omega_n^2 - \omega_0^2 - i\gamma\omega_n = D_{\omega_n}^*$ e $E(\omega_{-n}) = E^*(\omega_n)$ pela identidade (2.177)

$$X_{\omega_1 - \omega_2} = -\frac{2a_2 e^2}{m^2} \frac{E(\omega_1)E^*(\omega_2)}{D_{\omega_1} D_{\omega_2}^* D_{\omega_1 - \omega_2}} \quad (2.193)$$

Esse termo é conhecido como diferença de freqüência. Por simetria já podemos calcular o outro termo da diferença de freqüência

$$X_{\omega_2 - \omega_1} = -\frac{2a_2 e^2}{m^2} \frac{E(\omega_2)E^*(\omega_1)}{D_{\omega_2} D_{\omega_1}^* D_{\omega_2 - \omega_1}}$$

Para $\omega_k = \omega_1 - \omega_1$

$$D_{\omega_1 - \omega_1} X_{\omega_1 - \omega_1} = -\frac{a_2 e^2}{m^2} \left[\frac{E(\omega_1)E(\omega_{-1})}{D_{\omega_1} D_{-\omega_1}} + \frac{E(\omega_{-1})E(\omega_1)}{D_{-\omega_1} D_{\omega_1}} \right] = -\frac{2a_2 e^2}{m^2} \frac{E(\omega_1)E^*(\omega_1)}{D_{\omega_1} D_{\omega_1}^*} \quad (2.194)$$

$$X_{\omega_1 - \omega_1} = -\frac{2a_2 e^2}{m^2} \frac{E(\omega_1)E^*(\omega_1)}{D_{\omega_1} D_{\omega_1}^* \omega_0^2} \quad (2.195)$$

Esse é o termo constante, já que as exponenciais têm coeficientes zero. O termo é conhecido também como Retificação Óptica. Para calcular a Retificação Óptica devido ao outro campo basta substituir ω_1 por ω_2

$$X_{\omega_2 - \omega_2} = -\frac{2a_2 e^2}{m^2} \frac{E(\omega_2)E^*(\omega_2)}{D_{\omega_2} D_{\omega_2}^* \omega_0^2} \quad (2.196)$$

Calculando o termo $\omega_k = -\omega_1 - \omega_2 = -(\omega_1 + \omega_2)$

$$D_{-\omega_1 - \omega_2} X_{-\omega_1 - \omega_2} = -\frac{a_2 e^2}{m^2} \left[\frac{E(\omega_{-1})E(\omega_{-2})}{D_{-\omega_1} D_{-\omega_2}} + \frac{E(\omega_{-2})E(\omega_{-1})}{D_{-\omega_2} D_{-\omega_1}} \right] = -\frac{2a_2 e^2}{m^2} \frac{E(\omega_{-1})E(\omega_{-2})}{D_{-\omega_1} D_{-\omega_2}} \quad (2.197)$$

$$X_{-\omega_1-\omega_2} = -\frac{2a_2e^2}{m^2} \frac{E(\omega_{-1})E(\omega_{-2})}{D_{-\omega_1}D_{-\omega_2}D_{-\omega_1-\omega_2}} = -\frac{2a_2e^2}{m^2} \frac{E^*(\omega_1)E^*(\omega_2)}{D_{\omega_1}^*D_{\omega_2}^*D_{\omega_1+\omega_2}^*} \quad (2.198)$$

O resultado da equação anterior é igual a $X_{\omega_1+\omega_2}^*$, portanto

$$X_{-\omega_1-\omega_2} = X_{\omega_1+\omega_2}^* \quad (2.199)$$

Os termos $\omega_k = 2\omega_1$ e $\omega_k = 2\omega_2$ ficam

$$D_{2\omega_1}X_{2\omega_1} = -\frac{a_2e^2}{m^2} \left[\frac{E(\omega_1)E(\omega_1)}{D_{\omega_1}D_{\omega_1}} + \frac{E(\omega_1)E(\omega_1)}{D_{\omega_1}D_{\omega_1}} \right] = -\frac{2a_2e^2}{m^2} \frac{E(\omega_1)E(\omega_1)}{D_{\omega_1}D_{\omega_1}} \quad (2.200)$$

$$X_{2\omega_1} = -\frac{2a_2e^2}{m^2} \frac{E(\omega_1)E(\omega_1)}{D_{\omega_1}D_{\omega_1}D_{2\omega_1}} \quad (2.201)$$

$$X_{2\omega_2} = -\frac{2a_2e^2}{m^2} \frac{E(\omega_2)E(\omega_2)}{D_{\omega_2}D_{\omega_2}D_{2\omega_2}} \quad (2.202)$$

Esses termos são responsáveis pela geração de segundo harmônico. Os termos $\omega_k = -2\omega_1$ e $\omega_k = -2\omega_2$ são complexos conjugados como no caso de $\omega_k = -\omega_1 - \omega_2$

$$X_{-2\omega_1} = X_{2\omega_1}^* \quad (2.203)$$

$$X_{-2\omega_2} = X_{2\omega_2}^* \quad (2.204)$$

Portando se irradiarmos um meio não linear com uma radiação ω podemos detectar uma radiação saindo do meio com frequência 2ω . É importante ressaltar que apesar do SHG depender da não linearidade do meio, a frequência em que ele é gerado não depende do meio, depende apenas da frequência do laser de excitação. Algumas frequências podem ser ressonantes com o meio, como podemos ver pelos denominadores dos coeficientes calculados. Se o laser estiver em uma dessas ressonâncias o sinal do SHG deve aumentar bastante.

Uma explicação mais intuitiva para se entender o SHG pode ser feita em termos de níveis de energia. Temos um processo necessitando de 2 fótons ω para emitir 1 fóton 2ω como mostra a Figura 31.

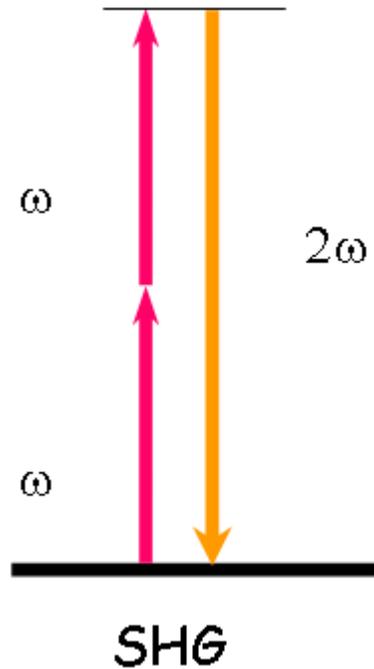


Figura 31 Níveis de energia no SHG

Diferentemente da fluorescência os níveis excitados no SHG são virtuais, não há uma absorção dos dois fótons do laser. O laser é espalhado pela molécula. Um ótimo gerador de segundo harmônico na área biológica é o colágeno. Uma representação de suas moléculas está na Figura 32.

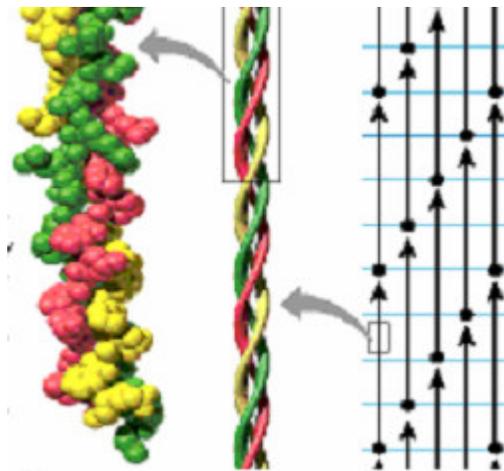


Figura 32 Molécula de colágeno

Suas moléculas são quirais, ou seja, já não possuem simetria de inversão que impede o SHG, preenchendo o quesito do potencial para o SHG. Além de suas

moléculas serem quirais, elas se alinham umas com as outras nas hélices triplas que crescem em fibras. Isso aumenta ainda mais o sinal de SHG.

Capítulo 3

Sistema Experimental

Neste capítulo vamos descrever o sistema experimental utilizado para realizar a aquisição das imagens. Optamos por apresentar a parte experimental separada dos resultados porque o objetivo dessa tese é a integração das técnicas, portanto faz mais sentido apresentar primeiro a integração, e o que foi necessário para realizá-la, e depois apresentar os resultados. Mesmo porquê uma grande quantidade de imagens obtidas compartilham da mesma montagem experimental, mostrando características diferentes de cada técnica. Colocá-las, portanto, entre a descrição das montagens experimentais poderia dificultar um pouco a leitura de quem estivesse interessado apenas nos detalhes experimentais.

Serão apresentados a montagem da microscopia confocal “single-photon”, multifóton e SHG bem como a pinça óptica num único microscópio de base. Serão apresentados os requisitos essenciais para o bom funcionamento isolado de cada técnica e do funcionamento em conjunto das mesmas. Começaremos mostrando o sistema experimental como um todo e depois explicaremos cada parte separadamente em detalhes, mostrando os requisitos essenciais para que cada

técnica funcione separadamente e em conjunto. A Figura 33 mostra o sistema experimental completo.

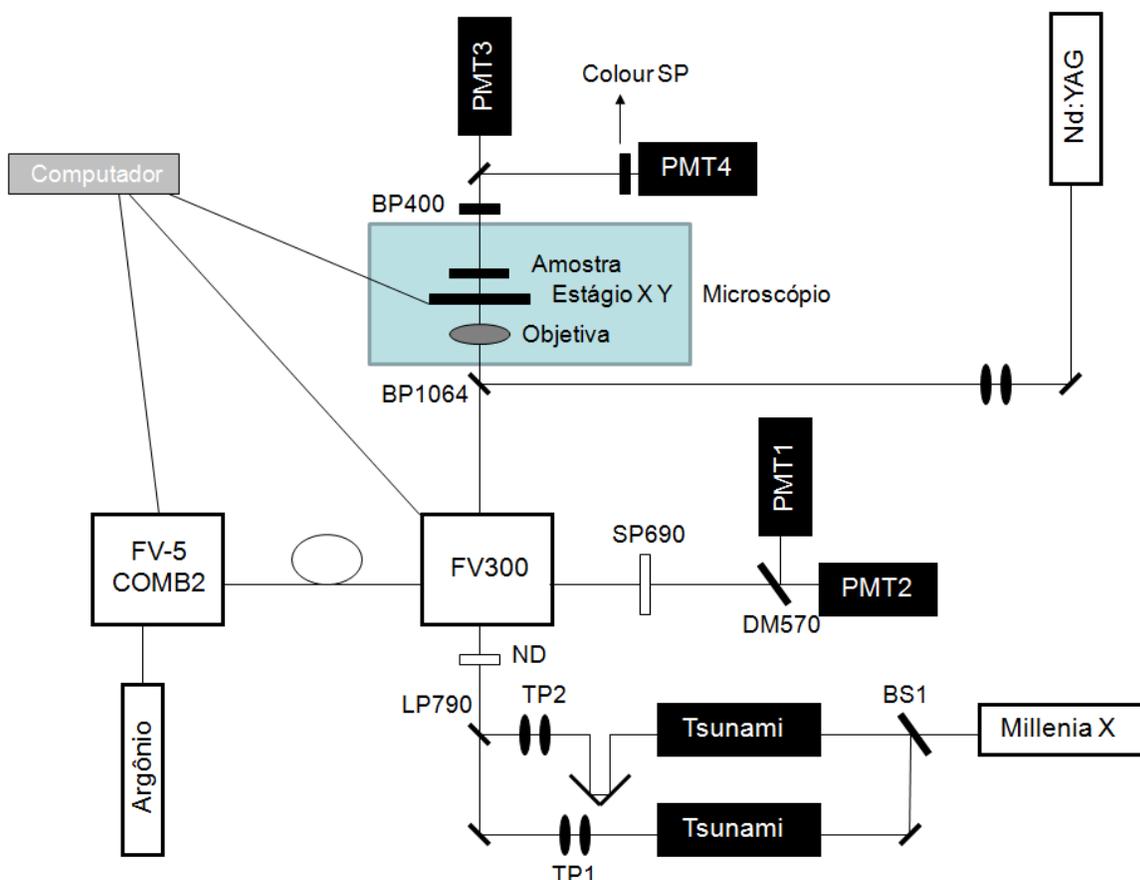


Figura 33 Sistema experimental completo

O sistema confocal utilizado é composto por um microscópio invertido IX-81, o scanner FV300, o combinador de laser FV-5 COMB2, todos da Olympus. Dentro do FV300 há 2 fotomultiplicadoras (PMT) e outras duas externas, todas da empresa Hamamatsu modelo 3896. O FV300 possui ainda uma porta especial e um espelho dicróico responsável por acoplar o laser de Ti:Safira com o laser de Argônio vindo do combinador por uma fibra óptica. O laser de Ti:Safira é um Tsunami bombeado por um Laser de Estado Sólido Bombeado por Diodo (DPSSL) de 10W, Millennia X, ambos da Spectra-Physics. Um estágio de translação da Prior Scientific, modelo ProScan foi usado para movimentar as amostras na

direção x-y, enquanto a movimentação em z foi feita pelo próprio motor do IX-81. Microscopia Confocal de “single photon” foi excitada com a linha de 488 nm do laser de Argônio da Omnicrome, modelo 170B, enquanto as microscopias TPEF e SHG foram excitadas pelo laser de Ti:Safira. Um telescópio é utilizado para coincidir a divergência do feixe de Ti:Safira com o plano focal após a objetiva, usando o feixe de Argônio como referência. Mudando a distância entre as lentes do telescópio nós garantimos que as imagens confocais de 1 e 2 fótons correspondem ao mesmo plano. As imagens foram obtidas com uma objetiva Uplan FL N da Olympus de 40x de N.A. 1.3 de imersão a óleo. Imagens confocais de 1 fóton foram coletadas usando a geometria de retro-reflexão, após passar pelo pinhole, enquanto a multifóton foi coletada em ambas as direções, retro-refletida e transmitida, simultaneamente ou não, e o sinal de SHG foi coletado apenas na direção transmitida. Um filtro passa baixa em 690 nm 3rd Millenium 690SP da Omega Filters foi utilizado para rejeitar o laser de Ti:Safira na fluorescência multifóton. Os sinais transmitidos foram coletados pelo condensador do microscópio e direcionados para a fotomultiplicadora externa. A fluorescência e o sinal do laser no caso da microscopia SHG foram rejeitados com dois filtros. Um filtro passa banda em 400 nm da Oriel colocado após o condensador e outro passa baixa acoplado à PMT externa. O espectro do SHG foi obtido com um monocromador de 30cm da Acton Research modelo 300, equipado com um detector CCD refrigerado por nitrogênio líquido “back-illuminated” da Princeton Instruments – LNCCD 1340/ 100 EB/1. As imagens foram reconstruídas pelo programa Fluoview da Olympus com aplicação do filtro Kalman 5 vezes. O laser da pinça óptica foi refletido utilizando um filtro passa banda em 1064 nm. O laser da pinça óptica é um Nd:YAG modelo 3800 S da Spectra Physics.

3.1 Laser para a Pinça Óptica

O primeiro passo para a montagem de uma pinça óptica é a escolha do laser. Nos primeiros trabalhos com pinça óptica se utilizou um laser de argônio em 514 nm. Logo se percebeu que após um período de captura os microorganismos morriam

devido aos danos térmicos²⁸. Como vimos anteriormente, o comprimento de onda do raio de luz não interfere na captura da partícula, então pode-se escolher outro laser que não seja tão absorvido pelos microorganismos. A Figura 34 mostra o espectro de absorção de algumas substâncias biológicas.

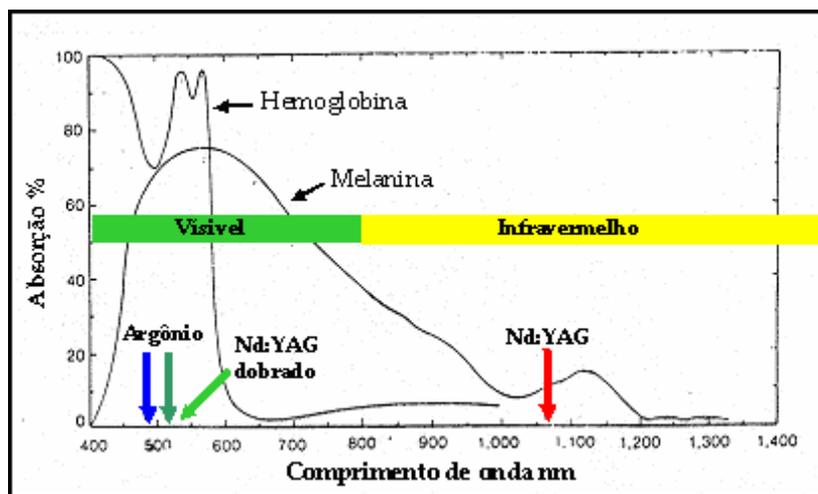


Figura 34 Espectro de Absorção da Melanina e Hemoglobina

Ao analisar o espectro vemos que a maior parte da absorção de luz por substâncias biológicas ocorre no visível. Já no infravermelho há bem menos absorção, o que deixa uma janela no espectro para a escolha do laser. O laser comercial mais comum e barato nessa região é o laser de Nd:YAG, Neodímio Yttrium Aluminum Garnet, operando em 1064 nm.

Na nossa pinça óptica usamos um laser de Nd:YAG modelo 3800 S da Spectra Physics operando em modo contínuo (“continuous wave” – cw) no comprimento de onda de $\lambda = 1064$ nm. Trata-se de um laser comercial de alta potência, mais de 10 W (existem lasers de Nd:YAG com centenas de W), com o comprimento de onda bem na janela desejada, conforme mostrou a Figura 34 acima, e excelente qualidade de modo, geralmente TEM₀₀, tornando-o a ferramenta ideal para a pinça óptica. É um laser de estado sólido capaz de operar por dezenas de anos apenas com troca das lâmpadas de bombeio e reposição da água deionizada.

²⁸ A. Ashkin, J. Dziedzic., T. M. Yamane: “*Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams*”. Nature 330, pg. 769, 1987.

3.2 Microscópios: Óptica Simples e Óptica Infinita

A Figura 35 mostra um objeto e sua imagem formada por uma objetiva de aumento m , que é o processo de formação da imagem em um microscópio de óptica simples.

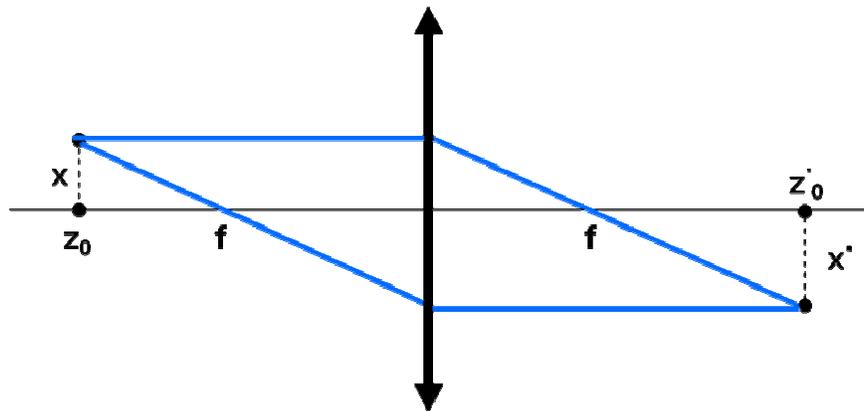


Figura 35 Formação da Imagem Microscópio Óptica Simples

Por semelhança de triângulos

$$\frac{x}{z'_0} = \frac{x'}{f} \rightarrow m = \frac{x'}{x} = \frac{f}{z'_0} \quad (3.1)$$

Dada uma magnificação m , o objeto que está em foco se encontra a uma distância $z'_0 = f/m$ do foco da objetiva. Agora, se algo se encontra no foco da objetiva sua imagem será formada no infinito pois seus raios são paralelos. Portanto nos microscópios de óptica simples o plano de visão é diferente do plano do foco da objetiva, não havendo nada que se possa fazer para que os planos coincidam.

Quando se trata de lasers, o feixe de luz incidente na objetiva geralmente é paralelo, isso quer dizer que o feixe de laser será focalizado no foco da objetiva, fora do plano de visão do microscópio. Esse fato nos mostra que as partículas pinçadas estariam fora de foco, ou no caso da microscopia confocal, as imagens

adquiridas não seriam as imagens visualizadas na câmera na TV, seriam imagens de outros planos como mostrado na Figura 36.

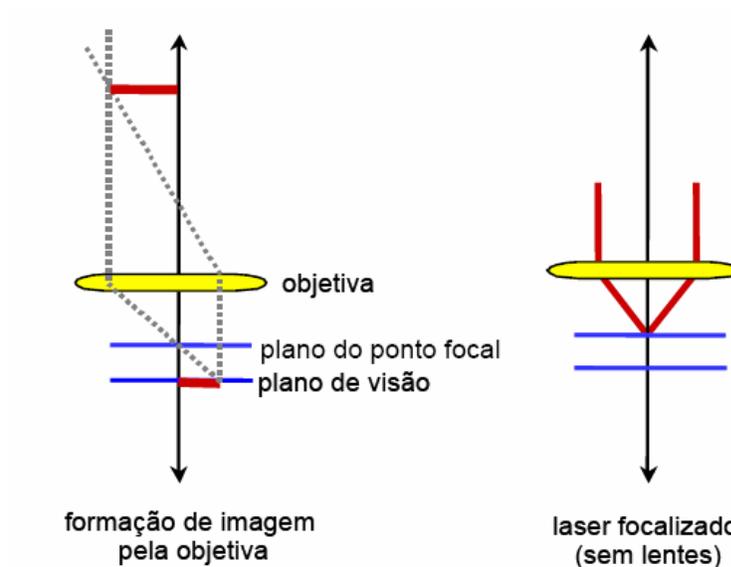


Figura 36 Plano de Visão e Focalização do Laser

Para corrigir esse problema é necessário o uso de um telescópio, que torna o feixe de laser um pouco mais divergente. O telescópio é composto por duas lentes, uma no foco da outra, como mostra a Figura 37.

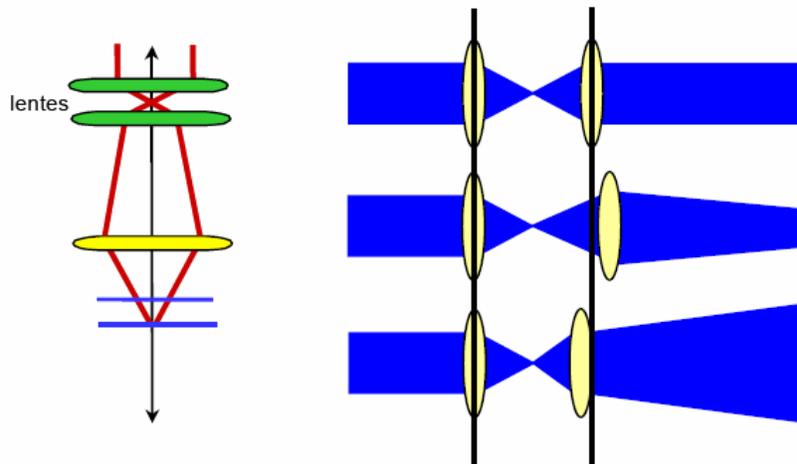


Figura 37 O Telescópio

Quando aproximamos uma lente da outra o feixe se torna divergente. Ao afastarmos uma lente da outra o feixe se torna convergente, como podemos

observar na Figura 37. As duas lentes, devem estar aproximadamente uma no foco da outra para possibilitar que capturemos no plano de visão do microscópio. A mudança da posição de captura, ou a mudança do plano adquirido para a imagem, é feita ajustando a distância entre essas duas lentes.

Os microscópios mais modernos são microscópios de óptica infinita. Nos microscópios de óptica infinita os objetos são colocados no foco da objetiva. Isso geraria raios paralelos que formariam a imagem no infinito, porém para corrigir isso, é utilizada uma outra lente para focar esses raios paralelos, conhecida como lente de tubo, como mostra a Figura 38

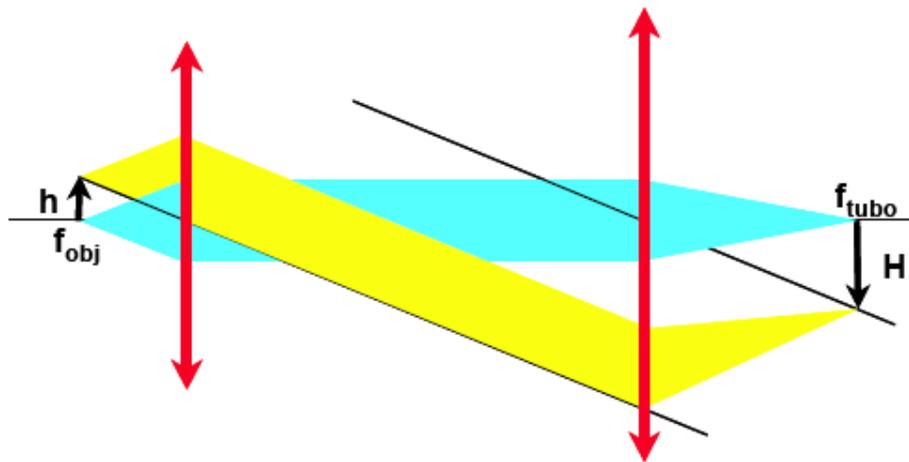


Figura 38 Formação da Imagem Microscópio de Óptica Infinita

O aumento nesse caso será

$$\frac{h}{f_{obj}} = \frac{H}{f_{tubo}} \rightarrow m = \frac{H}{h} = \frac{f_{obj}}{f_{tubo}} \quad (3.2)$$

Como os raios de luz que se formam entre a objetiva e a “lente de tubo” são paralelos, elementos ópticos como prismas, filtros e polarizadores podem ser colocados nesse espaço sem causar aberrações na formação da imagem. Há um número máximo de componentes que podem ser colocados, o qual é limitado pela distância existente entre a objetiva e a “lente de tubo”. Colocar a “lente de tubo” muito longe da objetiva reduz a quantidade de raios periféricos coletados resultando em imagens borradas e/ou escurecidas reduzindo assim sua qualidade.

Ao contrário do microscópio de óptica simples, se o laser não estiver sendo focalizado no foco da objetiva, por não estar entrando paralelo na objetiva, por exemplo, poderia-se aumentar ou diminuir a distância entre a lente de tubo e a câmera para trazer o plano de visão para o foco do laser. Porém no nosso caso, como estamos acoplando vários lasers ao mesmo tempo eles podem focar em planos diferentes, não adiantando alterar a distância da câmera para ajustar um ao plano de visão pois perderíamos o ajuste do outro laser. O que devemos fazer, então, é escolher um laser como referência e ajustar o foco dos demais lasers a partir desse referencial utilizando um telescópio individual para cada um. Como no nosso sistema acoplamos o laser de argônio por uma fibra, não podemos colocar um telescópio no seu caminho, portanto esse sempre será nosso laser de referência. Ainda mais, o acoplamento por fibra já tem as distâncias calculadas por fábrica para garantir que o laser chegue paralelo na objetiva focando, assim, no plano de visão.

3.3 Alinhamento da Pinça Óptica

O primeiro passo para o alinhamento da pinça óptica é a introdução de um espelho no microscópio que reflete o laser da pinça mas é transparente para todos os outros comprimentos de onda. Esse espelho é inserido dentro do carrossel de filtros do microscópio. O laser da pinça entra no microscópio por uma entrada especial, como mostra a Figura 39.



Figura 39 Montagem Pinça Óptica

Com o espelho no lugar, o próximo passo é fazer o feixe de laser incidir perpendicularmente na objetiva sem o telescópio. Para isso, removendo a objetiva fazemos o laser entrar no microscópio utilizando no mínimo dois espelhos externos. Os dois espelhos permitem um melhor controle sobre o feixe, garantido que o feixe entre sem inclinação no microscópio. Utilizando um papel espalhador onde ficaria a amostra verificamos se o laser está centralizado com o círculo de abertura da objetiva. Podemos também utilizar como referência o círculo de iluminação do condensador centralizando o laser no mesmo. Feito isso colocamos a objetiva de volta no lugar e tentamos visualizar o laser na tela da TV com a câmera. Começamos com a objetiva de menor aumento, 10x no nosso caso. Aparecendo uma porção do feixe na TV devemos então deixar o feixe perpendicular à objetiva.

Com os dois espelhos externos utilizamos um procedimento que converge conhecido como “walk”. Movimentamos um espelho e depois o outro, de forma que o movimento de um compense o movimento do outro até se obter um círculo perfeito na TV mostrado na Figura 40. O ponto central do círculo deve estar mais ou menos no centro da imagem, ou sairá do campo de visão quando usarmos objetivas de maiores aumentos.

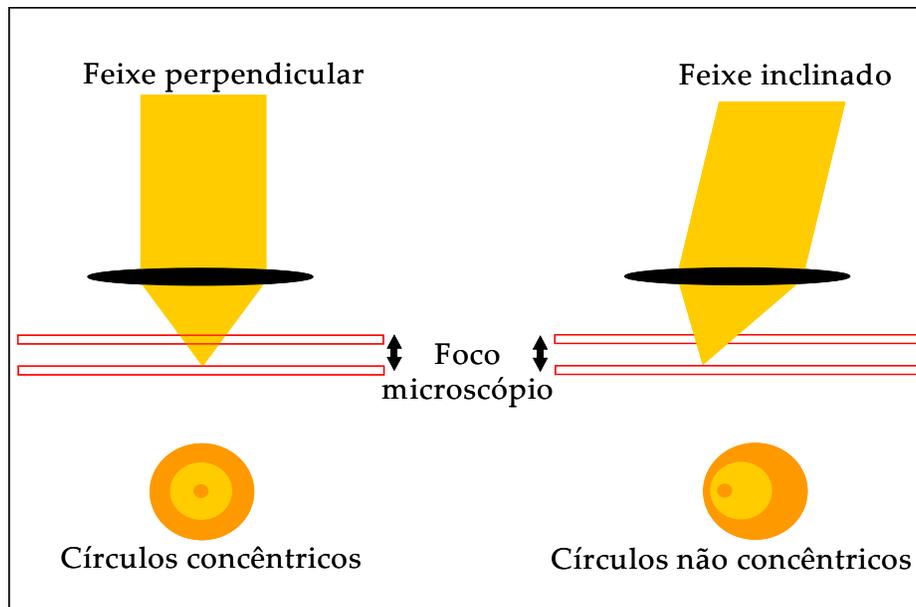


Figura 40 Círculos Concêntricos do Alinhamento do Feixe

Agora podemos introduzir o telescópio. O telescópio aqui tem duas funções: 1. Garantir que o foco do laser da pinça está no mesmo foco do laser de referência acoplado pela fibra 2. Garantir o preenchimento da objetiva pelo laser. Para centralizar o feixe ao longo dos eixos das várias lentes, primeiramente colocamos apenas a primeira delas que é normalmente montada sobre um sistema de translação XY. Essa lente tornará o laser divergente e mudará completamente a posição z do foco, que deve ser reencontrada. Agora, movendo apenas a lente que acabamos de introduzir no seu plano horizontal obrigamos o foco do laser a coincidir no mesmo ponto em que estava antes da lente ser colocada. Para isso, usamos a TV com um círculo desenhado na tela com uma caneta de retroprojektor. Repetimos então o processo de “verticalização”. Movimentando apenas a lente nos certificamos que o feixe, apesar de divergente, continua perpendicular formando círculos simétricos. Garantida que a primeira lente está centralizada, colocamos a segunda lente do telescópio, que deve ser montada em um sistema de translação XYZ, para se poder variar a distância entre as duas lentes na direção z. Repetimos o procedimento anterior.

Para que seja utilizada toda a abertura numérica da objetiva deve-se preencher com o laser toda a sua abertura de entrada, Figura 41.

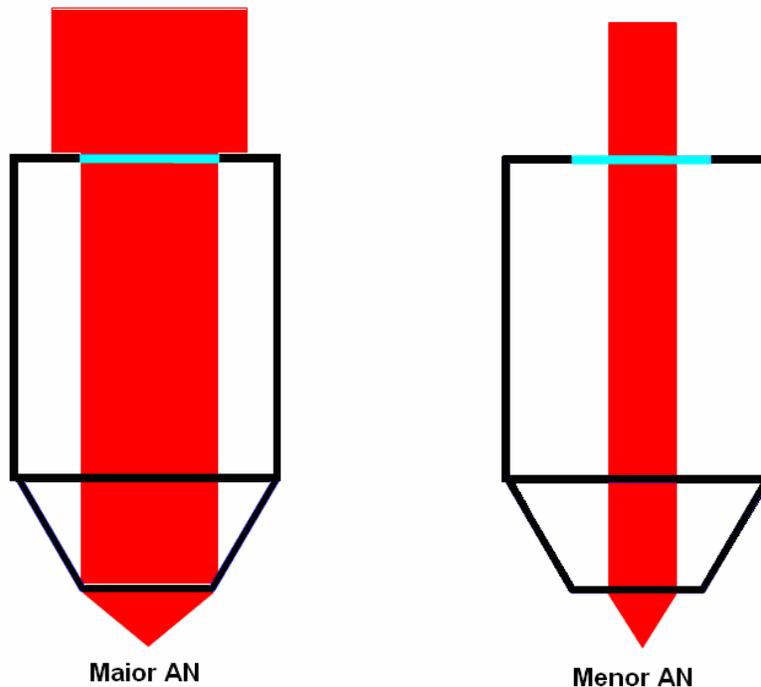


Figura 41 Preenchimento da objetiva

Qualquer preenchimento menor que sua abertura de entrada estaremos utilizando uma abertura numérica menor do que a abertura numérica nominal da objetiva e, portanto, uma menor eficiência da pinça óptica. Para isso utilizamos o telescópio, expandindo ou diminuindo o tamanho do feixe conforme escolhemos a distância focal das lentes. A razão entre os focos das lentes dá o aumento no tamanho do feixe. Se o foco da primeira lente do telescópio for menor que o foco da segunda o tamanho do feixe aumenta pela mesma razão, ocorrendo o inverso se o foco da primeira lente for maior que o foco da segunda.

A última etapa é fazer coincidir o laser da pinça com o laser de Argônio de referência. Para isso capturamos uma partícula fluorescente com a pinça no plano atual do seu laser. Depois começamos a adquirir uma imagem de fluorescência utilizando o laser de Argônio sem mexer no foco da objetiva. Como a partícula está capturada onde o laser da pinça está focado, provavelmente não haverá nenhum sinal de fluorescência para formar a imagem. Devemos, então, modificar a distância entre as lentes do telescópio até que o sinal de fluorescência comece a aparecer na tela do computador. A partir daí, devemos modificar a distância de

modo a intensificar o sinal de fluorescência na tela do computador. Como ao modificar a distância entre as lentes estamos modificando o foco em que a partícula está sendo capturada, ao obtermos o sinal máximo de fluorescência garantimos que os focos dos dois lasers estão coincidindo.

3.4 O Microscópio Confocal

No capítulo teórico demos uma descrição básica de um Microscópio Confocal, aqui neste capítulo daremos uma descrição mais detalhada indicando os principais componentes do microscópio e suas funções.

Um dos componentes principais de um LSCM é a unidade de varredura ou, mais usualmente conhecido, “scan head” ou “scanner”. Ele é responsável por fazer a varredura do laser na amostra bem como coletar o sinal requerido para construir a imagem. Um scan head típico contém entradas para os laser de excitação, filtros para fluorescência, espelhos dicróicos, espelhos galvanômetros para a varredura do laser, vários tamanhos de “pinhole” para gera a imagem confocal e fotomultiplicadoras para a detecção do sinal. Essa configuração típica é mostrada na Figura 42

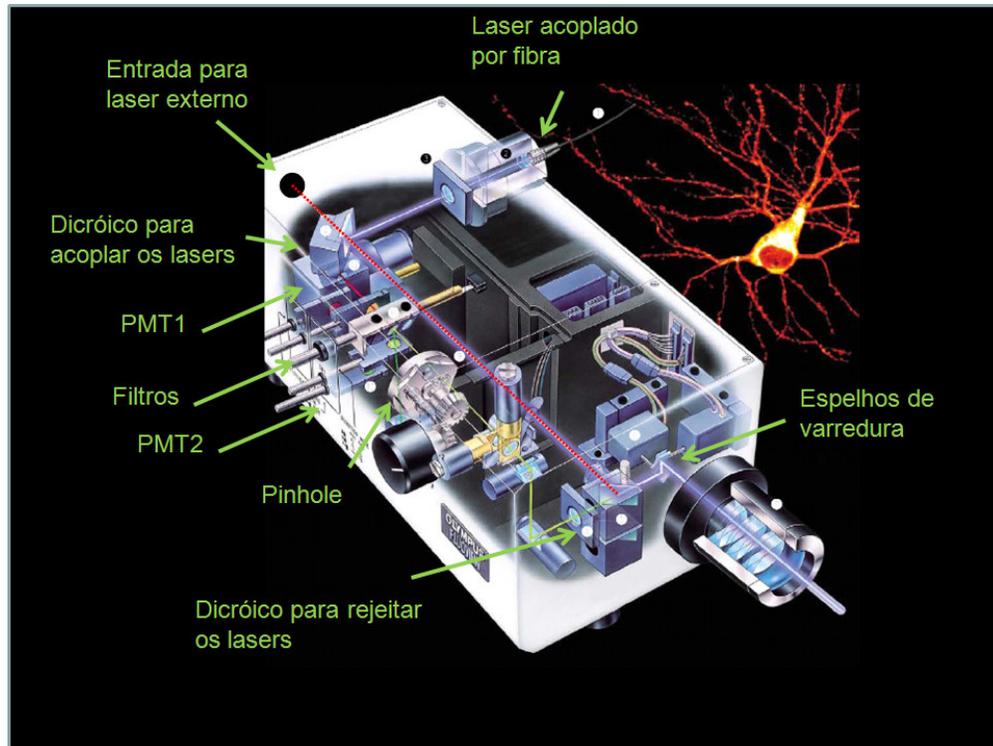


Figura 42 Scan Head

Um dos componentes mais importantes do scan head é o “pinhole” que atua como o filtro espacial conjugado com o plano focal da objetiva posicionado diretamente em frente a fotomultiplicadora. Geralmente estão presentes pinholes de diferentes tamanhos montados em um sistema rotatório permitindo que o operador selecione o tamanho desejado e por consequência o seccionamento óptico desejado.

Cada imagem 2-D de uma área parcial da amostra é adquirida varrendo o plano focal. Um espelho é responsável por fazer a varredura na direção X e o outro na direção Y. Assim que o espelho responsável pela direção X varre uma linha o feixe é rapidamente trazido para a posição inicial e transladado para a nova posição em Y. Durante o retorno do feixe para a posição inicial nenhum sinal é adquirido pelo detector. Conforme cada linha é varrida pelos espelhos o sinal de fluorescência é coletado pela objetiva e retorna pelo mesmo caminho passando novamente pelos espelhos galvanômetros, mas desta vez no sentido inverso, esse processo é conhecido como “descanning” do sinal. Após os espelhos de varredura a fluorescência passa direto pelo espelho dicroico e é focalizado no pinhole.

Conforme o feixe do laser varre a amostra, o sinal analógico da luz, detectado pela fotomultiplicadora, é convertido num sinal digital, formando assim uma imagem baseada em pixels no monitor do computador acoplado ao sistema. A intensidade relativa da luz fluorescente corresponde a intensidade do pixel resultante na imagem. Uma reconstrução da imagem 3-D da amostra pode ser feita recolhendo e sobrepondo várias imagens 2-D recolhidas em diferentes planos focais no eixo Z. A Figura 43 mostra o scanhead acoplado ao microscópio.

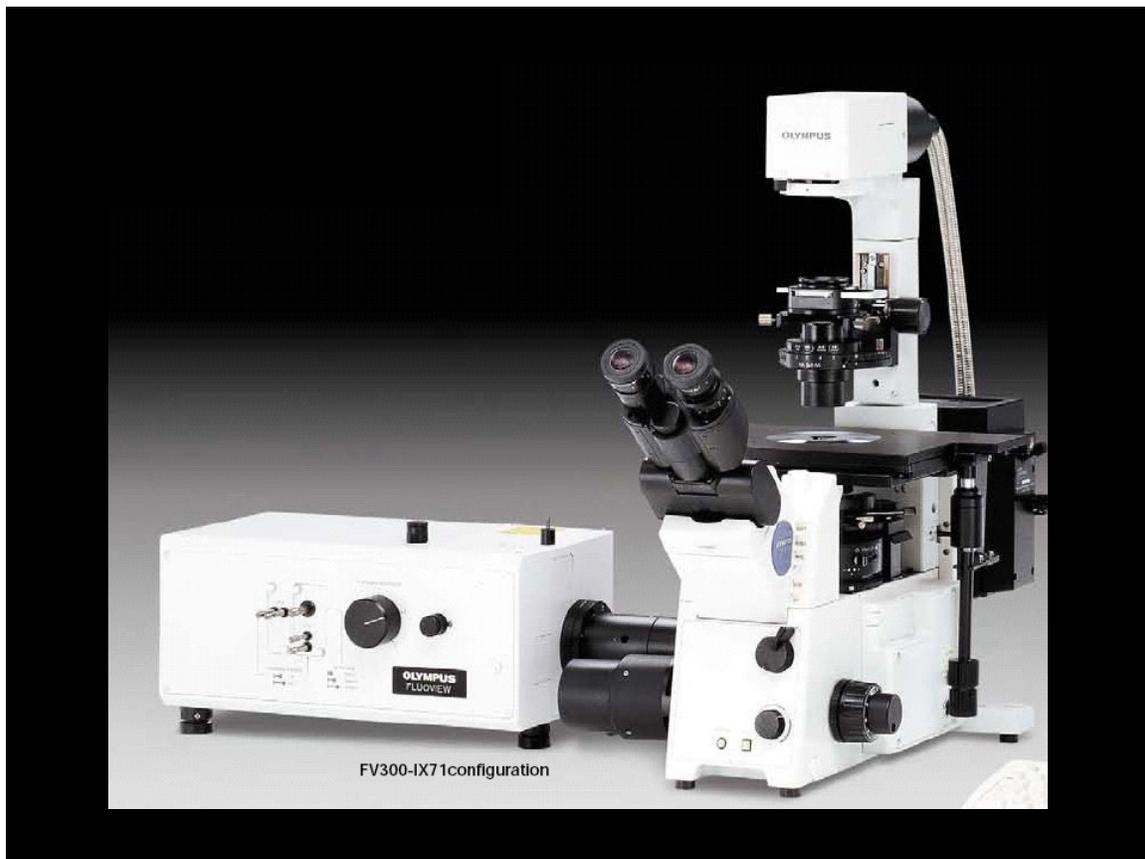


Figura 43 Microscópio Confocal

3.5 Alinhamento do Laser de Argônio

A Figura 44 mostra o combinador de lasers.

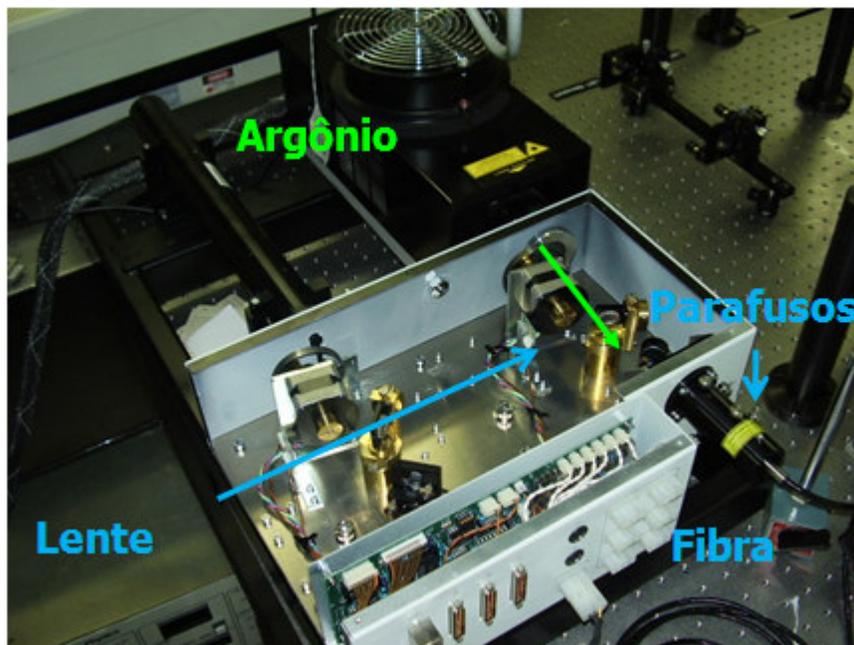


Figura 44 Combinador de lasers

Nessa parte do alinhamento devemos fazer o laser de Argônio ficar focalizado na entrada da fibra. O primeiro passo é utilizar os parafusos da lente mostrada na Figura 44 para fazer o feixe do laser incidir na entrada da fibra. Para achar o ponto ótimo colocamos um detector de potência na saída da fibra e movemos a lente até obter o sinal máximo de potência na saída. Esse é o alinhamento grosseiro. O alinhamento fino é feito utilizando os parafusos que ficam na entrada da fibra. Ainda olhando para a potência do laser na saída da fibra, apertamos ou soltamos os parafusos em pares para obter o máximo de potência no medidor. Uma perda de potência da ordem de 50% na fibra é o valor a ser atingido nesse caso.

Após conseguir o máximo de potência na saída da fibra, devemos acoplá-la no scan head FV300 apertando 3 parafusos que existem em seu suporte. Para saber a posição ideal dos parafusos, colocamos o suporte da fibra no lugar e fazemos o que chamamos de “bandeira do Japão”. A “bandeira do Japão” consiste em movimentar o suporte da fibra, sem apertar os parafusos, e olhar na tela do

computador adquirindo uma imagem transmitida do laser em uma fotomultiplicadora externa. O objetivo é centralizar o laser que é detectado pela fotomultiplicadora na tela do computador e, então, apertar os parafusos. O scan head é mostrado na Figura 45 já com a fibra acoplada.

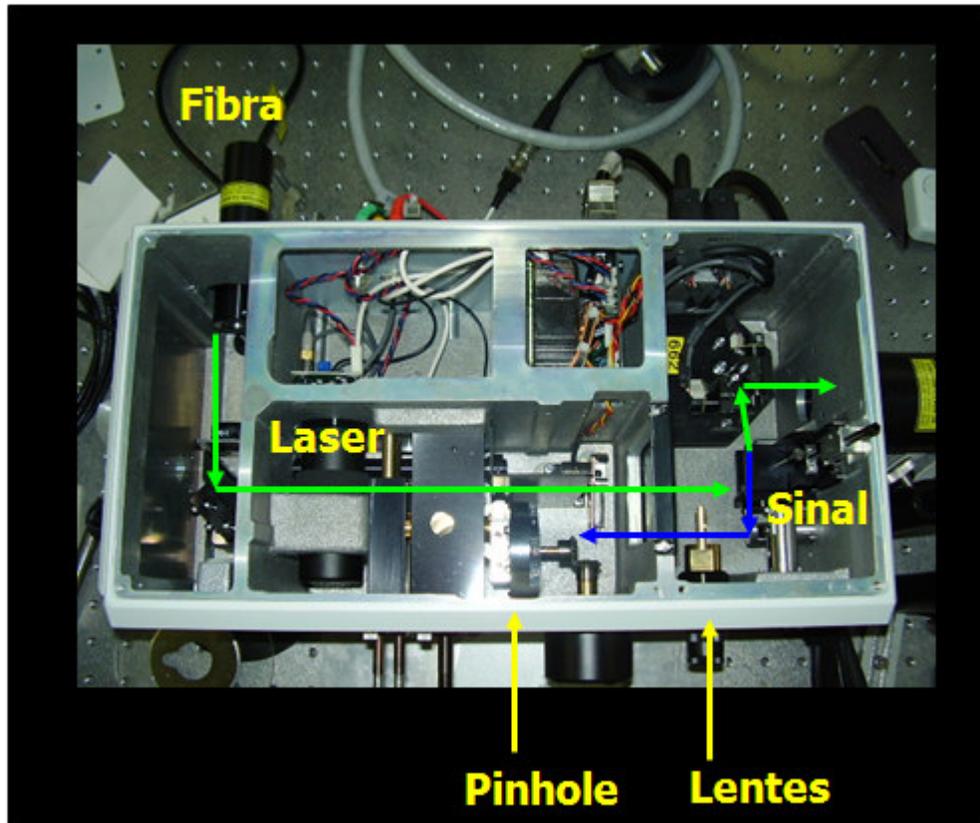


Figura 45 Scan Head visto de cima

Com a fibra acoplada na posição certa, já devemos ser capazes de obter alguma imagem confocal. Colocando alguma amostra fluorescente resta o último passo do alinhamento do Argônio. Utilizando as lentes que ficam na frente do pinhole, como mostrado na Figura 45, devemos maximizar o sinal da imagem de fluorescência que vemos na tela do computador. Começamos com o maior “pinhole” maximizando a fluorescência girando as lentes através de seus parafusos. Depois passamos sucessivamente para os pinholes menores girando as lentes para melhorar o sinal.

3.6 Laser de Ti:Safira

O laser que utilizamos em nosso sistema para realizar as Microscopias TPEF e SHG é um “Tsunami” que gera pulsos entre 60 a 120 femto-segundos (FWHM – “Full Width Half Maximum”) de duração, potência média de até 2 W, potência de pico de até 400 kW e taxa de repetição de 80 MHz. A grande vantagem desse laser é que ele é capaz de gerar pulsos de femto-segundos em todo intervalo de ganho. O mecanismo que possibilita isso é conhecido como Kerr Lens Mode Locking. O bastão de Ti:Safira tem um índice de refração não linear da forma $n(I) = n_0 + n_2 I$, com n_2 positivo. Isso quer dizer que se o feixe incidente no bastão tiver um perfil de intensidade distribuído espacialmente, distribuição gaussiana por exemplo, o índice de refração do cristal será maior no centro do feixe do que nas suas bordas. Esse fato faz com que o cristal de Ti:Safira funcione como uma lente. Esse fenômeno é conhecido como auto-focalização ou lente de Kerr, como mostra a Figura 46. Se as perdas na cavidade forem menores para o laser operando com essa lente extra do que sem ela o laser tende a operar na forma pulsada, também denominada por travamento de modos, ou “mode-locked”.

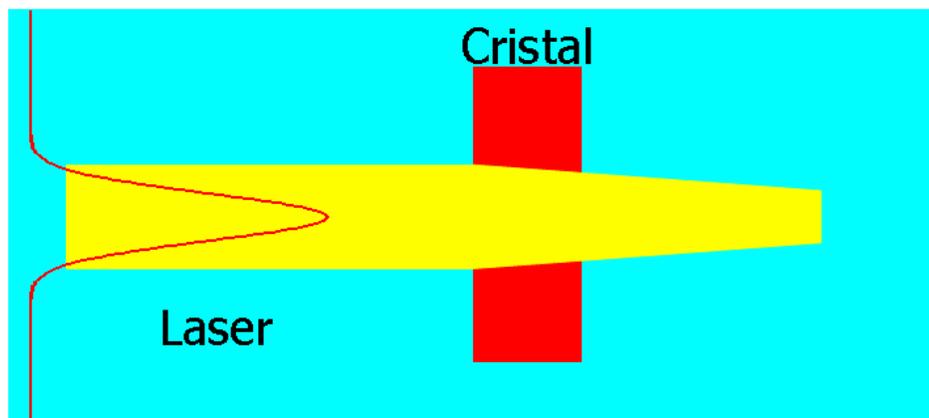


Figura 46 Auto-focalização do laser no cristal de Ti:Safira

Um laser opera na forma pulsada sempre que a janela de tempo na qual o ganho supera as perdas se repetir no tempo com o mesmo “round trip time” do feixe na cavidade, como mostra a **Figura 47**. O travamento de modos, “mode-locking” é

ativo quando existe um meio externo modulando as perdas da cavidade e passivo quando essa modulação ocorre naturalmente. No bombeamento ativo é necessário sincronizar o modulador com a frequência de repetição própria da cavidade.

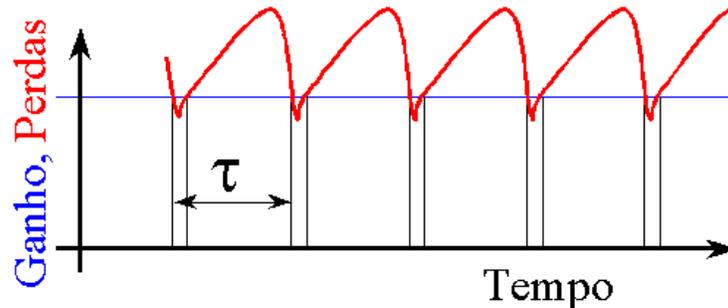


Figura 47 Esquema do ganho e as perdas na cavidade do laser. Nas janelas onde o ganho é maior que as perdas o laser pode pulsar

Como as diferenças de perdas entre as operações CW (“continuous wavelenght”) e pulsada do laser de Ti:safira são muito pequenas, esse laser não é “self-starting”, e comumente opera em ambas as formas simultaneamente. Para forçar apenas a operação pulsada, alguns fabricantes aumentam as perdas para a operação CW colocando uma fenda no foco da lente Kerr não-linear. No caso do “Tsunami” a opção foi iniciar a operação pulsada com “mode-locking” ativo através de um modulador acusto-óptico. A operação pulsada é mantida a seguir através de uma realimentação do modulador, uma forma de operação que mistura “mode-locking” ativo e passivo.

Para se construir pulsos ultra-curtos são adicionadas ondas de diferentes frequências com uma origem temporal comum. Se essas ondas possuírem uma relação de fase relativa bem definida podemos atingir o limite de um pulso curto limitado por transformada de Fourier, $\Delta\nu \Delta\tau > 1/2$. Como várias frequências estão percorrendo a cavidade do laser, se elas estivessem sincronizadas em $t = 0$, perderiam esse sincronismo nas voltas seguintes, porque cada componente de frequência possui velocidade de grupo diferente. Por isso é necessário adicionar um componente no caminho do feixe para corrigir essa dispersão. O dispositivo

de correção da dispersão de velocidade de grupo é formado por quatro prismas, mostrado na Figura 48. A inserção dos prismas no ângulo de Brewster evita perdas por reflexão.

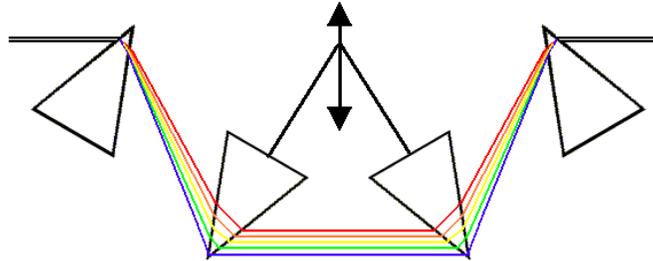


Figura 48 Configuração dos prismas para correção da dispersão

A presença dos prismas faz com que cada frequência percorra um caminho óptico diferente. Neste caso o caminho do feixe azul é maior que do feixe vermelho, isso quer dizer que o feixe azul está sendo atrasado em relação ao feixe vermelho. Essa dispersão é oposta à dispersão normal dos materiais existente na cavidade do laser e pode ser usada para compensá-la.

A Figura 49 mostra um esquema simplificado da cavidade do laser de Ti:safira

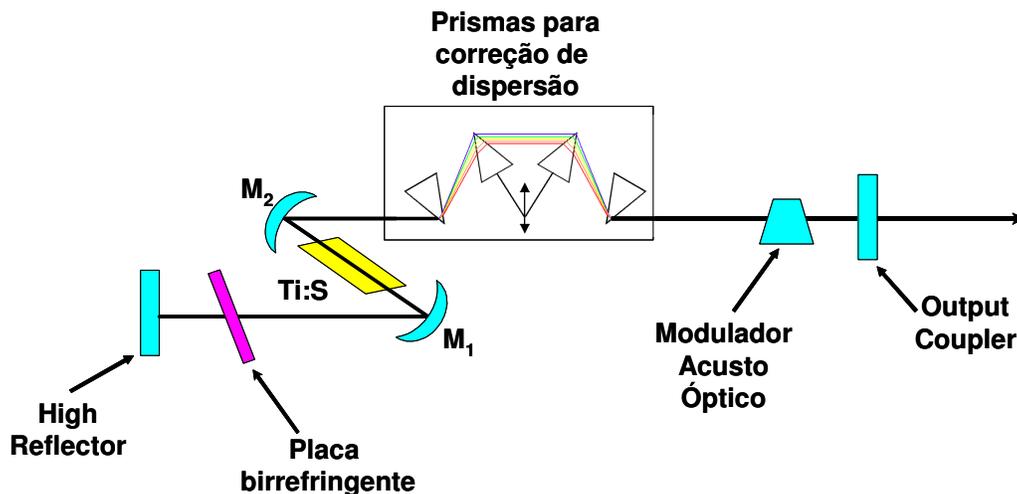


Figura 49 Esquema simplificado da cavidade do lase de Ti:Safira

A sintonia do comprimento de onda no laser pode ser feita tanto através da placa birrefringente, na qual apenas um comprimento de onda sai linearmente polarizado

no ângulo de Brewster e não sofrerá perdas, quanto através de uma fenda, “slit”, entre os prismas que corrigem o feixe. Ao deslocarmos essa slit sobre os feixes de diferentes comprimentos de onda “abertos” podemos selecionar qual comprimento de onda ficará percorrendo a cavidade. Essa seleção é mostrada na Figura 50.

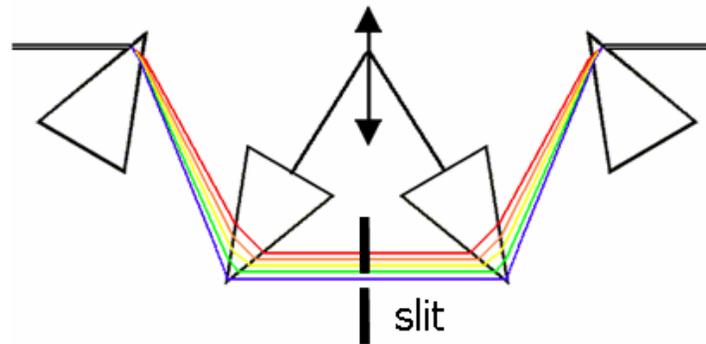


Figura 50 Slit para seleção do comprimento de onda

3.7 Alinhamento do Laser de Ti:Safira para Microscopia “Multifóton” e SHG

Para o alinhamento do laser de Ti:Safira utilizamos o laser de Argônio como referência, como mostra a Figura 51, onde a linha vermelha indica o Ti:Safira e a verde indica o laser de Argônio.

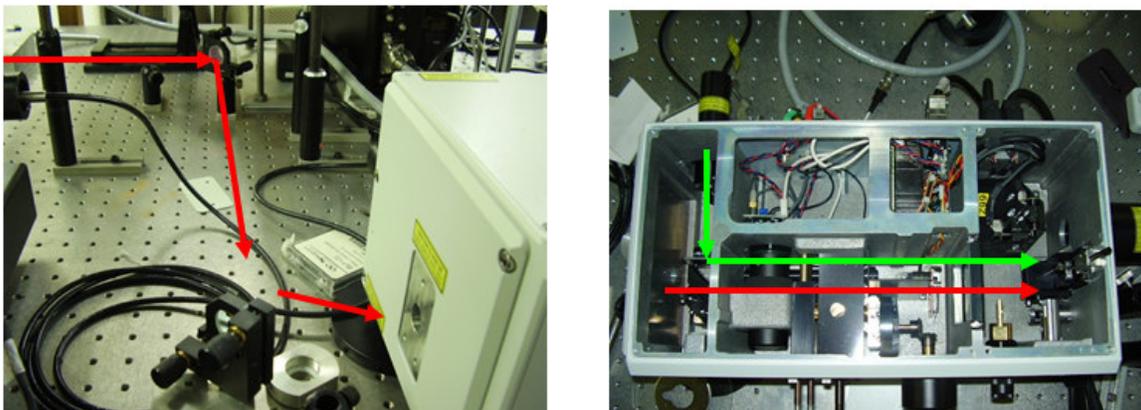


Figura 51 Entrada do laser de Ti:Safira no Scan Head

O primeiro passo é alinhar o laser de Ti:Safira sem o telescópio. Para isso utilizamos os dois espelhos antes da entrada do FV300, mostrados na foto da

esquerda da Figura 51, para fazer o laser de Ti:Safira coincidir com o Argônio. A coincidência é garantida em dois pontos nos caminhos do laser. Com isso garantimos que os dois lasers estão percorrendo o mesmo caminho. Com os dois lasers percorrendo os mesmos caminhos, inserimos o telescópio no caminho do Ti:Safira. O alinhamento do telescópio é feito da mesma maneira que da pinça óptica. Colocamos a primeira lente, recuperamos a posição do feixe. Colocamos a segunda lente, recuperamos a posição do feixe novamente. Com isso, já devemos obter alguma imagem de TPEF no computador. Falta agora fazer o alinhamento fino do telescópio. Fazemos uma imagem de fluorescência utilizando o laser de Argônio e bloqueando o laser de Ti:Safira. Depois bloqueamos o laser de Argônio e liberamos o laser de Ti:Safira, obtendo uma imagem um pouco fora de foco e deslocada na tela da imagem obtida com o Argônio. O deslocamento pode ser corrigido movimentando um pouco os dois espelhos externos. O foco é corrigido modificando a distância entre as lentes do telescópio.

O alinhamento para a TPEF e a microscopia SHG é o mesmo. O único cuidado que temos que tomar aqui é colocar os dois filtros na frente da fotomultiplicadora que coletará o sinal transmitido. O filtro passa banda em 400 nm foi colocado logo acima do condensador, enquanto o filtro passa baixa colorido foi colocado diretamente na entrada da PMT para eliminar sinais de ruído. Nessa configuração foi possível fazer imagens simultâneas de TPEF e SHG.

Com esses procedimentos montamos a ferramenta integrada de microscopias e manipulações fotônicas desta tese.

Capítulo 4

Resultados

Neste capítulo vamos tratar dos resultados obtidos. Os resultados aqui são imagens obtidas com o sistema descrito no capítulo experimental. A partir dessas imagens analisaremos as características de cada técnica e veremos a integração das mesmas num único equipamento.

4.1 Microscopia Confocal “Single-Photon”

Começamos pela Microscopia Confocal “Single Photon” porque ela é a referência para todas as outras técnicas, então um bom funcionamento da mesma é essencial para o bom funcionamento das outras técnicas.

A imagem da Figura 52 mostra a primeira imagem de Microscopia Confocal “Single Photon” conseguida em nosso laboratório. São células endoteliais bovinas com tripla marcação. A cor verde representa um corante que marca a actina, a cor vermelha um corante que marca a tubulina. Podemos ver no centro das células espaço que parecem ter a forma nuclear. É onde está o terceiro corante marcando

o núcleo, mas sua banda de excitação está abaixo do comprimento de onda do Argônio.

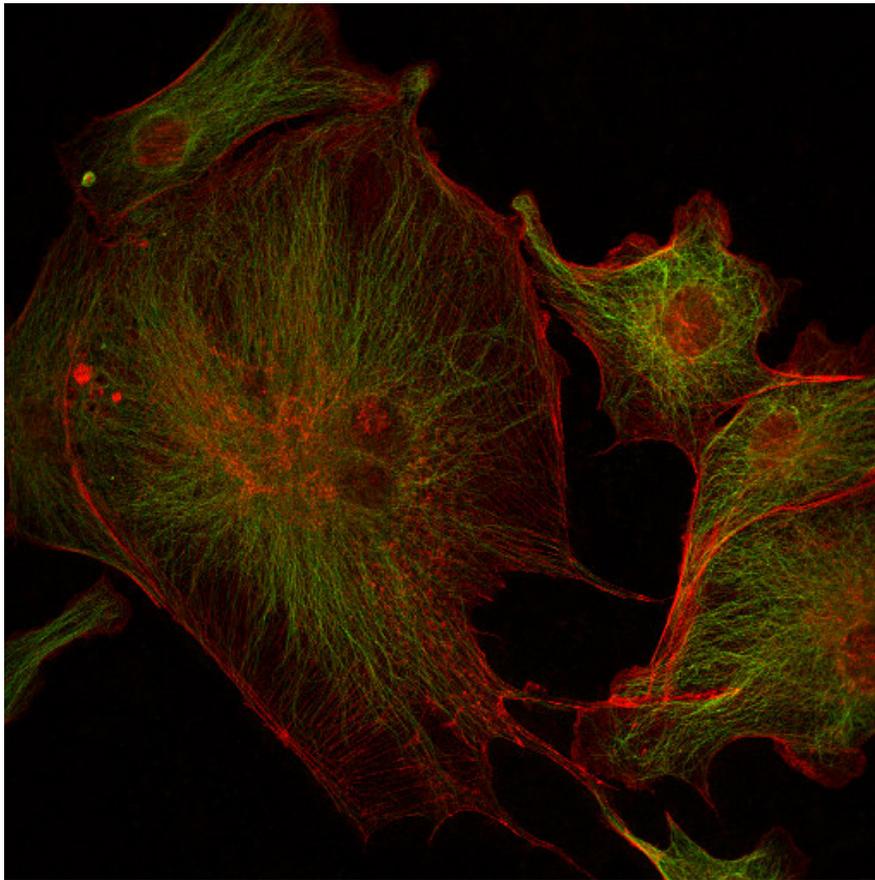
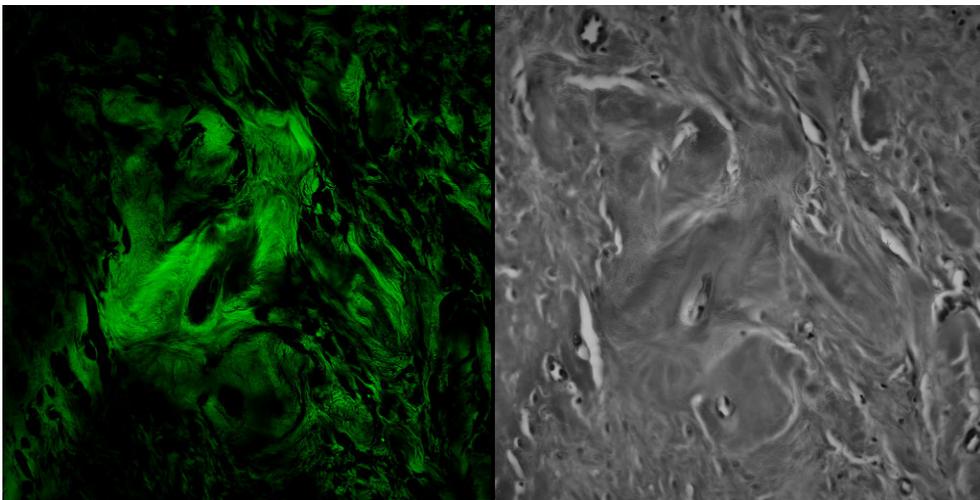
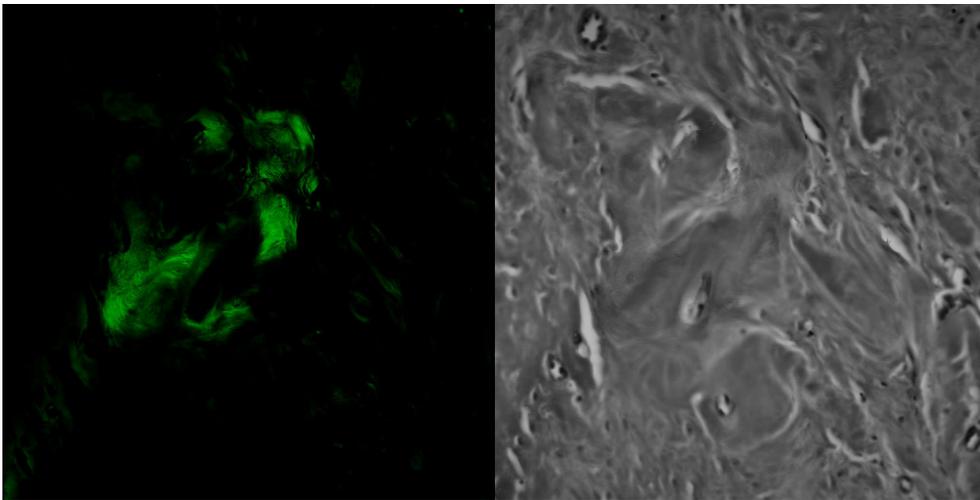
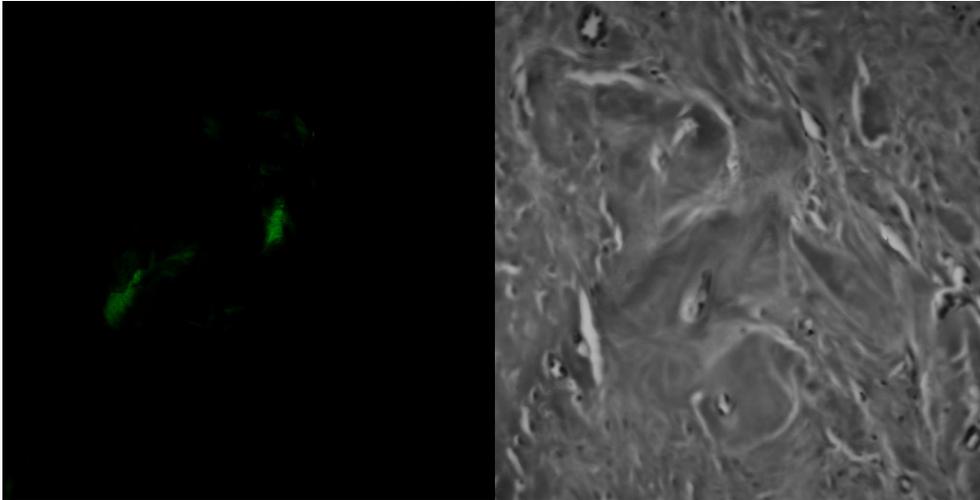


Figura 52 Imagem célula endotelial bovina

A seqüência de imagens da Figura 53 mostra uma das primeiras imagens confocais com seccionamento óptico obtidas no nosso sistema. O tecido é chamado de quelóide que é uma forma de cicatrização patológica na pele.



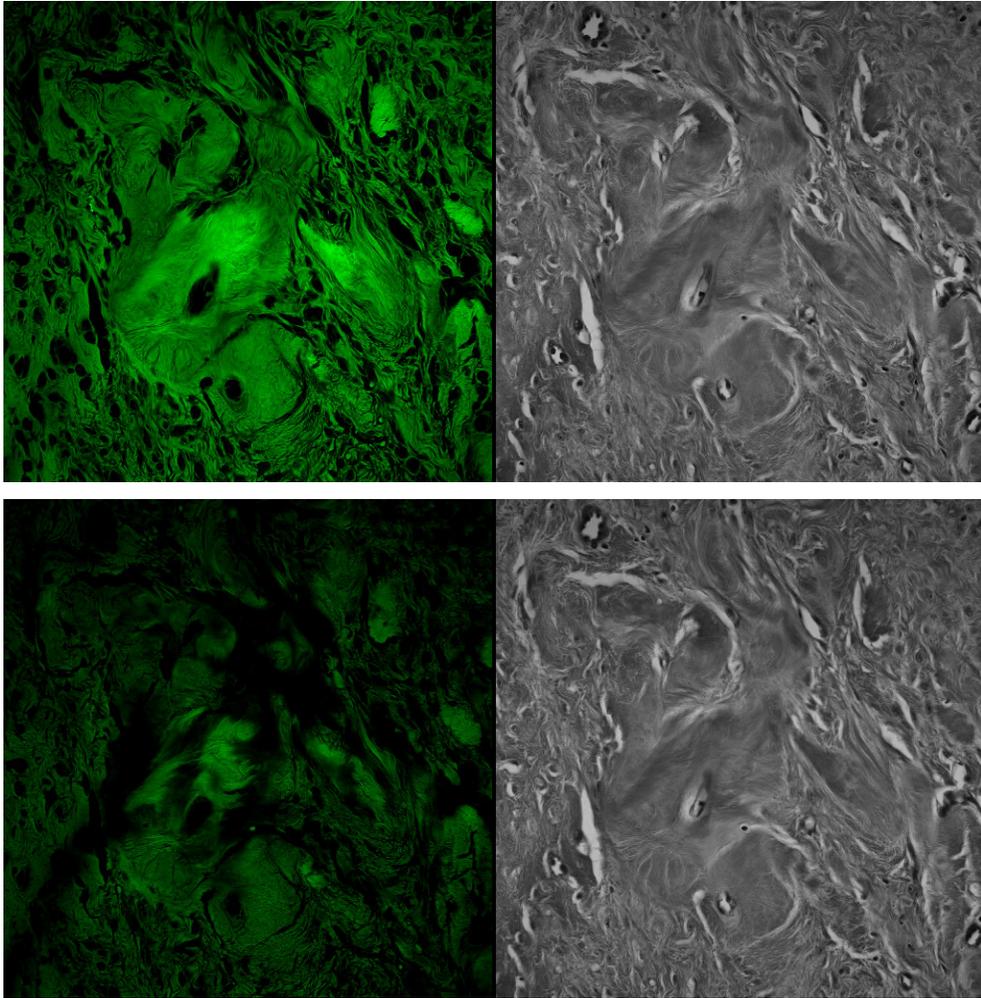


Figura 53 Fatias de imagens confocais de quelóide à esquerda, imagem de transmissão à direita

As imagens da Figura 53 mostram a imagem de fluorescência em verde e a imagem de transmissão do laser em cinza. O tecido foi corado com haematoxilina–eosina. A diferença entre as imagens é apenas a variação do foco do microscópio. O que podemos perceber claramente é que a imagem de fluorescência apresenta planos diferentes entre si, enquanto a imagem de transmissão apenas entra e sai de foco. Isso obviamente acontece porque a imagem de fluorescência tem o seccionamento óptico provido pelo pinhole, enquanto a imagem de transmissão do laser é igual da imagem da microscopia “wide-field”, de baixa resolução axial. Podemos perceber mais um fator interessante, discutido no capítulo 2. Há uma pequena melhora na resolução

lateral também. Ao compararmos as duas imagens de cada “fatia” podemos ver que na imagem confocal conseguimos distinguir melhor as estruturas do tecido.

A Figura 54 mostra mais uma imagem confocal “single photon”. A imagem é de um corte de parafina Aorta marcada com eosina. A imagem cinza mais a esquerda é a imagem de transmissão do laser, a verde central de fluorescência confocal e a imagem mais a direita, em cinza e amarelo, é a sobreposição das duas.

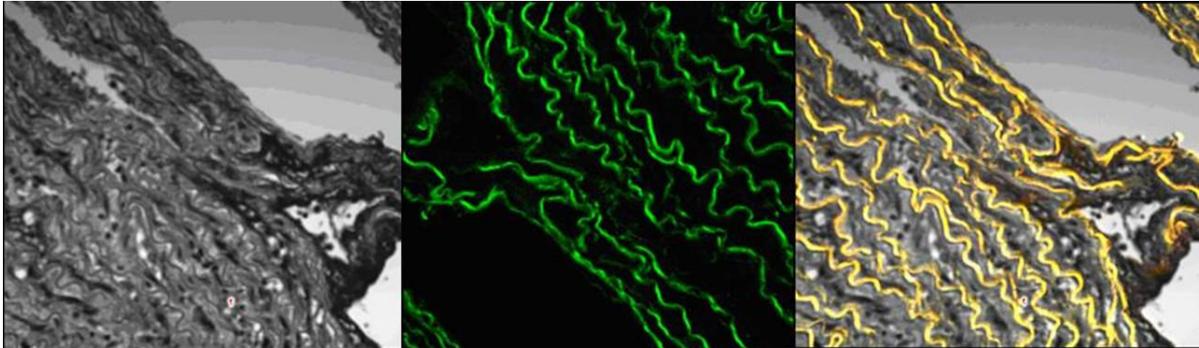
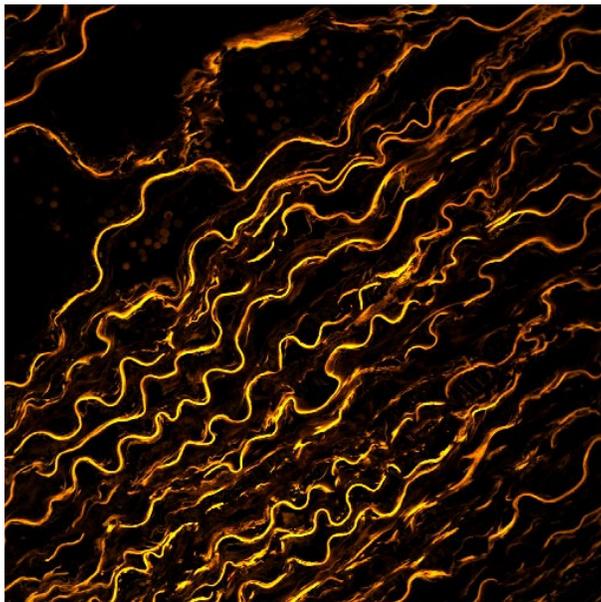
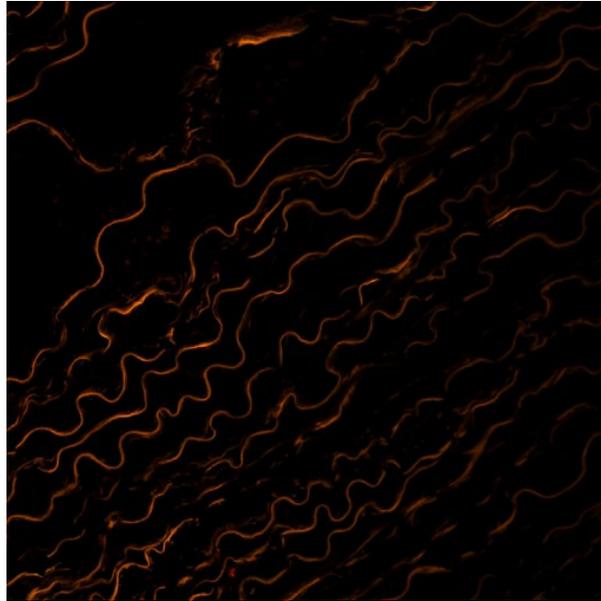
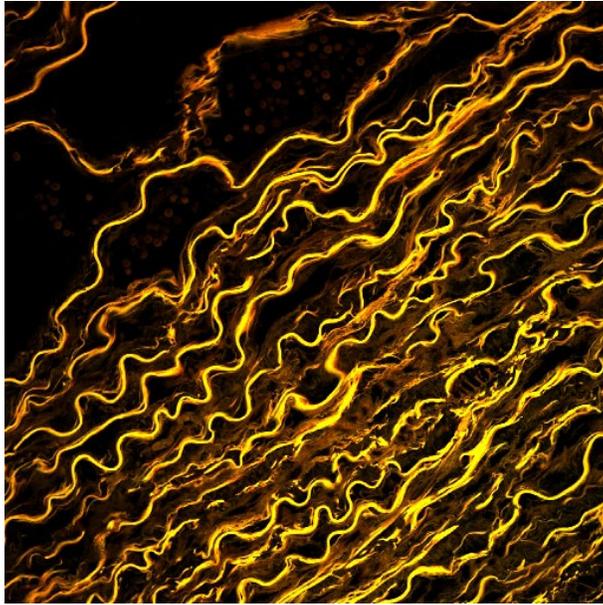


Figura 54 Imagem de transmissão em cinza, fluorescência verde e superposição das duas em amarelo de corte de Aorta

Essa imagem já mostra o quanto a resolução na direção Z pode acrescentar nos estudos da patologia. A imagem de fluorescência mostra apenas as fibras de elastina presentes no tecido. Essas estruturas são de especial interesse, pois a diminuição das fibras elásticas pode provocar doenças graves com êxito letal. Utilizando microscopia confocal podemos demonstrar seletivamente essas fibras e localizar a sua posição com exatidão, como mostra a imagem mais direita da Figura 54.

A seguir temos a seqüência de imagens da fluorescência da Figura 54.





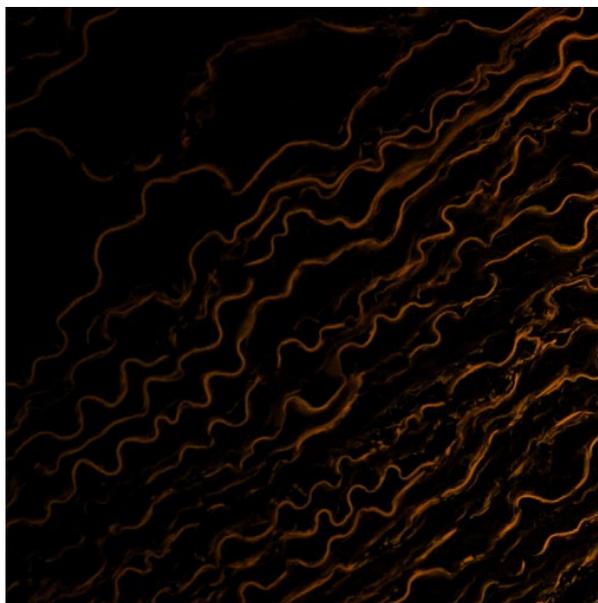


Figura 55 Imagens com variação em Z do corte de Aorta

A imagem da Figura 56 mostra novamente um corte de parafina da aorta, agora somente corado com iodeto de propídio, que se liga ao DNA nos núcleos, representados pela cor laranja na imagem. A cor verde representa a própria autofluorescência do tecido. Essa imagem demonstra, que conforme a escolha dos corantes usados, podemos visualizar diferentes estruturas no tecido. Esse é o mesmo tipo de tecido da imagem da Figura 54, porém por escolher corantes diferentes obtemos um resultado totalmente diferente.

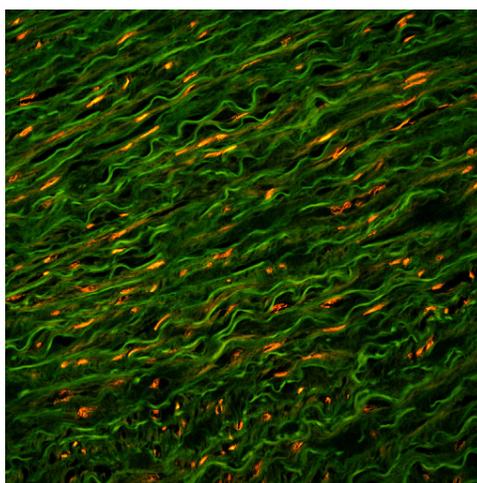
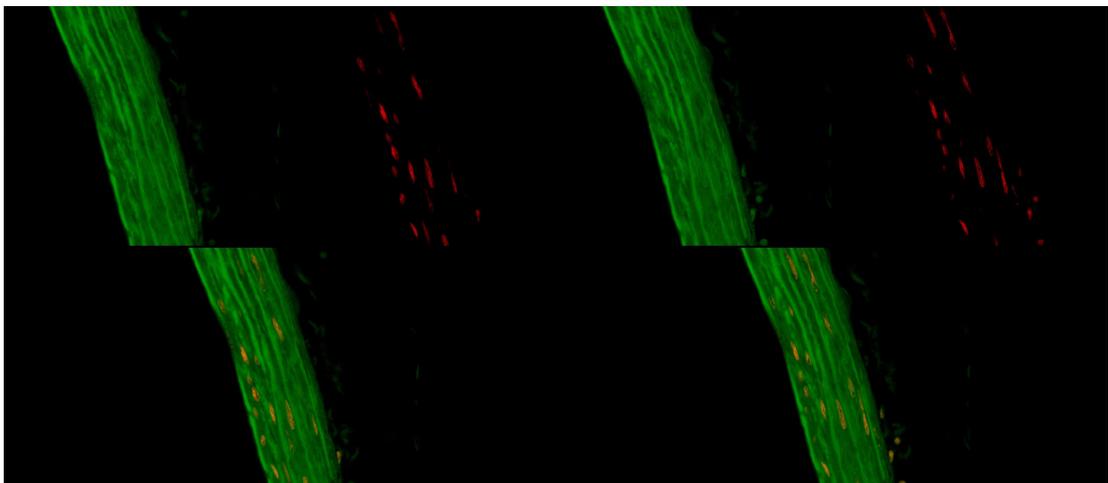
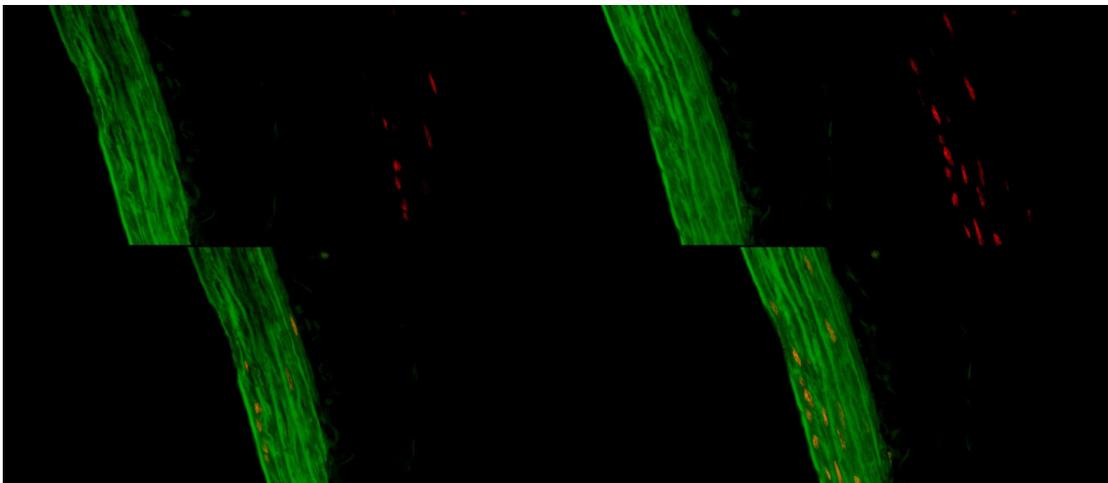
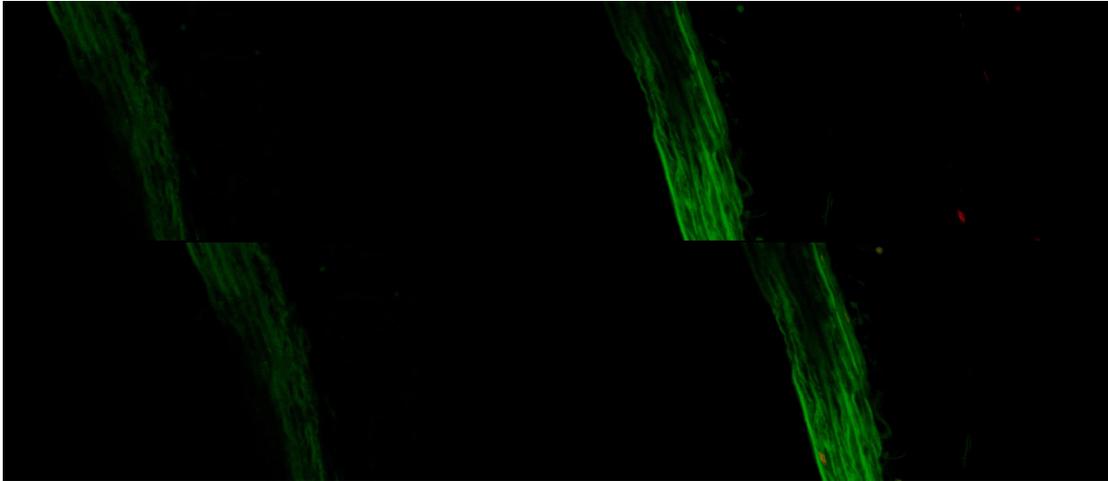


Figura 56 Imagem de fluorescência da fibras de elastina e núcleos no corte da Aorta

A próxima seqüência de imagens da Figura 57, mostra o mesmo tecido da Figura 56, analisados em cortes de diferentes profundidades apenas pela variação do foco do microscópio.



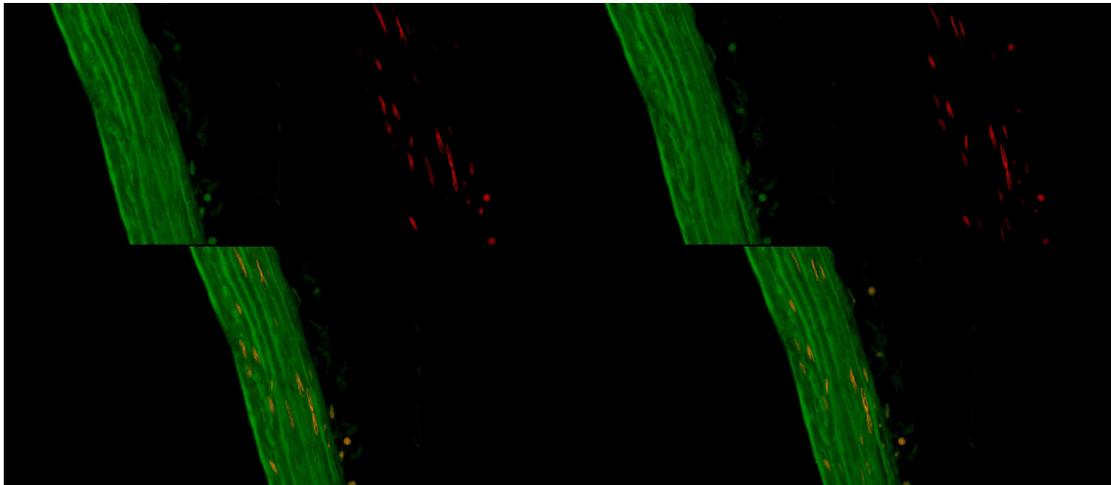
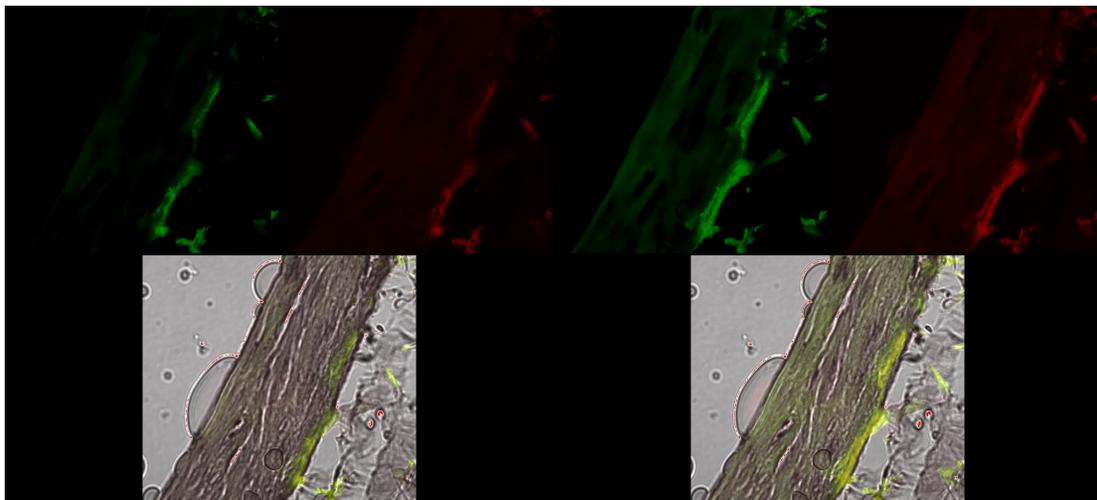


Figura 57 Imagens em várias posições de z do corte de aorta

Cada imagem da Figura 57 está dividida em três partes. A parte superior à esquerda, apenas na cor verde, mostra as fibras do tecido. A parte à direita, em vermelho, mostra os núcleos da célula, e a parte de baixo, em laranja e verde, a superposição das duas imagens. A seguir na Figura 58 temos mais uma seqüência dessas imagens.



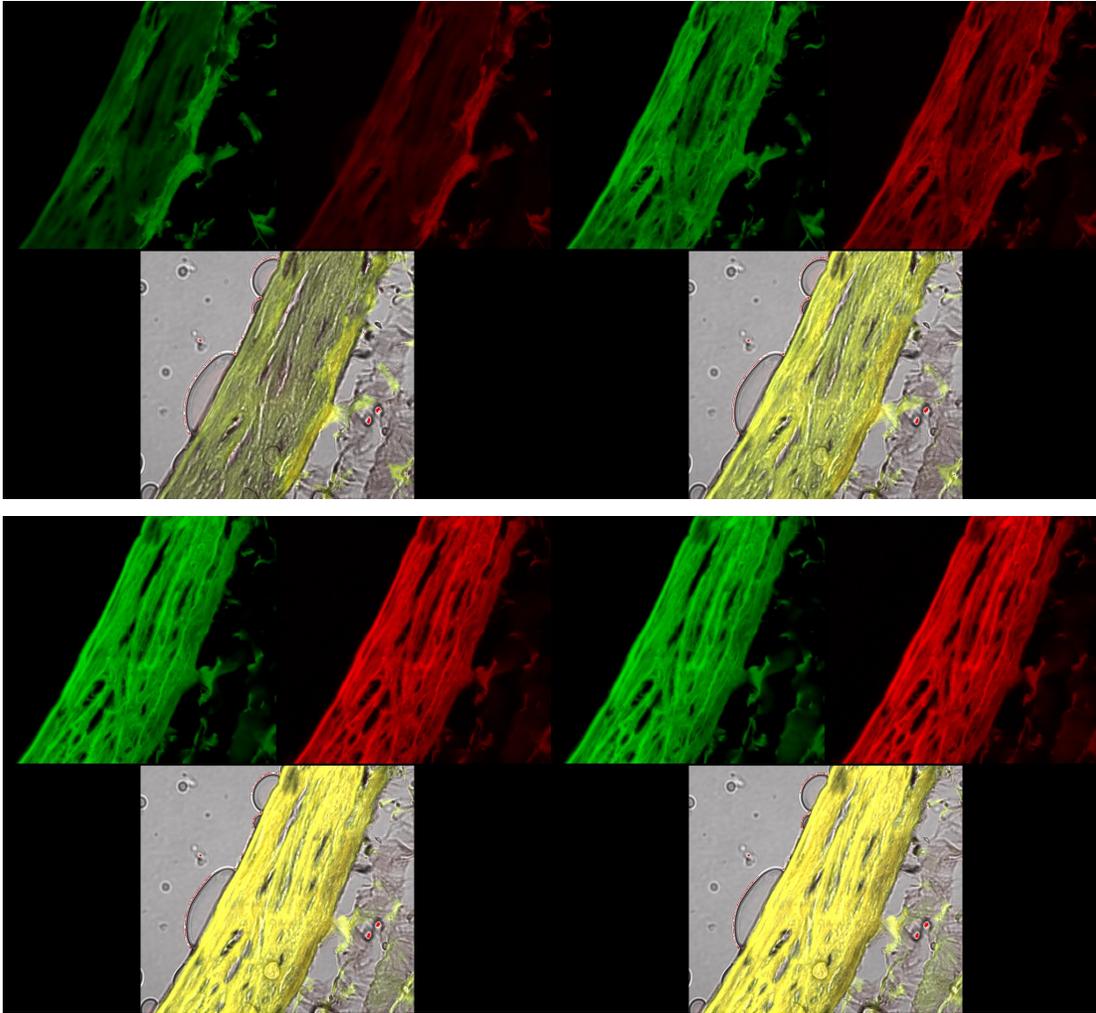


Figura 58 Sequencia de cortes de aorta com dissecção

Essas imagens da Figura 58 mostram uma seqüência de imagens de um corte de aorta com dissecção, o que significa uma rotura da média. As duas imagens acima são de fluorescência e abaixo transmissão superposta com as fluorescências. Percebe-se, ao variar o foco, como as fibras mostram um distúrbio arquitectural, com fibras distribuídas de maneira desalinhada. Essa distribuição é um sintoma de que o tecido não é sadio. Já a seqüência de imagens da Figura 59 mostra um tecido semelhante, mas sadio.

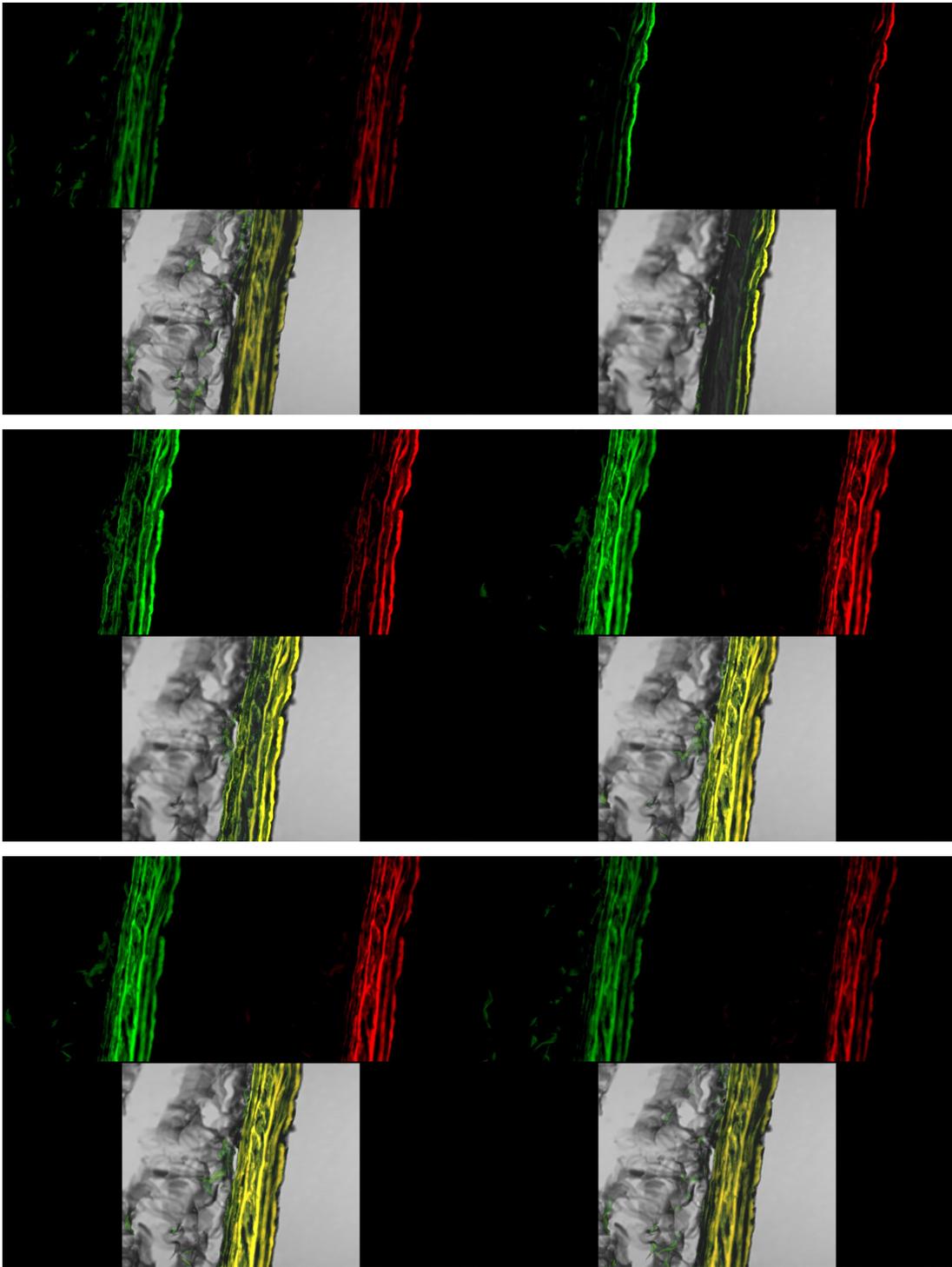


Figura 59 Sequência de fatias de corte de aorta sadia

Podemos ver como as fibras estão organizadas nesse caso, e não difusas como no caso anterior do tecido doente.

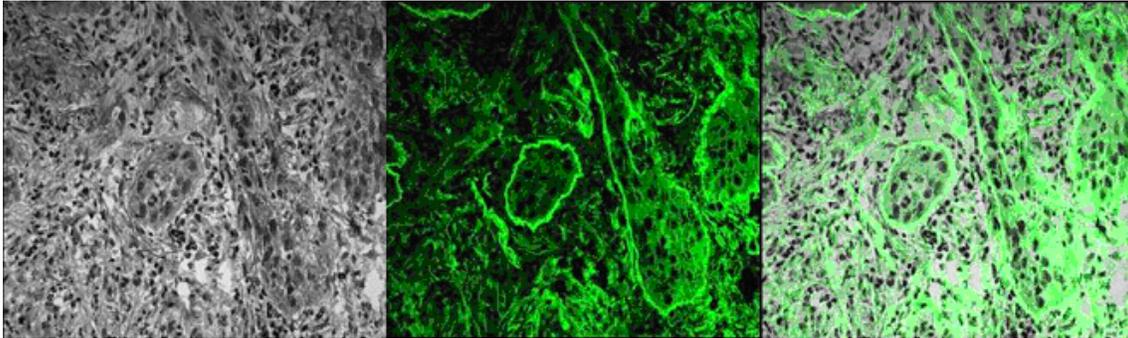


Figura 60 Imagens de Carcinóide Erpidemóide invasivo de pulmão

A Figura 60 mostra mais uma contribuição que a microscopia confocal pode trazer para diagnósticos de patologia. Novamente a imagem da esquerda é a transmissão do laser, a verde a fluorescência do tecido corado com eosina e a verde e cinza a sobreposição das duas. O tecido é um carcinoma epidermóide de pulmão congelado no criostato e corado com hematoxilina–eosina. A imagem de fluorescência demonstra uma faixa de intensa fluorescência circundando os complexos das células neoplásicas. Assim na imagem de fluorescência as células malignas podem ser mais facilmente reconhecidas em comparação a imagem de transmissão.

A seguir temos uma outra contribuição da Microscopia Confocal para a Anatomia Patológica, demonstrada na Figura 61.

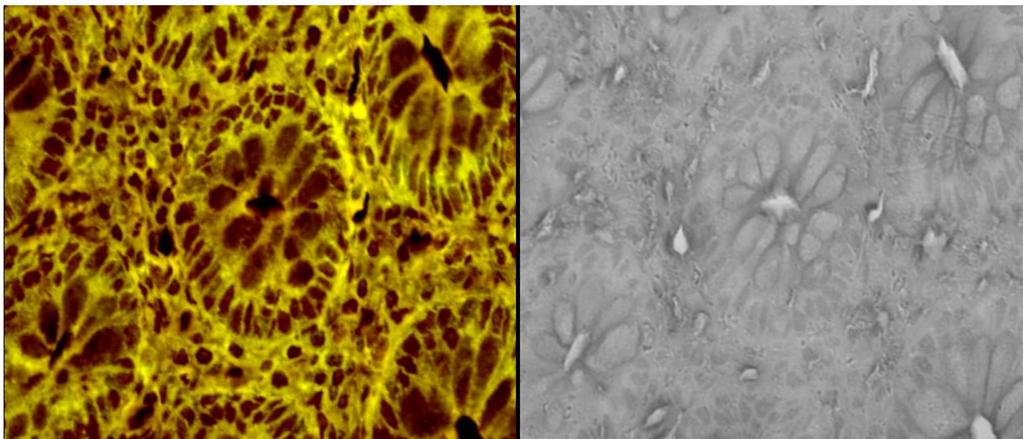


Figura 61 Mucosa de cólon de reto. Esquerda: imagem de fluorescência confocal;
Direita: imagem de transmissão

Um defeito na máquina responsável pelo processamento do tecido fixado causou uma desidratação incompleta do tecido, o que impede uma coloração satisfatória do tecido na lâmina histológica, tornando o diagnóstico muito difícil, ou até impossível. A figura 61 ilustra este problema num corte de mucosa de colon, cujo diagnóstico ficou prejudicado pela falta de contraste na imagem. Contudo a imagem de fluorescência da microscopia confocal “recupera” o contraste, permitindo uma identificação das células e assim permitindo um diagnóstico do tecido.

4.2 Microscopia Confocal Multifóton

Serão mostrados agora os resultados obtidos com a Microscopia Confocal Multifóton. O ponto principal aqui não é substituir a Microscopia Confocal “Single-Photon” mas utilizar as duas técnicas em conjunto para atingir diferentes objetivos. A primeira imagem de Microscopia Confocal Multifóton que obtivemos também foi das células da Figura 52, mostrada agora na figura Figura 62.

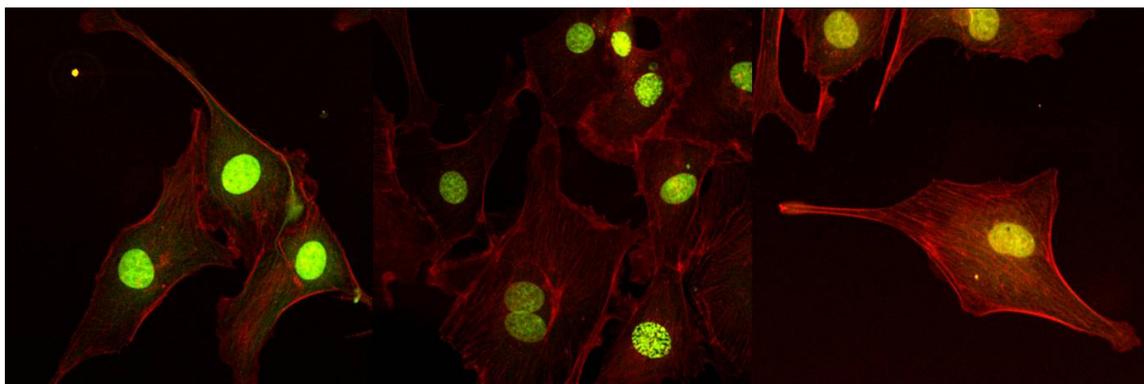
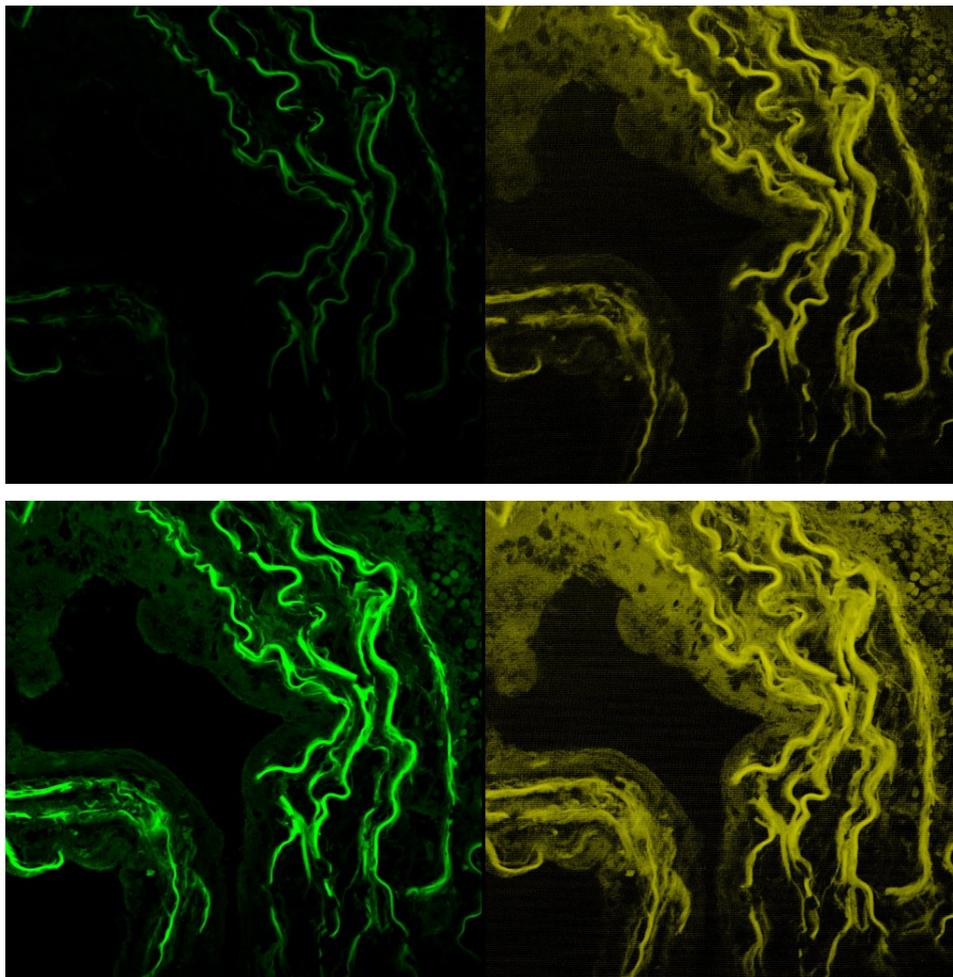


Figura 62 Imagem célula endotelial bovina

A Microscopia Confocal “Single-Photon” não permitiu excitar todos os corantes com um único laser. A diferença aqui é que, com absorção de dois fótons, conseguimos excitar o corante, DAPI, que está marcando o núcleo. A banda de excitação do DAPI está centrada por volta de 350 nm, de modo que usando o laser de Ti:safira operando em 740 nm, conseguimos excitá-lo facilmente. O

núcleo está representado em verde na figura. A cor vermelha representa o corante que marca a tubulina. A imagem central da Figura 62 mostra detalhes nucleares, onde podemos perceber que o núcleo não é uma massa inteiriça, mas composto por estruturas com espaços entre si. Essa imagem foi obtida ajustando a potência do laser de excitação para evitar a saturação da fotomultiplicadora.

A seqüência de imagens da Figura 63 mostra a imagem de um corte de Aorta marcado com eosina adquiridas em várias posições focais.



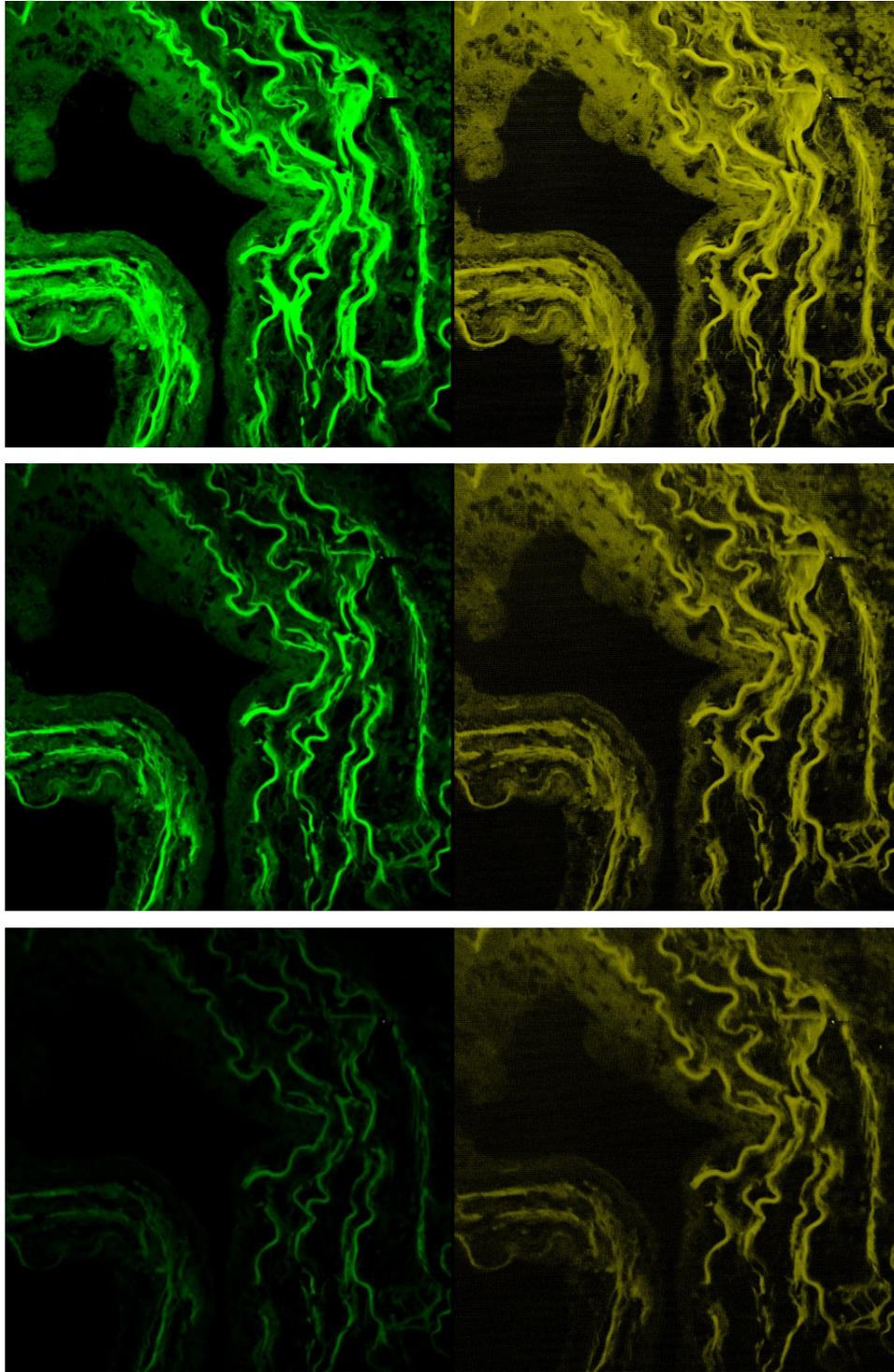


Figura 63 Fluorescência refletida em verde e transmitida em amarelo

Como no caso da Microscopia Confocal “Single-Photon”, aqui também, ao se variar o foco, mudamos o plano que estamos adquirindo a imagem. Porém

podemos perceber o fato que a Microscopia Confocal Multifoton não precisou do “pinhole” para fazer o seccionamento óptico. A imagem em verde da Figura 63 é a fluorescência refletida e a imagem em amarelo, a fluorescência transmitida, adquiridas simultaneamente. Conforme o foco muda as duas imagens mudam, ao contrário do que acontecia na imagem da Figura 53. Isso significa que ambos os sinais tem um seccionamento óptico. É possível, também, visualizar outra característica: a imagem transmitida possui uma resolução entre fatias um pouco pior do que a imagem refletida. Isso se deve ao fato de que a imagem refletida passa através do pinhole, ou seja, mesmo o “pinhole” sendo desnecessário ele fornece uma resolução axial um pouco melhor na Microscopia Confocal Multifoton.

Para finalizar os resultados de Microscopia Confocal Multifóton mostraremos mais uma imagem das células endoteliais bovina. Mas agora, com a superposição de todas as fluorescências dos três corantes excitados simultaneamente, como mostra a imagem da Figura 64

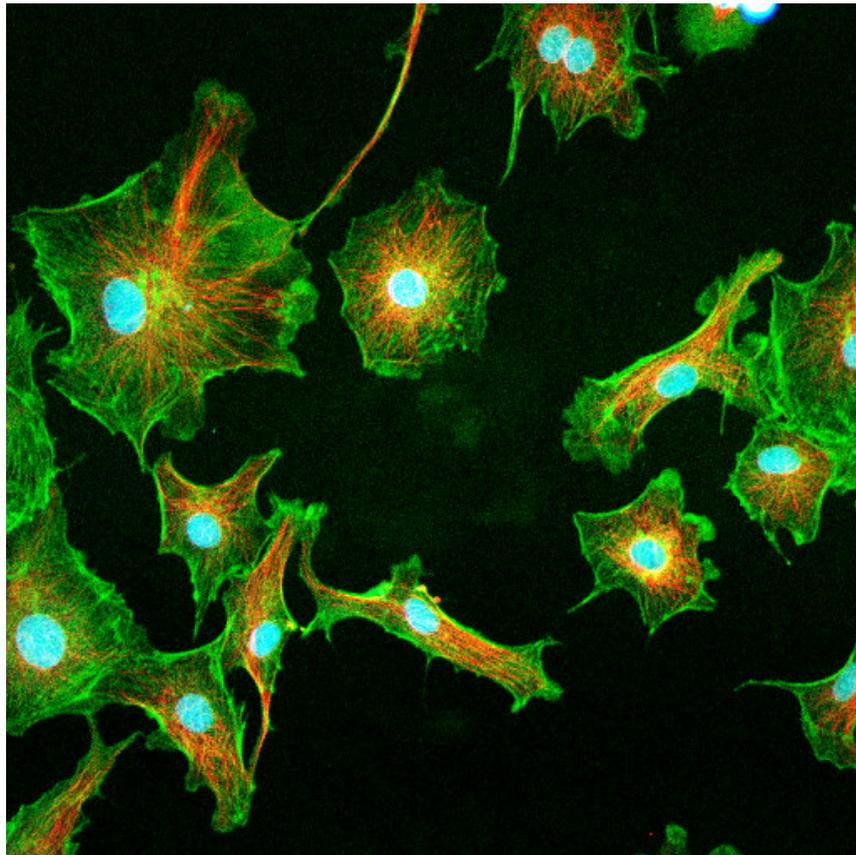


Figura 64 Célula endotelial bovina com tripla marcação

A cor verde representa o corante que marca tubulina, a cor vermelha o corante que marca a actina e a cor azul o corante que marca o núcleo. Essa imagem foi obtida utilizando os dois lasers para excitação, tanto o Argônio quanto o Ti:Safira. Essa imagem resume parte do que foi proposto no começo da tese: utilizar as técnicas integradas para chegar ao resultado desejado. Os lasers cw e pulsado, separadamente, não conseguem excitar todos os corantes, porém utilizando os dois lasers e as duas técnicas podemos excitar todos o corantes e obter a melhor imagem das células. A imagem da Figura 64 é montada adquirindo separadamente a imagem de cada corante como mostramos a seguir.

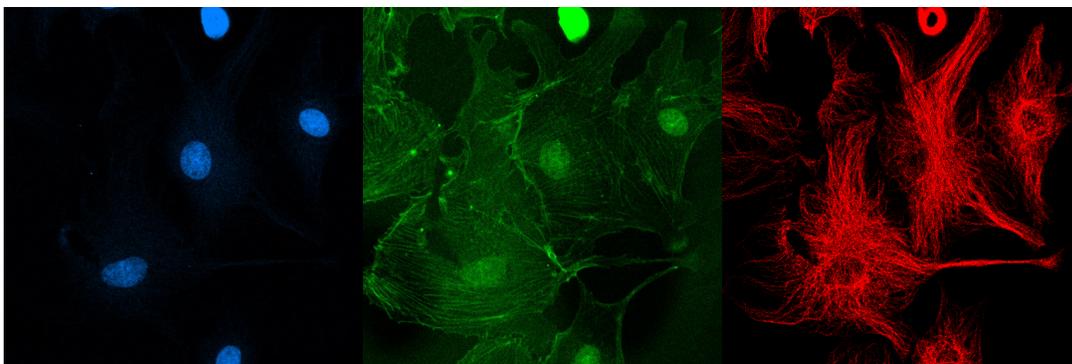


Figura 65 Imagens separadas de cada corante

A imagem da esquerda, em azul, e a imagem do centro, em verde, são excitadas pelo laser de Ti:Safira. São os corantes que marcam o núcleo e a membrana celular. Já a imagem em vermelho, da direita, é excitada pelo laser de Argônio, advém do corante que marca o citoesqueleto. Depois de obter as três imagens separadas juntamos as três para compor a imagem final com marcação tripla, como mostra a **Figura 66**.

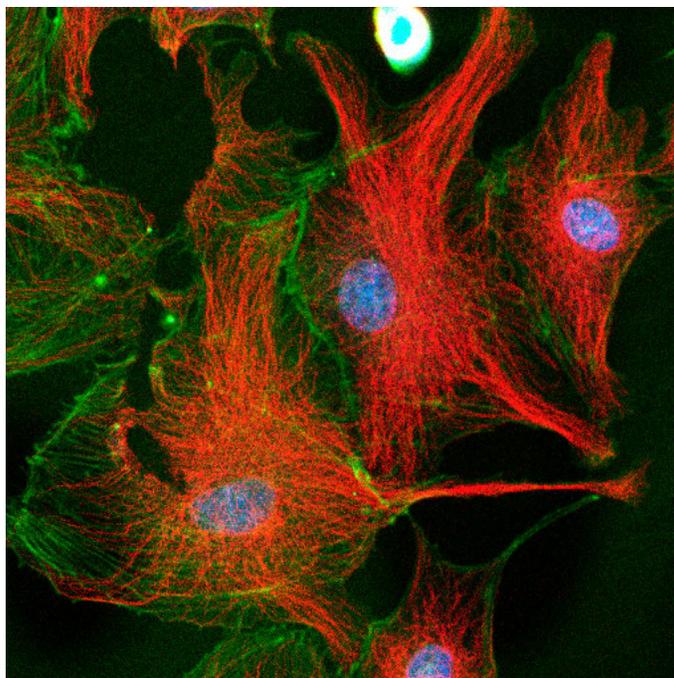


Figura 66 Adição das imagens separadas

4.3 Resultados da Microscopia SHG

A Figura 66 mostra a imagem de SHG e TPEF de um tendão de rato.

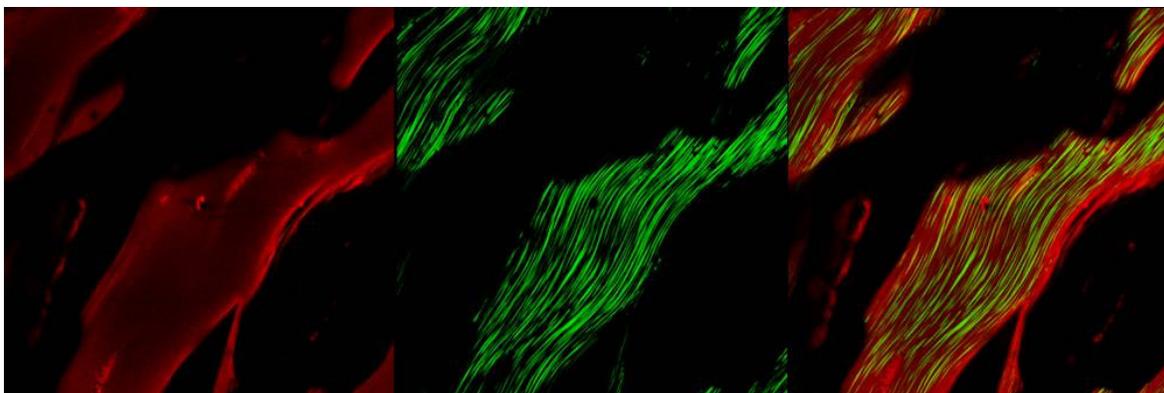
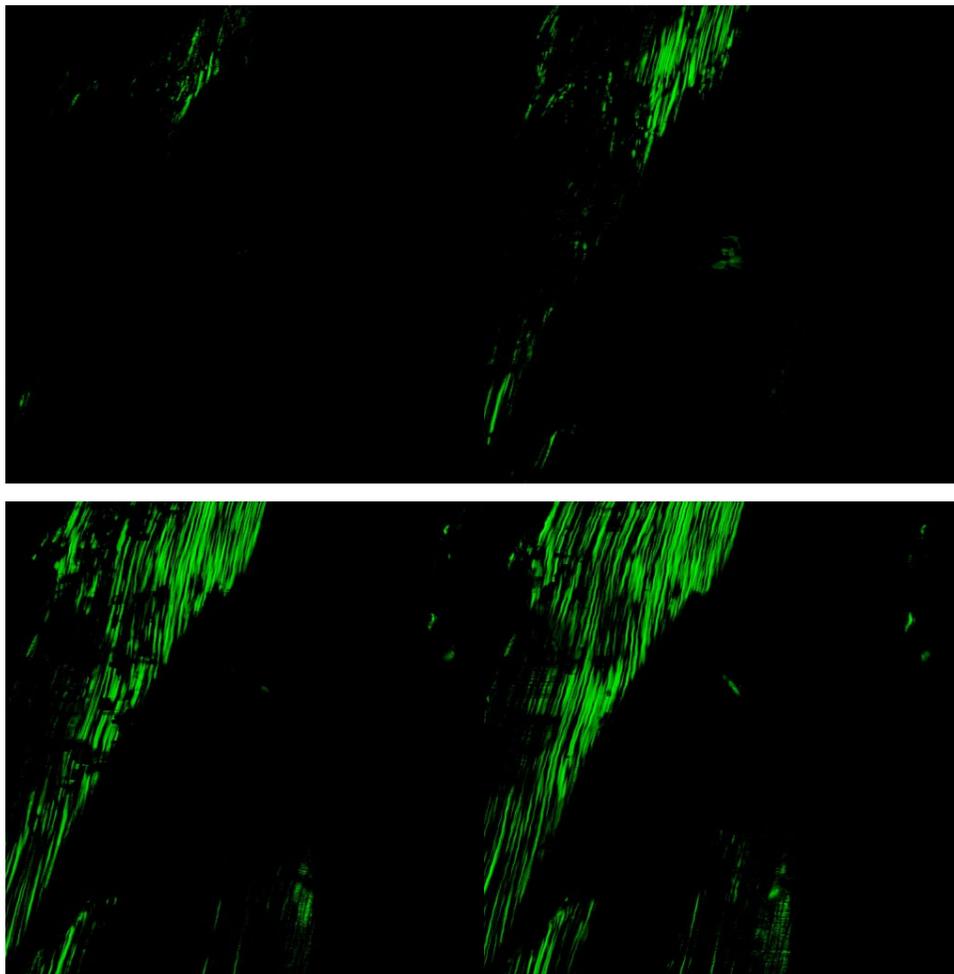


Figura 67 Imagem de fluorescência multifóton em vermelho, shg em verde e superposição em verde e vermelho de tendão de rato

A imagem em vermelho, à esquerda, mostra a fluorescência multifóton refletida, enquanto a imagem em verde, no centro, mostra o SHG, e, finalmente, a imagem

à direita, a sobreposição das duas. Podemos ver claramente pela imagem de SHG que o tecido é formado por fibras, ao contrário que levaria a crer a imagem de fluorescência. Uma imagem complementa a outra nesse caso. Mostrando aqui mais uma vez a importância de ter todas essas técnicas juntas em um mesmo equipamento.

A seqüência de imagens da Figura 68 mostra que essa técnica também tem as mesmas propriedades de seccionamento óptico que a microscopia confocal multifóton, uma vez que utiliza dois fótons para sua excitação.



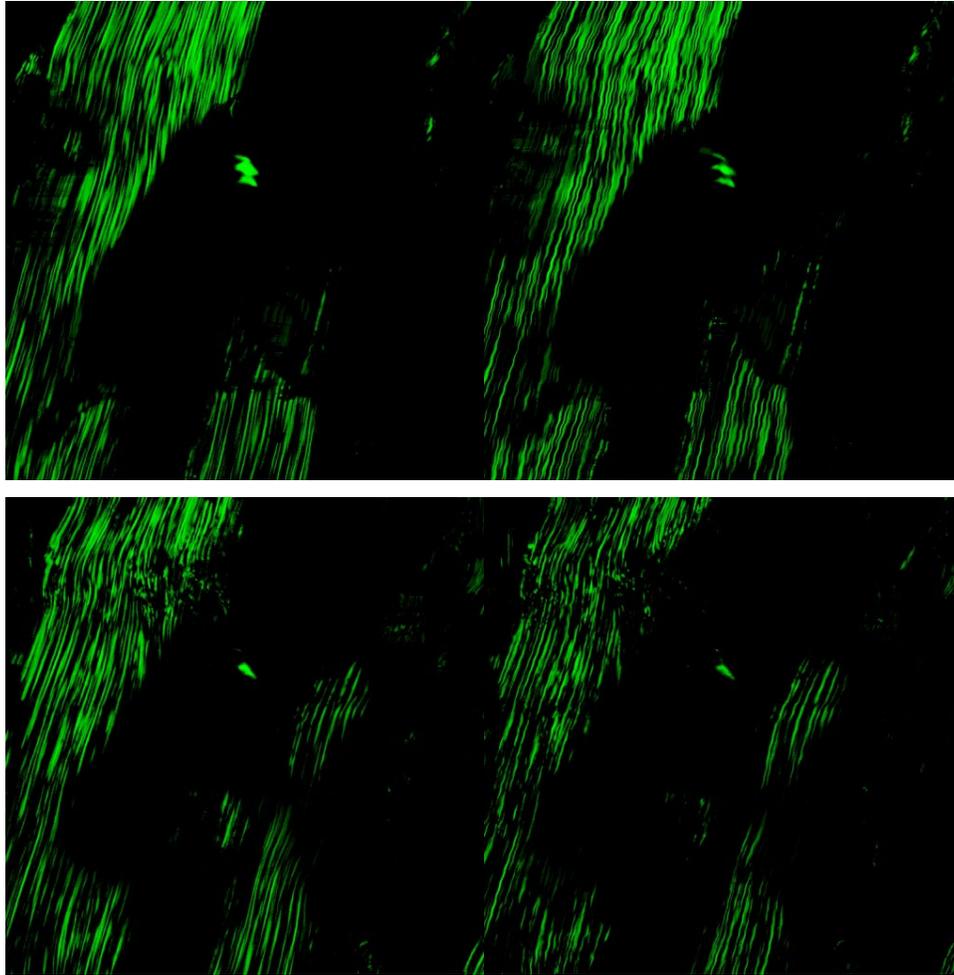


Figura 68 Imagens variando o foco de SHG de tendão de rato

Ao se variar o foco mudamos o plano da amostra em que adquirimos a imagem. Vale mais uma vez lembrar que adquirimos essas imagens na direção transmitida, surgindo o seccionamento óptico sem a necessidade de um “pinhole” antes do detector.

A seguir mostraremos mais uma aplicação da Microscopia SHG. A Figura 69 mostra a imagem de um corte de tecido fibroso ao redor da aorta marcado com eosina.

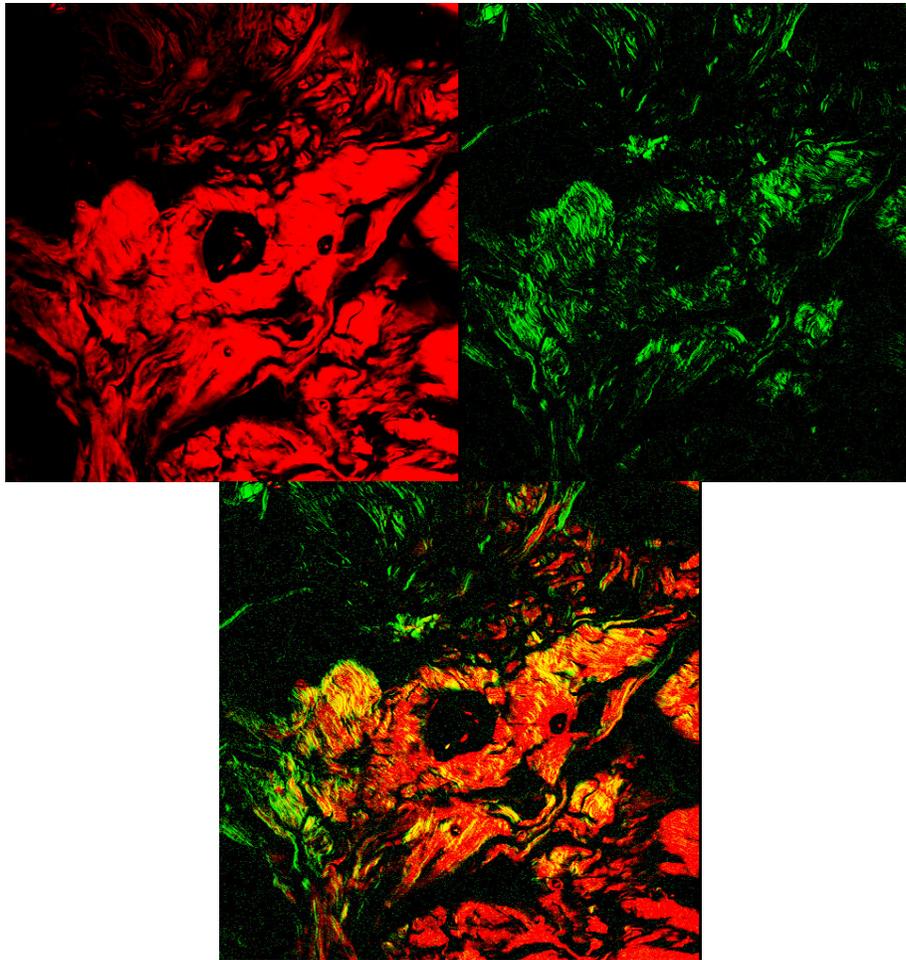
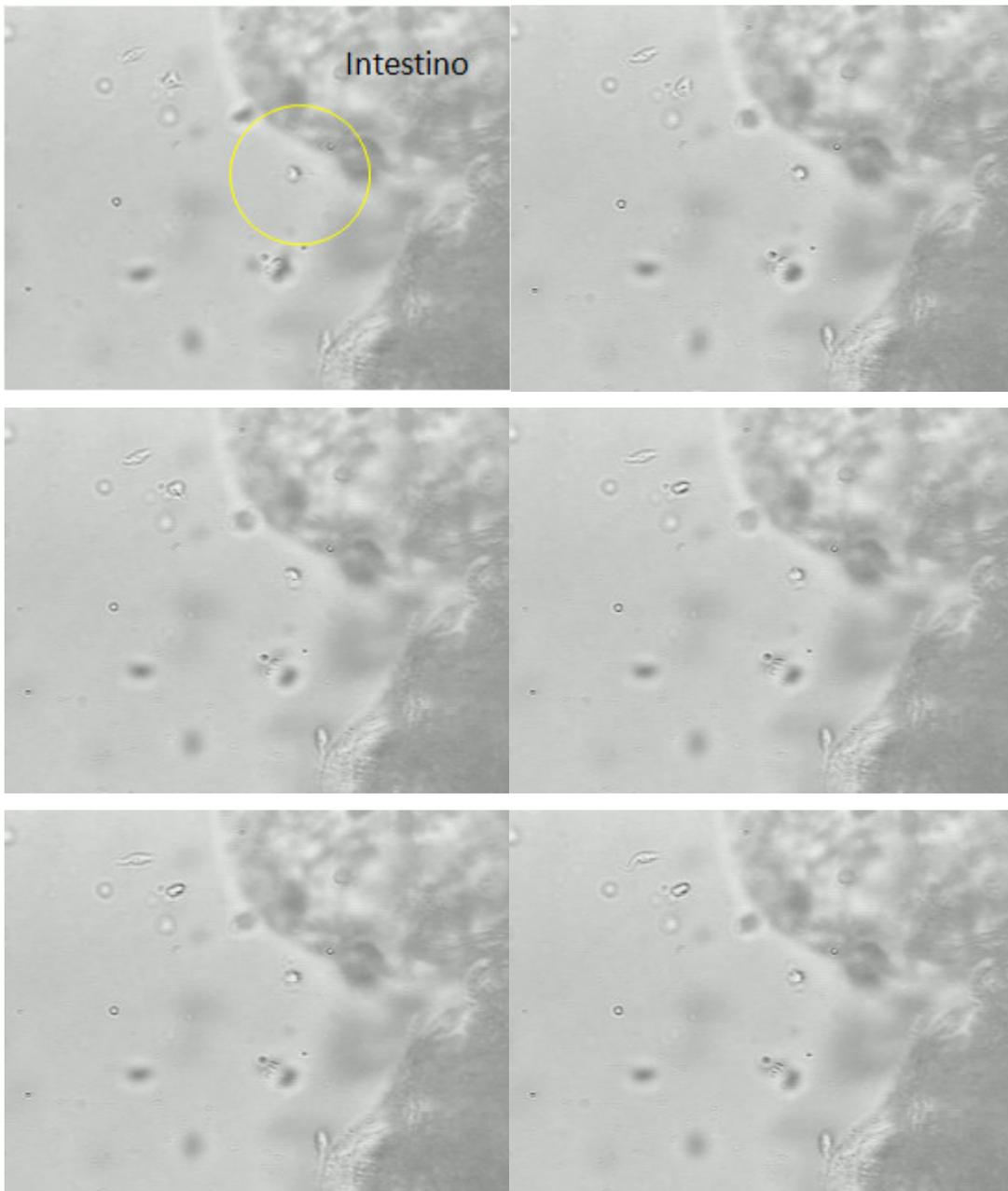


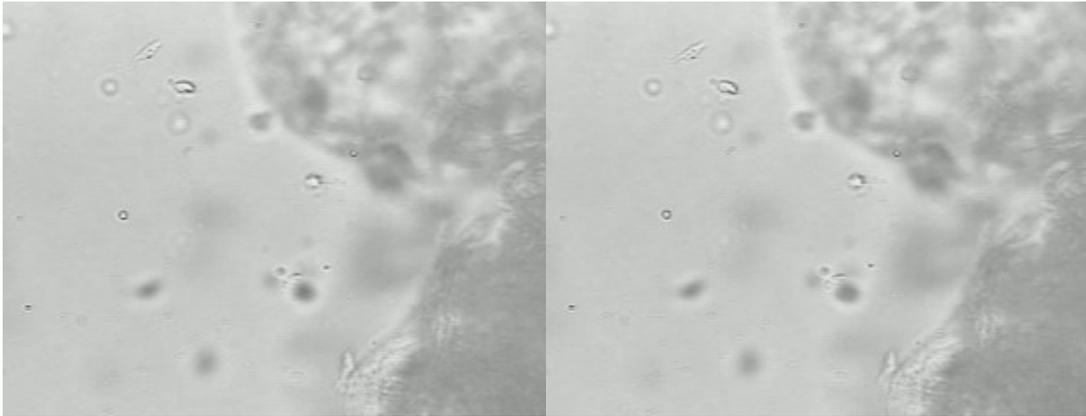
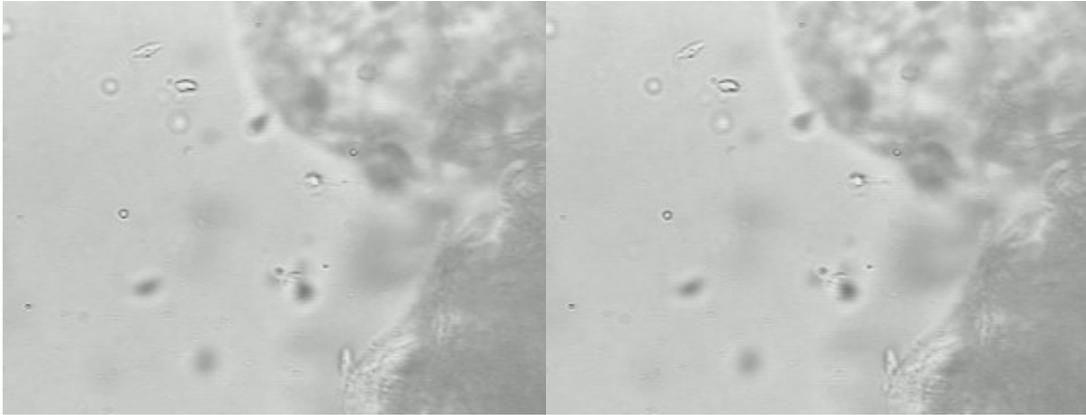
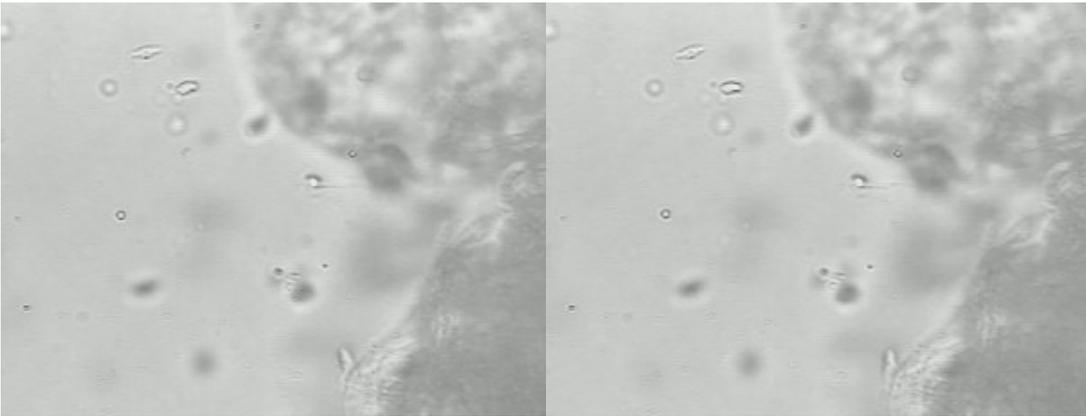
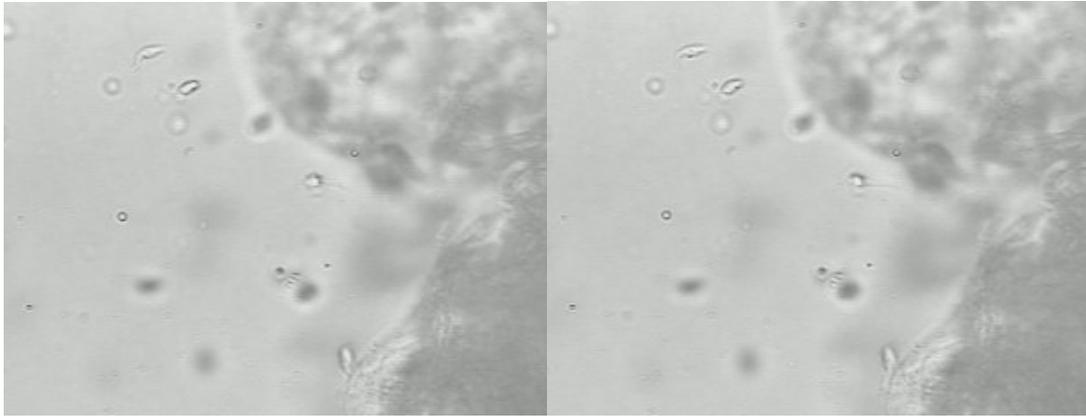
Figura 69 Corte de tecido fibroso. Vermelho: fluorescência multifóton; verde: SHG; verde e vermelho: sobreposição das duas

Ao analisar as imagens da figura Figura 69 podemos ver como se dá a distribuição de colágeno no tecido. Essa informação é importante porque algumas doenças estão relacionadas com a forma como o colágeno cresce no tecido. Se o colágeno não forma fibras ele tem sinal de SHG fraco, pois sua moléculas não estarão alinhadas para intensificar o sinal. Podemos utilizar a microscopia SHG, portanto, para seguir o crescimento do colágeno e analisar como o tecido está se desenvolvendo.

4.4 Resultados com a Pinça Óptica

Uma das maneiras mais rápidas de se medir um bom funcionamento da pinça, isto é, se a pinça está capturando em três dimensões, é capturar microorganismos com grande poder de movimentação, como parasitas ou espermatozóides. Para testar nossa pinça começamos prendendo um parasita chamado Trypanosoma Cruzi, como mostra a Figura 70.





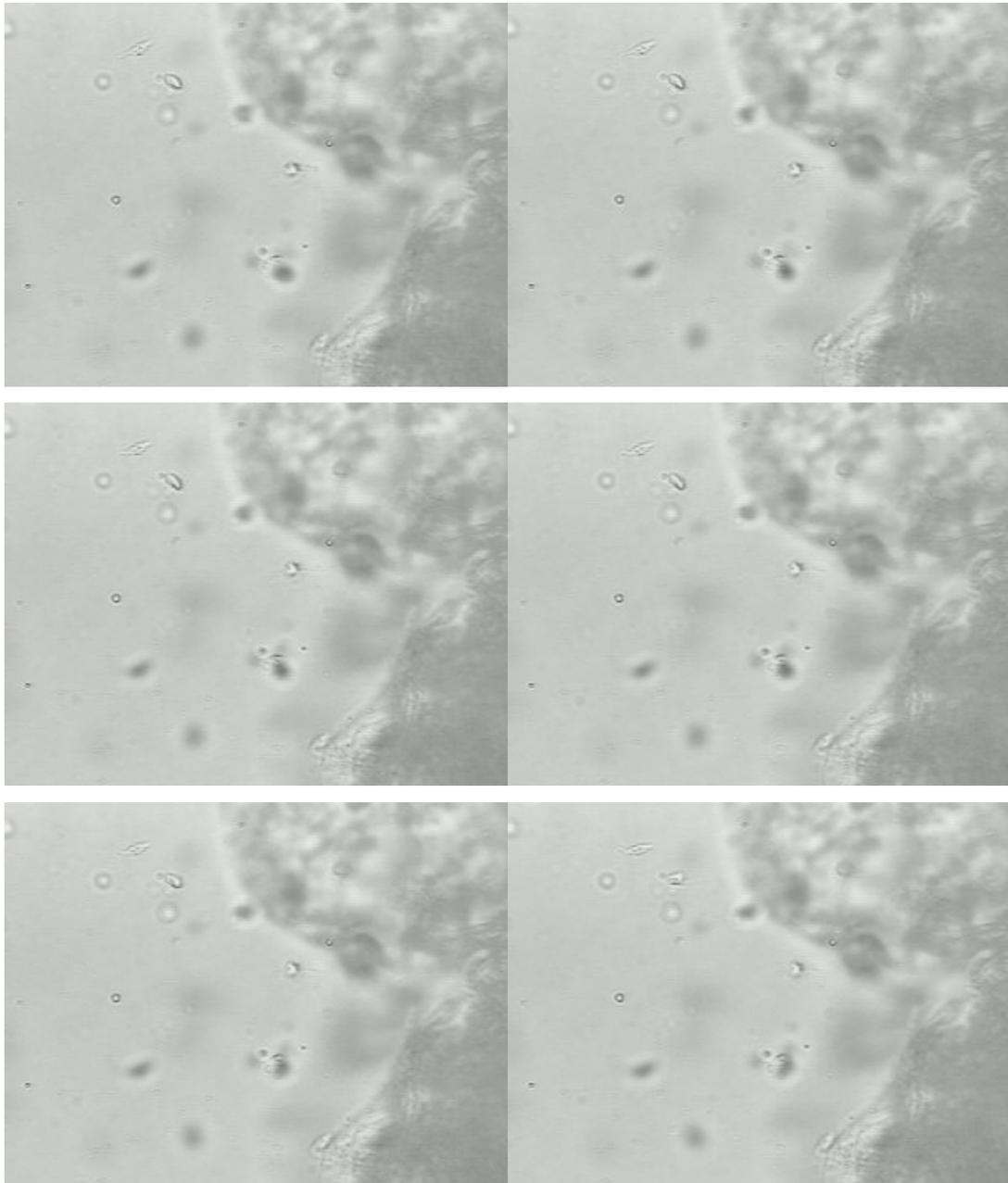


Figura 70 Trypanossoma Cruzi capturado pela pinça lançando seu flagelo

A seqüência de imagens da figura Figura 70 mostra o parasita Trypanosoma Cruzi capturado pela pinça óptica tentando estender seu flagelo até o intestino do animal hospedeiro. Quando aproximamos o parasita do intestino do barbeiro com a pinça, o Trypanosoma tenta se locomover para se fixar nele. Nesse movimento ele age de maneira bem agressiva atirando seu flagelo na direção do intestino. A seqüência de imagens na horizontal mostra esse comportamento. O parasita

preso está dentro do círculo em amarelo. Como esse movimento é agressivo, essa captura é um bom teste para a pinça óptica. O parasita tenta escapar em todas as direções e, se, a pinça não estiver alinhada fatalmente ele acabará escapando em alguma das tentativas.

Medir a força que o Trypanosoma Cruzi é capaz de aplicar é de grande interesse na biologia para o entendimento do processo de infecção. Nosso grupo já desenvolveu um método para a medida de força de microorganismos com pinça óptica^{Erro! Indicador não definido.}. A seqüência de imagens da Figura 71 mostra o parasita preso em uma microesfera capturada pela pinça óptica.

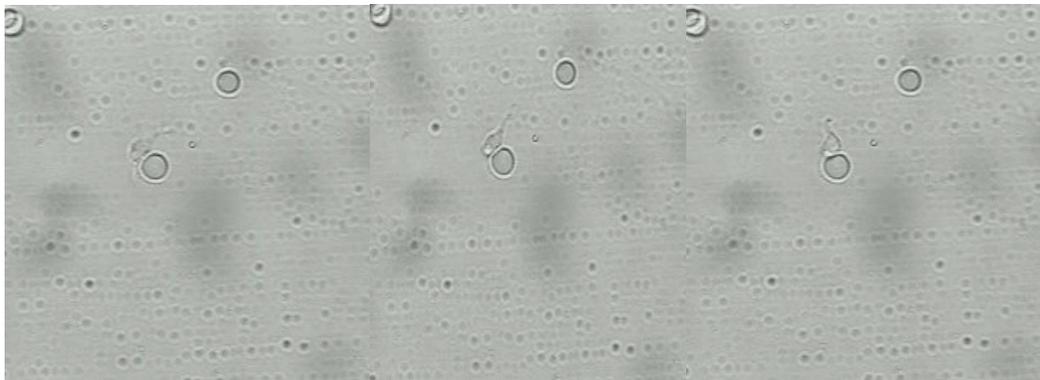


Figura 71 Medida de força do parasita

Ao analisar as imagens podemos ver que o parasita desloca a esfera, que está presa pela pinça, ao tentar se locomover. Como ele não consegue fazer a esfera se soltar da pinça, sabemos que a pinça está bem alinhada capturando nas três dimensões. Além de servir como teste essa medida também serve para medir a força que esse parasita é capaz de exercer. Sabendo o quanto a esfera deslocou e a força que a pinça óptica exerce na esfera podemos calcular a força que o parasita exerceu na esfera. Nossas medidas mostraram forças da ordem de dezenas de piconewtons, condizentes com as forças medidas anteriormente na tese de Adriana Fontes.

4.5 Resultados da Pinça Óptica + Microscopias Confocais

A imagem da Figura 72 mostra hemácias capturadas pela pinça óptica ao mesmo tempo em que obtemos sua imagem confocal “single-photon”.

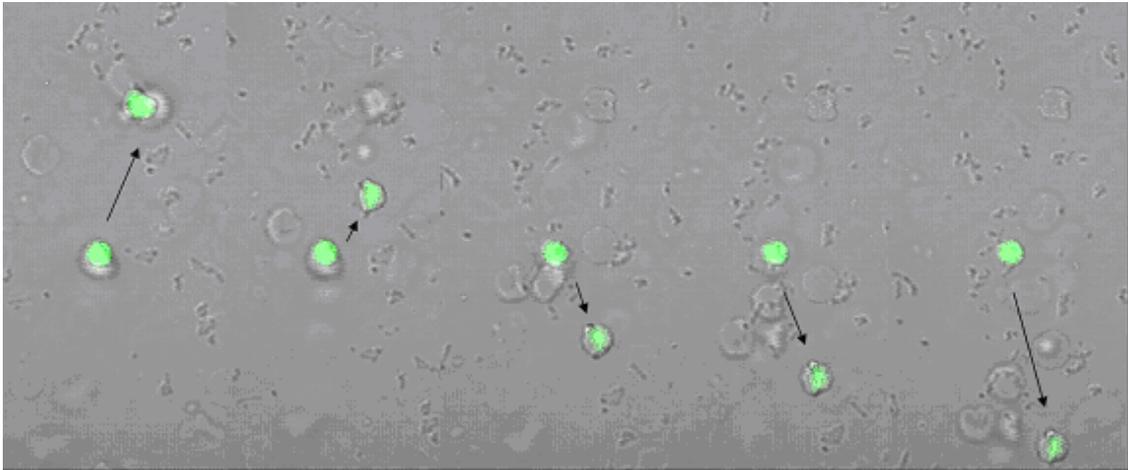


Figura 72 Imagem de fluorescência de hemácias capturadas na pinça óptica

Uma hemácia está fixa no centro da imagem enquanto movemos a outra com a pinça óptica. É importante notar que existem outras hemácias que não estão fluorescendo na imagem. Isso foi feito trazendo as duas hemácias para o foco do laser de Argônio através de movimentos no foco do laser da pinça. Esse fato demonstra que podemos ter total controle sobre qual parte da amostra vamos fazer a imagem com a pinça óptica, um dos objetivos desejados ao integrar as duas técnicas.

A imagem da Figura 73 mostra uma membrana de cebola marcada com quantum dots de CdTe sendo puxada pela pinça óptica.

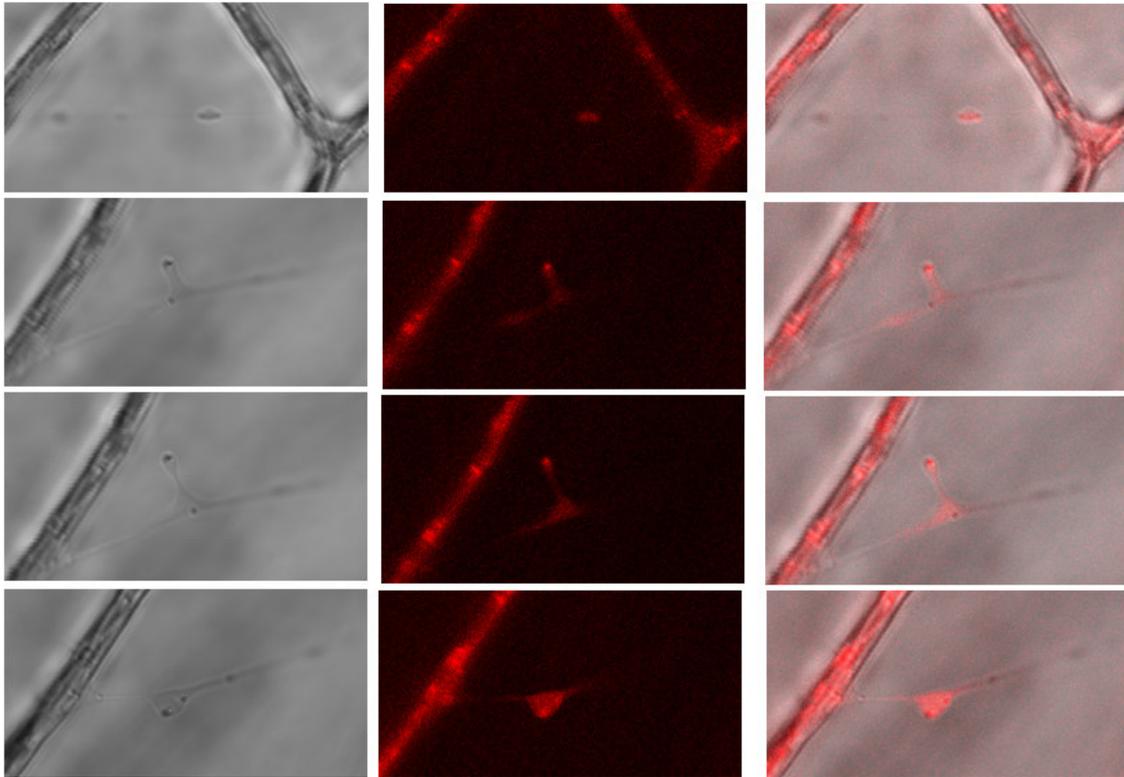
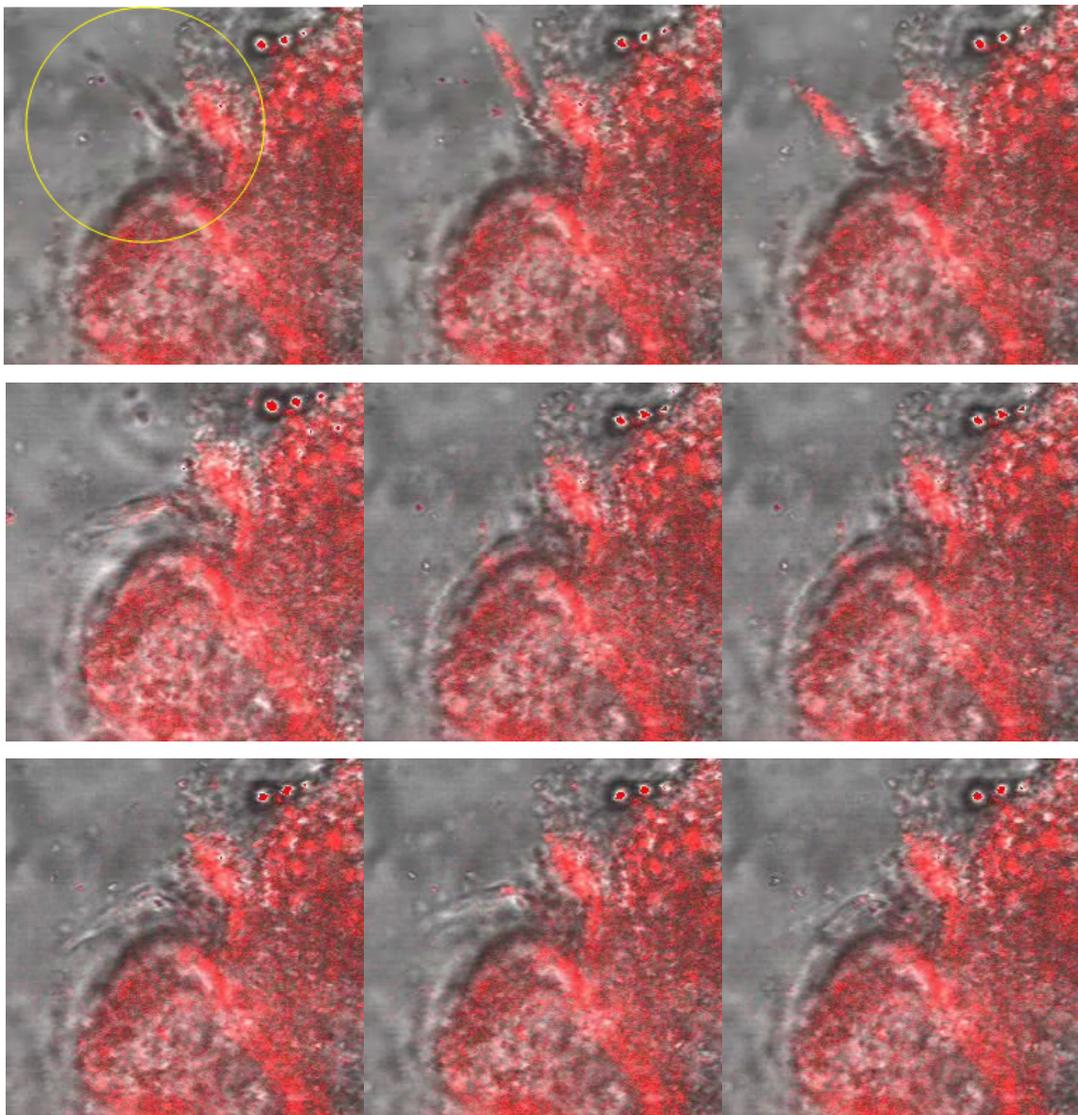


Figura 73 Imagem de transmissão, fluorescência e superposição de uma membrana de célula de cebola sendo puxada pela pinça óptica

A imagem da esquerda é de transmissão, do centro de fluorescência confocal e da esquerda, a superposição das duas. O interesse nesse caso é que podemos causar tensões na membrana com a pinça enquanto adquirimos a imagem de fluorescência e estudar se há alguma mudança no sinal de fluorescência. Como dissemos anteriormente, nossa ferramenta tem que ser capaz de disparar eventos mecânicos ou bioquímicos remotamente, permitidos pelo uso a pinça óptica.

A imagem da última figura mostrará o que o sistema é capaz de realizar envolvendo todas a técnicas. A seqüência de imagens da Figura 74 mostra cenas de um filme adquirido com um quadro a cada 300 ms. As imagens mostram um Trypanosoma Cruzi levado até o intestino do barbeiro pela pinça óptica. O parasita está dentro do circulo amarelo nas imagens. Tanto o intestino do inseto quanto o parasita estão marcados com quantum dots de CdTe. Quando o parasita se gruda no intestino começamos a adquirir as imagens de microscopia confocal “single-

photon". Estudar esse fenômeno é de grande interesse para a biologia, pois o parasita só é capaz de infectar seres humanos após se fixar no intestino do inseto e deixar o animal. Se entendermos as forças envolvidas nesse processo pode-se criar mecanismos que impeçam a fixação do parasita no intestino do animal e a posterior contaminação humana. Nossa ferramenta oferece a possibilidade de estudar esse fenômeno. Com a pinça pode-se manipular o parasita e acelerar o processo de fixação movendo o parasita para perto do intestino, medir a força de adesão, enquanto com a microscopia confocal podemos estudar se há alguma mudança química tanto no parasita quanto no intestino e partir daí determinar quais moléculas são responsáveis pela fixação.



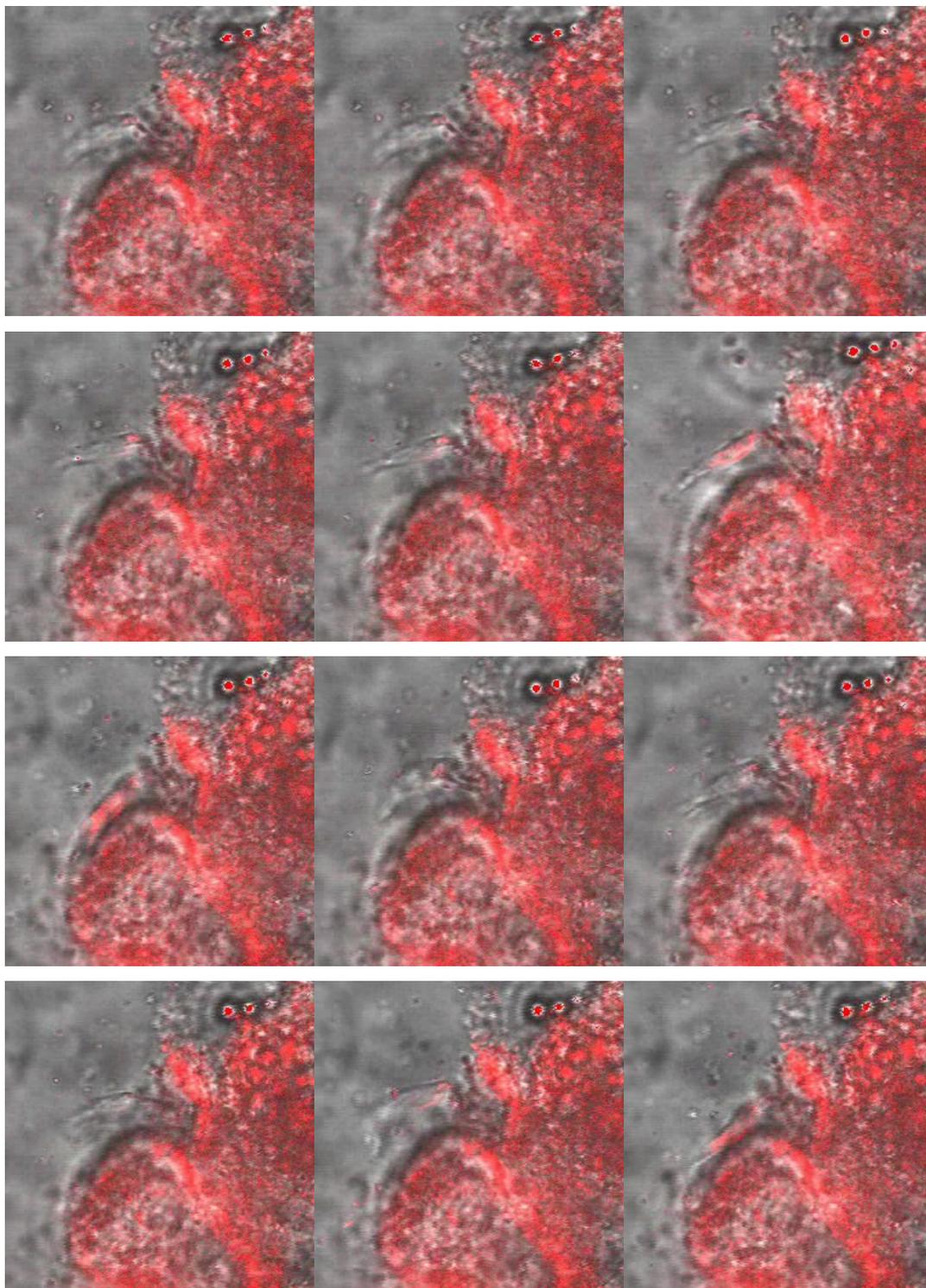


Figura 74 Filme com 300ms por quadro de fluorescência do parasita preso no intestino do barbeiro

Podemos ver nas imagens que o parasita se mexe entrando e saindo de foco conforme sua fluorescência aparece e desaparece. Isso mostra que a aquisição de imagens é rápida o suficiente e fornece uma definição satisfatória para estudar o movimento do parasita praticamente em tempo real.

Capítulo 5

Conclusões e Perspectivas

Como dito na introdução da tese a necessidade de uma ferramenta fotônica integrada capaz de acompanhar processos celulares é crucial para a pesquisa em ciências vida atualmente. Nos propusemos, então, a desenvolver essa ferramenta por partes. As partes que cabem a essa tese foram implantadas com um grande sucesso em apenas um único sistema integrado. O sistema atualmente é capaz de realizar Microscopia Confocal “Single-photon”, Multifóton e SHG. É capaz, também, de fazer manipulações ópticas e fazer medidas de força, elasticidade e adesão de microorganismos. A integração se dá no momento que pode-se utilizar qualquer dessas técnicas, separadas ou em conjunto. Um dos pontos principais dessa dissertação está no capítulo 3, onde mostramos o que é necessário para ter todas essas técnicas funcionando em conjunto. As imagens do capítulo 4 falam por si só. Foram adquiridas uma infinidade de imagens que não puderam ser colocadas nessa tese por questão de espaço, mas estão guardadas em nosso banco de dados. Além disso, vários filmes em tempo real foram também adquiridos, porém, pela limitação da apresentação estática do papel, foram colocados aqui só os mais interessantes em forma de sequência de imagens.

Além de adquirir imagens como uma forma de testar nosso sistema, também foram adquiridas imagens que prontamente ajudam áreas da medicina como a patologia. A delimitação das células de câncer foram bem mais evidentes nas imagens de fluorescência do que na imagem de transmissão.

Os sistema em seu estado atual abre espaço para implementações das técnicas restantes apontadas na introdução. O equipamento necessário para realizar o CARS já está em nosso laboratório pronto para ser incorporado ao sistema integrado. O sistema de FLIM, FRET e FCS já foi comprado e estará chegando no começo de 2008. Com eles será possível medir pH, co-localização de proteínas e tamanho de moléculas, respectivamente. Fora essas técnicas, que ainda precisam ser incorporadas ao sistema, várias medidas feitas na tese abrem possibilidades para trabalhos interessantes. Foram realizadas apenas medidas preliminares da força exercida pelo *Trypanosoma cruzi*. É possível também medir a força de ligação entre o parasita e o intestino do inseto hospedeiro. As microscopias confocais oferecem imagens com resolução da ordem de centenas nanômetros. O sistema integrado já oferece e oferecerá grandes possibilidades dos estudos de processos celulares, os resultados apresentados podem ser considerados, até certo ponto, apenas um relance de todo potencial que o sistema completo poderá oferecer.